

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

### **Absorption cutanée : méthode *in vitro***

#### **INTRODUCTION**

1. Cette Ligne directrice a été élaborée pour fournir une information sur l'absorption d'une substance d'essai appliquée sur une peau excisée. Elle peut être combinée avec la Ligne directrice de l'OCDE relative à l'absorption cutanée : méthode *in vivo* (1), ou être menée séparément. Il est recommandé de consulter le document d'orientation de l'OCDE pour la conduite des études d'absorption cutanée (2) pour élaborer des études sur la base de la présente Ligne directrice. Ce document de l'OCDE a été préparé pour faciliter la sélection des procédures *in vitro* appropriées, utilisées selon les circonstances spécifiques, et dans le but de garantir la fiabilité des résultats obtenus avec cette méthode.

#### **CONSIDÉRATIONS INITIALES**

2. Les méthodes de mesure de l'absorption cutanée se divisent en deux grandes catégories: *in vivo* et *in vitro*. Les méthodes *in vivo* d'étude de l'absorption cutanée sont bien connues et fournissent des informations pharmacocinétiques sur un large éventail d'espèces animales. Une méthode *in vivo* est décrite dans une autre Ligne directrice de l'OCDE (1). Les méthodes *in vitro* sont utilisées depuis de nombreuses années pour mesurer l'absorption cutanée. Même si des études de validation formelle des méthodes *in vitro* présentées dans cette Ligne directrice n'ont pas été menées, les experts de l'OCDE ont estimé en 1999 que le volume des données évaluées suffisait pour étayer cette Ligne directrice pour des essais *in vitro* (3). Le document d'orientation de l'OCDE (2) présente des détails supplémentaires appuyant cette décision, dont un certain nombre de comparaisons directes des méthodes *in vitro* et *in vivo*. De même, de nombreuses monographies examinent cette question et offrent un contexte de référence détaillé sur l'utilisation de la méthode *in vitro* (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). Les méthodes *in vitro* mesurent la diffusion d'une substance dans et à travers la peau jusqu'à un réservoir de fluide. On peut utiliser une peau non-viable pour mesurer la diffusion seule, ou une peau fraîche et métaboliquement active pour mesurer simultanément la diffusion et le métabolisme cutané. Ces méthodes conviennent particulièrement pour comparer le transport des substances chimiques dans et à travers la peau, pour différentes préparations, mais elles proposent aussi des modèles utiles pour l'évaluation de l'absorption percutanée chez l'homme.

3. La méthode *in vitro* ne convient pas nécessairement pour toutes les situations et classes de substances, mais on peut l'utiliser pour une première évaluation qualitative de la pénétration cutanée. Dans certains cas, il peut s'avérer nécessaire de compléter l'étude par des données *in vivo*. Pour des informations complémentaires sur les situations où la méthode *in vitro* conviendrait, il est recommandé de consulter le document d'orientation de l'OCDE (2). De même, on peut se reporter au rapport de la réunion des experts de l'OCDE (3).

4. La présente Ligne directrice présente des principes généraux pour mesurer l'absorption cutanée et la diffusion d'une substance d'essai à partir de peau excisée. Dans ce contexte, la peau de nombreuses espèces de mammifères, y compris l'homme, peut être utilisée. Les propriétés de perméabilité de la peau sont conservées après l'excision et le prélèvement, dans la mesure où c'est le *stratum corneum* non-viable qui constitue le principal obstacle à la diffusion ; aucune forme de transport actif des substances chimiques

à travers la peau n'a jamais été identifiée. En revanche, il a été établi que la peau pouvait métaboliser certaines substances au cours de l'absorption percutanée (6), mais ce processus ne limite pas la dose réellement absorbée, même si elle est susceptible d'affecter la nature du produit qui passe ensuite dans le sang.

### **PRINCIPE DE L'ESSAI**

5. La substance d'essai, le cas échéant radiomarquée, est appliquée à la surface d'un échantillon de peau séparant les deux chambres d'une cellule à diffusion. La substance chimique reste sur la peau pendant un temps donné et dans des conditions spécifiques, avant d'être retirée selon une procédure de nettoyage appropriée. Au cours de l'étude, on échantillonne le fluide receveur à des moments donnés, puis on l'analyse pour y rechercher la substance d'essai et/ou des métabolites.

