



Section 4
Effets sur la santé

Ligne directrice n° 432

Essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU

18 juin 2019

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



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 une réaction toxique causée par des produits chimiques photoréactifs administrés par voie topique ou systémique, après exposition du corps à la lumière ambiante.
2. Le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU (fixation du colorant vital rouge neutre, *Neutral Red Uptake*) permet de déterminer le potentiel phototoxique d'un produit chimique testé, induit par l'excitation dudit produit après exposition à la lumière. Cet essai évalue la photo-cytotoxicité d'après la réduction relative de la viabilité des cellules exposées au produit chimique testé, en présence ou absence de lumière. Les produits chimiques identifiés par cet essai sont susceptibles d'être phototoxiques *in vivo*, après administration par voie topique ou systémique et diffusion dans la peau/ les yeux.
3. Les définitions utilisées dans cette Ligne directrice figurent à l'Annexe A.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

4. Divers 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. La photoréaction nécessite l'absorption d'un nombre suffisant de quanta de lumière. Aussi convient-il, avant d'envisager un essai, de déterminer le spectre d'absorption UV/lumière visible du produit chimique à tester, en suivant la Ligne directrice 101 de l'OCDE. Il a été observé que, si le coefficient d'extinction/d'absorption molaire (MEC) mesuré dans le méthanol est inférieur à $1000 \text{ litres} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, il est peu probable que le produit chimique soit photoréactif (5)(6). Il est alors 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)(7). En

général, ce principe s'applique à tous les produits chimiques testés, cependant, en fonction de l'utilisation du produit chimique attendue ou des possibles conditions d'exposition, des lignes directrices plus spécifiques peuvent être indiquées (par exemple, la ligne directrice S10 de l'ICH pour les produits pharmaceutiques) (5). Consulter également l'Annexe B.

5. La fiabilité et la pertinence de l'essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU ont été évaluées (8)(9)(10)(11). L'essai s'est révélé fiable pour la prévision d'effets de phototoxicité aiguë chez l'animal et chez l'humain *in vivo*. L'essai en tant que tel 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. Par ailleurs, cet essai n'est pas conçu pour prendre en compte les mécanismes indirects de la phototoxicité, les effets des métabolites du produit chimique testé, ou les effets des mélanges. En revanche, dans certains cas, un résultat négatif avec l'essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU permet d'omettre d'autres essais, par exemple l'essai de photogénotoxicité (voir la note n°2 (6)(12)(13)).

6. L'utilisation de systèmes d'activation métabolique n'est pas nécessaire pour l'essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU car, jusqu'à présent, on ne dispose pas de preuves indiquant que des produits phototoxiques passeraient inaperçus en l'absence d'activation métabolique (13).

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. 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 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 (NR) 18 à 24 heures après traitement par le produit chimique testé et exposition à la lumière (14). Le rouge neutre est un colorant cationique faible qui pénètre facilement dans les membranes cellulaires par diffusion non-ionique, et s'accumule au niveau intracellulaire dans les lysosomes. Le NR est non chargé dans l'environnement presque neutre du cytoplasme ; il devient chargé positivement dans le lumen lysosomal, au pH faible, et y reste bloqué. Le maintien actif du faible pH du lumen lysosomal nécessite une dépense d'ATP et dépend de la bonne intégrité de la membrane lysosomale. Des phototoxines peuvent altérer les cellules par la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) et par d'autres mécanismes qui accroissent la perméabilité de la membrane lysosomale, réduisent le gradient de pH et provoquent d'autres modifications graduellement irréversibles (15)(16). Ces modifications induites par l'action de xénobiotiques entraînent une diminution de la fixation du NR, ce qui permet distinguer les cellules viables des cellules mortes ou abîmées.

8. Des cellules Balb/c 3T3 sont maintenues en culture pendant 18 à 24 heures jusqu'à formation de monocouches. Pour chaque produit chimique testé, deux plaques à 96 puits sont alors préincubées pendant 1 heure avec 8 concentrations distinctes du produit chimique. Ensuite, l'une des deux plaques est exposée à une dose de lumière, 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 frais et, après une nouvelle période d'incubation de 18 à 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 valeurs NRU obtenues après traitement par rapport aux valeurs des témoins de solvant non traités, est calculée pour chaque concentration d'essai. Afin de prédire le

potentiel phototoxique, les réponses aux concentrations obtenues en présence et en absence d'exposition à la lumière sont comparées au niveau CE₅₀, c'est-à-dire la concentration inhibant la viabilité cellulaire de 50 % par rapport aux témoins non traités.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

