DIRECTIVE 2000/33/CE DE LA COMMISSION

du 25 avril 2000

portant vingt-septième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses (*)

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu la directive 67/548/CEE du Conseil du 27 juin 1967 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses [1], modifiée en dernier lieu par la directive 1999/33/CE du Parlement européen et du Conseil [2], et notamment son article 28,

considérant ce qui suit:

(1) L'annexe V de la directive 67/548/CEE définit les méthodes permettant de déterminer les propriétés physico-chimiques, la toxicité et l'écotoxicité des substances et préparations. L'adaptation au progrès technique de cette annexe est nécessaire.

(2) L'article 7, paragraphe 2, de la directive 86/609/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques [3] dispose «qu'il ne sera pas effectué d'expérience s'il existe une possibilité raisonnable et pratique d'avoir recours à une autre méthode scientifiquement acceptable et n'impliquant pas l'utilisation d'un animal pour obtenir le résultat recherché».

(3) La Commission entend introduire à l'annexe V de la directive 67/548/CEE des méthodes d'essais de remplacement qui ne nécessitent pas d'utiliser un animal afin que ces méthodes soient disponibles pour tester les substances chimiques aux termes de l'article 3, paragraphe 1, de la directive 67/548/CEE.

(4) Les mesures prévues par la présente directive sont conformes à l'avis du comité pour l'adaptation au progrès technique des directives visant à l'élimination des entraves techniques aux échanges dans le secteur des substances et préparations dangereuses,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE:

Article premier

Les textes des annexes I et II de la présente directive sont ajoutés à la partie B de l'annexe V de la directive 67/548/CEE.

Article 2

1. Les États membres mettent en vigueur les dispositions législatives, réglementaires et administratives nécessaires pour se conformer à la présente directive au plus tard le 1er octobre 2001. Ils en informent immédiatement la Commission.

Lorsque les États membres adoptent ces dispositions, celles-ci contiennent une référence à la présente directive ou sont accompagnées d'une telle référence lors de leur publication officielle. Les modalités de cette référence sont adoptées par les États membres.

2. Les États membres communiquent à la Commission les principales dispositions législatives de droit national qu'ils adoptent dans le domaine concerné par la présente directive et un tableau de correspondance entre la présente directive et les dispositions nationales adoptées.

Article 3

La présente directive entre en vigueur le troisième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel des Communautés européennes*.

Article 4

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Bruxelles, le 25 avril 2000.

Par la Commission
Margot WALLSTRÖM
Membre de la Commission

(*) Adoptée avant la vingt sixième adaptation.
[1] JO 196 du 16.8.1967, p. 1.
[2] JO L 199 du 30.7.1999, p. 57.
[3] JO L 358 du 18.12.1986, p. 1.

ANNEXE I

«B.40. CORROSION CUTANÉE

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (CEVMA ou ECVAM) du Centre commun de recherche de la Commission européenne a reconnu la validité scientifique de deux essais *in vitro* de corrosivité cutanée, l'essai de résistance électrique transcutanée (RET) sur peau de rat et un essai utilisant un modèle de peau humaine (1) (2) (3). L'étude de validation du CEVMA a montré que les deux essais permettent de faire la distinction de manière fiable entre substances corrosives et non corrosives pour la peau. En outre, le protocole d'essai basé sur un modèle de peau humaine a permis de faire une distinction correcte entre les différents degrés de corrosivité (effet corrosif sévère pour la peau, R35, et effet corrosif pour la peau, R34) (2). La description et le mode opératoire sont présentés pour chacun des deux essais; le choix de l'essai dépend des exigences et préférences de l'utilisateur.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. Définitions

Corrosion cutanée: la survenue de lésions irréversibles de la peau après l'application d'un matériel d'essai.

1.3. Substances de référence

Aucune substance de référence n'est spécifiée, mais voir les points 1.5.3.4 et 1.7.2.3.

1.4. Principe de la méthode d'essai — Essai RET sur peau de rat

Le matériel d'essai est appliqué pour une durée n'excédant pas 24 heures sur la surface épidermique de disques de peau prélevés sur la peau de jeunes rats humainement sacrifiés. Les matières corrosives sont identifiées sur la base de leur capacité de provoquer la perte de l'intégrité du *stratum corneum* normal et de la fonction de barrière, cette perte étant mesurée comme une diminution de la RET de base jusqu'à un niveau situé en dessous d'une valeur seuil (5 kΩ) (4) (5). Les substances irritantes ou non irritantes ne font pas baisser la RET en dessous de ce seuil. Pour les substances tensio-actives et les substances organiques neutres, une étape de fixation d'un colorant peut être incluse dans la procédure d'essai [pour la définition, voir la référence (6)] afin de réduire le nombre de faux positifs obtenus spécifiquement avec ces types de substances chimiques (2) (7).

1.5. Description de la méthode d'essai — Essai RET sur peau de rat

1.5.1. *Animaux*

Il est nécessaire d'utiliser de jeunes (20-23 jours) rats (Wistar ou souche comparable) pour la préparation des disques de peau. Les poils du dos et des flancs sont coupés soigneusement à l'aide d'une tondeuse pour petits animaux. Les animaux sont ensuite nettoyés soigneusement avec un linge humide, la zone tondue étant plongée dans une solution antibiotique (contenant, par exemple, de la streptomycine, de la pénicilline, du chloramphénicol et de l'amphotéricine à des concentrations efficaces pour inhiber la croissance bactérienne). Les animaux sont lavés une nouvelle fois avec des antibiotiques le troisième et le quatrième jour après le premier lavage, et doivent ensuite être utilisés dans un délai de 3 jours (pour la préparation de la peau, les animaux ne doivent pas être âgés de plus de 31 jours).

1.5.2. *Préparation des disques cutanés*

Les animaux sont sacrifiés humainement. On prélève la peau dorsale de chaque animal et on la débarrasse soigneusement du tissu adipeux en excès. La peau est placée sur l'extrémité d'un tube PTFE (polytétrafluoroéthylène) en veillant à ce que la surface épidermique soit en contact avec le tube. Après avoir monté à force un joint torique en caoutchouc sur l'extrémité du tube pour maintenir la peau en place, on coupe le tissu excédentaire. Les dimensions du tube et du joint torique sont indiquées à la figure 1. Le joint torique en caoutchouc est ensuite soigneusement fixé de manière étanche à l'extrémité du tube PTFE à l'aide de vaseline. Le tube est introduit dans une chambre réceptrice contenant une solution de sulfate de magnésium (154 mM) dans lequel il est maintenu par une pince à ressort (figure 2).

1.5.3. *Mode opératoire*

1.5.3.1. Application du matériel d'essai

Des substances d'essai liquides (150 µl) sont appliquées sur la surface épidermique à l'intérieur du tube (figure 2). Pour l'essai de substance solides, une quantité suffisante du solide est appliquée sur le disque de peau pour que la totalité de la surface de l'épiderme soit couverte. Après avoir ajouté de l'eau désionisée (150 µl), on agite le tube doucement. Le contact entre les substances d'essai et la peau doit être maximal. Dans le cas de certains solides, ceci peut être obtenu en chauffant à 30 °C pour dissoudre la substance d'essai ou en la broyant pour obtenir des grains ou une poudre.

On utilise trois disques de peau pour chaque substance d'essai. Celle-ci est appliquée pendant 24 heures (voir aussi le point 1.5.3.4), puis éliminée par lavage avec un jet d'eau courante à 30 °C. L'élimination des substances d'essai qui se sont solidifiées dans le tube peut être facilitée par un lavage avec un jet d'eau tiède à 30 °C.

