

Phycher

Bio développement

Les tests alternatifs en toxicologie

REGLEMENTATION BIOCIDES

08-avril 2014

@: f.richeux@phycher.com



06 74 08 65 52

Contexte réglementaire

Cosmétique: SCCNFP

24/10/2000

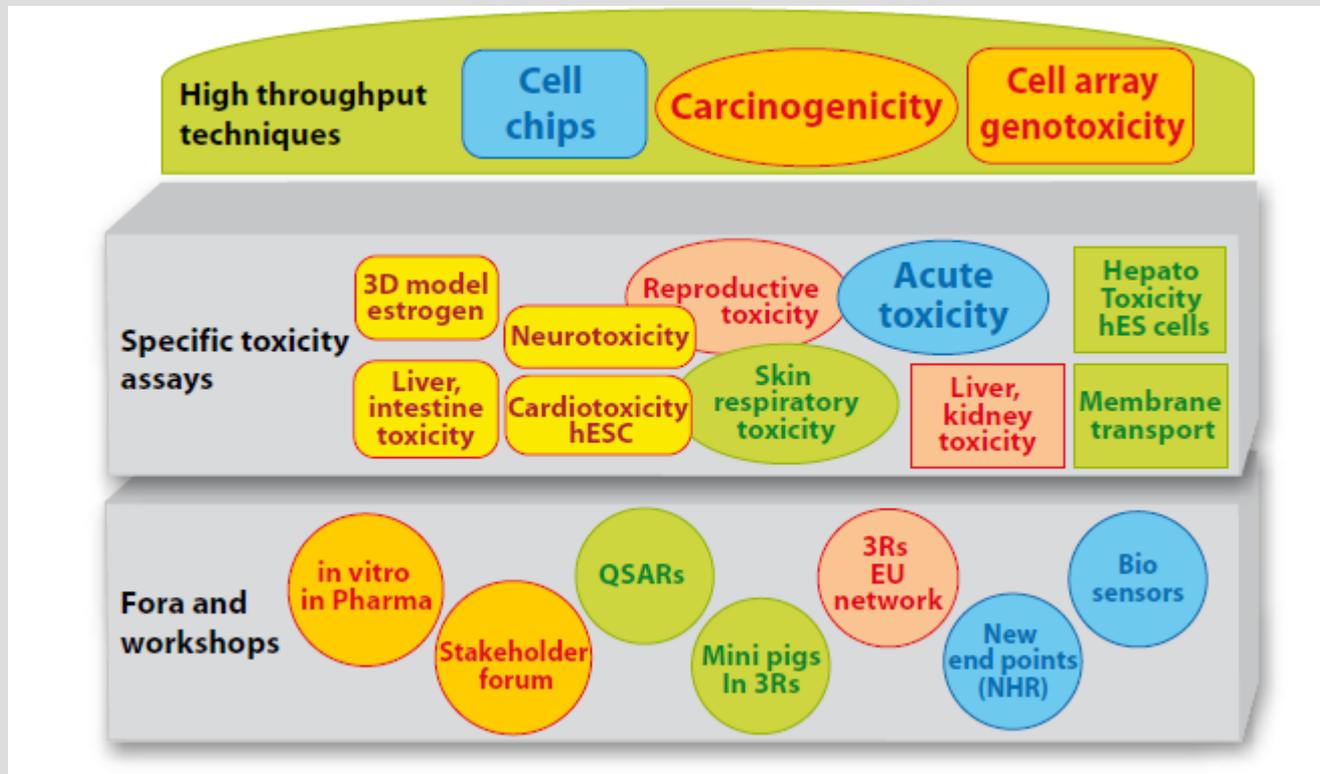
Directive 76/768/CEE
et son 7^{ème} amendement

Chimie: mise à jour du
règlement (CE) 440/2008 pour y
inclure en priorité les méthodes
d'essai alternatives nouvelles et
actualisées, conformément à la
directive 2010/63/UE



