

**MINISTERE DES AFFAIRES SOCIALES,
DE LA SANTE PUBLIQUE ET DE L'ENVIRONNEMENT**

F. 2001 — 3051

[C — 2001/22685]

14 SEPTEMBRE 2001. — Arrêté royal modifiant l'arrêté royal du 24 mai 1982 réglementant la mise sur le marché de substances pouvant être dangereuses pour l'homme ou son environnement

ALBERT II, Roi des Belges,
A tous, présents et à venir, Salut.

Vu la loi du 21 décembre 1998 relative aux normes de produits ayant pour but la promotion de modes de production et de consommation durables et la protection de l'environnement et de la santé, notamment l'article 5, § 1^{er}, premier alinéa, 5°;

Vu la 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;

Vu l'arrêté royal du 24 mai 1982 réglementant la mise sur le marché de substances pouvant être dangereuses pour l'homme ou son environnement, modifié par les arrêtés royaux des 14 février 1985, 14 septembre 1989, 19 juillet 1994, 13 novembre 1997, 14 décembre 1998, 25 novembre 1999, 4 février 2000, du 28 septembre 2000 et du 11 juillet 2001 et dont l'annexe VI a été rectifiée par l'arrêté ministériel du 10 octobre 2000;

Vu l'association des Gouvernements de région à l'élaboration du présent arrêté;

Vu l'avis du Conseil fédéral du Développement durable du 24 avril 2001;

Vu l'avis du Conseil supérieur d'Hygiène publique du 18 janvier 2001;

Vu l'avis du Conseil de la Consommation du 18 décembre 2000;

Vu l'avis du Conseil central de l'Economie du 19 janvier 2001;

Vu l'avis de l'Inspecteur des Finances, donné le 18 décembre 2000;

Vu l'accord du Ministre du Budget, donné le 19 juillet 2001;

Vu la délibération du Conseil des Ministres sur la demande d'avis dans un délai d'un mois;

Vu l'avis 32103/1/V du Conseil d'Etat, donné le 23 août 2001, en application de l'article 84, alinéa 1^{er}, 1°, des lois sur le Conseil d'Etat, coordonnées le 12 janvier 1973, remplacé par la loi du 4 août 1996;

Sur la proposition de Notre Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,

Nous avons arrêté et arrêtons :

Article 1^{er}. Les annexes de l'arrêté royal du 24 mai 1982 réglementant la mise sur le marché de substances pouvant être dangereuses pour l'homme ou son environnement, sont modifiées comme suit :

Les textes des annexes I et II du présent arrêté sont ajoutés à la partie B de l'annexe V complétée par l'arrêté royal du 14 septembre 1989 et modifiée par les arrêtés royaux des 13 novembre 1997, 14 décembre 1998, et du 11 juillet 2001.

Art. 2. Notre Ministre qui a l'Environnement dans ses attributions est chargée de l'exécution du présent arrêté.

Donné à Bruxelles, le 14 septembre 2001.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation,
de la Santé publique et de l'Environnement,
Mme M. AELVOET

**MINISTERIE VAN SOCIALE ZAKEN,
VOLKSGEZONDHEID EN LEEFMILIEU**

N. 2001 — 3051

[C — 2001/22685]

14 SEPTEMBER 2001. — Koninklijk besluit tot wijziging van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu

ALBERT II, Koning der Belgen,
Aan allen die nu zijn en hierna wezen zullen, Onze Groet.

Gelet op de wet van 21 december 1998 betreffende de productnormen ter bevordering van duurzame productie- en consumptiepatronen en ter bescherming van het leefmilieu en de volksgezondheid, inzonderheid artikel 5, § 1, eerste lid 5°;

Gelet op de richtlijn 2000/33/EG van de Commissie van 25 april 2000 tot zevenentwintigste aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van Richtlijn 67/548/EEG van de Raad betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen;

Gelet op het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu, gewijzigd bij de koninklijke besluiten van 14 februari 1985, 14 september 1989, 19 juli 1994, 13 november 1997, 14 december 1998, 25 november 1999, 4 februari 2000, van 28 september 2000 en van 11 juli 2001 en waarvan bijlage VI gerectificeerd werd door het ministerieel besluit van 10 oktober 2000;

Gelet op de omstandigheid dat de Gewestregeringen bij het ontwerpen van dit besluit betrokken zijn;

Gelet op het advies van de Federale Raad voor Duurzame Ontwikkeling van 24 april 2001;

Gelet op het advies van de Hoge Gezondheidsraad van 18 januari 2001;

Gelet op het advies van de Raad voor het Verbruik van 18 december 2000;

Gelet op het advies van de Centrale Raad voor het Bedrijfsleven van 19 januari 2001;

Gelet op het advies van de Inspecteur van Financiën van 18 december 2000;

Gelet op het akkoord van de Minister van Begroting, gegeven op 19 juli 2001;

Gelet op de beraadslaging van de Ministerraad betreffende de adviesaanvraag binnen een termijn van één maand;

Gelet op het advies 32103/1/V van de Raad van State, gegeven op 23 augustus 2001, met toepassing van artikel 84, eerste lid, 1°, van de wetten op de Raad van State, gecoördineerd op 12 januari 1973, vervangen bij de wet van 4 augustus 1996;

Op de voordracht van Onze Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Hebben Wij besloten en besluiten Wij :

Artikel 1. De bijlagen van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu, worden gewijzigd als volgt :

De tekst van de bijlagen I en II van dit besluit wordt toegevoegd aan deel B van bijlage V aangevuld door het koninklijk besluit van 14 september 1989 en gewijzigd bij de koninklijke besluiten van 13 november 1997, 14 december 1998, en van 11 juli 2001.

Art. 2. Onze Minister bevoegd voor Leefmilieu is belast met de uitvoering van dit besluit.

Gegeven te Brussel, 14 september 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken,
Volksgezondheid en Leefmilieu,
Mevr. M. AELVOET

ANNEXE I

‘B.40. CORROSION CUTANEE

1. METHODE**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 k Ω) (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 tondu 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 μ l) sont appliquées sur la surface épidermique à l'intérieur du tube (figure 2). Pour l'essai de substances 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 μ l), 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 k Ω /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 k Ω , ceci peut être dû au fait que de la substance d'essai recouvre la surface épidermique 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 (k Ω)
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 k Ω , 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 μ l 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 $\sim$ 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 (μ g/disque)
Positif	10 M acide chlorhydrique (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 k Ω 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 référence 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-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl) tétrazolium 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/cm² 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. DONNEES

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. Evaluation 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

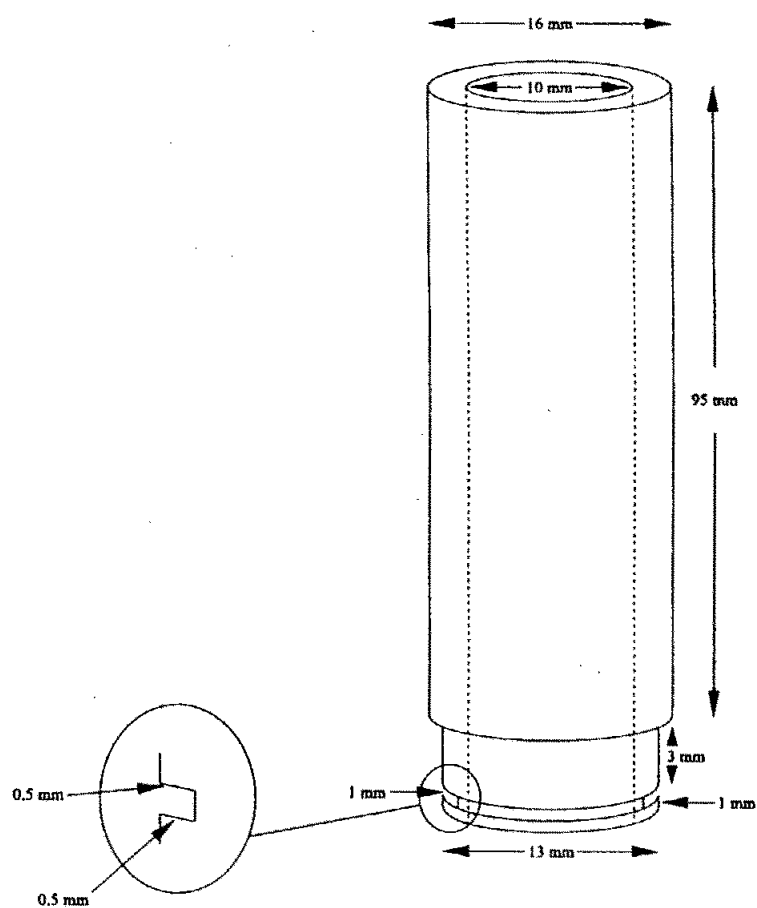
Conclusions

4. REFERENCES 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., Ponc, 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

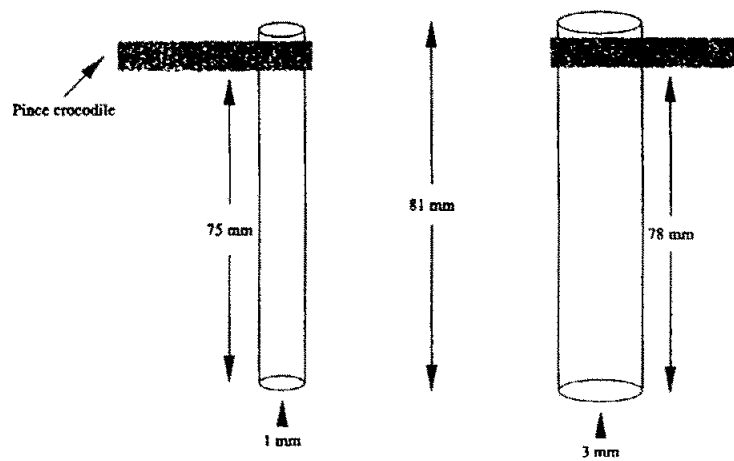
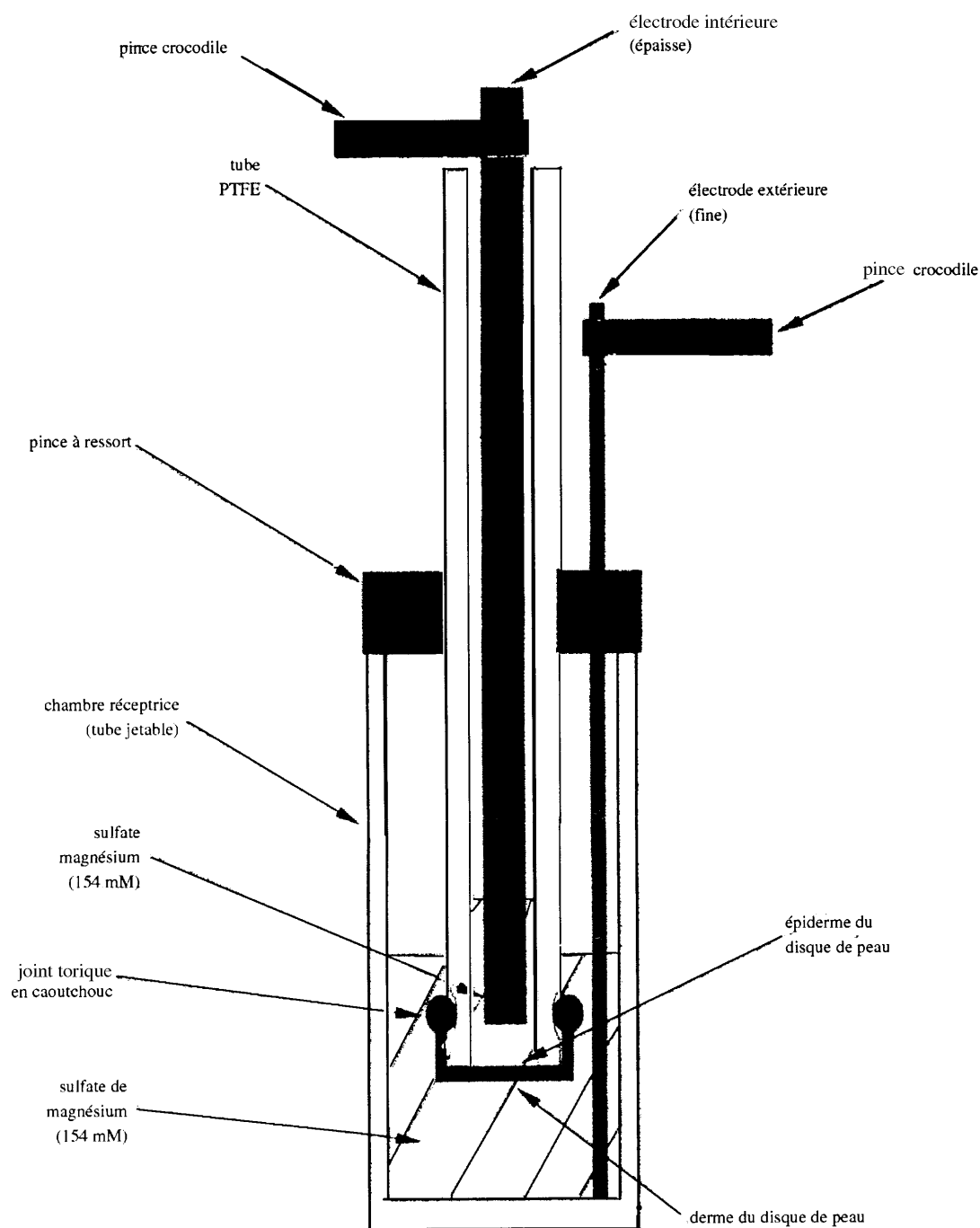