1.5.3.2. Mesures de la RET

La RET est mesurée à l'aide d'un pont de mesure en courant alternatif basse tension (par exemple AIM 401 ou 6401, ou équivalent). Avant la mesure de la résistance électrique, on réduit la tension de surface de la peau en ajoutant un volume suffisant d'éthanol à 70 % pour couvrir l'épiderme. Après quelques secondes, on enlève l'éthanol en renversant le tube, puis on hydrate le tissu par l'addition de 3 ml d'une solution de sulfate de magnésium (154 mM). Les électrodes du pont de mesure sont placées de part et d'autre du disque cutané pour prendre la mesure de la résistance en kΩ/disque cutané (figure 2). Les dimensions des électrodes et la longueur d'électrode en dessous des pinces crocodiles sont indiquées à la figure 1. La pince maintenant l'électrode intérieure (épaisse) repose sur la partie supérieure du tube PTFE pendant la mesure de la résistance, afin que la longueur d'électrode immergée dans la solution de sulfate de magnésium reste constante. L'électrode extérieure (fine) est introduite dans la chambre réceptrice de telle manière qu'elle repose sur le fond de celle-ci. La distance entre la partie inférieure de la pince à ressort et la partie inférieure du tube PTFE est maintenue constante (figure 1), cette distance influençant la valeur de résistance obtenue.

Il convient de noter que si la valeur de résistance mesurée est supérieure à 20 kΩ, ceci peut être dû au fait que de la substance d'essai recouvre la surface épidérmique du disque de peau. On peut essayer d'y remédier, par exemple en fermant de façon étanche le tube PTFE avec le pouce revêtu d'un gant et en l'agitant pendant 10 secondes environ; on élimine ensuite la solution de sulfate de magnésium et on répète la mesure de la résistance avec une nouvelle solution de sulfate de magnésium.

Les valeurs moyennes de la RET sont acceptées à condition que les valeurs des contrôles positifs et négatifs effectués parallèlement se situent dans les fourchettes acceptables pour la méthode. Les substances de contrôle proposées et leur fourchette acceptable pour la méthodologie et l'appareillage décrits sont les suivantes:

Contrôle	Substance	Résistance (kΩ)
Positif	10 M acide chlorhydrique (36 %)	0,5-1,0
Négatif	Eau distillée	10-25

1.5.3.3. Mode opératoire modifié pour substances tensio-actives et substances organiques neutres

Si les valeurs RET de substances d'essai qui sont des substances tensio-actives ou des substances organiques neutres sont inférieures ou égales à 5 kΩ, on peut évaluer la pénétration d'un colorant dans les tissus. Cette procédure déterminera si les résultats sont des faux positifs (2).

1.5.3.3.1. Application et élimination du colorant sulforhodamine B

Après traitement initial avec la substance d'essai, 150 µl d'une dilution à 10 % (p/v) de sulforhodamine B dans de l'eau distillée sont appliqués sur la surface épidermique de chaque disque de peau pendant 2 heures. Les disques de peau sont lavés ensuite avec un jet d'eau courante à la température ambiante pendant environ 10 secondes pour éliminer le colorant excédentaire/non fixé. Chaque disque de peau est soigneusement enlevé du tube PTFE et placé dans un flacon (par exemple un flacon à scintillation en verre de 20 ml) contenant de l'eau désionisée (8 ml). Les flacons sont agités doucement pendant 5 minutes pour éliminer complètement tout colorant excédentaire/non fixé. Après avoir répété cette opération de rinçage, on enlève les disques de peau et on les place dans des flacons contenant 5 ml de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 30 % (p/v) dans de l'eau distillée, puis on les incube pendant une nuit à 60 °C. Après incubation, chaque disque de peau est enlevé et jeté et la solution restante est centrifugée pendant 8 minutes à 21 °C (force centrifuge relative ~ 175). Un échantillon de 1 ml de surnageant est ensuite dilué dans un rapport de 1 à 5 (v/v) [soit 1 ml + 4 ml] avec du SDS à 30 % (p/v) dans de l'eau distillée. La densité optique (DO) de la solution est mesurée à environ 565 nm.

1.5.3.3.2. Calcul de la teneur en colorant

La teneur de chaque disque en sulforhodamine B est calculée sur la base des valeurs de DO (coefficient d'extinction molaire de la sulforhodamine B à 565 nm = $8{,}7 \times 10^4$; poids moléculaire = 580). La teneur en sulforhodamine B est déterminée pour chaque disque de peau et on calcule ensuite une teneur moyenne en colorant pour les essais répétés. Les valeurs moyennes de la fixation du colorant sont acceptées à condition que les valeurs des contrôles effectués parallèlement se situent dans la fourchette acceptable pour la méthode. Les fourchettes acceptables de teneur en colorant pour les substances de contrôle proposées pour la méthodologie et l'appareillage décrits sont les suivantes:

Contrôle	Substance	Résistance (µg/disque)
Positif	10 M acide chorhydrique (36 %)	40-100
Négatif	Eau distillée	15-35

1.5.3.4. Informations complémentaires

Les substances d'essai peuvent aussi être appliquées sur les disques cutanés pendant des durées plus courtes (2 heures, par exemple) pour identifier les substances fortement corrosives. Cependant, dans l'étude de validation, on a constaté que l'essai RET surestimait le potentiel corrosif de plusieurs substances chimiques après leur application pendant 2 heures (2), alors qu'il assurait une identification correcte des substances corrosives et non corrosives après une application de 24 heures.

Les propriétés et les dimensions de l'appareillage et le mode opératoire utilisés peuvent influencer les valeurs de la RET obtenues. Le seuil de corrosivité a été fixé à 5 kΩ sur la base de données obtenues avec l'appareillage et le mode opératoire spécifiques décrits dans cette méthode. Des valeurs de seuil et de contrôle différentes seront éventuellement nécessaires en cas de changement important des conditions d'essai. Par conséquent, il est recommandé d'étalonner la méthodologie et la valeur seuil de résistance en testant une série de substances standard de reférence choisies parmi les substances chimiques utilisées dans l'étude de validation (3).

1.6. **Principe de la méthode d'essai — Essai sur modèle de peau humaine**

Le matériel d'essai est appliqué localement pendant 4 heures sur un modèle tridimensionnel de peau humaine comprenant un épiderme reconstitué avec un *stratum corneum* fonctionnel. Les matières corrosives sont identifiées sur la base de leur aptitude à réduire la viabilité cellulaire [déterminée, par exemple, à l'aide de l'essai de réduction du MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl) tetrazolium bromide] en dessous de valeurs seuils définies pour des périodes d'exposition déterminées. Le principe de l'essai concorde avec l'hypothèse selon laquelle les substances chimiques corrosives sont capables de pénétrer dans le *stratum corneum* (par diffusion ou érosion) et sont suffisamment cytotoxiques pour provoquer la mort cellulaire dans les couches cellulaires sous-jacentes.

1.7. **Description de la méthode d'essai — Essai sur modèle de peau humaine**

1.7.1. *Modèles de peau humaine*

Les modèles de peau humaine peuvent provenir de diverses sources mais doivent remplir certains critères. Le modèle doit avoir un *stratum corneum* fonctionnel avec une couche sous-jacente de cellules vivantes. La fonction de barrière du *stratum corneum* doit être suffisante, ce qui peut être mis en évidence en démontrant la résistance du modèle à la cytotoxicité après l'application de substances connues pour leur cytotoxicité cellulaire mais qui ne traversent normalement pas le *stratum corneum*. Le modèle doit donner des résultats reproductibles dans des conditions expérimentales définies.

La viabilité des cellules vivantes dans le modèle doit être suffisante pour qu'il soit possible de faire la distinction entre les substances de contrôle positives et négatives. La viabilité cellulaire (par exemple, mesurée par le niveau de réduction du MTT, c'est-à-dire une valeur de DO) après l'exposition à la substance de contrôle négative doit se situer dans des limites acceptables pour le modèle en question. De même, les valeurs de viabilité cellulaire avec la substance de contrôle positive (par rapport à celles du contrôle négatif) doivent se situer dans des limites déterminées. Le plus important est que le modèle prédictif utilisé doit être conforme aux normes de validation internationales (2).