6. Lorsque des systèmes métaboliquement actifs sont utilisés, les éventuels métabolites de la substance d'essai peuvent être analysés selon les méthodes appropriées. A la fin de l'expérience, la distribution de la substance d'essai est déterminée et ses métabolites sont quantifiés, le cas échéant.

7. Dans les conditions appropriées, décrites dans cette Ligne directrice et le document d'orientation associé (2), on mesure l'absorption d'une substance d'essai au cours d'une période de temps donnée en analysant le fluide receveur et la peau traitée. La substance d'essai restant sur la peau doit être considérée comme étant absorbée, à moins qu'il soit démontré que l'on puisse déterminer l'absorption sur la seule base des valeurs relatives au fluide receveur. L'analyse des autres éléments (matières récupérées par nettoyage de la peau et matières restant à l'intérieur des couches dermiques) permet d'enrichir l'évaluation des données, en précisant notamment l'évacuation totale de la substance d'essai et le pourcentage de récupération.

8. Pour démontrer les performances et la fiabilité du système d'essai dans le laboratoire chargé de l'étude, les résultats relatifs aux substances chimiques de référence pertinentes doivent être tenus disponibles et être conformes à la littérature publiée pour la méthode utilisée. Pour répondre à cette exigence, on peut procéder à un essai simultané de la substance d'essai et d'une substance de référence appropriée (présentant de préférence une lipophilicité proche de celle de la substance d'essai), ou proposer un historique approprié relatif à un certain nombre de substances de référence présentant une lipophilicité différente (par exemple, la caféine, l'acide benzoïque et la testostérone).

### **DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI**

#### **Cellule à diffusion**

9. Une cellule à diffusion se compose d'un compartiment donneur et d'un compartiment receveur entre lesquels on place la peau (la Figure 1 présente une cellule à diffusion de conception classique). La cellule doit répondre à plusieurs objectifs : assurer une bonne étanchéité sur le pourtour de la peau, permettre un échantillonnage aisé et un bon mélange de la solution dans le compartiment receveur en contact avec le dessous de la peau, et garantir le maintien de la température voulue au niveau de la cellule et de son contenu. Des cellules à diffusion statique ou dynamique peuvent indifféremment être utilisées. Normalement, les compartiments donneurs sont laissés sans occlusion pendant l'exposition à une dose finie d'une préparation d'essai. Toutefois, pour les applications infinies et pour certains scénarios avec des doses finies, l'occlusion du compartiment donneur peut être envisagée.

### **Fluide receveur**

10. L'emploi d'un fluide receveur compatible avec des éléments physiologiques doit être privilégié, mais d'autres fluides peuvent être utilisés à condition que ce choix soit justifié. La composition précise du fluide receveur doit être fournie. La bonne solubilité de la substance d'essai dans le fluide receveur doit être démontrée, de façon à garantir qu'il ne fait pas obstacle à l'absorption. En outre, le fluide receveur ne doit pas affecter l'intégrité de la préparation cutanée. Dans un système dynamique, la vitesse de l'écoulement ne doit pas gêner la diffusion de la substance d'essai dans le fluide receveur. Dans un cellule statique, le fluide doit être remué en permanence et échantillonné régulièrement. Si le métabolisme entre également dans le cadre de l'étude, le fluide receveur doit garantir la viabilité de la peau pendant toute la durée de l'expérience.

### **Préparations de la peau**

11. On peut utiliser indifféremment de la peau d'origine humaine ou animale. Il est reconnu que l'emploi de la peau humaine dépend de considérations et conditions d'ordre éthique nationales et internationales. L'utilisation d'une peau viable est préférable, mais une peau non-viable peut aussi être utilisée dès lors que son intégrité est démontrée. Des membranes d'épiderme (séparées par procédé enzymatique, chimique ou à la chaleur) ou certaines strates de peau (d'une épaisseur généralement comprise entre 200 et 400 µm) préparées avec un dermatome, peuvent être utilisées. Des épaisseurs de peau complètes peuvent être utilisées, mais les épaisseurs excessives (environ > 1 mm) doivent être évitées, sauf si elles sont spécifiquement requises pour examiner la substance d'essai dans les couches de la peau. Les différents choix effectués (espèce retenue, site anatomique et technique de préparation) doivent être justifiés. Des données acceptables pour un minimum de quatre essais répétés par préparation d'essai doivent être fournies.