Figure 2
Appareillage pour l'essai RET sur peau de rat



Vu pour être annexé à Notre arrêté du 14 septembre 2001.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,
Mme M. AELVOET

BIJLAGE I

— B.40. HUIDCORROSIE

1. METHODE**1.1. Inleiding**

Twee in vitro-tests voor huidcorrosiviteit, de bepaling aan de hand van de transcutane elektrische weerstand (TEW) in rattenhuid en een test met een model van de humane huid, zijn door het Europees Centrum voor de validering van alternatieve methoden (ECVAM) van het Gemeenschappelijk Centrum voor onderzoek van de Europese Commissie als wetenschappelijk verantwoord bekrachtigd (1) (2) (3). Bij het valideringsonderzoek van het ECVAM is aangetoond dat met beide tests een betrouwbaar onderscheid kan worden gemaakt tussen stoffen waarvan bekend is dat ze corrosief c.q. niet-corrosief voor de huid zijn. Bovendien kon met het testprotocol op basis van het model van de humane huid een correct onderscheid worden gemaakt tussen stoffen met een meer of minder hevige corrosieve werking (stoffen waarvan bekend is dat ze ernstig corrosief voor de huid zijn, R35, en andere stoffen die corrosief voor de huid zijn, R34) (2). Voor beide tests wordt een beschrijving en een procedure vermeld; de keuze van de te gebruiken test wordt bepaald door de specifieke eisen en voorkeuren van de gebruiker.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. Definities

Huidcorrosie: het ontstaan van onomkeerbare weefselschade in de huid na het aanbrengen van testmateriaal.

1.3. Referentiestoffen

Er worden geen referentiestoffen gespecificeerd, maar zie ook de punten 1.5.3.4 en 1.7.2.3.

1.4. Principe van de testmethode - TEW-bepaling met rattenhuid

Het testmateriaal wordt gedurende maximaal 24 uur aangebracht op het oppervlak van de epidermis van huidschijfjes die uit de huid van op humane wijze gedode jonge ratten worden genomen. Corrosief materiaal wordt gekenmerkt doordat het kan leiden tot een verlies van de normale integriteit en barrièrefunctie van het stratum corneum, dat wordt gemeten als een daling van de inherente TEW tot onder een drempelwaarde (5 k Ω) (4) (5). Irriterende en niet-irriterende materialen verlagen de TEW niet tot onder de drempelwaarde.

Voor oppervlakteactieve stoffen en neutrale organische verbindingen (zie referentie (6) voor een definitie) kan in de testprocedure een kleurstofbindende stap worden opgenomen om te zorgen dat er specifiek met deze soorten chemische stoffen minder vals-positieve resultaten worden verkregen (2) (7).

1.5. Beschrijving van de testmethode - TEW-bepaling met rattenhuid**1.5.1. Dieren**

Jonge (20-23 dagen) ratten (Wistar of een vergelijkbare stam) zijn nodig voor het prepareren van de huidschijfjes. Het haar op de rug en de flanken wordt met een kleine dierschaaar zorgvuldig verwijderd. De dieren worden vervolgens gewassen door zorgvuldig te wrijven terwijl het gebied wordt ondergedompeld in een antibioticaoplossing (die bijvoorbeeld streptomycine, penicilline, chlooramfenicol of amfotericine bevat met een concentratie die werkzaam is voor het remmen van de groei van bacteriën). De dieren worden op de derde of vierde dag na de eerste maal wassen opnieuw met antibiotica gewassen en binnen drie dagen gebruikt (de dieren mogen voor het prepareren van de huid niet ouder dan 31 dagen zijn).

1.5.2. Het prepareren van de huidschijfjes

De dieren worden op humane wijze gedood. Vervolgens wordt de huid van de rug van elk dier verwijderd en van overtollig vet ontdaan door het voorzichtig van de huid los te trekken. De huid wordt over het uiteinde van een PTFE-buis (polytetrafluoretheen) gelegd, waarbij ervoor wordt gezorgd dat het oppervlak van de epidermis in contact met de buis is. Een rubber "O" ring wordt strak over het uiteinde van de buis geschoven om de huid op zijn plaats te houden en het overtollige weefsel wordt weggeknipt. In figuur 1 worden de afmetingen van de buis en de "O" ring aangegeven. Vervolgens wordt de rubber "O" ring zorgvuldig met vaseline aan de PTFE-buis vastgekit. De buis wordt met een klemring vastgezet in een houder die een magnesiumsulfaatoplossing (154 mM) bevat (figuur 2).

1.5.3. Testprocedure**1.5.3.1. Aanbrengen van het testmateriaal**

Vloeibare teststoffen (150 μ l) worden op het oppervlak van de epidermis in de buis aangebracht (figuur 2).

Wanneer vast materiaal wordt getest, wordt een zodanige hoeveelheid van de vaste stof op het schijfje aangebracht, dat het hele oppervlak van de epidermis bedekt is. Vervolgens wordt gedeïoniseerd water (150 μ l) boven op de vaste stof toegevoegd en worden de buizen voorzichtig geschud. De teststoffen moeten een maximaal contact met de huid hebben. Voor sommige vaste stoffen kan dit worden bereikt door ze te verwarmen tot 30 °C om de stof te laten smelten of door ze fijn te malen om een korrelig materiaal of poeder te verkrijgen.

Voor elke teststof worden drie huidschijfjes gebruikt. De teststoffen worden gedurende 24 uur aangebracht (zie ook punt 1.5.3.4). De teststof wordt verwijderd door te spoelen onder een straal leidingwater van maximaal 30 °C tot er geen materiaal meer kan worden verwijderd. De verwijdering van teststoffen die in de buis gestold zijn, kan worden vergemakkelijkt door te spoelen onder een straal warm water van ongeveer 30 °C.

1.5.3.2. TEW-metingen

De TEW wordt gemeten met een wisselstroommeetbrug voor zwakstroom (bv. AIM 401 of 6401 of gelijkwaardig). Alvorens de elektrische weerstand te meten wordt de oppervlaktespanning van de huid verlaagd door zoveel 70 %-ethanol toe te voegen dat de epidermis bedekt is. Na enkele seconden wordt de ethanol verwijderd door de buis om te keren en wordt het weefsel gehydrateerd door 3 ml magnesiumsulfaatoplossing (154 mM) toe te voegen. De elektroden van de meetbrug worden aan weerszijden van het huidschijfje geplaatst om de weerstand in k Ω te meten (zie figuur 2). De afmetingen van de elektrode en de lengte van het stuk elektrode dat onder de krokodillenklem uitkomt, zijn vermeld in figuur 1. De klem van de binnenste (dikke) elektrode rust tijdens de weerstandsmeting op de bovenkant van de PTFE-buis om ervoor te zorgen dat steeds een even lang stuk van de elektrode in de magnesiumsulfaatoplossing steekt. De buitenste (dunne) elektrode wordt zodanig in de houder aangebracht dat deze op de bodem rust. De afstand tussen de onderkant van de klemring en de onderkant van de PTFE-buis wordt constant gehouden (zie figuur 1), aangezien deze afstand de gemeten weerstand beïnvloedt. Als de gemeten weerstand hoger is dan 20 k Ω , kan dit worden veroorzaakt doordat het oppervlak van de epidermis van het huidschijfje met een laag teststof bedekt is. Deze laag kan men trachten te verwijderen door bijvoorbeeld de PTFE-buis met de duim (met handschoenen) dicht te houden en gedurende ongeveer 10 seconden te schudden. De magnesiumsulfaatoplossing wordt weggegooid en de weerstandsmeting wordt met verse magnesiumsulfaatoplossing herhaald. De gemiddelde TEW-resultaten worden geaccepteerd, mits de tegelijkertijd gemeten positieve en negatieve controlewaarden binnen de voor de methode aanvaardbare marges vallen. Als controlestoffen en aanvaardbare weerstandsintervallen voor de

beschreven methodologie en apparatuur worden voorgesteld :

Controle	Stof	Weerstandsinterval (kΩ)
Positief	10 M zoutzuur (36 %)	0,5-1,0
Negatief	Gedestilleerd water	10-25

1.5.3.3. Gewijzigde procedure voor oppervlakreactieve stoffen en neutrale organische verbindingen

Als de TEW van teststoffen die oppervlakreactieve stoffen of neutrale organische verbindingen zijn, lager is dan of gelijk is aan 5 kΩ, kan op de weefsels een bepaling van de kleurstofpenetratie worden uitgevoerd. Via deze procedure wordt bepaald of de resultaten vals-positief zijn (2).