1.7.2. *Mode opératoire*

1.7.2.1. Application du matériel d'essai

Pour les substances liquides, il faut appliquer une quantité suffisante de substance d'essai pour couvrir la surface cutanée (25 µl/cm^2 au minimum). Pour les substances solides, il faut appliquer une quantité suffisante de substance d'essai pour couvrir la peau et ensuite l'humidifier pour assurer un bon contact avec la peau; si nécessaire, les substances solides doivent être réduites en poudre avant leur application. La méthode d'application doit convenir à un large éventail de substances chimiques (2). À la fin de la période d'exposition, le matériel d'essai doit être enlevé soigneusement de la surface cutanée avec une solution saline.

1.7.2.2. Mesures de la viabilité cellulaire

La viabilité des cellules peut être mesurée à l'aide de toute méthode quantitative validée. La méthode la plus fréquemment utilisée est la réduction du MTT, dont on a constaté l'exactitude et la reproductibilité des résultats dans différents laboratoires (2). Le disque de peau est placé dans une solution de MTT de 0,3 mg/ml à 20-28 °C pendant 3 heures. Après extraction du précipité bleu de formazan (extraction par solvant), on mesure la concentration de formazan en déterminant la DO à une longueur d'onde de 545 à 595 nm.

1.7.2.3. Informations complémentaires

Le modèle de peau utilisé ainsi que le protocole exact de la durée d'exposition et des procédures de lavage, etc. auront une grande influence sur les résultats des mesures de la viabilité cellulaire. Il est recommandé d'étalonner la méthodologie et le modèle prédictif en testant une série de substances standard de référence choisies parmi les substances chimiques utilisées dans l'étude de validation du CEVMA ou ECVAM (3). Il est essentiel de démontrer que la méthode utilisée est reproductible dans un même laboratoire et entre laboratoires pour un large éventail de substances chimiques, conformément aux normes internationales. La méthode doit au moins satisfaire aux critères de validité scientifique définis précédemment (2) et les résultats de cette étude de validation doivent être publiés dans une revue scientifique faisant appel à l'évaluation par des experts (*peer-reviewed*).

2. DONNÉES

2.1. Traitement des résultats

2.1.1. *Essai de RET sur peau de rat*

Les valeurs de résistance (kΩ) pour le matériel d'essai, les contrôles positifs et négatifs ainsi que toute substance chimique standard de référence sont présentées sous forme de tableau, y compris les données des essais répétés/répliqués, les valeurs moyennes et la classification qui en découle.

2.1.2. *Essai sur modèle de peau humaine*

Les valeurs de DO et les pourcentages calculés de viabilité cellulaire pour le matériel d'essai, les contrôles positifs et négatifs ainsi que toute substance chimique standard de référence sont présentés sous forme de tableau, y compris les données des essais répétés, les valeurs moyennes et la classification qui en est déduite.

2.2. Évaluation et interprétation des résultats

2.2.1. *Essai de RET sur peau de rat*

Si la valeur moyenne de la RET obtenue pour la substance d'essai est supérieure à 5 kΩ, cette substance n'est pas corrosive. Si la valeur RET est inférieure ou égale à 5 kΩ et la substance d'essai n'est pas une substance tensio-active ou une substance organique neutre, cette substance est corrosive.

Dans le cas des substances tensio-actives ou des substances organiques neutres dont la valeur de la RET est inférieure ou égale à 5 kΩ, on peut évaluer la pénétration d'un colorant. Si la teneur moyenne en colorant du disque est supérieure ou égale à la teneur moyenne en colorant du disque du contrôle positif (HCl à 36 %) obtenue parallèlement, la substance d'essai est un vrai positif et est donc corrosive. Si la teneur moyenne en colorant du disque est inférieure à la teneur moyenne en colorant du disque du contrôle positif (HCl à 36 %) obtenue parallèlement, la substance d'essai est un faux positif et donc non corrosive.

2.2.2. *Essai sur modèle de peau humaine*

La valeur de la DO du contrôle négatif représente une viabilité cellulaire de 100 %; par conséquent, la valeur de la DO obtenue pour chaque échantillon d'essai peut être utilisée pour calculer un pourcentage de viabilité par rapport au contrôle négatif. La valeur seuil du pourcentage de viabilité cellulaire qui établit la distinction entre les matières corrosives et les matières non corrosives (ou entre différentes classes de substances corrosives) doit être clairement définie dans le modèle prédictif avant la validation de la méthode et l'étude de validation doit ensuite montrer que la valeur seuil est appropriée (2).

3. RAPPORTS

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir au moins les informations suivantes:

Substance d'essai:

— données d'identification, nature physique et, si nécessaire, propriétés physicochimiques. Le cas échéant, des informations analogues doivent être fournies pour les substances de référence.

Conditions d'essai:

— détails du mode opératoire,

— description et justification de toute modification.

Résultats:

— présentation sous forme de tableau des valeurs des résistances (essai de RET) ou des pourcentages de viabilité cellulaire (essai sur modèle de peau humaine) pour le matériel d'essai, les contrôles positifs et négatifs ainsi que toute substance chimique standard de référence, y compris les données des essais répétés/répliqués et les valeurs moyennes,

— description de tout autre effet observé.

Discussion des résultats

Conclusions

4. **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

(1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, *ATLA* 26, S. 275-280.

(2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, S. 483-524.

(3) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, *Toxicology in Vitro* 12, p. 471-482.

(4) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986), An *in vitro* skin corrosivity test — modifications and validation, *Food & Chemical Toxicology* 24, p. 507-512.

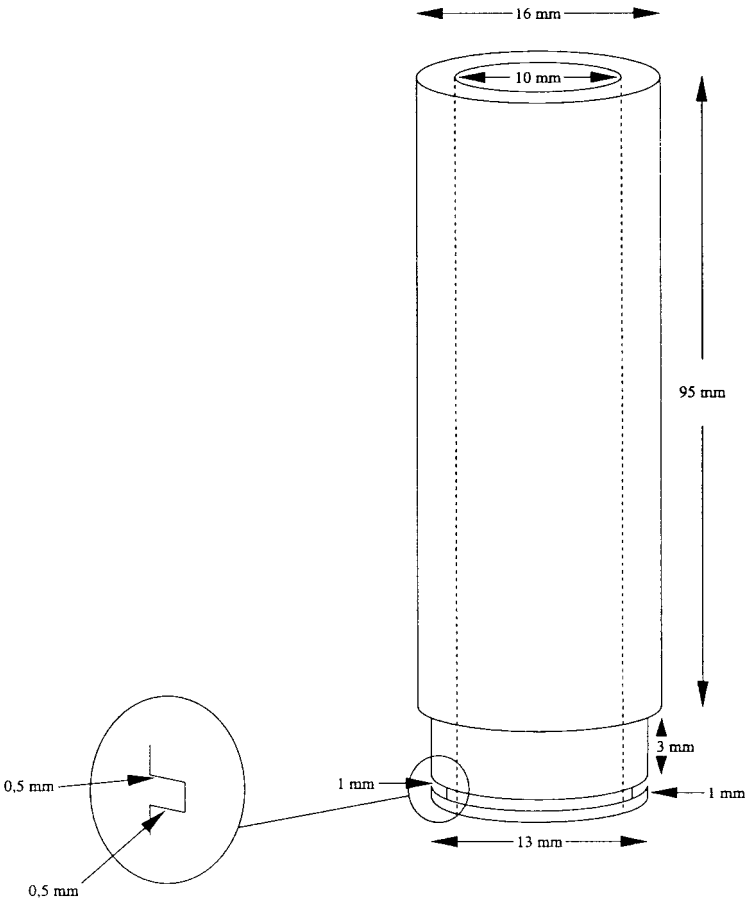
(5) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial, *Toxicology in Vitro* 6, p. 191-194.

(6) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998), An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, *ATLA* 26, p. 709-720.

(7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6, *ATLA* 23, p. 219-255.