Préparations

Cellules

9. Une lignée permanente de cellules de fibroblaste de souris, Balb/c 3T3, clone A31, provenant de l'ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, Virginie, États-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 recommandé que les cellules proviennent d'une banque de cellules bien qualifiée (23). D'autres cellules ou lignées cellulaires peuvent aussi être utilisées avec la même méthode expérimentale si les conditions de culture sont adaptées aux besoins spécifiques des cellules. Il convient toutefois d'en démontrer l'équivalence (c.-à-d. la réponse appropriée aux étalons de toxicité), conformément aux principes énoncés dans le Document d'orientation n°34 (22).

10. Les cellules doivent être contrôlées à l'arrivée en laboratoire (voir les recommandations en (17)) pour vérifier l'absence de contamination par des mycoplasmes, et ne doivent être utilisées que si aucun n'est trouvé (18).

11. Il importe de contrôler régulièrement la sensibilité aux UV des cellules 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 de préférence moins de 100 passages (voir le paragraphe 29 et l'Annexe C). Si des cellules ayant subi plus de 100 passages sont utilisées, les données démontrant que les cellules respectent les paramètres de qualité de cette Ligne directrice doivent être fournies.

Milieu 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 de 10 % 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 % selon le tampon (voir le paragraphe 17). En fonction du tampon utilisé, le niveau de CO₂ peut être ajusté. Il est 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, les cellules sontensemencées dans le milieu de culture 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 produit chimique testé, les cellules sontensemencées de façon 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 du produit chimique testé

16. Les produits chimiques testés doivent être fraîchement préparés, le jour de leur utilisation, à moins que les données de stabilité ne démontrent qu'ils peuvent être conservés. 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 du produit chimique testé avant exposition à la lumière.

17. Dans l'idéal, les produits chimiques testés doivent être dissous dans des solutions salines tamponnées, par exemple, solution saline équilibrée de Earl (*Earl's Balanced Salt Solution*, EBSS) ou de Hanks (*Hanks' Balanced Salt Solution*, HBSS) ou d'autres solutions tamponnées physiologiquement équilibrées, exemptes d'éléments protéiques ou qui absorbent la lumière (p. ex., indicateurs de pH tels que le rouge de phénol, ou vitamines), afin d'éviter les interférences lors de l'exposition à la lumière. Sachant que, pendant l'exposition à la lumière, les cellules sont maintenues pendant 50 minutes environ en dehors de l'incubateur CO₂, des précautions doivent être prises pour éviter l'alcalinisation. Si les cellules sont incubées à 5 % 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 (solvant) et dans toutes les concentrations du produit chimique testé, et être en outre non cytotoxique à la concentration utilisée.

19. Si un produit chimique n'est pas soluble dans l'eau, les solvants recommandés sont le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'éthanol (EtOH). D'autres solvants de faible cytotoxicité peuvent convenir dans le cas où un produit chimique aurait une solubilité limitée dans l'eau, dans le DMSO ou dans l'éthanol. Les propriétés spécifiques de tous les solvants doivent être évaluées avant utilisation, notamment les risques de réaction avec le produit chimique testé, l'effet phototoxique, l'atténuation de l'effet phototoxique, les propriétés de fixation des radicaux, et/ou la stabilité du produit chimique dans le solvant. Les produits chimiques testés dissous dans les solvants organiques DMSO ou éthanol sont préparés en effectuant huit dilutions en série dans le même solvant, les huit solutions mères préparées dans le solvant organique étant quant à elles transférées dans le milieu aqueux (p. ex., EBSS ou HBSS) avant application aux cellules. La solution mère de chaque produit chimique testé est préparée à la concentration soluble la plus élevée dans le DMSO ou l'éthanol, afin d'obtenir la concentration maximum de 1000 µg/ml dans le milieu aqueux. La concentration finale de solvant dans le milieu aqueux est maintenue constante dans les huit concentrations d'essai (en général, 1 % (v/v)). Les produits chimiques testés préparés dans le solvant organique peuvent former un précipité après le passage en milieu aqueux. En conséquence, la solubilité aux différents dosages des dilutions en milieu aqueux est évaluée et les observations sont enregistrées.

20. Si nécessaire, on peut recourir à un mélangeur Vortex, à la sonication et/ou à un chauffage à des températures appropriées pour faciliter la solubilisation, à moins qu'une telle manipulation n'affecte la stabilité du produit chimique testé.