### **Intégrité de la préparation cutanée**

12. Il est essentiel que la peau soit correctement préparée. Toute manipulation inappropriée peut endommager le *stratum corneum*, auquel cas il convient de contrôler l'intégrité de la peau préparée. Si le champ de l'étude englobe le métabolisme de la peau, une peau fraîchement excisée doit être utilisée dans les plus courts délais, et dans des conditions propres à soutenir l'activité métabolique. De manière générale, la peau fraîchement excisée doit être utilisée dans les 24 heures, mais la période de stockage acceptable peut varier selon le système enzymatique impliqué dans la métabolisation et les températures de stockage (13). Lorsque les préparations de peau ont été stockées avant utilisation, des éléments établissant qu'elles ont conservé toutes leurs fonctions doivent être présentés.

### **Substance d'essai**

13. La substance d'essai est le produit dont on étudie les caractéristiques de pénétration. Dans l'idéal, cette substance d'essai doit être radiomarquée.

### **Préparation d'essai**

14. La préparation de la substance d'essai (c'est-à-dire la préparation pure, diluée ou le mélange contenant la substance d'essai à appliquer sur la peau) doit être identique (ou représenter un substitut réaliste) aux produits auxquels peuvent être exposés l'homme ou les autres espèces cibles. Toute modification par rapport à la préparation « d'usage » doit être justifiée.

### **Concentrations et formulations des substances d'essai**

15. Normalement, plusieurs concentrations de la substance d'essai sont utilisées dans les formulations habituelles, de façon à couvrir une gamme réaliste d'expositions humaines potentielles. De la même manière, on peut envisager d'étendre l'étude à un éventail de formulations classiques.

### **Application sur la peau**

16. Dans les conditions normales de l'exposition humaine aux produits chimiques, l'exposition porte généralement sur des doses finies. Par conséquent, il convient d'utiliser des quantités correspondant à une exposition humaine potentielle, soit généralement 1 à 5 mg/centimètre carré pour une substance solide ou jusqu'à 10 µl/centimètre carré pour les liquides. La quantité retenue doit être justifiée par les conditions d'utilisation attendues, les objectifs fixés pour l'étude, ou les caractéristiques physiques de la préparation d'essai. Par exemple, des applications infinies sur la surface de la peau peuvent être envisagées s'il s'agit d'étudier une exposition à des volumes importants par unité de surface.

### **Température**

17. La température a une incidence sur la diffusion passive des produits chimiques (et ainsi sur leur absorption cutanée). Par conséquent, la cellule à diffusion et la peau doivent être maintenues à une température constante proche de la température normale de la peau, soit  $32 \pm 1$  °C. Selon la conception de la cellule, la température du bain ou du bloc de chauffage pourra varier, l'objectif étant de maintenir la peau et le compartiment receveur à leur norme physiologique. De préférence, l'humidité doit être maintenue entre 30 et 70 pour cent.

### **Durée de l'exposition et échantillonnage**

18. L'exposition de la peau à la préparation d'essai peut durer tout le temps de l'expérience, ou moins longtemps (par exemple, pour correspondre à un type spécifique d'exposition humaine). La peau doit être lavée, à l'aide d'un agent lavant approprié, pour éliminer les excédents de la préparation d'essai, et les produits de rinçage utilisés doivent être collectés pour analyse. La procédure de retrait de la préparation, qui dépend des conditions d'utilisation envisagées, doit être justifiée. Normalement, une période d'échantillonnage de 24 heures est nécessaire pour permettre une caractérisation adéquate du profil d'absorption. Sachant que l'intégrité de la peau peut commencer à se détériorer au-delà de 24 heures, la durée d'échantillonnage ne doit normalement pas excéder 24 heures. Cette durée n'est pas nécessaire pour les substances d'essai qui pénètrent rapidement la peau, mais pour celles qui pénètrent lentement, des temps plus importants peuvent se révéler nécessaires. La fréquence d'échantillonnage du fluide receveur doit permettre d'établir une représentation graphique du profil d'absorption de la substance d'essai.

### **Procédures terminales**

19. Tous les éléments du système d'essai (compartiment donneur, produits de rinçage de la surface de la peau, préparation cutanée et compartiment/fluide receveur) doivent être analysés et le niveau de récupération déterminé. Dans certains cas, il peut être nécessaire de fractionner la peau entre la zone exposée et celle placée sous le rebord de la cellule, et entre le *stratum corneum*, l'épiderme et les différentes strates du derme, pour procéder à des analyses séparées.