Figure 1

Dimensions du tube PTFE



Dimensions des électrodes

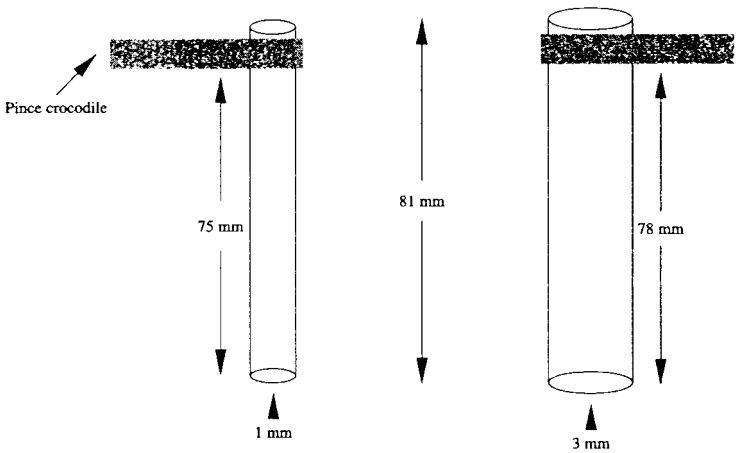
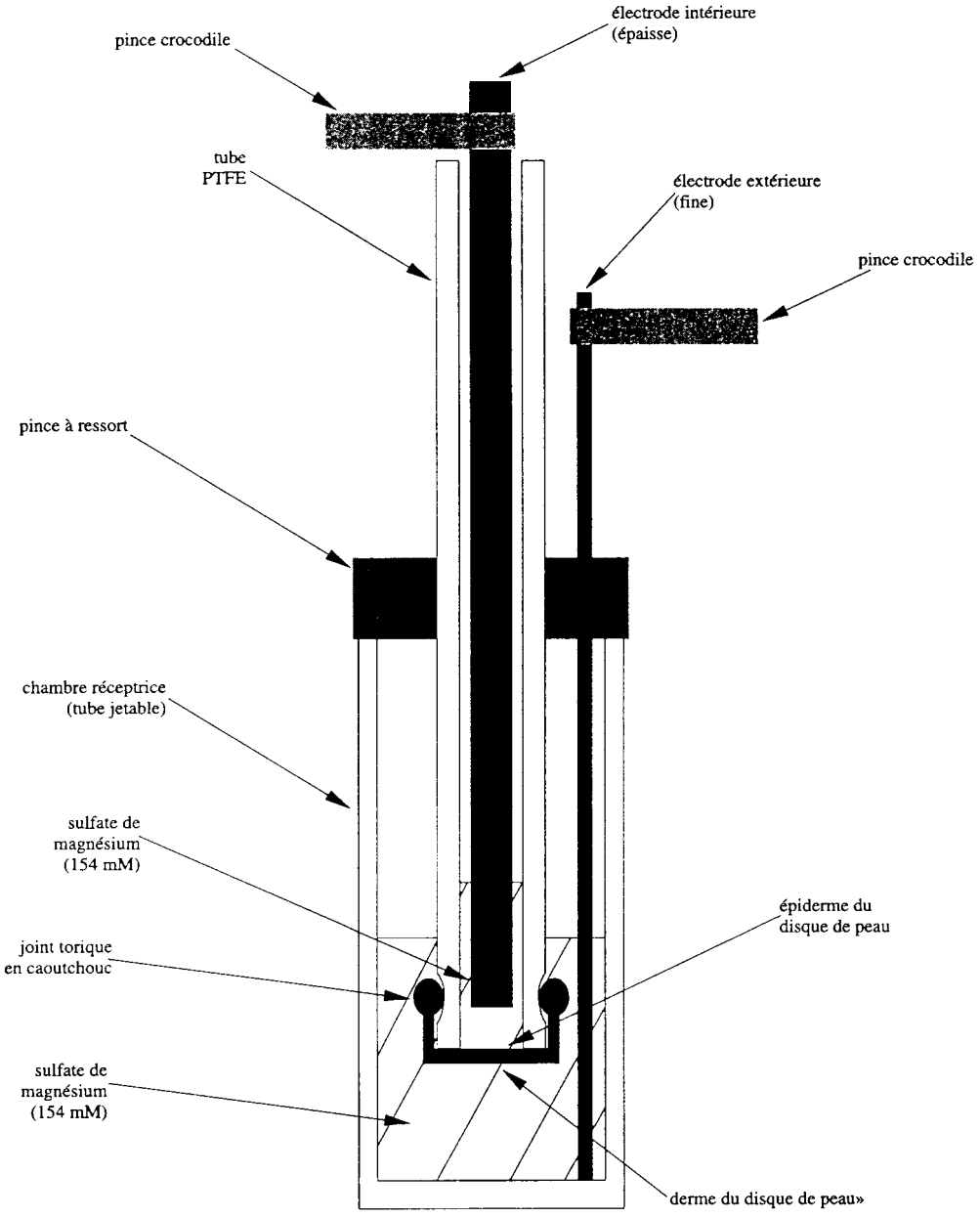


Figure 2

Appareillage pour l'essai RET sur peau de rat



ANNEXE II

«B.41. PHOTOTOXICITÉ — ESSAI DE PHOTOTOXICITÉ *IN VITRO* 3T3 NRU

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

La phototoxicité est définie comme une réaction toxique déclenchée par une première exposition de la peau à certains produits chimiques, suivie d'une exposition à la lumière, ou bien par l'irradiation de la peau après administration d'un produit chimique par voie systémique.

Les informations fournies par le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU permettent de déterminer le potentiel phototoxique d'une substance d'essai, c'est-à-dire les dangers qu'elle est susceptible de présenter (ou son absence de dangers) en cas d'exposition au rayonnement UV et à la lumière visible.

Dans la mesure où la finalité toxicologique du test *in vitro* est de déterminer la photocytotoxicité induite par l'action combinée d'un produit chimique et de la lumière, les composés qui se révèlent phototoxiques *in vivo* après administration systémique et diffusion dans la peau, ainsi que les composés qui ont une action photo-irritante après application topique sur la peau peuvent être détectés par ce test.

Le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU a été élaboré et validé dans le cadre d'un projet conjoint UE/COLIPA entre 1992 et 1997 (1) (2) (3), visant à trouver une méthode *in vitro* valable pour remplacer les divers tests *in vivo* utilisés. En 1996, l'OCDE avait recommandé, à l'issue d'un groupe de travail, une approche séquentielle *in vitro* pour l'évaluation de la toxicité (4).

Les résultats du test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU ont été comparés aux effets de phototoxicité/photo-irritation aiguë *in vivo* chez les animaux et chez les humains, et le test s'est révélé extrêmement fiable pour la prévision de ces effets. Le test 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 photocancérogénicité, mais de nombreux produits chimiques qui possèdent des propriétés spécifiques donneront des résultats positifs au test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU. Par ailleurs, le test ne permet pas non plus d'évaluer le pouvoir phototoxique.

L'appendice propose une approche séquentielle pour les essais visant à déterminer la phototoxicité des produits chimiques.

1.2. Définitions

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

Dose de lumière: la 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.

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

Modèle prédictif: algorithme utilisé pour transformer les résultats d'un test de toxicité en une prévision du potentiel toxique. Dans les présentes lignes directrices d'essai, le PIF et le MPE peuvent être utilisés pour transformer les résultats du test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU en une prévision du potentiel phototoxique.

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

MPE (Mean Photo Effect — Photo-effet moyen): nouvelle mesure dérivée d'une analyse mathématique du tracé complet de deux courbes concentration-réponse obtenues avec (+ UV) ou sans (− UV) 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.

Photo-irritation: terme désignant une sous-catégorie de "phototoxicité", utilisé pour décrire uniquement les réactions phototoxiques qui se manifestent au niveau de la peau après exposition (par voie topique ou orale) à des produits chimiques. Ces réactions phototoxiques entraînent toujours des dommages cellulaires non spécifiques (réactions de type coup de soleil).