Conditions d'exposition à la lumière

21. *Sources de lumière* : le choix d'une source de lumière et d'un filtrage appropriés (simulateur solaire, par exemple) 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)(19), tandis que les UVB sont moins pertinents, mais très cytotoxiques, avec une cytotoxicité qui augmente d'un facteur 1000 entre 313 et 280 nm (20). Les sources de lumière acceptables émettent dans la totalité du spectre solaire (de 290 nm à 700 nm). Le spectre peut-être ajusté à l'aide de filtres pour atténuer les UVB tout en laissant passer les UVA et la lumière visible (voir Annexe C). En outre, les longueurs d'ondes, doses employées et source de lumière (appareil ouvert ou fermé, par exemple), ne doivent pas endommager le système d'essai (à cause d'une émission de chaleur ou de longueurs d'onde dans l'infrarouge, par exemple).

22. La lumière solaire simulée par des simulateurs solaires est considérée comme la source optimale de lumière artificielle. La distribution du pouvoir d'émission de lumière du simulateur solaire filtré doit être proche de celle de la lumière du jour extérieure donnée dans le document (21). Des arcs au xénon ou des arcs aux halogénures de métal-mercure (dopé) peuvent être utilisés comme simulateurs solaires (22). 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 (Annexe A). Étant donné que les matériaux plastiques utilisés pour les cultures cellulaires contiennent des stabilisateurs UV, le spectre transmis 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 (21). L'éclairage extérieur normalisé D65 est la norme d'émission correspondant à la lumière du jour extérieure reconnue internationalement ; sa définition est fournie dans le document ISO DIS 18909:2006. Les documents (10)(23) donnent un exemple de distribution spectrale de l'irradiance du simulateur solaire équipé de filtres qui a été utilisé dans l'étude de validation de l'essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU. Consulter aussi la Figure 1 de l'Annexe C.

23. *Dosimétrie* : l'intensité de lumière (irradiance) doit être régulièrement contrôlée avant chaque essai de phototoxicité, à l'aide d'un radiomètre UVA à large bande approprié (Annexe A). L'irradiance doit être mesurée à travers le même type de couvercle de plaques à 96 puits que celui employé dans l'essai. Le radiomètre UVA doit avoir été étalonné par rapport à la source. À intervalles plus grands, il convient d'utiliser un spectroradiomètre étalonné en dehors du laboratoire par rapport à une source UV-lumière visible pour mesurer l'irradiance spectrale de la source de lumière filtrée du laboratoire et pour ajuster si besoin l'étalonnage du radiomètre UVA à large bande. Il est également possible de faire calibrer le radiomètre UVA dans un laboratoire d'étalonnage externe, à condition que celui-ci soit équipé d'une combinaison identique de source de lumière et filtre.

24. Une dose de 5 J/cm² (dans la plage des UVA) est non cytotoxique pour les cellules Balb/c 3T3 et suffisamment puissante pour exciter les produits chimiques et déclencher des réactions phototoxiques (6)(24). Pour obtenir 5 J/cm² dans un délai de 50 minutes,

l'irradiance a été réglée à 1,7 mW/cm². Voir Figure 2, Annexe C. D'autres durées d'exposition et/ou niveaux d'irradiance peuvent être utilisés pour obtenir 5 J/cm², en suivant la formule ci-dessous :

25.

$$t(\text{minutes}) = \frac{\text{Dose d' irradiation}(\text{J}/\text{cm}^2) \times 1000}{\text{Irradiance}(\text{mW}/\text{cm}^2) \times 60} \quad (1\text{J}=1\text{W}\cdot\text{sec})$$

26. De même, en cas d'utilisation d'une autre lignée cellulaire ou d'une source de lumière différente, il peut être nécessaire d'ajuster la dose de lumière en respectant le critère selon lequel cette dose ne doit pas être nocive pour les cellules tout en étant suffisante pour activer les phototoxines standard (par exemple, utiliser les produits chimiques d'épreuve de compétence décrits au Tableau 1)(28).

Conditions de l'essai :

Concentrations des produits chimiques testés

27. 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 de détermination de la plage. 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 au cours de l'exposition. Pour éviter toute toxicité induite par des conditions de culture inappropriées ou par des produits chimiques hautement acides ou alcalins, il faut que le pH des cultures cellulaires, auxquelles le produit chimique testé a été ajouté, se situe dans une plage comprise entre 6,5 et 7,8.