1.5.3.3.1. Aanbrenging en verwijdering van de kleurstof sulforhodamine B

Na de eerste behandeling met de teststof wordt 150 µl van een 10 %-verdunding (g/v) van de kleurstof sulforhodamine B in gedestilleerd water gedurende twee uur aangebracht op het oppervlak van de epidermis van elk huidschijfje. De huidschijfjes worden vervolgens gedurende ongeveer 10 seconden onder een straal leidingwater van ten hoogste kamertemperatuur gespoeld om een eventuele overmaat of ongebonden kleurstof te verwijderen. Elk huidschijfje wordt voorzichtig van de PTFE-buis verwijderd en in een flesje (bv. een glazen scintillatieflesje van 20 ml) met gedeïoniseerd water (8 ml) gelegd. De flesjes worden gedurende 5 minuten zachtjes geschud om eventueel nog resterende overmaat of ongebonden kleurstof te verwijderen. Daarna wordt deze spoelprocedure herhaald en vervolgens worden de huidschijfjes in flesjes met 5 ml 30 % (g/v) natriumdodecylsulfate (SDS) in gedestilleerd water gelegd en een nacht bij 60 °C geïncubeerd. Na incubatie wordt elk huidschijfje verwijderd en weggegooid en wordt de resterende oplossing gedurende 8 minuten bij 21 °C gecentrifugeerd (relatieve centrifugale kracht ~ 175). Vervolgens wordt 1 ml van het supernatans 1:5 (v/v) (d.w.z. 1 ml + 4 ml) verdund met 30 % (g/v) SDS in gedestilleerd water. De optische dichtheid (OD) van de oplossing wordt bij ongeveer 565 nm gemeten.

1.5.3.3.2. Berekening van het kleurstofgehalte

Het gehalte aan de kleurstof sulforhodamine B wordt berekend uit de OD-waarde (de molaire extinctiecoëfficiënt van de kleurstof sulforhodamine B bij 565 nm = $8,7 \times 10^4$ en het molecuulgewicht = 580). Het gehalte aan de kleurstof sulforhodamine B wordt voor elk huidschijfje bepaald en vervolgens wordt voor de duplo's het gemiddelde kleurstofgehalte berekend. De gemiddelde resultaten voor de kleurstofbinding worden geaccepteerd, mits de tegelijkertijd gemeten controlewaarden binnen de voor de methode aanvaardbare marges vallen. Als aanvaardbare intervallen voor het kleurstofgehalte bij de controlestoffen en de beschreven methodologie en apparatuur worden voorgesteld :

Controle	Stof	Interval kleurstofgehalte (µg / schijfje)
Positief	10 M Zoutzuur (36 %)	40-100
Negatief	Gedestilleerd water	15-35

1.5.3.4. Aanvullende informatie

De teststoffen kunnen ook gedurende een kortere periode (bv. 2 uur) op de huidschijfjes worden aangebracht om te bepalen of het materiaal sterk corrosief is. Bij het valideringsonderzoek is echter gebleken dat bij de TEW-bepaling voor verschillende teststoffen een te hoge corrosieve werking werd gevonden nadat ze gedurende 2 uur op de huidschijfjes waren aangebracht (2), terwijl na aanbrengen gedurende 24 uur op correcte wijze onderscheid kon worden gemaakt tussen corrosief en niet-corrosief.

De eigenschappen en afmetingen van de gebruikte testapparatuur en -procedure kunnen de gevonden TEW-waarden beïnvloeden. De corrosiedrempelwaarde van 5 kΩ is bepaald op grond van gegevens die met de specifieke hier beschreven apparatuur en procedure zijn verkregen. Het is mogelijk dat er bij significant gewijzigde testomstandigheden ook andere drempel- en controlewaarden van toepassing zijn. Daarom wordt aanbevolen de methodologie en de drempelwaarde voor de weerstand te kalibreren door een aantal referentiestandaards te testen die worden gekozen uit de chemische stoffen die bij het valideringsonderzoek zijn gebruikt (3).

1.6. Principe van de testmethode - Bepaling met een model van de humane huid

Het testmateriaal wordt gedurende maximaal 4 uur plaatselijk aangebracht op een driedimensionaal model voor de humane huid, bestaande uit een gereconstrueerde epidermis met een functioneel stratum corneum.

Corrosief materiaal wordt gekenmerkt doordat het bij gespecificeerde blootstellingsperioden kan leiden tot een daling van de levensvatbaarheid van de cellen (die bijvoorbeeld wordt bepaald door de reductie van MTT te meten) tot onder gedefinieerde drempelwaarden. Het principe van de bepaling is gebaseerd op de hypothese dat stoffen corrosief zijn wanneer ze (door diffusie of erosie) het stratum corneum kunnen penetreren en voldoende cytotoxisch zijn om in de daaronder liggende cellen celdood te veroorzaken.

1.7. Beschrijving van de testmethode - Bepaling met een model van de humane huid

1.7.1. Modellen van de humane huid

Modellen van de humane huid kunnen van verschillende bronnen afkomstig zijn, maar ze moeten aan bepaalde criteria voldoen. Het model moet een functioneel stratum corneum hebben met daaronder een laag levende cellen. De barrièrefunctie van het stratum corneum moet afdoende zijn. Dit kan worden aangetoond door te demonstreren dat het model bestand is tegen cytotoxiciteit na de toediening van stoffen waarvan bekend is dat ze cytotoxisch zijn voor cellen maar die normaal gesproken het stratum corneum niet kunnen passeren. Er moet worden aangetoond dat het model onder gedefinieerde experimentele omstandigheden reproduceerbare resultaten oplevert.

De levensvatbaarheid van de levende cellen in het model moet zo hoog zijn dat er duidelijk onderscheid kan worden gemaakt tussen de positieve en negatieve controlestoffen. De levensvatbaarheid van de cellen (zoals die bijvoorbeeld wordt gemeten aan de hand van de reductie van MTT, d.w.z. een OD-waarde) na blootstelling aan de negatieve controlestof moet binnen aanvaardbare grenzen voor het specifieke model vallen. Evenzo moeten de waarden voor de levensvatbaarheid van de cellen met de positieve controlestof (in vergelijking met die voor de negatieve controle) binnen gespecificeerde grenzen liggen. Het belangrijkste is dat moet zijn aangetoond dat het gebruikte voorspellingsmodel aan internationale valideringsnormen voldoet (2).

1.7.2. *Testprocedure*

1.7.2.1. Aanbrengen van het testmateriaal

Voor vloeibaar materiaal moet zoveel teststof worden aangebracht dat het huidoppervlak bedekt is (minimaal 25 µl/cm²). Voor vast materiaal moet zoveel teststof worden aangebracht dat het huidoppervlak bedekt is en moet dit vervolgens worden bevochtigd om te zorgen voor een goed contact met de huid; indien nodig moeten vaste stoffen tot een poeder worden vermalen voordat ze worden aangebracht. Van de wijze van aanbrengen moet worden aangetoond dat deze voor een breed scala van chemische stoffen geschikt is (2). Aan het eind van de blootstellingsperiode moet het testmateriaal met een fysiologisch zoutoplossing zorgvuldig van het huidoppervlak worden gewassen.

1.7.2.2. Meting van de levensvatbaarheid van de cellen

Voor de meting van de levensvatbaarheid van de cellen kan een willekeurige kwantitatieve gevalideerde methode worden gebruikt. De meest gebruikte bepaling is de reductie van MTT, waarvan is aangetoond dat deze in verschillende laboratoria nauwkeurige en reproduceerbare resultaten oplevert (2). Het huidschijfje wordt gedurende 3 uur bij 20-28 °C in een MTT-oplossing van 0,3 mg/ml gelegd. Er ontstaat een blauw formazan-neerslag dat vervolgens wordt geëxtraheerd (vloeistofextractie) en de formazanconcentratie wordt gemeten door de OD bij een golflengte tussen 545 en 595 nm te bepalen.

1.7.2.3. Aanvullende informatie

Het gebruikte huidmodel en het exacte protocol voor de blootstellingstijd, de spoelprocedures enz. hebben een grote invloed op de resultaten van de bepaling van de levensvatbaarheid van de cellen. Daarom wordt aanbevolen de methodologie en het voorspellingsmodel te kalibreren door een aantal referentiestandaards te testen die worden gekozen uit de chemische stoffen die bij het valideringsonderzoek van het ECVAM zijn gebruikt (3). Het is van fundamenteel belang dat wordt aangetoond dat de gebruikte methode voor een breed scala van chemische stoffen zowel binnen één laboratorium als voor verschillende laboratoria overeenkomstig de internationale normen reproduceerbaar is. De methode moet minimaal voldoen aan de reeds eerder vastgestelde criteria voor wetenschappelijk verantwoorde tests (2) en de resultaten van een dergelijk valideringsonderzoek moeten in een wetenschappelijk tijdschrift met intercollegiale toetsing ("peer review") worden gepubliceerd.

2. GEGEVENS

2.1. Behandeling van de resultaten

2.1.1. *TEW-bepaling met rattenhuid*

De weerstand (in kΩ) voor het testmateriaal, de positieve en negatieve controles en eventuele standaard-referentiestoffen moeten in tabelvorm worden gerapporteerd, met vermelding van gegevens over duplobepalingen, herhaalde bepalingen, gemiddelden en de daaruit afgeleide indeling.

2.1.2. *Bepaling met een model van de humane huid*

De OD-waarden en de berekende procentuele levensvatbaarheid van de cellen voor het testmateriaal, de positieve en negatieve controles en eventuele standaardreferentiestoffen moeten in tabelvorm worden gerapporteerd, met vermelding van gegevens over duplobepalingen, herhaalde bepalingen, gemiddelden en de daaruit afgeleide indeling.

2.2. Evaluatie en interpretatie van de resultaten

2.2.1. *TEW-bepaling met rattenhuid*

Als de gemiddelde TEW voor de teststof hoger is dan 5 KΩ, is de stof niet corrosief. Als de TEW-waarde 5 kΩ of lager is en de teststof geen oppervlakteactieve stof of neutrale organische verbinding is, is de stof wel corrosief.

Voor oppervlakteactieve stoffen of neutrale organische verbindingen die een TEW van 5 kΩ of lager opleveren, kan een bepaling van de kleurstofpenetratie worden uitgevoerd. Als het gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje hoger is dan of gelijk is aan het tegelijkertijd bepaalde gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje met de positieve controle (36 % HCl), is de teststof echt positief en derhalve corrosief. Als het gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje lager is dan het tegelijkertijd bepaalde gemiddelde kleurstofgehalte van het schijfje met de positieve controle (36 % HCl), is de teststof vals-positief en derhalve niet corrosief.

2.2.2. *Bepaling met een model van de humane huid*

De OD-waarde van de negatieve controle komt overeen met een levensvatbaarheid van de cellen van 100 %, zodat de voor elk testmonster bepaalde OD-waarden kunnen worden gebruikt voor de berekening van een procentuele levensvatbaarheid in vergelijking met de negatieve controle. De grenswaarde van de procentuele levensvatbaarheid van de cellen die als scheiding tussen corrosieve en niet-corrosieve materialen (of tussen verschillende klassen van corrosiviteit) fungeert, moet in het voorspellingsmodel duidelijk worden gespecificeerd alvorens de methode wordt gevalideerd en vervolgens moet in het valideringsonderzoek worden aangetoond dat deze grenswaarde correct is (2).

3. RAPPORTAGE

Testverslag

In het testverslag moet ten minste de volgende informatie worden opgenomen :

Teststof :

- gegevens over identificatie, fysisch karakter en indien van toepassing fysisch-chemische eigenschappen.

Indien referentiestoffen worden gebruikt, moet ook daarover dergelijke informatie worden verstrekt.

Testomstandigheden :

- gedetailleerde informatie over de gebruikte testprocedure;
- een beschrijving en motivering van eventuele wijzigingen.

Resultaten :

- een tabel met de waarden voor de weerstand (TEW-bepaling) of de procentuele levensvatbaarheid van de cellen (bepaling met een model van de humane huid) voor het testmateriaal, de positieve en negatieve controles en eventuele standaardreferentiestoffen, met vermelding van gegevens over dublobepalingen, herhaalde bepalingen en gemiddelden;

- een beschrijving van eventuele andere waargenomen effecten.