Photo-allergie: réactivité immunologique acquise qui ne se manifeste pas lors de la première exposition à la lumière et au produit chimique et nécessite une période d'induction d'une ou de deux semaines avant que la réactivité cutanée puisse être mise en évidence.

Photogénotoxicité: réaction génotoxique observée pour un paramètre génétique, qui apparaît après exposition des cellules à une dose non génotoxique de lumière UV/visible et à un produit chimique non génotoxique.

Photocancérogénicité: cancérogénicité induite par une exposition répétée à la lumière et à un produit chimique. Le terme "photococancérogénicité" s'emploie lorsque l'effet tumorigène induit par les UV est accentué par l'exposition à un produit chimique.

1.3. Substances de référence

Outre la substance chimique chlorpromazine servant de témoin positif qui doit être testée concurremment dans chaque cas, il est recommandé d'utiliser comme substances de référence pour le test de phototoxicité 3T3 NRU un sous-ensemble des produits chimiques utilisés pour ce test lors des essais interlaboratoires (1) (3) (13).

1.4. Remarques initiales

Des effets phototoxiques ont été signalés pour de nombreux types de produits chimiques (5) (6) (7) (8). Le seul point commun entre ces derniers est leur capacité à absorber l'énergie lumineuse dans le domaine de la lumière solaire. D'après la première loi de photochimie (loi de Grotthaus-Draper) la photoréaction nécessite l'absorption d'un nombre suffisant de quanta de lumière. Aussi convient-il, avant d'envisager un essai biologique selon les présentes lignes directrices, de déterminer le spectre d'absorption UV/lumière visible du produit chimique à tester (par exemple, suivant les lignes directrices d'essai 101 de l'OCDE). Si le coefficient d'extinction/d'absorbance molaire est inférieur à 10 litre × mol^{-1} × cm^{-1}, le produit chimique n'a pas de potentiel photoréactif et il est inutile de le soumettre au test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU ou à tout autre test biologique visant à détecter des effets photochimiques indésirables (appendice).

1.5. Principe de la méthode d'essai

Quatre mécanismes ont été mis en évidence pour expliquer comment l'absorption de lumière par un chromophore (chimique) peut entraîner une réaction phototoxique (7). Tous ces mécanismes entraînent des dommages cellulaires. Par conséquent, le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU repose sur la comparaison de la cytotoxicité d'un produit chimique avec et sans exposition à une dose non cytotoxique d'UVA/lumière visible. Dans ce test, la cytotoxicité est exprimée comme la diminution, en fonction de la concentration, de la fixation du colorant vital rouge neutre [Neutral Red — NR (9)] 24 heures après traitement par le produit chimique à tester et irradiation.

Des cellules Balb/c 3T3 sont maintenues en culture pendant 24 h jusqu'à obtention de monocouches. Pour chaque produit chimique à tester, deux plaques à 96 puits sont alors préincubées pendant 1 h avec huit concentrations distinctes du produit chimique. Ensuite, l'une des deux plaques est exposée à une dose d'UVA/lumière visible non cytotoxique de 5 J/cm^2 UVA (expérience +UV), tandis que l'autre plaque est maintenue à l'obscurité (expérience −UV). 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 h, la viabilité cellulaire est déterminée par le test de fixation du rouge neutre (Neutral Red Uptake — NRU) pendant 3 h. La viabilité cellulaire relative, exprimée sous forme d'un pourcentage des témoins négatifs non traités, est calculée pour chacune des huit concentrations d'essai. Afin de prévoir le potentiel phototoxique, les réponses aux concentrations obtenues en présence (+UV) et en absence (−UV) d'irradiation sont comparées, généralement au niveau EC_{50}, c'est-à-dire la concentration inhibant la viabilité cellulaire de 50 % par rapport aux témoins non traités.

1.6. Critères de qualité

Sensibilité des cellules aux UVA, données historiques: la sensibilité des cellules aux UVA doit être régulièrement contrôlée. Les cellules sont mises en culture à la densité utilisée dans le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU; elles sont irradiées le jour suivant par des doses d'UVA allant de 1 à 9 J/cm^2, et la viabilité cellulaire est déterminée un jour plus tard à l'aide du test NRU. Les cellules répondent aux critères de qualité si leur viabilité après irradiation par 5 J/cm^2 UVA est supérieure ou égale à 80 % de la viabilité des témoins maintenus à l'obscurité. À la dose la plus forte de 9 J/cm^2 UVA, la viabilité doit être au moins égale à 50 % de celle des témoins conservés à l'obscurité. Ce contrôle doit être répété tous les 10 passages de cellules environ.

Sensibilité aux UVA des cellules constituant les témoins négatifs, dans le test en cours: le test répond aux critères de qualité si les témoins négatifs [cellules dans une solution saline équilibrée de Earl — Earl's Balanced Salt Solution (EBSS)] avec ou sans 1 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) ou 1 % d'éthanol (EtOH) dans l'expérience +UVA ont une viabilité supérieure ou égale à 80 % de celle des cellules non irradiées dans le même solvant dans l'expérience menée en parallèle dans l'obscurité (−UVA).

Viabilité des témoins négatifs: la densité optique absolue ($OD_{540\ NRU}$), mesurée dans l'extrait NR des témoins négatifs 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 d'essai. Un test répond aux critères d'acceptation si la densité optique moyenne $OD_{540\ NRU}$ des témoins non traités est ≥ 0,2.

Témoin positif: pour chaque test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU réalisé, un produit chimique phototoxique connu doit être testé concurremment. La chlorpromazine (CPZ) a été utilisée comme témoin positif dans l'étude de validation UE/COLIPA et est donc recommandée. Dans le cas de la CPZ testée selon le protocole standard dans le test *in vitro* 3T3 NRU, les critères d'acceptation suivants ont été définis: CPZ irradiée (+UVA): EC_{50} = 0,1 à 2,0 µg/ml, CPZ non irradiée (−UVA): EC_{50} = 7,0 à 90,0 µg/ml. Le facteur de photo-irritation (PIF), c'est-à-dire la variation de l'EC_{50} doit être d'au moins 6.

À la place de la CPZ, d'autres produits chimiques phototoxiques connus, convenant à la classe chimique ou aux caractéristiques de solubilité du produit chimique à tester, peuvent aussi être utilisés en tant que témoins positifs parallèles. Dans ce cas, en fonction des données historiques, les intervalles de valeurs de la EC_{50} et le PIF ou le MPE (Mean Photo Effect — photo-effet moyen) doivent être correctement définis en tant que critères d'acceptation du test.

1.7. Description de la méthode d'essai

1.7.1. *Préparations*

1.7.1.1. Cellules

Une lignée permanente de cellules de fibroblaste de souris — Balb/c 3T3, clone 31 — provenant de ATCC (American Type Culture Collection) ou de ECACC (European Collection of Cell Cultures) a été utilisée dans l'étude de validation et est donc recommandée. 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.

Les cellules doivent être régulièrement controlées pour vérifier l'absence de contamination par des mycoplasmes, et ne doivent être utilisées que si les résultats du contrôle sont satisfaisants.

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. Il importe de contrôler régulièrement la sensibilité aux UVA des cellules Balb/c 3T3 selon la procédure de contrôle de la qualité décrite dans les présentes lignes directrices.

1.7.1.2. Milieux et conditions de culture

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. Pour les cellules Balb/c 3T3, le milieu de culture est du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) enrichi avec 10% de sérum de veau nouveau-né, 4 mM de glutamine, de pénicilline et de streptomycine, et incubé à 37 °C en atmosphère humidifiée/7,5% CO_2. Il est particulièrement important que les conditions de culture cellulaire permettent de maintenir la durée du cycle cellulaire dans les limites normales pour les cellules ou la lignée cellulaire utilisées.