28. La concentration la plus élevée du produit chimique testé doit rester dans les conditions d'essai physiologiques, par exemple le stress pH ou osmotique doit être évité. Selon le produit chimique testé, il peut s'avérer nécessaire d'envisager d'autres propriétés physico-chimiques comme facteurs limitant la concentration d'essai la plus élevée. Pour les produits chimiques 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. Pour les produits chimiques non cytotoxiques (n'atteignant pas la valeur EC₅₀ avant précipitation), il est souhaitable de démontrer la limite de solubilité dans les conditions de l'essai. Il est alors utile d'inclure deux ou trois concentrations susceptibles de produire un effet de précipité dans l'expérience principale. Ces concentrations sont ensuite exclues des analyses de phototoxicité. La concentration maximale d'un produit chimique testé ne doit pas dépasser 1000 µg/ml. La concentration maximale peut souvent être réduite à 100 µg/ml, car les composés ne montrant aucune cytotoxicité significative (en présence de lumière) jusqu'à ce seuil sont considérés comme sans phototoxicité notoire (5). Une concentration maximale plus élevée en l'absence de lumière peut cependant être utilisée pour établir la valeur CE₅₀ pour le calcul du facteur de photo-irritation (PIF, *Photo Irritation Factor*). Il convient d'utiliser une série de dilutions en progression géométrique comprenant huit concentrations du produit chimique testé avec un facteur de dilution constant (voir le paragraphe 47).

29. Si les informations provenant d'expériences préalables de détermination de la plage établissent qu'un produit chimique n'est pas cytotoxique jusqu'à la concentration limite dans

l'obscurité (-Irr), mais se révèle hautement cytotoxique exposé 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.

Témoins

30. *Sensibilité des cellules à l'exposition à la lumière, données historiques* : la sensibilité à la source lumineuse des cellules utilisées doit être contrôlée au moins une fois, par évaluation de la viabilité après une exposition à des doses croissantes de lumière. La sensibilité aux UV doit être démontrée pour les cellules utilisées ayant subi le plus de repiquages. Pour cette évaluation, plusieurs doses de lumière doivent être utilisées, y compris des niveaux significativement supérieurs à ceux de l'essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU. La méthode la plus simple pour quantifier ces doses consiste à mesurer les UV à la source. Les cellules sontensemencées à la même densité que celle utilisée dans l'essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU et exposées à la lumière le jour suivant (voir le paragraphe Mode opératoire). On détermine la viabilité cellulaire à trois jours en mesurant la fixation du colorant rouge neutre. Il faut alors démontrer que la dose non cytotoxique la plus élevée (par exemple, 5 J/cm² [UVA] dans l'étude de validation) est suffisante pour classer correctement les substances d'épreuve (Tableau 1).

31. *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 % de celle des témoins de contrôle négatifs non irradiés.

32. *Viabilité des témoins de solvant* : la densité optique absolue (OD_{540±10} NRU), mesurée dans l'extrait NR des témoins de solvant indique si les 1 x 10⁴ cellulesensemencées 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±10} NRU des témoins non traités est ≥ 0,4 (c'est-à-dire approximativement vingt fois l'absorbance de fond du solvant).

33. Il faut veiller à éviter la cristallisation de la solution de NR pendant l'incubation avec les cellules, car les cristaux peuvent causer une forte variabilité. Un changement de pH dans la solution de NR peut provoquer la cristallisation du colorant. On peut ajouter un tampon pour stabiliser le pH (HEPES, par exemple) dans le milieu de culture cellulaire, afin d'éviter la cristallisation (29). Il est recommandé d'évaluer la qualité de la solution de colorant rouge neutre par avance, avant utilisation dans l'essai, car la qualité peut varier d'un fournisseur à un autre. Il est fortement recommandé de filtrer ou de centrifuger la solution de NR dans le milieu de culture cellulaire.

34. *Témoin positif* : pour chaque essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU réalisé, un produit chimique phototoxique connu doit être testé en parallèle. La chlorpromazine (CPZ) est recommandée. Dans le cas de la CPZ testée selon le protocole standard dans l'essai 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. Chaque laboratoire menant cet essai doit établir sa propre base de données historiques, y compris pour le photo-effet moyen (MPE, *Mean Photo Effect*), afin d'assurer un suivi des performances dans le temps (Tableau 1).

35. À la place de la CPZ, d'autres produits chimiques phototoxiques convenant à la classe chimique ou aux caractéristiques de solubilité du produit chimique testé peuvent aussi être utilisés en tant que témoins positifs parallèles (Tableau 1).