### **Analyse**

20. Dans toutes les études, un niveau de récupération approprié doit être atteint (à savoir, une moyenne de  $100 \pm 10$  pour cent de la radioactivité, tous les écarts devant être justifiés). La quantité de

substance d'essai dans le fluide receveur, la préparation cutanée, les produits de rinçage de la surface de la peau et des appareils, doivent être analysés selon des procédures appropriées.

## **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### **Résultats**

21. L'analyse du fluide receveur, la distribution de la substance d'essai dans le système d'essai et le profil d'absorption dans le temps doivent être présentés. Dans des conditions d'exposition à une dose finie, la quantité récupérée dans le nettoyage de la peau, la quantité présente dans la peau (et dans les différentes couches dermiques si celles-ci ont fait l'objet d'une analyse) et la quantité présente dans le fluide receveur (taux et quantité ou pourcentage de la dose appliquée) doivent être calculées. Parfois, l'absorption cutanée peut être exprimée à partir des seules données relatives au fluide receveur. Toutefois, lorsque de la substance d'essai reste dans la peau à la fin de l'étude, il peut être nécessaire de l'inclure dans la quantité totale absorbée (voir le document d'orientation de l'OCDE, paragraphe 66). Dans des conditions d'exposition à une dose infinie, les données peuvent permettre de calculer une constante de perméabilité ( $K_p$ ). Dans ce dernier cas, le pourcentage absorbé n'est pas pertinent.

### **Rapport d'essai**

22. Le rapport d'essai doit préciser les conditions établies dans le protocole, justifier le choix du système d'essai utilisé, et également contenir les informations suivantes :

Substance d'essai :

- état physique ; propriétés physico-chimiques (au minimum, poids moléculaire et  $\log P_{oe}$ ), pureté (pureté radiochimique) ;
- informations d'identification (par exemple, numéro de lot) ;
- solubilité dans le fluide receveur.

Préparation de l'essai :

- formulation et justification de l'utilisation ;
- homogénéité.

Conditions expérimentales :

- sources et site de la peau, méthode de préparation, conditions de stockage avant utilisation, pré-traitement éventuel (nettoyage, traitement antibiotique, etc.), mesures de l'intégrité de la peau, état métabolique, justification de l'utilisation ;
- conception de la cellule à diffusion, composition du fluide receveur, vitesse d'écoulement du fluide receveur ou temps et procédures d'échantillonnage ;
- détails de l'application de la préparation d'essai et quantification de la dose appliquée ;
- durée de l'exposition ;
- détails du retrait de la préparation d'essai de la peau (par exemple, rinçage de la peau) ;
- détails de l'analyse de la peau et des techniques de fractionnement employées pour mettre en évidence la distribution dans la peau ;
- procédures de nettoyage de la cellule et du matériel ;
- méthodes d'essai, techniques d'extraction, seuils de détection et validation de la méthode analytique.

## Résultats:

- récupération totale de l'expérience (dose appliquée  $\equiv$  produits de rinçage de la peau + peau + fluide receveur + produits de rinçage de la cellule) ;
- tableau indiquant la récupération de chaque cellule dans chaque compartiment ;
- profil d'absorption ;
- tableau indiquant les données relatives à l'absorption (sous forme de taux, de quantités ou de pourcentages).

Discussion des résultats.