1.7.1.3. Préparation des cultures

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.

Pour le test de phototoxicité, le milieu de culture est ensemencé 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 h 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.

Pour chaque produit chimique testé, les cellules sont mises en culture de manière identique sur deux plaques à 96 puits distinctes, qui sont utilisées en même temps pendant toute la procédure d'essai, dans les mêmes conditions de culture, sauf pendant la période où l'une des plaques est irradiée (+UVA/lumière visible) et l'autre maintenue à l'obscurité (−UVA/lumière visible).

1.7.1.4. Activation métabolique

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 connaît pas jusqu'à présent de produit chimique qui nécessite 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 test en présence d'un système d'activation métabolique.

1.7.1.5. Produit chimique à tester/Préparation

Les produits chimiques à tester doivent être fraîchement préparés juste avant utilisation, à moins que les données de stabilité ne démontrent qu'ils sont conservables. Une préparation en lumière rouge peut s'avérer nécessaire lorsqu'une photodégradation rapide est probable.

Les produits chimiques à tester doivent être dissous dans des solutions salines tamponnées, par exemple, solution saline équilibrée de Earl (Earl's Balanced Salt Solution — EBSS) ou solution saline tamponnée au phosphate (Phosphate Buffered Saline — PBS), qui doivent être exemptes de constituants protéiques et d'indicateurs pH colorés qui absorbent la lumière, afin d'éviter les interférences lors de l'irradiation.

Les produits chimiques ayant une solubilité limitée dans l'eau doivent être dissous dans des solvants appropriés à 100 fois la concentration finale souhaitée, puis dilués à raison de 1:100 avec la solution saline tamponnée. Si un solvant est utilisé, il doit être présent au volume constant de 1 % (v/v) dans toutes les cultures, c'est-à-dire dans les témoins négatifs et dans toutes les concentrations du produit chimique à tester.

Les solvants recommandés sont le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'éthanol (EtOH). D'autres solvants de faible cytotoxicité (par exemple, l'acétone) peuvent convenir, mais leurs propriétés spécifiques doivent être évaluées avec soin, notamment les possibilités de réaction avec le produit chimique à tester, l'atténuation de l'effet phototoxique, ou les propriétés de fixation des radicaux.

Si nécessaire, on pourra recourir à un mélangeur Vortex et/ou à la sonication et/ou à un chauffage à 37 °C pour faciliter la solubilisation.

1.7.1.6. Irradiation UV/Préparation

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 une photosensibilisation (7) (10), tandis que les UVB sont moins importants de ce point de vue, étant directement très cytotoxiques avec une cytotoxicité qui augmente d'un facteur 1 000 entre 313 et 280 nm (11). 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 le produit chimique à tester et que la dose de lumière (pouvant être obtenue dans un délai raisonnable) soit suffisante pour détecter les substances photosensibilisantes connues. En outre, les longueurs d'onde et les doses employées ne doivent pas trop endommager le système d'essai, notamment en ce qui concerne l'émission de chaleur (domaine infrarouge).

La lumière solaire simulée par les simulateurs solaires est considérée comme la source de lumière optimale. Les simulateurs solaires utilisent des arcs au xénon ainsi que des arcs au mercure (dopé) ou des arcs aux halogénures de métaux. Ces derniers ont l'avantage d'émettre moins de chaleur et d'être moins chers, mais ils ne reproduisent pas parfaitement la lumière solaire. 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.

Pour l'essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU, il convient d'utiliser un spectre d'irradiance pratiquement exempt d'UVB (UVA:UVB ∼ 1:20). 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, a été publié (3).

Dosimétrie: l'intensité de lumière (irradiance) doit être régulièrement contrôlée avant chaque test de phototoxicité à l'aide d'un radiomètre UV à large bande approprié qui doit avoir été étalonné en fonction de la source. La performance du radiomètre UV doit être contrôlée. 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 filtrée et pour vérifier l'étalonnage du radiomètre UV à large bande, mais l'utilisation de tels instruments exige des opérateurs dûment qualifiés.

L'étude de validation a établi qu'une dose de 5 J/cm^2 (UVA) était non cytotoxique pour les cellules Balb/c 3T3 et suffisamment puissante pour exciter même les produits chimiques faiblement phototoxiques. Pour obtenir 5 J/cm^2 dans un délai de 50 min, l'irradiance doit être réglée à 1,666 mW/cm^2. 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'UVA 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:

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

1.7.2. *Conditions d'essai*

La concentration maximale du produit chimique à tester ne doit pas dépasser 100 µg/ml, puisque tous les produits chimiques phototoxiques ont été détectés à des concentrations plus faibles, et qu'à des concentrations plus élevées, l'incidence des faux positifs augmente (surprédiction) (13). Le pH de la plus forte concentration du produit chimique à tester doit être satisfaisant (pH entre 6,5 et 7,8).

Les plages de concentrations du produit chimique testé en présence (+UVA) et en absence (–UVA) de lumière doivent être déterminées de manière adéquate lors d'expériences préalables. La plage et les intervalles d'une série de concentrations doivent être ajustées de telle façon que les courbes concentration-réponse soient suffisamment confirmées par les données expérimentales. Il convient de recourir à une progression géométrique des concentrations (avec un facteur de dilution constant).

1.7.3. *Mode opératoire* ([1])

1.7.3.1. Premier jour

Préparer une suspension cellulaire de 1×10^5 cellules/ml dans le milieu de culture, et verser 100 µl de milieu de culture seul dans les puits périphériques d'une plaque de microtitrage à 96 puits (= essais à blanc). Dans les puits restants, verser 100 µl de la suspension cellulaire de 1×10^5 cellules/ml (= 1×10^4 cellules/puits). Pour chaque produit chimique à tester, préparer deux plaques: une pour la détermination de la cytotoxicité (–UVA) et l'autre, pour la détermination de la phototoxicité (+UVA).

Incuber les cellules pendant 24 h (7,5% CO_2, 37 °C) jusqu'à obtention d'une monocouche semi-confluente. Cette période d'incubation permet la récupération et l'adhérence des cellules, et leur croissance exponentielle.

1.7.3.2. Deuxième jour

Après incubation, décanter le milieu de culture pour séparer les cellules et laver deux fois avec 150 µl de EBSS/PBS par puits. Ajouter 100 µl de EBSS/PBS contenant la concentration appropriée du produit chimique à tester ou uniquement du solvant (témoin négatif). Appliquer 8 concentrations distinctes du produit chimique à tester. Incuber les cellules avec le produit chimique à tester dans l'obscurité pendant 60 minutes (7,5% CO_2, 37 °C).

Pour réaliser la partie (+UVA) de l'essai, irradier les cellules à température ambiante pendant 50 minutes à travers le couvercle de la plaque à 96 puits par une dose d'UVA de 1,7 mW/cm^2 (= 5 J/cm^2). Ventiler avec un ventilateur pour éviter la condensation d'H_2O sous le couvercle. Conserver les plaques répliques (–UVA) à température ambiante dans une boîte sombre pendant 50 min (= durée de l'exposition aux UVA).

Décanter la solution d'essai et laver deux fois avec 150 µl de EBSS/PBS. Remplacer le EBSS/PBS par le milieu de culture et incuber (7,5% CO_2, 37 °C) jusqu'au lendemain (18-22 h).

1.7.3.3. Troisième jour

Évaluation microscopique

Examiner les cellules au microscope à contraste de phase. Noter les changements morphologiques des cellules dus aux effets cytotoxiques du produit chimique testé. Ce contrôle est recommandé pour exclure les erreurs expérimentales, mais les observations ne sont pas utilisées pour l'évaluation de la cytotoxicité ou de la phototoxicité.

Test de fixation du rouge neutre

Laver les cellules avec 150 µl de EBSS/PBS préchauffé. Éliminer la solution de lavage en tapotant légèrement. Ajouter 100 µl de milieu NR et incuber à 37 °C en atmosphère humidifiée/7,5% CO_2, pendant 3 h.