Mode opératoire (8)(9)(10)(22)(23)(24) :*Premier jour :*

36. 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/puit). Préparer deux plaques pour chaque série de concentrations du produit chimique testé, y compris les témoins de solvant. Préparer également deux plaques pour les témoins positifs, y compris les témoins de solvant.

37. Incuber les cellules pendant 18 à 24 heures (voir 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 :

38. 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 (voir paragraphe 17). Ajouter 100 µl de la solution tamponnée contenant la concentration appropriée du produit chimique testé, ou uniquement du solvant (témoin négatif). Appliquer huit concentrations distinctes du produit chimique testé aux deux plaques. Incuber les cellules en présence du produit chimique testé à l'obscurité pendant 60 minutes.

39. Sur les deux plaques préparées pour chacune des huit concentrations du produit chimique testé, ainsi que pour les témoins, une plaque est sélectionnée pour la détermination de la cytotoxicité (-Irr) (c.-à-d., la plaque témoin), et l'autre (la plaque de traitement) pour la détermination de la photocytotoxicité (+Irr).

40. 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 (c.-à-d., 5 J/cm² ; voir également l'Annexe C). Conserver les plaques non irradiées (-Irr) à température ambiante à l'obscurité pendant 50 minutes (= durée de l'exposition à la lumière).

41. Décanter la solution d'essai et laver délicatement deux fois avec 150 µl de la solution tamponnée utilisée pour l'incubation, mais ne contenant pas le produit chimique testé. Remplacer le tampon par le milieu de culture et incuber jusqu'au lendemain (soit 18-24 heures) (voir paragraphe 12).

Troisième jour :

Évaluation au microscope

42. 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 (NRU)

43. Laver les cellules avec 150 µl de la solution tamponnée préchauffée à 37 °C. Éliminer la solution tamponnée. Ajouter 100 µl de milieu sans sérum à 50 µg/ml de NR (chlorure de 3-amino-7-diméthylamino-2-méthylphénazine, n°CAS 553-24-2 ; C.I. 50040) (23) et incuber selon la procédure décrite au paragraphe 12, pendant 3 heures.

44. 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.
45. 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).
46. Passer doucement la plaque de microtitrage à l'agitateur pendant 10 minutes au moins, jusqu'à ce que le NR soit extrait des cellules et forme une solution homogène.
47. Mesurer la densité optique de l'extrait de NR à 540±10 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

48. Les concentrations utilisées doivent permettre une analyse significative des courbes concentration-effet obtenues avec et sans exposition à la lumière, et si possible de la concentration du produit chimique testé à laquelle la viabilité cellulaire est réduite de moitié (CE₅₀). Si l'on constate une cytotoxicité, il y a lieu d'ajuster la gamme des concentrations pour pouvoir enregistrer la gamme des réponses aux concentrations (p. ex., les concentrations provoquant une viabilité supérieure ou inférieure à 50 %).
49. 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.
50. 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, notamment la plage ou l'espacement des concentrations, la durée d'incubation, et la durée d'exposition à la lumière. Une réduction de cette durée d'exposition peut présenter un intérêt pour les produits chimiques instables dans l'eau.

Évaluation des résultats

51. 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).
52. Pour le calcul des mesures de photocytotoxicité (voir ci-après), l'ensemble des valeurs discrètes de concentration-effet doit être déterminé par une courbe concentration-effet continue appropriée (modèle). On fait généralement concorder la courbe aux données en appliquant une méthode de régression non linéaire (25). Pour évaluer l'influence de la variabilité des données sur la courbe ajustée, il est recommandé d'employer une procédure de type « bootstrap ».
53. On calcule un PIF à l'aide de la formule suivante :

$$PIF = \frac{CE_{50}(-Irr)}{CE_{50}(+Irr)}$$

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 le produit chimique testé.

54. Le MPE est une mesure basée sur une comparaison des courbes de concentration-effet complètes (26). Il correspond à la moyenne pondérée d'un ensemble représentatif de valeurs du photo-effet.

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^n w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

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

$$DEc = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

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 $Rc (-Irr)$, la dose-effet est fixée à 1. Les facteurs de pondération w_i sont donnés par la valeur la plus élevée, soit $w_i = \text{MAX} \{Ri (+Irr), Ri (-Irr)\}$. 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 %. 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 ». Le produit chimique est ensuite classé ou non comme étant phototoxique, selon que la valeur MPE est supérieure ou non à une valeur de seuil correctement choisie ($MPE_c \geq 0,15$).