Bespreking van de resultaten.

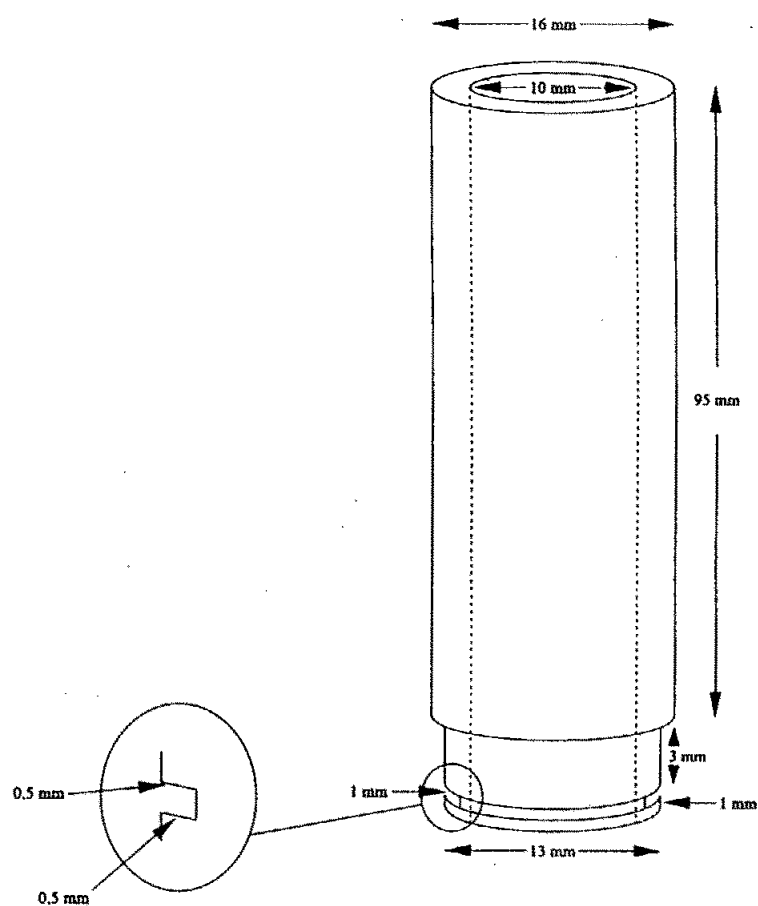
Conclusies.

4. REFERENTIES

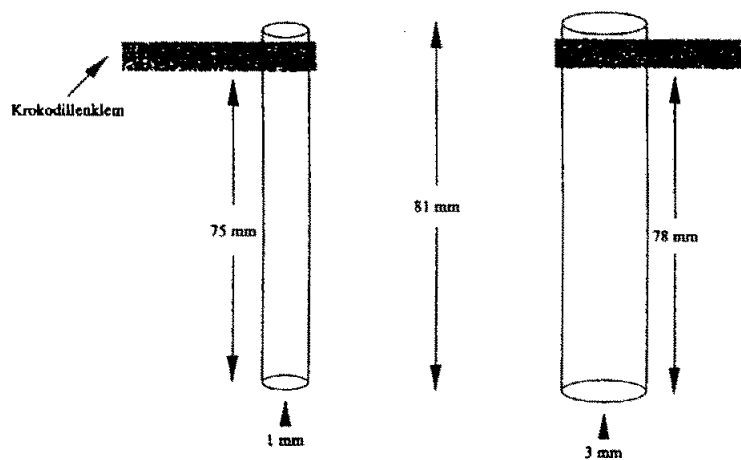
- (1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, ATLA 26, blz. 275-280.
- (2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, Toxicology in Vitro 12, blz. 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, blz. 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, blz. 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, blz. 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, blz. 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., Ponc, 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, blz. 219-255.

Figuur 1

Afmetingen PTFE-buis

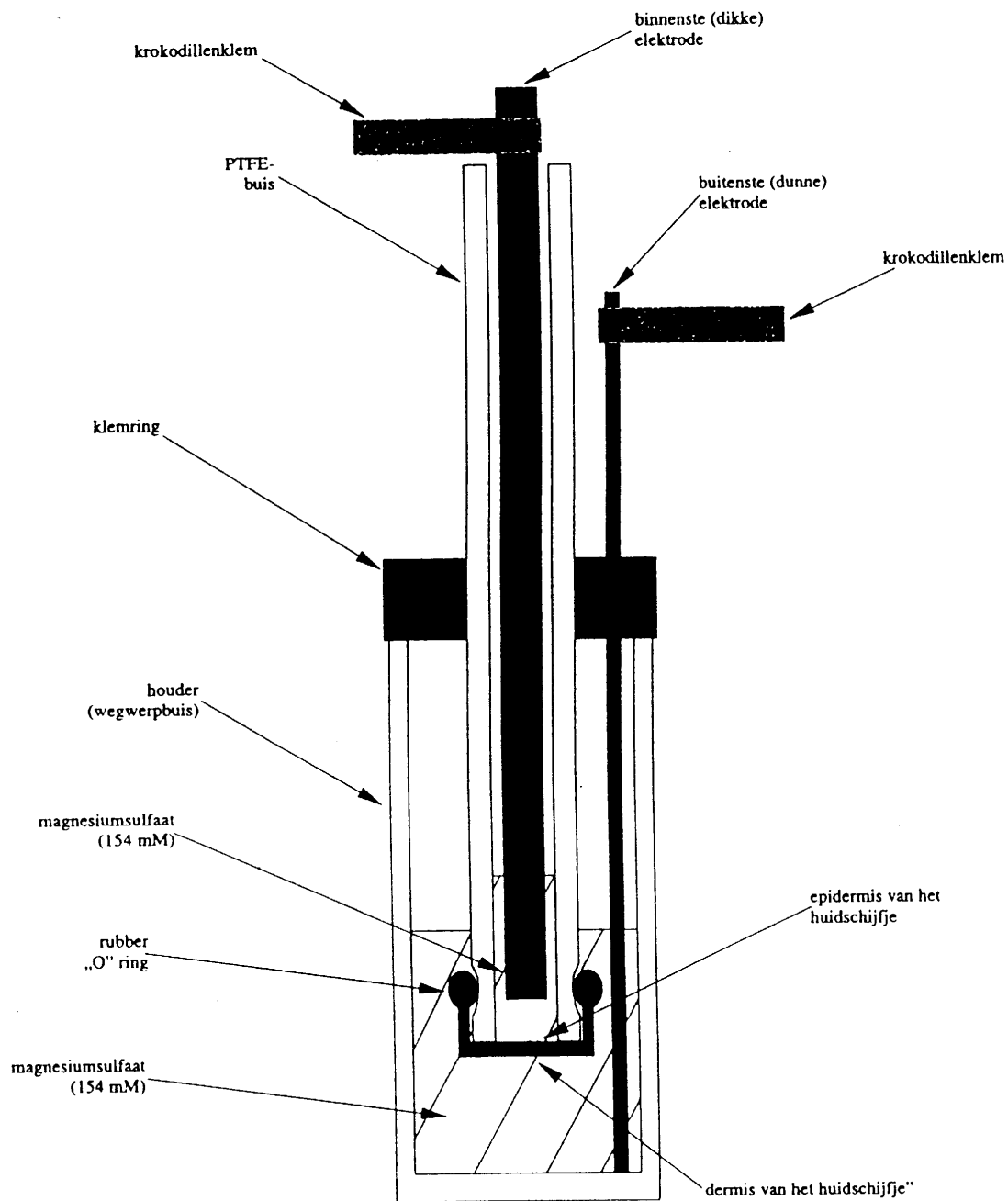


Afmetingen elektrode



Figuur 2

Apparatuur voor de TEW-bepaling bij rattenhuid



Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 14 september 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,
Mevr. M. AELVOET

ANNEXE II

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

1. METHODE**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 photoirritante 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/photoirritation 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 x temps) de rayonnement ultraviolet (UV) ou visible incident sur une surface, exprimée en Joules (= $W \times s$) par unité de surface, par exemple, J/m^2 ou J/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 "photocancérogénicité" 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 $10 \text{ litre} \times \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 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 ($\text{OD}_{540 \text{ NRU}}$), 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 $\text{OD}_{540 \text{ NRU}}$ des témoins non traités est $\geq 0,2$.

Témoin positif : pour chaque test de phototoxicité in vitro 3T3 NRU réalisé, un produit chimique phototoxique connu doit être testé concurrentement. 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) :

$\text{EC}_{50} = 0,1$ à $2,0 \text{ } \mu\text{g/ml}$, CPZ non irradiée (- UVA) : $\text{EC}_{50} = 7,0$ à $90,0 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Le facteur de photo-irritation (PIF), c'est-à-dire la variation de l' EC_{50} doit être 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 contrôlées 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 appropriées 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 % CO₂. 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 estensemencé avec une densité de cellules telle que les cultures n'arrivent pas à confluence avant la fin de l'essai, c'est-à-dire au moment où la viabilité cellulaire est déterminée, 48 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 cancérigène, 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/cm² (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/cm² dans un délai de 50 min, l'irradiance doit être réglée à 1,666 mW/cm². 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 :

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

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 % CO₂, 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 % CO₂, 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/cm² (= 5 J/cm²). Ventiler avec un ventilateur pour éviter la condensation d'H₂O 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 % CO₂, 37 °C) jusqu'au lendemain (18-22 h).

1.7.3.3. Troisième jour

Evaluation 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. Eliminer la solution de lavage en tapotant légèrement. Ajouter 100 µl de milieu NR et incuber à 37 °C en atmosphère humidifiée/7,5 % CO₂ 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. DONNEES

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. Etant 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. Evaluation 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 :

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

Un $PIF < 5$ indique une absence de potentiel phototoxique, alors qu'un $PIF \geq 5$ 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":

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

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.

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

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)

A 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 ($PIF \geq 5$ ou $MPE \geq 0,1$) 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 RESULTATS

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 CO₂, 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/cm²,
- durée de l'exposition UV/lumière visible,
- dose d'UVA (irradiance x temps), exprimée en J/cm²,
- 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 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 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 EC₅₀ (+ UVA) et EC₅₀ (- 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 :
 - EC₅₀ (+ UVA) et EC₅₀ (- UVA) et PIF du produit chimique témoin positif,
 - données historiques sur le produit chimique témoin positif : EC₅₀ (+ UVA) et EC₅₀ (- UVA) et PIF, écart moyen et écart type.

*Discussion des résultats**Conclusions*

4. REFERENCES

(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., 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, *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. (1 994) , 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 Hl 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".