Après incubation, éliminer le milieu NR et laver les cellules avec 150 µl de EBSS/PBS. Décanter et absorber complètement le EBSS/PBS (facultatif: centrifuger la plaque retournée).

Ajouter exactement 150 µl de solution de désorption du NR (solution d'éthanol/acide acétique fraîchement préparé).

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

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 approprié (par exemple, ASCII) en vue d'une analyse ultérieure.

([1]) Des détails supplémentaires sont donnés par la référence (12).

2. DONNÉES

2.1. Qualité et quantité des données

Les données doivent permettre une analyse significative des courbes concentration-réponse obtenues avec et sans irradiation UVA/lumière visible. 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. Étant donné qu'un produit chimique peut ne pas être cytotoxique jusqu'à la concentration limite définie de 100 µg/ml dans l'expérience à l'obscurité (– UVA), mais être très cytotoxique lorsqu'il est irradié (+ UVA), il peut s'avérer utile de faire différer de plusieurs ordres de grandeur les gammes de concentrations à tester dans les deux parties de l'expérience, afin de satisfaire à l'exigence de qualité des données. Si aucune cytotoxicité n'est constatée dans les deux parties de l'expérience (– UVA et + UVA), il suffit de réaliser l'essai avec un grand intervalle entre chaque dose jusqu'à la concentration maximale.

Il n'est pas nécessaire de procéder à une contre-expérience pour vérifier un résultat clairement positif. Il n'est pas non plus nécessaire de vérifier les résultats clairement négatifs, à condition que le produit chimique ait été testé à des concentrations suffisamment élevées. Dans de tels cas, une expérience principale, étayée par une ou plusieurs expériences préliminaires de détermination des gammes de concentrations, est suffisante.

Les tests qui donnent des résultats limites, proches du seuil critique du modèle prédictif, doivent être vérifiés par une contre-expérience.

Si une contre-expérience s'avère nécessaire, il peut être utile de faire varier les conditions expérimentales afin d'obtenir un résultat bien net. Une des variables clés dans ce test est la préparation des solutions du produit chimique à tester. Aussi la variation de ces conditions (cosolvant, pulvérisation, sonication) peut-elle être essentielle dans la répétition d'un test. Une autre possibilité est de faire varier le temps de préincubation. Une réduction de cette durée peut présenter un intérêt pour les produits chimiques instables dans l'eau.

2.2. Traitement des résultats

Si possible, on cherchera à déterminer la concentration du produit chimique à tester qui entraîne une inhibition de 50 % de la fixation du rouge neutre par les cellules (EC_{50}). Cela peut se faire en appliquant n'importe quelle méthode de régression non linéaire appropriée (de préférence une fonction de Hill ou une régression logistique) aux données de réponse aux concentrations, ou en utilisant d'autres méthodes d'ajustement (14). Avant d'utiliser une EC_{50} pour la suite des calculs, il convient de vérifier comme il se doit la qualité de l'ajustement. Une autre solution consiste à utiliser des méthodes d'ajustement graphique pour calculer l'EC_{50}. Dans ce cas, il est recommandé d'utiliser du papier semi-logarithmique (axe des x: log, axe des y: probit) car très souvent, la fonction concentration-réponse devient pratiquement linéaire après cette transformation.

2.3. Évaluation des résultats (modèles prédictifs)

2.3.1. *Modèle prédictif, version 1: facteur de photo-irritation (PIF)*

Si, tant en présence (+ UVA) qu'en absence (– UVA) de lumière, on obtient des courbes concentration-réponse complètes, on calcule un facteur de photo-irritation (PIF) à l'aide de la formule suivante:

(a) $$PIF = \frac{EC_{50}\,(-\,UV)}{EC_{50}\,(+\,UV)}$$

Un PIF < 5 indique une absence de potentiel phototoxique, alors qu'un PIF ≥ 5 indique un potentiel phototoxique.

Si un produit chimique est cytotoxique uniquement en présence de lumière (+ UVA) et n'est pas cytotoxique dans les conditions – UVA, il n'est pas possible de calculer le PIF, bien que ce résultat indique un potentiel phototoxique. Dans un tel cas, on peut calculer un "> PIF" si le test de cytotoxicité (–UV) est réalisé jusqu'à la concentration d'essai la plus élevée (C_{max}); c'est cette dernière valeur qui est utilisée pour calculer le "> PIF":

(b) $$> PIF = \frac{C_{max}\ (-\,UV)}{EC_{50}\ (+\,UV)}$$

Si l'on ne peut obtenir qu'un "> PIF", alors toute valeur > 1 indique un potentiel phototoxique.

Si l'on ne peut calculer ni la EC_{50} (– UV) ni la EC_{50} (+ UV) parce que le produit chimique ne fait preuve d'aucune cytotoxicité jusqu'à la concentration d'essai la plus forte, cela démontre une absence de potentiel phototoxique. Dans ce cas, on utilise un "PIF = *1" théorique pour caractériser ce résultat.

(c) $$PIF = *1 = \frac{C_{max}\ (-\,UV)}{C_{max}\ (+\,UV)}$$

Si l'on ne peut obtenir qu'un "PIF = *1", cela signifie qu'il n'y a pas de potentiel phototoxique.

Dans les cas (b) et (c), les concentrations atteintes dans le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU doivent être soigneusement prises en considération lors de la détermination du potentiel phototoxique.

2.3.2. *Modèle prédictif, version 2: photo-effet moyen (MPE)*

À titre de variante, on peut utiliser une nouvelle version du modèle de prédiction du potentiel phototoxique, qui a été mise au point à partir des données de l'étude de validation UE/COLIPA (15) et testée en aveugle dans une étude subséquente portant sur la phototoxicité *in vitro* des substances chimiques utilisées comme filtres UV (13). Ce modèle permet de s'affranchir des limites inhérentes au modèle PIF dans les cas où l'on ne peut obtenir une EC_{50}. Ce modèle utilise le photo-effet moyen ["Mean Photo Effect" (MPE)] qui est une mesure basée sur une comparaison des courbes concentration-réponse complètes. Pour utiliser le modèle MPE, l'université Humboldt (Berlin, Allemagne) a mis au point un logiciel spécial qui peut être obtenu gratuitement.

2.4. **Interprétation des résultats**

Un résultat positif au test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU (PIF ≥ 5 ou MPE ≥ 0,1) indique que la substance testée a un potentiel phototoxique. Si ce résultat est obtenu à des concentrations inférieures à 10 µg/ml, le produit chimique est aussi susceptible d'agir comme une phototoxine dans diverses conditions d'exposition *in vivo*. Si un résultat positif n'est obtenu qu'à la concentration d'essai maximale de 100 µg/ml, d'autres investigations peuvent s'avérer nécessaires pour évaluer les risques ou le pouvoir phototoxique. Il peut s'agir notamment d'étudier la pénétration et l'absorption cutanées ou l'éventuelle accumulation du produit chimique dans la peau, ou de soumettre le produit à un autre type de test pour confirmer les résultats, en utilisant par exemple un modèle de peau humaine *in vitro*.

Un résultat négatif au test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU (PIF < 5 ou MPE < 0,1) indique que la substance testée ne s'est pas révélée phototoxique pour les cellules de mammifère en culture dans les conditions utilisées. Dans les cas où le produit chimique a pu être testé jusqu'à la concentration maximale de 100 µg/ml, un résultat négatif indique que le produit chimique n'a pas de potentiel phototoxique et qu'une phototoxicité *in vivo* peut être considérée comme improbable. Dans les cas où l'on a obtenu des réponses toxiques identiques (EC_{50} +UV et EC_{50}−UV) à des concentrations plus faibles, l'interprétation des résultats sera la même. En revanche, si aucune toxicité n'a été mise en évidence (+UV et −UV) et si la solubilité du produit dans l'eau a limité les concentrations à des valeurs inférieures à 100 µg/ml, il faut peut-être s'interroger sur l'adéquation du système d'essai pour la substance à tester, et envisager un test de confirmation (par exemple, un test sur un modèle de peau *in vitro* ou *ex vivo*, ou bien un test *in vivo*).