55. Un logiciel de calcul des PIF et MPE est disponible auprès du Secrétariat de l'OCDE (27).

Interprétation des résultats

56. Sur la base de l'étude de validation (10), un produit chimique testé dont le PIF est < 2 ou le MPE $< 0,1$ ne présente « aucune phototoxicité ». Un PIF ≥ 2 et < 5 ou un MPE $\geq 0,1$ et $< 0,15$ indique une « phototoxicité probable » et un PIF ≥ 5 ou un MPE $\geq 0,15$ indique une « phototoxicité ». Il peut être nécessaire de s'appuyer sur d'autres recommandations spécifiques à certains produits pharmaceutiques (6).

Prédiction	PIF		MPE
Aucune phototoxicité	PIF < 2	ou	MPE $< 0,1$

Phototoxicité probable*	$PIF \geq 2$ et < 5	ou	$MPE \geq 0,1$ et $< 0,15$
-------------------------	-----------------------	----	----------------------------

Phototoxicité	$PIF \geq 5$	ou	$MPE \geq 0,15$
---------------	--------------	----	-----------------

Note : * dans le domaine des produits pharmaceutiques, la pertinence des produits chimiques relevant de cette catégorie pour les médicaments systémiques est remise en question et aucune évaluation supplémentaire du potentiel phototoxique n'est nécessaire (6).

57. Pour les laboratoires qui entreprennent cet essai pour la première fois, il est préconisé de procéder à un essai sur les substances d'épreuve de compétence fournies au Tableau 1, avant d'entreprendre l'évaluation phototoxique de produits chimiques à tester. Les valeurs PIF ou MPE doivent être proches des valeurs données dans le Tableau 1 (9)(10)(11).

Tableau 1. Substances d'épreuve de compétence

Produit chimique	N °CAS	PIF	MPE	Phototoxique	Pic d'absorption
Amiodarone HCL	19774- 82-4	> 3.25	0.27- 0.54	Oui	242 nm 300 nm (épaule) dans l'éthanol
Chloropromazine HCL	69-09-0	> 14.4	0.33- 0.63	Oui	309 nm dans l'éthanol
Norfloxacin	70458- 96-7	> 71.6	0.34- 0.90	Oui	316 nm dans l'acétonitrile
Anthracène	120-12-7	> 18.5	0.19- 0.81	Oui	356 nm dans l'acétonitrile
Protoporphyrine IX, Disodium	50865- 01-5	> 45.3	0.54- 0.74	Oui	402 nm dans l'éthanol
L – Histidine	7006-35- 1	pas de PIF	0.05- 0.10	Non	211 nm dans l'eau
Hexachlorophène	70-30-4	1.1-1.7	0.00- 0.05	Non	299 nm 317 nm (épaule) dans l'éthanol
Dodécyl sulfate de sodium	151-21-3	1.0-1.9	0.00- 0.05	Non	pas d'absorption dans l'eau

Source : valeurs issues de Spielmann et al. 1998 (9).

Interprétation des données

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

Rapport d'essai

60. 33. Le rapport d'essai contient les informations suivantes :

Produit chimique testé :

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

Solvant :

- justification du choix du solvant ;
- solubilité du produit chimique testé dans le solvant ;
- pourcentage de solvant présent dans le milieu de traitement.

Cellules :

- type et source des cellules utilisées ;
- absence de mycoplasmes et autre contamination ;
- nombre de repiquages des cellules ;
- sensibilité des cellules à la lumière pour une plage de repiquages donnée, déterminée avec la source lumineuse utilisée 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 le produit chimique :

- justification du choix des concentrations du produit chimique testé utilisées en présence et en absence de lumière ;
- en cas de solubilité limitée du produit chimique testé 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) ; exposition à la lumière :

- 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'exposition à la lumière et aux cultures cellulaires maintenues en parallèle 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 du produit chimique testé, exprimée en pourcentage de la viabilité moyenne des témoins de solvant ;
- courbes concentration-réponse (concentration du produit chimique testé – viabilité cellulaire relative) obtenues dans les expériences +Irr et -Irr parallèles ;
- analyse des courbes concentration-réponse : si possible, calcul/détermination des CE₅₀ (+Irr) et CE₅₀ (-Irr) ;

- comparaison des deux courbes concentration-effet obtenues en présence et en absence de lumière, soit par le calcul du facteur de photo-irritation (PIF), soit par le calcul du photo-effet moyen (MPE), en fonction de la courbe dose-effet ;
- 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.