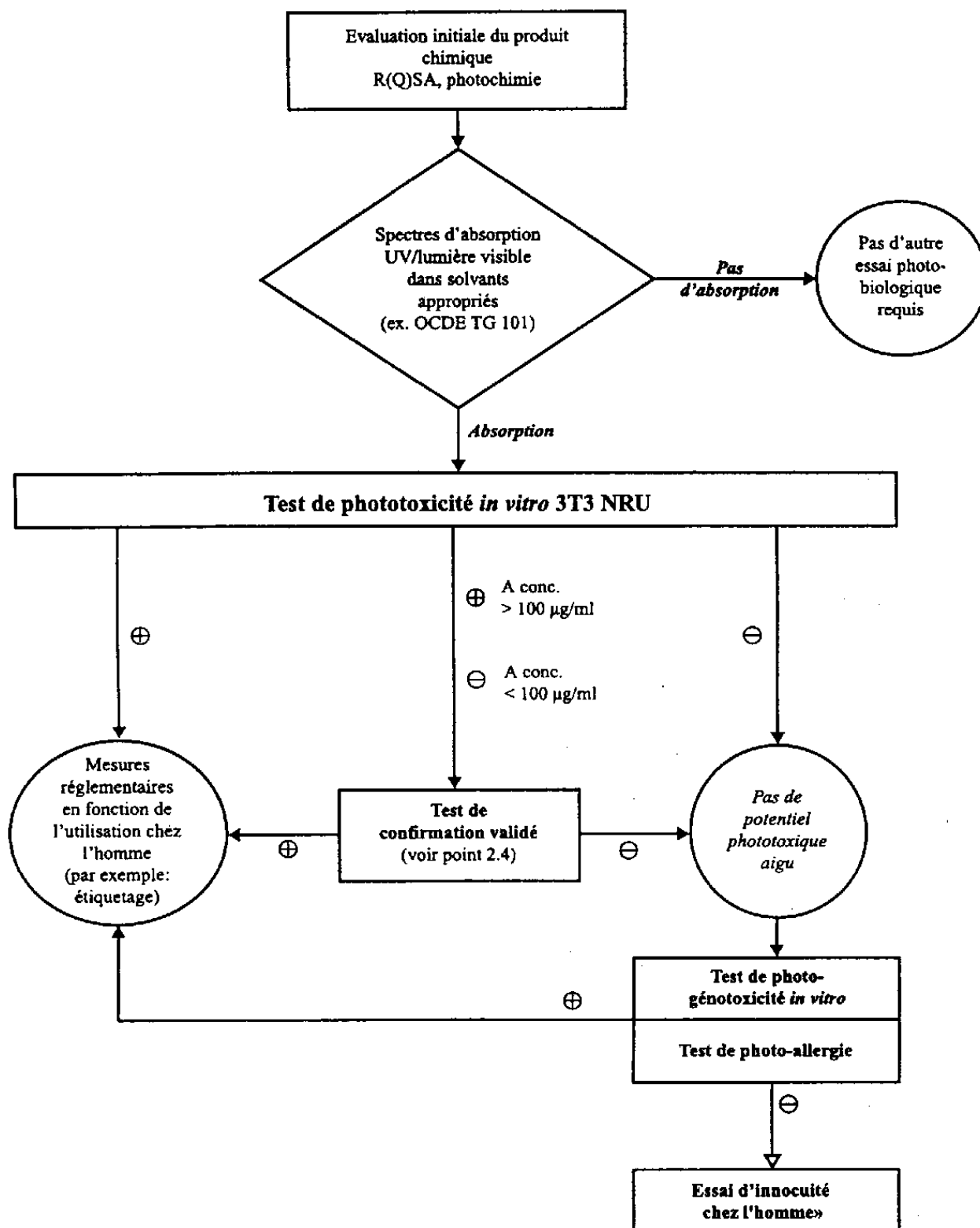
(13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998) , A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU In Vitro Phototoxicity 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



Vu pour être annexé à Notre arrêté du 14 septembre 2001.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,
Mme M. AELVOET

BIJLAGE II

— B.41. FOTOTOXICITEIT- IN VITRO 3T3 NRU FOTOTOXICITEITSTEST

1. METHODE**1.1. Inleiding**

Fototoxiciteit is gedefinieerd als een toxische respons die wordt opgewekt door de blootstelling van de huid aan bepaalde stoffen gevolgd door de blootstelling aan licht dan wel op vergelijkbare wijze wordt geïnduceerd door bestraling van de huid na systemische toediening van een stof.

Informatie die wordt verkregen met de in vitro 3T3 NRU fototoxiciteitstest, wordt gebruikt om het fototoxische potentieel van een onderzochte stof te bepalen, d.w.z. het al dan niet aanwezig zijn van mogelijke risico's die zijn verbonden aan een onderzochte stof in combinatie met de blootstelling aan UV en zichtbaar licht.

Aangezien het toxicologische eindpunt van de in vitro-test wordt gevormd door de bepaling van de fototoxiciteit die wordt geïnduceerd door de gecombineerde werking van een stof en licht, kunnen verbindingen die in vivo fototoxisch zijn na systemische aanbrenging en verdeling op de huid en verbindingen die na topische aanbrenging op de huid een foto-irriterend effect hebben, als zodanig worden herkend.

De in vitro 3T3 NRU fototoxiciteitstest is van 1992-1997 ontwikkeld en gevalideerd in een gezamenlijk EU/Colipa-project (1) (2) (3) om een valide in vitro-alternatief te bieden voor de verschillende in vivo tests die werden gebruikt. In 1996 werd door een OESO-workshop aanbevolen om voor de bepaling van de fototoxiciteit een stapsgewijze in vitro-testprocedure te volgen (4).

Resultaten van de in vitro 3T3 NRU fototoxiciteitstest zijn vergeleken met acute fototoxiciteits- en foto-irritatie-effecten in vivo bij dieren en mensen, waarbij is gebleken dat de test deze effecten uitstekend voorspelt. De test is niet ontworpen om andere nadelige effecten te voorspellen die kunnen optreden bij de gecombineerde blootstelling aan een stof en licht, d.w.z. fotogenotoxiciteit, fotoallergie en fotocarcinogeniciteit, hoewel veel stoffen die deze specifieke eigenschappen hebben bij de in vitro 3T3 NRU fototoxiciteitstest een positieve reactie zullen opleveren. Evenmin is de test bedoeld om de fototoxische potentie te kwantificeren.

Een stapsgewijze procedure voor de uitvoering van fototoxiciteitstests is in het aanhangsel geschetst.

1.2. Definities

Bestralingssterkte : de intensiteit van het ultraviolette (UV) of zichtbare licht dat op een oppervlak valt, uitgedrukt in W/m^2 of mW/cm^2 .

Lichtdosis : de hoeveelheid (= intensiteit x tijd) ultraviolette (UV) of zichtbare straling die op een oppervlak valt uitgedrukt in joules (= Wxs) per oppervlakte-eenheid, d.w.z. J/m^2 of J/cm^2 .

UV-golflengtebanden : de door de CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) aanbevolen indeling is : UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) en UVC (100-280 nm). Er worden ook andere indelingen gehanteerd : de grens tussen UVB en UVA wordt vaak op 320 nm gelegd en UVA wordt soms onderverdeeld in UV-A1 en UV-A2, waarbij de grens ligt op ongeveer 340 nm.

Levensvatbaarheid van cellen : parameter waarmee de totale activiteit van een celpopulatie wordt aangegeven (d.w.z. opname van de vitale kleurstof neutraalrood in cellulaire lysosomen) die, afhankelijk van het gemeten eindpunt en de opzet van de test, is gecorreleerd met het totale aantal en/of de vitaliteit van de cellen.

Relatieve levensvatbaarheid van cellen : levensvatbaarheid van cellen uitgedrukt in verhouding tot negatievecontrolecellen (oplosmiddel) die tijdens de gehele testprocedure worden meegenomen, al dan niet met UV bestraald, maar niet met een onderzochte stof behandeld.

Voorspellend model : een algoritme om de resultaten van een toxiciteitstest om te zetten in een voorspelling van het toxische potentieel. In de hier beschreven test kunnen PIF en MPE worden gebruikt om de resultaten van de in vitro 3T3 NRU fototoxiciteitstest om te zetten in een voorspelling van het fototoxische potentieel.

PIF (foto-irritatiefactor) : een factor die wordt verkregen door twee even effectieve cytotoxische concentraties (EC_{50}) van de onderzochte stof te vergelijken die zijn bepaald zonder (- UV) en met (+ UV) een niet-cytotoxische bestraling met UVA / zichtbaar licht.

MPE (gemiddeld foto-effect) : een nieuwe parameter die wordt bepaald aan de hand van een wiskundige analyse van de volledige vorm van twee concentratiereponskrommen die zijn verkregen zonder (- UV) en met (+ UV) een niet-cytotoxische bestraling met UVA / zichtbaar licht.

Fototoxiciteit : een acute toxische respons die wordt opgewekt door de blootstelling van de huid aan bepaalde stoffen gevolgd door de blootstelling aan licht of op vergelijkbare wijze wordt geïnduceerd door bestraling van de huid na systemische toediening van een stof.

Foto-irritatie : een begrip dat deel uitmaakt van de term "fototoxiciteit" en dat wordt gebruikt om alleen die fototoxische reacties te beschrijven die de huid vertoont na de blootstelling aan stoffen (topisch of oraal).

Deze fototoxische reacties leiden altijd tot specifieke celbeschadiging (zonnebrandachtige reacties).

Fotoallergie : een verworven immunologische reactie die niet optreedt bij een eerste blootstelling aan een stof en licht, maar een inductieperiode van één of twee weken nodig heeft voordat een reactie van de huid kan worden aangetoond.

Fotogenotoxiciteit : een genotoxische respons die wordt waargenomen op een genetisch eindpunt en wordt opgewekt door de blootstelling van cellen aan een niet-genotoxische dosis UV / zichtbaar licht en een niet-genotoxische stof.

Fotocarcinogeniciteit : carcinogeniciteit die wordt geïnduceerd door herhaalde blootstelling aan licht en een chemische stof. De term "foto-cocarcinogenese" wordt gebruikt als door UV geïnduceerde tumorvorming wordt versterkt door een chemische stof.

1.3. Referentiestoffen

Behalve de positieve controlestof chloorpromazine, die in elke proef parallel moet worden getest, wordt aanbevolen voor het opzetten van de 3T3 NRU fototoxiciteitstest als referentiestoffen gebruik te maken van een aantal van de stoffen die bij deze test in interlaboratoriumproeven zijn gebruikt (1) (3) (13).

1.4. Achtergrond

Van veel typen stoffen zijn fototoxische effecten gemeld (5) (6) (7) (8). De enige gemeenschappelijke eigenschap is hun vermogen om lichtenergie te absorberen in het zonlichtgebied. Volgens de eerste wet van de fotochemie (wet van Grotthaus-Draper) is de voorwaarde voor het optreden van een fotoreactie dat er voldoende lichtkwanta worden geabsorbeerd. Voordat wordt overwogen een biologische test volgens de onderhavige methode uit te voeren, moet dan

ook een absorptiespectrum van de te onderzoeken stof in het UV/ zichtbare licht worden bepaald (bv. volgens OESO-testrichtlijn 101). Als de molaire extinctieabsorptiecoëfficiënt minder is dan $10 \text{ liter} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, heeft de stof geen fotoreactief potentieel en hoeft deze niet volgens de in vitro 3T3 NRU fototoxiciteitstest of een andere biologische test te worden getest op nadelige fotochemische effecten (aanhangsel).

1.5. Principe van de testmethode

Er zijn vier mechanismen bekend voor een fototoxische respons als gevolg van de absorptie van licht door een (chemische) chromofor (7). Deze kunnen allen leiden tot celbeschadiging. Daarom is de in vitro 3T3 NRU fototoxiciteitstest gebaseerd op een vergelijking van de cytotoxiciteit van een stof met en zonder de blootstelling aan een niet-cytotoxische dosis UVA/ zichtbaar licht. De cytotoxiciteit wordt in deze test uitgedrukt als de concentratieafhankelijke verlaging van de opname van de vitale kleurstof neutraalrood (NR) (9) 24 uur na de behandeling met de te onderzoeken stof en bestraling.

Balb/c 3T3 cellen worden gedurende 24 uur in cultuur gehouden zodat zich een monocellulaire laag vormt.