3. **COMMUNICATION DES RÉSULTATS**

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

Produit chimique à tester:

— données d'identification et n° CAS si connu,

— nature physique et pureté,

— propriétés physicochimiques importantes pour la réalisation de l'étude,

— stabilité et photostabilité si connues.

Solvant:

— justification du choix du solvant,

— solubilité du produit chimique à tester dans ce solvant,

— pourcentage de solvant présent dans le milieu de traitement (EBSS ou PBS).

Cellules:

— type et provenance des cellules,

— absence de mycoplasmes,

— nombre de passages cellulaires, si connu,

— sensibilité des cellules aux UVA, déterminée avec l'équipement d'irradiation utilisé dans le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU.

Conditions d'essai (a); incubation avant et après traitement:

— type et composition du milieu de culture,

— conditions d'incubation (concentration de CO_2, température, humidité),

— durée de l'incubation (avant traitement et après traitement).

Conditions d'essai (b); traitement par le produit chimique:

— justification des concentrations du produit chimique utilisées en présence et en absence de rayonnement UV/lumière visible,

— 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 d'essai (c); irradiation:

— justification de la source de lumière utilisée,

— 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/cm^2,

— durée de l'exposition UV/lumière visible,

— dose d'UVA (irradiance × temps), exprimée en J/cm^2,

— température appliquée aux cultures cellulaires durant l'irradiation et aux cultures cellulaires maintenues concurremment dans l'obscurité.

Conditions d'essai (d); test NRU:

— composition du milieu NR,

— durée de l'incubation dans NR,

— conditions d'incubation (concentration de CO_2, 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 du produit chimique à tester, exprimée en % de la viabilité moyenne des témoins,

— courbes concentration-réponse (concentration du produit chimique — viabilité cellulaire relative) obtenues dans les expériences +UVA et −UVA parallèles,

— analyse des données fournies par les courbes concentration-réponse: si possible, calcul/détermination des EC_{50} (+UVA) et EC_{50} (−UVA),

— comparaison des deux courbes concentration-réponse obtenues en présence et en absence de rayonnement UVA/lumière visible, soit par le calcul du facteur de photo-irritation (PIF), soit par le calcul du photo-effet moyen (MPE),

— classification du potentiel phototoxique,

— critères d'acceptation de l'essai (a), témoin négatif simultané:

  — viabilité absolue (densité optique de l'extrait de NR) des cellules irradiées et des cellules non irradiées,

  — données historiques sur le témoin négatif, écart moyen et écart type,

  critères d'acceptation de l'essai (b), témoin positif simultané:

  — EC_{50} (+UVA) et EC_{50} (−UVA) et PIF du produit chimique témoin positif,

  — données historiques sur le produit chimique témoin positif: EC_{50} (+UVA) et EC_{50} (−UVA) et PIF, écart moyen et écart type.

Discussion des résultats

Conclusions

4. **RÉFÉRENCES**

(1) 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 vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro* 8, p. 793-796.

(2) 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 and DGXI/E/2, 3 November 1997, *ATLA* 26, p. 7-8.

(3) 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. and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA "*In vitro* phototoxicity" validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, p. 305-327.

(4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.

(5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro* 7, p. 95-102.

(6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry* Vol. 3 Part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, p. XI-XXXV.

(7) 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 2, *ATLA* 22, p. 314-348.

(8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, p. 79-110.

(9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, p. 119-124.

(10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, p. 515-530.

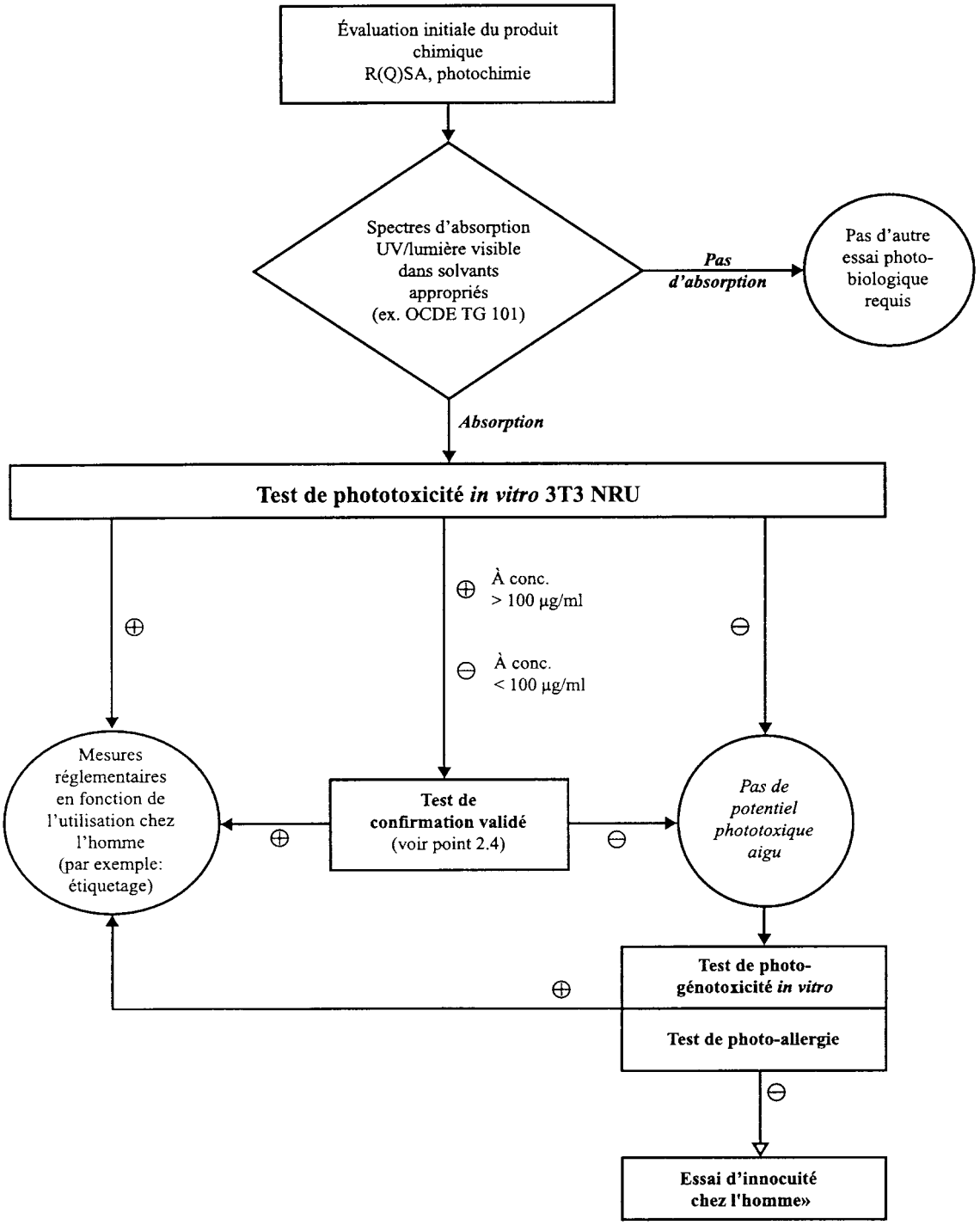
(11) Tyrrell R.M. and Pidoux M (1987), Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Research* 47, p. 1825-1829.

(12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project "*In Vitro* Photoirritation".

(13) 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 (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test, *ATLA* 26, p. 679-708.

(14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, p. 127-138.

(15) 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, p. 445-462.

Appendice

Rôle du test de phototoxicité 3T3 NRU dans une approche séquentielle des essais de phototoxicité des produits chimiques