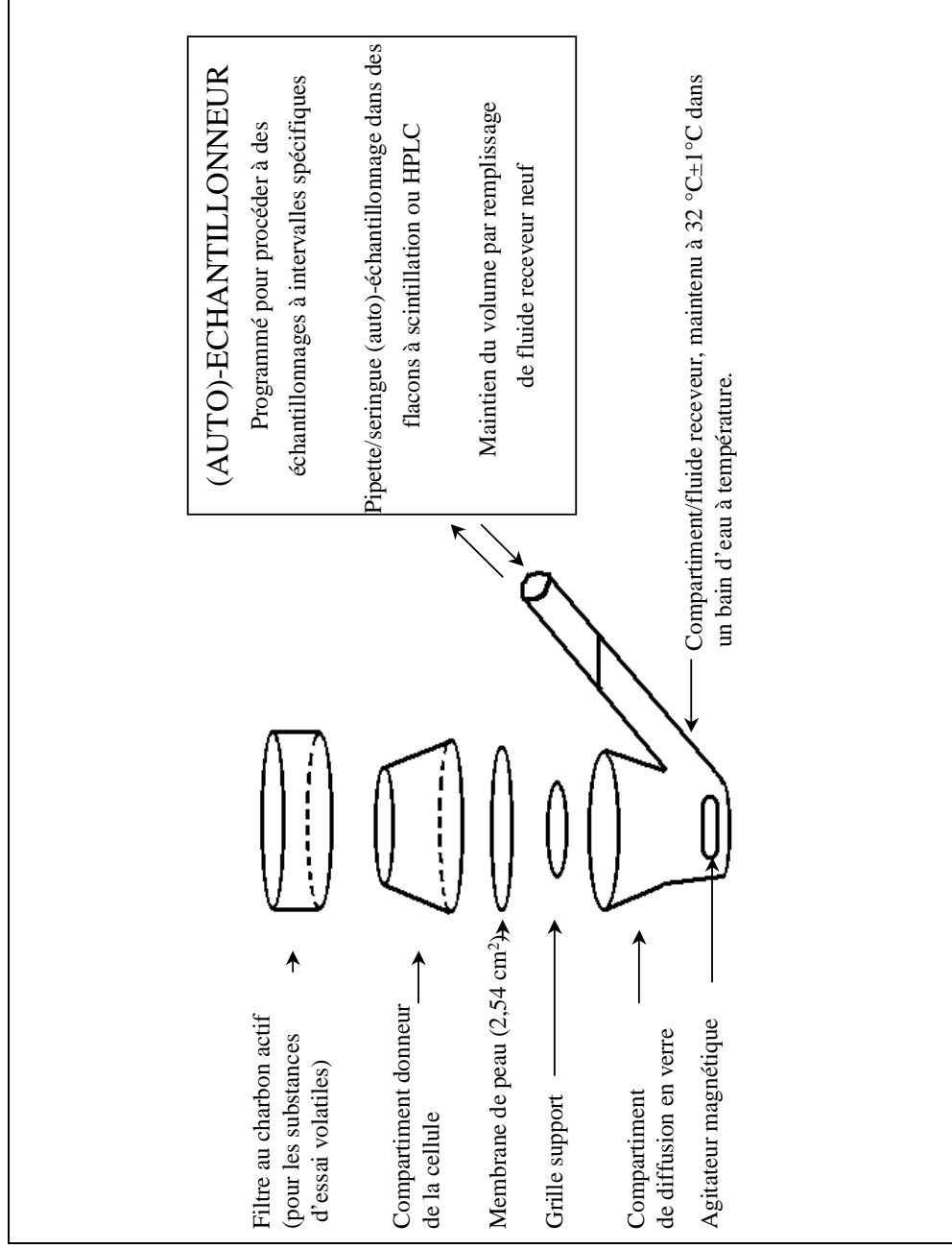
Conclusions.

**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) OCDE (2004). Ligne directrice 427 – Absorption cutanée : méthode *in vivo*. OCDE, Paris.
- (2) OCDE (2004). Document d'orientation de l'OCDE pour la conduite des études d'absorption cutanée. OCDE, Paris.
- (3) OCDE (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OCDE, Paris.
- (4) Kemppainen BW et Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.
- (5) Bronaugh RL et Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237-241.
- (6) Bronaugh RL et Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.
- (7) Centre européen d'écotoxicologie et de toxicologie des produits chimiques (1993). Monographie No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Bruxelles.
- (8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, *Fd Chem Tox*, 37, 191-205.
- (9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.
- (10) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR et al. (1996). Methods for assessing percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.
- (11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

- (12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.
- (13) Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356-365.

Figure 1 : Exemple de cellule à diffusion statique classiquement utilisée pour la conduite d'études d'absorption percutanée *in vitro*





ANNEXEDÉFINITIONS

Dose non absorbée : la quantité retirée par nettoyage de la surface de la peau après exposition et toute quantité présente sur le couvercle non-occlusif, y compris toutes les quantités volatilisées au cours de l'exposition.

Dose absorbée : (*in vitro*) la masse de substance d'essai atteignant le fluide receveur (ou la circulation systémique) dans une période de temps donnée.

Dose absorbable : (*in vitro*) la quantité présente sur ou dans la peau après nettoyage.