Vervolgens worden voor elke te onderzoeken stof twee 96-wells-platen gedurende één uur gepreïncubeerd met acht verschillende concentraties van de stof. Daarna wordt één van de twee platen blootgesteld aan een niet-cytotoxische dosis UVA/ zichtbaar licht van 5 J/cm^2 UVA (+ UV-experiment) terwijl de andere plaat in het donker wordt bewaard (- UV-experiment). In beide platen wordt het behandelingsmedium vervolgens vervangen door cultuurmedium en na nog eens 24 uur incubatie wordt de levensvatbaarheid van de cellen bepaald aan de hand van de opname van neutraalrood (NRU - neutral red uptake) gedurende drie uur. De relatieve levensvatbaarheid van de cellen, uitgedrukt als percentage van de levensvatbaarheid van onbehandelde negatieve controles, wordt voor elk van de acht testconcentraties berekend. Om een uitspraak te doen over het fototoxische potentieel worden de concentratiereponsen die zijn verkregen met (+ UV) en zonder (- UV) bestraling vergeleken, gewoonlijk op het EC_{50} niveau, d.w.z. de concentratie die de levensvatbaarheid van de cellen met 50 % vermindert ten opzichte van onbehandelde controles.

1.6. Kwaliteitscriteria

UVA-gevoeligheid van de cellen, historische gegevens: de cellen moeten regelmatig worden gecontroleerd op gevoeligheid voor UVA. Cellen worden overgeënt met de dichtheid die wordt gebruikt in de in vitro 3T3 NRU fototoxiciteitstest, de volgende dag bestraald met UVA-doses van $1\text{--}9 \text{ J/cm}^2$ en de levensvatbaarheid van de cellen wordt één dag later bepaald door middel van de NRU-test. Cellen voldoen aan de kwaliteitscriteria als hun levensvatbaarheid na bestraling met 5 J/cm^2 UVA ten minste 80 % bedraagt van de levensvatbaarheid van de niet-belichte controles. Bij de hoogste UVA-dosis van 9 J/cm^2 mag de levensvatbaarheid niet minder zijn dan 50 % van die van de niet-belichte controles. Deze controle dient ongeveer om de tien celpassages te worden herhaald.

UVA-gevoeligheid van de negatievecontrolecellen, lopende test: de test voldoet aan de kwaliteitscriteria als negatieve controles (cellen in EBSS (Earl's balanced salt solution) met of zonder 1% dimethylsulfoxide (DMSO) of 1% ethanol (EtOH)) in het +UVA-experiment een levensvatbaarheid vertonen van ten minste 80 % van die van niet-bestraalde cellen in hetzelfde oplosmiddel in het parallel uitgevoerde niet-belichte experiment (- UVA).

Levensvatbaarheid van negatievecontrolecellen: de absolute optische dichtheid ($\text{OD}_{540 \text{ NRU}}$) die wordt gemeten in het NR-extract van de negatieve controles laat zien of de 1×10^4 cellen die per well zijn overgeënt tijdens de twee dagen van de test met de normale verdubbelingstijd zijn gegroeid. Een test voldoet aan de goedkeuringscriteria als de gemiddelde $\text{OD}_{540 \text{ NRU}}$ van onbehandelde controles $\geq 0,2$ is.

Positieve controle: parallel aan elke in vitro 3T3 NRU fototoxiciteitstest moet een bekende fototoxische stof worden getest. Chloorpromazine (CPZ) is als positieve controle gebruikt in de EU/Colipa-valideringsstudie en wordt daarom aanbevolen. Voor CPZ dat wordt getest volgens het standaardprotocol in de in vitro 3T3 NRU fototoxiciteitstest, zijn de volgende goedkeuringcriteria gedefinieerd: CPZ bestraald (+ UVA): $\text{EC}_{50} = 0,1$ tot $2,0 \text{ } \mu\text{g/ml}$, CPZ niet-bestraald (-UVA): $\text{EC}_{50} = 7,0$ tot $90,0 \text{ } \mu\text{g/ml}$. De foto-irritatiefactor (PIF), d.w.z. de verschuiving van EC_{50} moet ten minste 6 zijn.

In plaats van CPZ kunnen ook andere bekende fototoxische stoffen die geschikt zijn wat betreft de chemiële klasse of de oplosbaarheidseigenschappen van de onderzochte stof, als parallelle positieve controle worden gebruikt. In dit geval dienen de bereiken van de EC_{50} waarden en PIF of MPE (gemiddeld foto-effect) uitgaande van historische gegevens op adequate wijze gedefinieerd te zijn als aanvaardbaarheidscriteria voor de test.

1.7. Beschrijving van de testmethode

1.7.1. Voorbereidingen

1.7.1.1. Cellen

In de valideringsstudie is een permanente fibroblastcellijn van muizen — Balb/c 3T3, kloon 31 — van ATCC of ECACC gebruikt. Deze wordt daarom aanbevolen. Andere cellen of cellijnen kunnen met succes volgens hetzelfde testprotocol worden gebruikt als de culturomstandigheden worden aangepast aan de specifieke behoeften van de cellen, maar de gelijkwaardigheid moet worden aangetoond.

De cellen moeten regelmatig worden gecontroleerd op de afwezigheid van mycoplasma-besmetting en mogen alleen worden gebruikt als de resultaten van die controle bevredigend zijn.

Aangezien de UVA-gevoeligheid van cellen kan toenemen met het aantal passages, moeten Balb/c 3T3 cellen met het laagste verkrijgbare passagegetal worden gebruikt, bij voorkeur lager dan 100. Het is belangrijk dat de UVA-gevoeligheid van de Balb/c 3T3 cellen regelmatig wordt gecontroleerd volgens de kwaliteitscontroleprocedure die in dit document is beschreven.

1.7.1.2. Media en culturomstandigheden

Voor routinematige passage van de cellen en tijdens de testprocedure moeten geschikte cultuurmedia en incubatieomstandigheden worden gebruikt. Voor Balb/c 3T3 cellen zijn dit DMEM gesupplementeerd met 10 % serum van pasgeboren kalveren, 4 mM glutamine, penicilline en streptomycine en incubatie onder vochtige omstandigheden bij $37^\circ\text{C}/7,5\% \text{ CO}_2$. Het is vooral belangrijk dat de culturomstandigheden zo zijn dat de celcyclustijd binnen het normale gedocumenteerde bereik van de gebruikte cellen of cellijn ligt.

1.7.1.3. Prepareren van de culturen

Cellen uit ingevroren voorraadculturen worden met een geschikte dichtheid overgeënt in cultuurmedium en ten minste één maal in subcultuur gebracht voordat zij in de in vitro 3T3 NRU fototoxiciteitstest worden gebruikt.

Voor de fototoxiciteitstest worden testcellen overgeënt in een cultuurmedium, waarbij de dichtheid zo is dat de culturen geen confluentie bereiken voor het einde van de test, d.w.z. wanneer de levensvatbaarheid van de cellen wordt bepaald 48 uur na het overenten van de cellen. Voor Balb/c 3T3 die worden gekweekt in 96-wells-platen, wordt een celdichtheid van 1×10^4 cellen per well aanbevolen.

Voor elke te onderzoeken stof worden cellen op identieke wijze overgeënt op twee afzonderlijke 96-wells-platen die vervolgens parallel de gehele testprocedure onder identieke culturomstandigheden doorlopen, met uitzondering van de tijd gedurende welke een van de platen wordt bestraald (+ UVA / zichtbaar licht) en de andere in het donker wordt bewaard (- UVA / zichtbaar licht).

1.7.1.4. Metabolische activering

Hoewel het gebruik van metaboliserende systemen een algemene voorwaarde is voor alle in vitro tests voor de voorspelling van genotoxisch en carcinogeen potentieel, is tot dusverre voor fototoxicologie geen stof bekend die pas na metabolische transformatie in vivo of in vitro als fototoxine werkt. Het wordt dan ook niet nodig geacht, en evenmin zijn er wetenschappelijke gronden, om de huidige test uit te voeren met een metabolisch activeringssysteem.

1.7.1.5. Te onderzoeken stof/preparatie

Te onderzoeken stoffen moeten vlak voor het gebruik vers worden geprepareerd, tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is. Prepareren onder rood licht kan nodig zijn als het waarschijnlijk is dat snelle fotodegradatie optreedt.

Te onderzoeken stoffen moeten worden opgelost in gebufferde zoutoplossingen, bijvoorbeeld Earl's balanced salt solution (EBSS) of fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS), die om interferentie tijdens de bestraling te voorkomen, vrij moeten zijn van proteïnecomponenten en lichtabsorberende pH-indicatorkleurstoffen.

Te onderzoeken stoffen met een beperkte oplosbaarheid in water moeten in geschikte oplosmiddelen worden opgelost met een concentratie die 100-maal de gewenste eindconcentratie is en vervolgens met de gebufferde zoutoplossing een factor 100 worden verdund. Als er een oplosmiddel wordt gebruikt, moet dit in alle culturen met een constant volumegehalte van 1 % (v/v) aanwezig zijn, d.w.z. zowel in de negatieve controles als in alle concentraties van de te onderzoeken stof.

De aanbevolen oplosmiddelen zijn dimethylsulfoxide (DMSO) en ethanol (EtOH). Andere oplosmiddelen met een lage cytotoxiciteit (bv. aceton) kunnen in aanmerking komen, maar zij moeten zorgvuldig worden onderzocht op specifieke eigenschappen, bijvoorbeeld reactie met de te onderzoeken stof, onderdrukking van het fototoxische effect, vermogen om radicalen te binden.

Om het oplossen te bevorderen kan gebruik worden gemaakt van vortex-menging en/of sonificatie en/of verwarming tot 37 °C.

1.7.1.6. UV bestraling/preparatie

Lichtbron: de keuze van een geschikte lichtbron en geschikte filtering is de meest cruciale factor bij fototoxiciteitstests. UVA en zichtbaar licht worden gewoonlijk geassocieerd met fotosensibilisatie (7) (10), terwijl UVB van minder belang is en rechtstreeks hoogcytotoxisch is waarbij de cytotoxiciteit van 313 nm tot 280 nm een factor 1000 toeneemt (11). Bij de keuze van een geschikte lichtbron geldt de essentiële eis dat de lichtbron golflengten uitzendt die door de te onderzoeken stof worden geabsorbeerd en dat de lichtdosis (die binnen een redelijke tijd kan worden bereikt) voldoende is om bekende fotosensitizers te detecteren. Bovendien mogen de gebruikte golflengtes en doses, met inbegrip van de emissie van warmte (infrarood), geen ontoelaatbare schade berokkenen aan het testsysteem.

Simulatie van zonlicht met zonnemulatoren wordt als de optimale lichtbron beschouwd. In zonnemulatoren worden xenonbooglampen en (gedoteerde) kwik-metaalhalidebooglampen gebruikt. Laatstgenoemde hebben het voordeel dat zij minder warmte afgeven en goedkoper zijn, maar de overeenstemming met het zonlicht is niet volmaakt. Aangezien alle zonnemulatoren significante hoeveelheden UVB uitstralen, moeten er filters worden toegepast om de hoogcytotoxische UVB-golflengtes te verzwakken.

Voor de in vitro 3T3 NRU fototoxiciteitstest moet een bestralingspectrum worden gebruikt dat vrijwel geen UVB bevat (UVA:UVB ~ 1:20). Er is een voorbeeld gepubliceerd van de spectrale stralingsverdeling van de gefilterde zonnemulator die is gebruikt in de valideringsstudie van de in vitro 3T3 NRU fototoxiciteitstest (3).