RÉFÉRENCES

- (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. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In "Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-XXXV.
- (3) 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, 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) Bauer D, Averett LA, De Smedt A, Kleinman MH, Muster W, Pettersen BA, Robles C. (2014). Standardized UV-vis spectra as the foundation for a threshold-based, integrated photosafety evaluation. Regul Toxicol Pharmacol, 68: 70-75.
- (6) ICH S10 Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals. Guidance for Industry. January 2015. <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm065007.htm>
- (7) OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 7 "Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water" Environment Directorate, OECD, Paris
- (8) 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., Pfannenbecker, 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. *Toxic. In vitro* 8, 793-796.
- (9) 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, 7-8.
- (10) 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). 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.
- (11) OECD (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, available upon request from the Secretariat
- (12) Lynch AM, Guzzie PJ, Bauer D, Gocke E, Itoh S, Jacobs A, Frul CA, Schepky A, Tanaka N, Kasper P. (2011) Consideration on photochemical genotoxicity. II: report of the 2009 International Workshop on Genotoxicity Testing Working Group. *Mutat Res* 723: 91-100.
- (13) Ceridono M, Tellner Par, Bauer D, Barroso J, Alépée N, Corvi R, De Smedt A, Fellows MD, Gibbs NK, Heisler E, Jacobs A, Jirova D, Jones D, Kanádarová H, Kasper P, Akunda JK, Krul C, Learn D, Liebsch M, Lynch AM, Muster W, Nakamura K, Nash JF, Pfannenbecker U, Phillips G, Robles C, Rogiers V, Van De Water F, Liminga UW, Vohr HW, Wattrelos O, Woods J, Zuang V, Kreysa J, Wilcox P. (2012) The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test: practical experience and implications for phototoxicity Testing – The report of an ECVAM-EFPIA workshop. *Reg Tox Pharm.* 63: 480-488.
- (14) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Lett.*, 24, 119-124.
- (15) Brunk UT, Svensson I (1999) Oxidative stress, growth factor starvation and Fas activation may all cause apoptosis through lysosomal leak. *Redox Report*; 4(1-2): 3-11.
- (16) Johansson A-C, Appelqvist H, Nilsson C, Kågedal K, Roberg K, Öllinger K. (2010) Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis.*;15(5):527-540. doi:10.1007/s10495-009-0452-5)
- (17) OECD (2018). Guidance Document on Good *In vitro* Methods Practices (GIVIMP). OECD Series on Testing and Assessment No. 286. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2018\)1&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2018)1&doclanguage=en)
- (18) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. *Analytical Biochemistry*

171, 225-237.

- (19) Lambert L.A, Wamer W.G., and 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.
- (20) 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.
- (21) ISO 10977. (1993). Photography - Processed photographic colour films and paper prints - Methods for measuring image stability.
- (22) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumination, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275
- (23) ZEBET/ECVAM/COLIPA - Standard Operating Procedure: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.
- (24) 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.
- (25) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. *J. Biol. Systems* 3, 127-138.
- (26) 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.
- (27) Software to be used with TG 432: phototox version 2.0
<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/section4software.htm>
- (28) INVITTOX Protocol 78. 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) Phototoxicity Assay. ECVAM DB-ALM; 2008. <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (29) Baker C. S., 1998. Crystallization of neutral red vital stain from minimum essential medium due to pH instability. *In vitro Cell Dev Biol Anim.* 1998 Sep;34(8):607-8

Annexe A DÉFINITIONS

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.

CE₅₀ : concentration du produit chimique d'essai chimique testé à laquelle la viabilité cellulaire est réduite de 50 pour cent.

CEM : le coefficient d'extinction molaire (également appelé coefficient d'absorption molaire ou absorptivité molaire) est une constante établie dans des conditions spécifiques (solvant, température, longueur d'onde, notamment) caractérisant, pour toute molécule, l'efficacité avec laquelle cette molécule peut absorber un photon (généralement exprimé en L·mol⁻¹·cm⁻¹).

Dose de lumière : quantité (= intensité × temps) de rayonnement ultraviolet (UV) ou visible incident sur une surface, exprimée en Joules (= W × s) par unité de surface, par exemple, J/m² ou J/cm².

Irradiance : intensité du rayonnement ultraviolet (UV) ou visible incident sur une surface, mesurée en W/m² ou en mW/cm².