Dosimetrie: de intensiteit van het licht (bestralingssterkte) moet regelmatig voor elke fototoxiciteitstest worden gecontroleerd met een geschikte breedband-UV-meter. De UV-meter moet op de bron zijn gekalibreerd. De werking van de UV-meter moet worden gecontroleerd en daarvoor wordt het gebruik van een tweede referentie-UV-meter van hetzelfde type en met dezelfde kalibratie aanbevolen. Idealiter moet met grotere intervallen een spectroradiometer worden gebruikt om de spectrale stralingssterkte van de gefilterde lichtbron te meten en de kalibratie van de breedband-UV-meter te controleren, maar dergelijke instrumenten vereisen speciaal opgeleid personeel.

In de valideringsstudie is vastgesteld dat een dosis van 5 J/cm² (UVA) niet-cytotoxisch is voor Balb/c 3T3 cellen maar toch voldoende sterk om zelfs zwak fototoxische stoffen te exciteren. Om in 50 minuten een bestralingsdosis van 5 J/cm² te bereiken, moet de bestralingssterkte worden afgesteld op 1,666 mW/cm². Als een andere cellijn of een andere lichtbron wordt gebruikt, kan het nodig zijn de UVA-dosis enigszins aan te passen rekening houdend met het criterium dat de straling de cellen geen schade mag berokkenen en krachtig genoeg moet zijn om standaardfototoxines te detecteren. De duur van de blootstelling aan het licht wordt als volgt berekend:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{bestralingsdosis (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{bestralingssterkte (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W sec})$$

1.7.2. Testomstandigheden

De maximale concentratie van een te onderzoeken stof mag niet hoger zijn dan 100 µg/ml, aangezien alle fototoxische stoffen zijn gedetecteerd bij lagere concentraties, terwijl bij hogere concentraties de incidentie van fout-positieve resultaten toeneemt (13). De pH van de hoogste concentratie van de te onderzoeken stof moet een aanvaardbare waarde hebben (pH tussen 6,5 en 7,8).

Het bereik waarbinnen de concentraties van een met (+ UVA) en zonder (- UVA) licht onderzochte stof moeten liggen, moet in voorbereidende experimenten worden bepaald. Het bereik en de intervallen van een concentratiereeks moeten zo worden gekozen dat de experimentele gegevens de concentratieresponskrommen voldoende onderbouwen. Er moeten geometrische concentratiereeksen (met een constante verdunningsfactor) worden gebruikt.

1.7.3. Testprocedure (I)

1.7.3.1. Eerste dag

Bereid een celsuspensie van 1 x 10⁵ cellen/ml in een cultuurmedium en breng uitsluitend in de buitenste wells van een 96-wells microtiterplaat voor weefselkweek 100 µl cultuurmedium aan (= blanco's). Breng in de overige wells 100 µl celsuspensie van 1 x 10⁵ cellen/ml (= 1 x 10⁴ cellen/well) aan. Prepareer voor elke te onderzoeken stof twee platen: één voor de bepaling van de cytotoxiciteit (- UVA), en de ander voor de bepaling van de fotocytotoxiciteit (+ UVA).

Incubeer de cellen gedurende 24 uur (7,5 % CO₂, 37 °C) totdat zij een halfconfluente monocellulaire laag vormen. Deze incubatieperiode is lang genoeg voor het herstel en de hechting van de cellen en voor exponentiële groei.

1.7.3.2. Tweede dag

(1) Nadere gegevens zijn te vinden in referentie 12.

Na incubatie het cultuurmedium van de cellen decanteren en tweemaal spoelen met 150 µl EBSS/PBS per well. Voeg 100 µl EBSS/PBS met de gewenste concentratie te onderzoeken stof dan wel enkel oplosmiddel (negatieve controle) toe. Breng 8 verschillende concentraties van de te onderzoeken stof aan. Incubeer de cellen met de te onderzoeken stof in het donker gedurende 60 minuten (7,5 % CO₂, 37 °C).

Voor het (+ UVA) deel van de test de cellen gedurende 50 minuten bij kamertemperatuur door het deksel van de 96-wells-plaat bestralen met 1,7 mW/cm² UVA (= 5 J/cm²). Ventileer met een ventilator om condensatie van H₂O onder het deksel te voorkomen. Bewaar de duplicaatplaten (- UVA) bij kamertemperatuur gedurende 50 minuten (= UVA-blootstellingstijd) in een donkere kast.

Decanteer de testoplossing en spoel tweemaal met 150 µl EBSS/PBS. Vervang EBSS/PBS door cultuurmedium en incubeer tot de volgende dag (18-22 h) (7,5 % CO₂, 37 °C).

1.7.3.3. Derde dag

Microscopisch onderzoek

Onderzoek de cellen onder een fasecontrastmicroscop. Leg de morfologische veranderingen van de cellen als gevolg van de cytotoxische effecten van de onderzochte stof vast. Deze controle wordt aanbevolen om experimentele fouten uit te sluiten, maar deze gegevens worden niet gebruikt voor de beoordeling van de cytotoxiciteit of fototoxiciteit.

Opname van neutraalrood

Spoel de cellen met 150 µl voorverwarmde EBSS/PBS. Verwijder de spoeloplossing door voorzichtig af te tappen. Voeg 100 µl NR medium toe en incubeer gedurende 3 uur op 37 °C, in een gehumidificeerde atmosfeer met 7,5 % CO₂.

Na incubatie het NR-medium verwijderen en de cellen spoelen met 150 µl EBSS/PBS. Decanteren en EBSS/PBS volledig met vloeipapier verwijderen. (Andere mogelijkheid : omgekeerde plaat centrifugeren).

Voeg precies 150 µl NR-desorptieoplossing (vers bereid ethanol/azijnzuur) toe.

Schud de microtiterplaat gedurende 10 minuten snel op een microtiterplaatschudder totdat het NR uit de cellen is geëxtraheerd en zich een homogene oplossing heeft gevormd.

Meet de optische dichtheid van het NR-extract bij 540 nm in een spectrofotometer, waarbij de blanco's als referentie worden gebruikt. Sla de gegevens in een geschikt bestandsformaat (bv. ASCII) op voor verdere analyse.

GEGEVENS**2.1. Kwaliteit van de gegevens en aantal gegevens**

De gegevens moeten een zinvolle analyse van de met en zonder UVA/zichtbaar licht verkregen concentratie-responskrommen mogelijk maken. Als cytotoxiciteit wordt geconstateerd, moeten het concentratiebereik en de intervallen tussen de verschillende concentraties zo worden gekozen dat er een kromme aan de experimentele gegevens kan worden gefit. Aangezien het mogelijk is dat een onderzochte stof niet cytotoxisch is beneden de voorgeschreven maximumconcentratie van 100 µg/ml in het niet-belichte experiment (- UVA), maar zeer cytotoxisch bij bestraling (+ UVA), kan het nodig zijn dat de concentratiebereiken die in beide onderdelen van het experiment moeten worden onderzocht, grootteordes verschillen om de vereiste kwaliteit van de gegevens te bereiken. Als in geen van beide onderdelen van het experiment (- UVA en + UVA), cytotoxiciteit wordt aangetroffen, volstaat een test met grote intervallen tussen de opeenvolgende doses tot aan de maximale concentratie.

Een duidelijk positief resultaat hoeft niet in een herhalingsexperiment te worden geverifieerd. Evenmin hoeven duidelijk negatieve resultaten te worden geverifieerd, op voorwaarde dat de onderzochte stof bij voldoende hoge concentraties was getest. In dergelijke gevallen volstaat één groot experiment voorafgegaan door één of meer voorbereidende experimenten om het concentratiebereik vast te stellen.

Tests met onduidelijke resultaten in de nabijheid van de grenswaarde van het voorspellingsmodel moeten ter verificatie worden herhaald.

Als herhaald testen nodig wordt geacht, kan het van belang zijn dat de experimentele omstandigheden worden gevarieerd om een duidelijk resultaat te bereiken. Een belangrijke variabele in deze test is het bereiden van oplossingen van de onderzochte stof. Bij de herhaling van een test kan het dan ook essentieel zijn dat deze omstandigheden (co-solvent, verpulvering, sonificeren) worden gevarieerd. Een andere mogelijkheid is de incubatietijd voor de bestraling te variëren. Een kortere tijd kan zinvol zijn voor stoffen die onstabiel zijn in water.

2.2. Verwerking van de resultaten

Waar mogelijk wordt bepaald bij welke concentratie van een onderzochte stof 50 % inhibitie van de cellulaire NRU (EC₅₀) optreedt. Dit kan worden gedaan door een geschikte niet-lineaire regressiemethode (bij voorkeur een Hillfunctie of logistische regressie) toe te passen op de concentratieresponsgegevens of door andere fittechnieken toe te passen (14). Voordat een EC₅₀-waarde voor verdere berekeningen wordt gebruikt, moet de kwaliteit van de fit worden gecontroleerd. Een andere mogelijkheid is de EC₅₀-waarde te bepalen met grafische fittechnieken. In dit geval wordt aanbevolen waarschijnlijkheidspapier (x-schaal : logaritmisch, y-schaal : probit) te gebruiken, aangezien de concentratieresponsfunctie na deze transformatie in veel gevallen nagenoeg lineair zal zijn.

2.3. Beoordeling van de resultaten (voorspellende modellen)**2.3.1. Voorspellend model versie 1 : foto-irritatiefactor (PIF)**

Als zowel met (+ UVA) als zonder (- UVA) licht volledige concentratieresponskrommen zijn verkregen, wordt een foto-irritatiefactor van (PIF) berekend met de volgende formule :

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

PIF < 5, wijst erop dat er geen fototoxisch potentieel is, PIF ≥ 5 wijst erop dat er fototoxisch potentieel is. Als een stof alleen +UVA cytotoxisch is en -UVA getest geen cytotoxiciteit vertoont, kan de PIF niet worden berekend, hoewel het resultaat wijst op fototoxisch potentieel. In dergelijke gevallen kan een "> PIF" waarde worden berekend als de (- UV) cytotoxiciteitstest wordt uitgevoerd tot de hoogste testconcentratie (C_{max}) en deze waarde wordt gebruikt om de ">PIF"waarde te berekenen.

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

Als alleen een "> PIF"waarde kan worden verkregen, wijst elke waarde > 1 erop dat er fototoxisch potentieel is.

Als er geen EC_{50} (- UV) en EC_{50} (+ UV) kunnen worden berekend omdat de stof zelfs bij de hoogste testconcentratie geen cytotoxiciteit vertoont, wijst dit erop dat er geen fototoxisch potentieel is. In dergelijke gevallen wordt een formele waarde "PIF = *1" gebruikt om het resultaat weer te geven :

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

Als alleen een "PIF = *1" kan worden verkregen, wijst dit erop dat er geen fototoxisch potentieel is.

In de gevallen (b) en (c) moet bij de voorspelling van het fototoxisch potentieel zorgvuldig rekening worden gehouden met de bij de in vitro 3T3 NRU fototoxiciteitstest bereikte concentraties.