Mélange : mélange ou solution composée de deux substances ou plus, qui ne réagissent pas entre elles (4).

MPE (photo-effet moyen) : mesure dérivée d'une analyse mathématique du tracé de deux courbes concentration-effet obtenues avec (+Irr) ou sans (-Irr) exposition irradiation non cytotoxique par un rayonnement aux UVA/ à la lumière 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 l'exposition de la peau à la lumière après administration systémique d'un produit chimique.

PIF (facteur de photo-irritation) : facteur obtenu en comparant deux concentrations cytotoxiques efficaces (CE₅₀) du produit chimique d'essai chimique testé, obtenues en absence (-Irr) ou en présence (+Irr) d'une irradiation exposition non cytotoxique aux par un rayonnement UVA/à la lumière visible.

Viabilité cellulaire relative : 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.

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.

Annexe B Le rôle de l'essai 3T3 NRU dans une approche par étapes d'évaluation de la phototoxicité des produits chimiques testés.

Note : Dans certaines lignes directrices officielles, d'autres valeurs seuil ont parfois été utilisées pour le coefficient d'extinction/absorption molaire (MEC). La valeur $MEC > 1000 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ est tirée de données scientifiques (5) mais, en cas de doute, il convient de contacter les autorités compétentes.

Évaluation initiale des propriétés physiques, chimiques et toxicologiques du produit chimique d'essai

- Propriétés physiques et chimiques
- Structure chimique, alertes structurelles
- Absorption UV/ vis
- QSAR - photochimie
- Toxicité générale (y compris cinétique et métabolisme)

Spectre d'absorption
UV/vis
dans un solvant approprié
(ex. OCDE
LD 101)

Pas d'absorption
[c.-à-d., $MEC < 1000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (5)]

Test de phototoxicité
non nécessaire

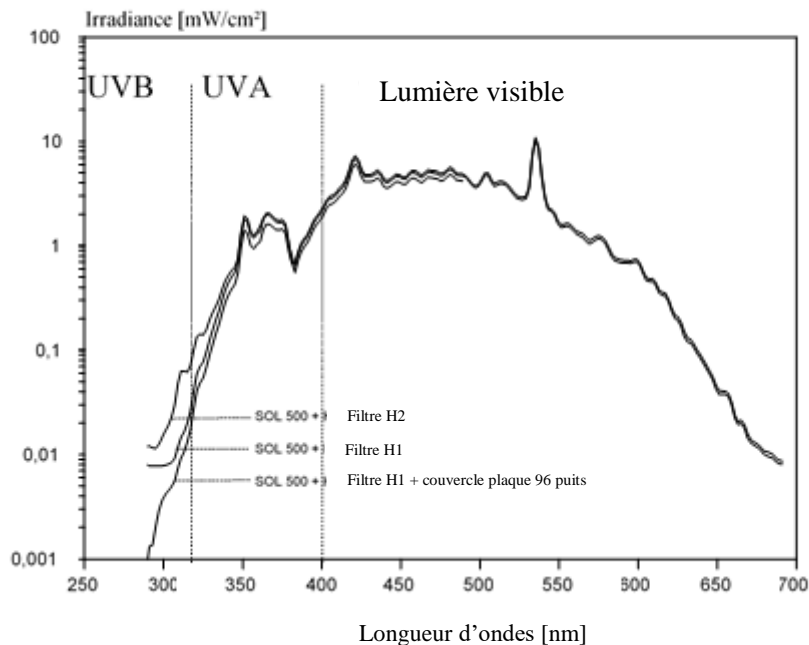
Absorption
[c.-à.d., $MEC > 1000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (5)]

Test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU
et/ou autres méthodes si nécessaire

Annexe C

Graphique 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 de l'essai de phototoxicité 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'exposition pour exciter les produits chimiques qui absorbent généralement la lumière dans la plage des UVB, tels que l'Amiodarone (voir Tableau 2).



Graphique 2. Sensibilité à l'exposition à la lumière des cellules Balb/c 3T3 (mesurée dans la plage des UVA)

Voir paragraphes 24, 28, 29. Sensibilité des cellules Balb/c 3T3 à l'exposition à la lumière 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 que les courbes aux symboles pleins sont associées à des cellules montrant une tolérance acceptable à l'exposition. Ces données ont permis de dériver la dose maximale d'exposition non cytotoxique de 5 J/cm² (ligne discontinue verticale). La ligne de pointillés horizontale montre en outre l'effet maximal d'exposition acceptable (paragraphe 29).