2.3.2. Voorspellend model versie 2 : gemiddeld foto-effect (MPE)

Een andere mogelijkheid is om een nieuwe versie van het model voor de voorspelling van het fototoxische potentieel toe te passen, die is ontwikkeld door gebruik te maken van gegevens van de EU/Colipa-valideringsstudie (15) en die in een latere studie van de in vitro fototoxiciteit van chemicaliën voor UV-filters blind is getest (13). Dit model heeft geen last van de beperking van het PIF-model in gevallen waarin geen EC_{50} waarde kan worden verkregen. In dit model wordt het « gemiddelde-foto-effect » (MPE) gebruikt, een maat die is gebaseerd op de vergelijking van de volledige concentratieresponskrommen. Voor de toepassing van het MPE-model is speciale computersoftware ontwikkeld aan de Humboldt Universiteit (Berlijn), die kosteloos kan worden verkregen.

2.4. Interpretatie van de resultaten

Een positief resultaat van de in vitro 3T3 NRU fototoxiciteitstest ($PIF \geq 5$ of $MPE \geq 0,1$) wijst erop dat de onderzochte stof fototoxisch potentieel heeft. Als dit resultaat wordt verkregen bij concentraties lager dan 10 µg/ml, is het waarschijnlijk dat de onderzochte stof ook onder verschillende blootstellingsomstandigheden in vivo fototoxisch is. Als alleen een positief resultaat wordt verkregen bij de hoogste testconcentratie van 100 µg/ml, kan het nodig zijn verder onderzoek te doen om het gevaar of de fototoxische potentie te bepalen. Dit kan betekenen dat gegevens nodig zijn over penetratie, absorptie en eventuele accumulatie van de stof in de huid, of dat ter bevestiging een andere test op de stof moet worden uitgevoerd, bijvoorbeeld met een humaan in vitro huidmodel.

Een negatief resultaat van de in vitro 3T3 NRU fototoxiciteitstest ($PIF < 5$ of $MPE < 0,1$) wijst erop dat de onderzochte stof onder de toegepaste omstandigheden niet fototoxisch was voor de zoogdiercellen in de cultuur. In gevallen waarin de stof kon worden getest tot de hoogste concentratie van 100 µg/ml, wijst een negatief resultaat erop dat de stof geen fototoxisch potentieel heeft en dat in vivo fototoxiciteit onwaarschijnlijk mag worden geacht. In gevallen waarin bij lagere concentraties identieke concentratietoxiciteitsresponsen (EC_{50} + UV en EC_{50} - UV) werden verkregen, kunnen de gegevens op dezelfde wijze worden geïnterpreteerd.

Als echter geen toxiciteit is aangetoond (+ UV en - UV) en de concentraties als gevolg van de beperkte oplosbaarheid in water beperkt waren tot waarden lager dan 100 µg/ml, valt te betwijfelen of de test geschikt is voor de betreffende stof en moet worden overwogen ter bevestiging een andere test uit te voeren (bv. met een in vitro huidmodel of een ex vivo huidmodel of een in vivo test).

3. RAPPORTAGE

Testrapport

Het testrapport moet de volgende informatie bevatten :

Onderzochte stof :

- identificatiegegevens en CAS-nummer, indien bekend,
- fysische toestand en zuiverheid,
- fysisch-chemische eigenschappen die voor de test van belang zijn,
- stabiliteit en fotostabiliteit, indien bekend.

Oplosmiddel :

- motivering van de keuze van het oplosmiddel,
- oplosbaarheid van de onderzochte stof in dit oplosmiddel,
- percentage oplosmiddel aanwezig in het behandelingsmedium (EBSS of PBS).

Cellen :

- type en bron van de cellen,
- afwezigheid van mycoplasma's,
- aantal celpassages indien bekend,
- UVA-gevoeligheid van de cellen, bepaald met de bestralingsapparatuur die in de in vitro 3T3 NRU fototoxiciteits-test wordt gebruikt.

Testomstandigheden (a) - incubatie vóór en na behandeling :

- type en samenstelling van het cultuurmedium,
- incubatieomstandigheden (CO_2 -concentratie, temperatuur, vochtigheid),
- incubatieduur (voorbehandeling, nabehandeling).

Testomstandigheden (b) - behandeling met de stof :

- motivering van de keuze van de concentraties van de onderzochte stof die met en zonder bestraling met UV/zichtbaar licht zijn gebruikt,
- in geval van beperkte oplosbaarheid van de onderzochte stof en afwezigheid van cytotoxiciteit : motivering van de hoogste geteste concentratie,
- samenstelling van het behandelingsmedium (gebufferde zoutoplossing),
- duur van de chemische behandeling.

Testomstandigheden (c) - bestraling :

- motivering van de keuze van de lichtbron,
- spectrale bestralingskarakteristieken van de lichtbron,
- transmissie/absorptiekarakteristieken van de filters,
- karakteristieken van de radiometer en gegevens over de kalibratie ervan,
- afstand van de lichtbron tot het testsysteem,
- UVA-bestralingsterkte op deze afstand uitgedrukt in mW/cm^2 ,
- duur van de blootstelling aan UV/zichtbaar licht,

- UVA-dosis (bestralingssterkte x tijd), uitgedrukt in J/cm²,
- temperatuur waarbij de celculturen tijdens bestraling respectievelijk in het donker werden bewaard.

Testomstandigheden (d) - NRU test :

- samenstelling van NR-medium,
- duur van NR-incubatie,
- incubatieomstandigheden (CO₂-concentratie, temperatuur, vochtigheid),
- NR-extractieomstandigheden (extractiemiddel, duur),
- golflengte voor spectrofotometrische bepaling van NR optische dichtheid,
- tweede golflengte (referentie) indien gebruikt,
- inhoud van de blancocuvetten van de spectrofotometer indien van toepassing.

Resultaten :

- levensvatbaarheid van cellen bepaald bij elke concentratie van de onderzochte stof, uitgedrukt in gemiddelde procentuele levensvatbaarheid ten opzichte van de controles,
- concentratieresponskrommen (concentratie onderzochte stof vs. relatieve levensvatbaarheid van cellen) verkregen in parallelle + UVA en - UVA-experimenten,
- gegevensanalyse van de concentratieresponskrommen : zo mogelijk berekening van EC₅₀ (+ UVA) en EC₅₀ (- UVA),
- vergelijking van de twee concentratieresponskrommen die zijn verkregen met respectievelijk zonder bestraling met UVA / zichtbaar licht, hetzij door berekening van de foto-irritatiefactor (PIF), hetzij door berekening van het gemiddelde foto-effect (MPE),
- classificatie van het fototoxische potentieel,
- criteria voor acceptatie van de test (a) - parallelle negatieve controle :
 - absolute levensvatbaarheid (optische dichtheid van NR-extract) bestraalde en niet-bestraalde cellen,
 - bestaande gegevens m.b.t. negatieve controle : gemiddelde en standaarddeviatie,
- criteria voor acceptatie van de test (b) - parallelle positieve controle :
 - EC₅₀ (+ UVA) en EC₅₀ (- UVA) en PIF van voor positieve controle gebruikte stof,
 - bestaande gegevens m.b.t. voor positieve controle gebruikte stof : EC₅₀ (+ UVA) en EC₅₀ (- UVA) en PIF : gemiddelde en standaarddeviatie.

Bespreking van de resultaten.

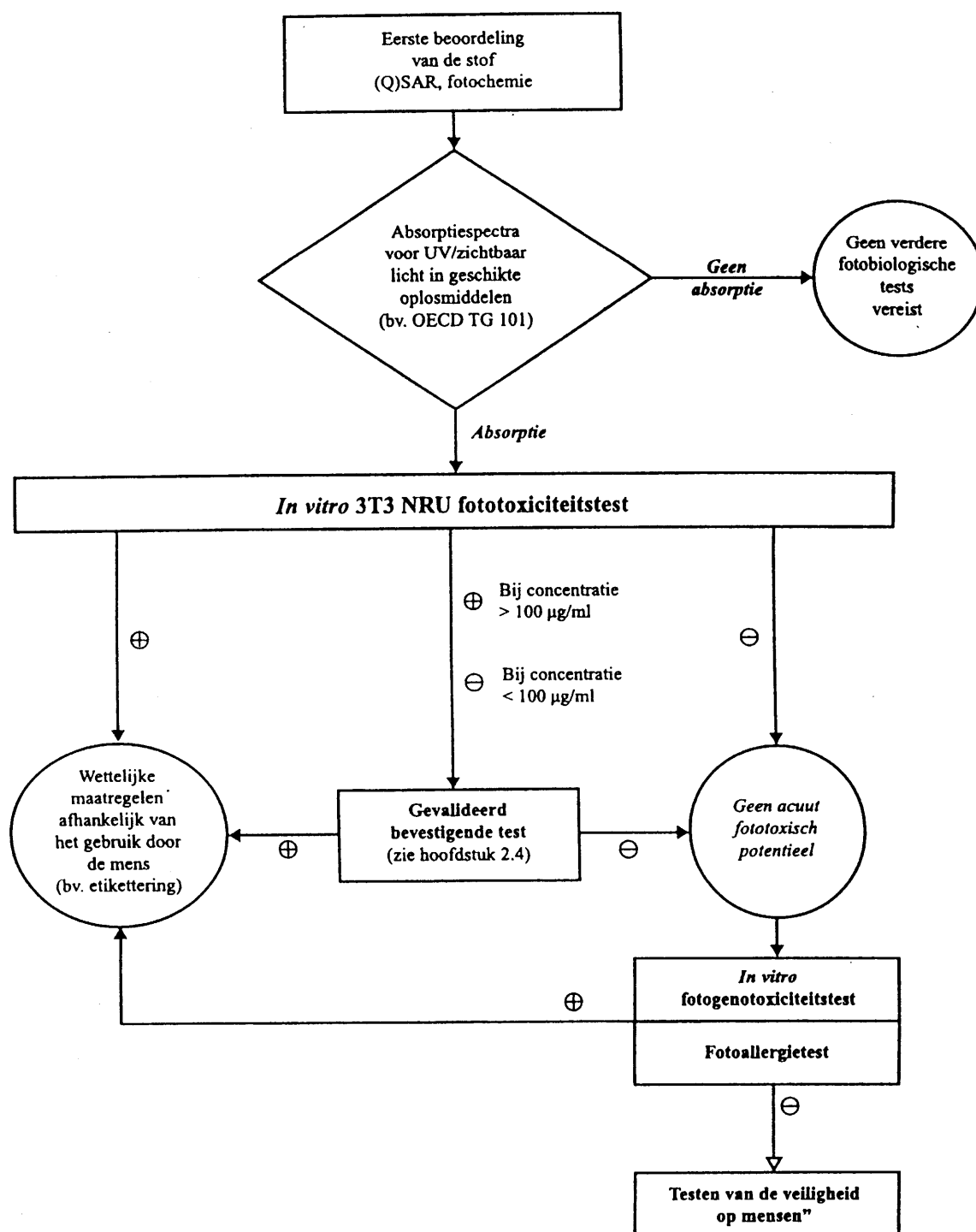
Conclusies.

4. REFERENTIES

- (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., 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, *Toxicology in Vitro* 8, blz. 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 blz. 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, blz. 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, blz. 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, blz. 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, blz. 314-348.
- (8) Spikes, J.D. (1989), *Photosensitization, The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, blz. 79-110.
- (9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination in vitro bij morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, blz. 119-124.
- (10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), *Animal models for phototoxicity testing, Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and Hl Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, blz. 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, blz. 1825-1829.
- (12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure : Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 bij 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, blz. 679-708.
- (14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, blz. 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, blz. 445-462.

Aanhangsel

Plaats van de 3T3 NRU fototoxiciëitstests in een stapsgewijze bepaling van de fototoxiciëit van stoffen



Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 14 september 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,
Mevr. M. AELVOET