Les méthodes alternatives

Programme FP6



Tests validés

Toxicité *in vitro* pour le choix des doses

- Balb/c 3T3 neutral red uptake – Guidance No.129 OCDE

Corrosion cutanée

- TG OCDE 431; 430 & 435

Irritation cutanée

- TG OCDE 439

Phototoxicité

- TG OCDE 432

Irritation oculaire

- TG OCDE 437, 438

- Het-Cam, Agarose, RRN

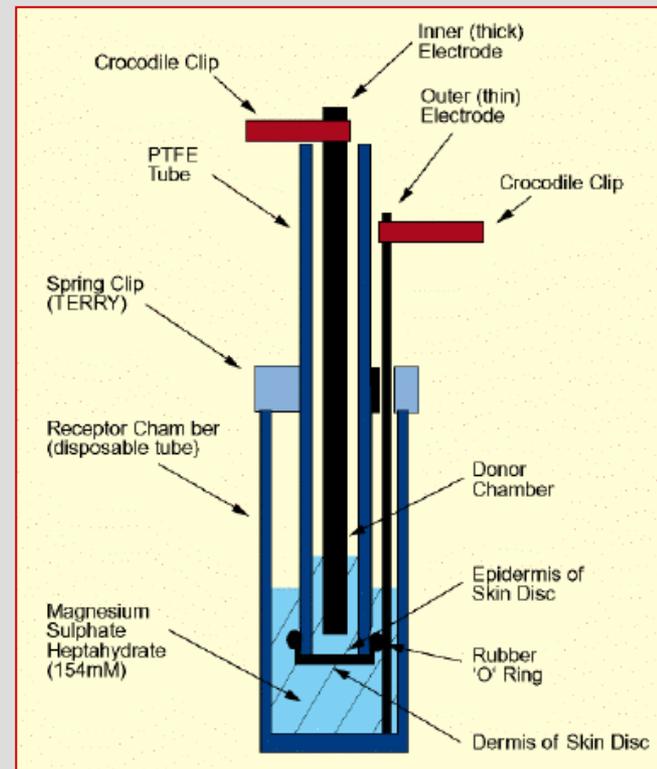
- RBC, Epithelium reconstruit, Fluorescein leakage test (TG OCDE 460), Cytosensor mycrophysiometer (draft TG)

Corrosion cutanée - OCDE 430, EC B.40

□ Transcutaneous Electrical Resistance (TER)

- Ex-vivo - Peau de rat
- Application 24 h
- Mesure de la résistance électrique

$> 5 \text{ k}\Omega$	non corrosif
$\leq 5 \text{ k}\Omega$	R34 ou R35 H314 1A ou 1B



Corrosion cutanée - OCDE 435

- Méthode d'essai *in vitro* sur membrane d'étanchéité - CORROSITEX®
 - Membrane artificielle : matrice de collagène sur une membrane support
 - Mesure du temps de passage de l'échantillon à travers la matrice par suivi de la coloration d'un liquide réactionnel présent sous la membrane



Corrosion cutanée – OCDE 435

- Classification selon le temps de réaction entre l'application du produit et pénétration dans la membrane
- Sous catégorisation des produits en fonction du pH (coloration du tampon différente)

Catégorie 1
(acide/base forte)

1A	0-3 minutes
1B	3-60 minutes
1C	1h-4h

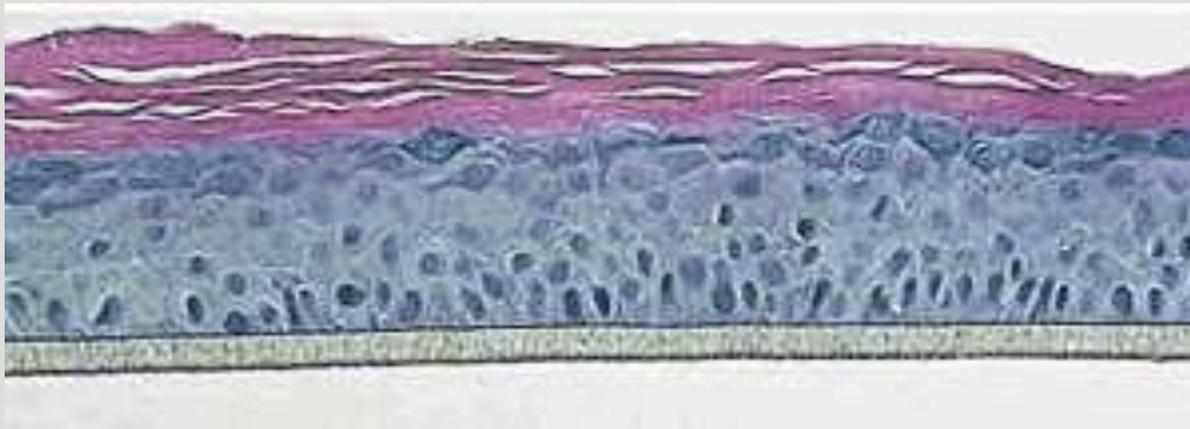
Catégorie 2
(acide/base faible)

1A	0-3 minutes
1B	3-30 minutes
1C	30-60 minutes



Corrosion cutanée – OCDE 431, EC B.40bis

- **Reconstructed Human epidermis:**
↳ Skinethic – Episkin – Cell system



Corrosion cutanée – OCDE 431, EC B.40bis

✓ Test item application: 3' & 1 hour / Tissue viability via MTT

Tableau 4 : Modèle prédictif d'EpiSkin™

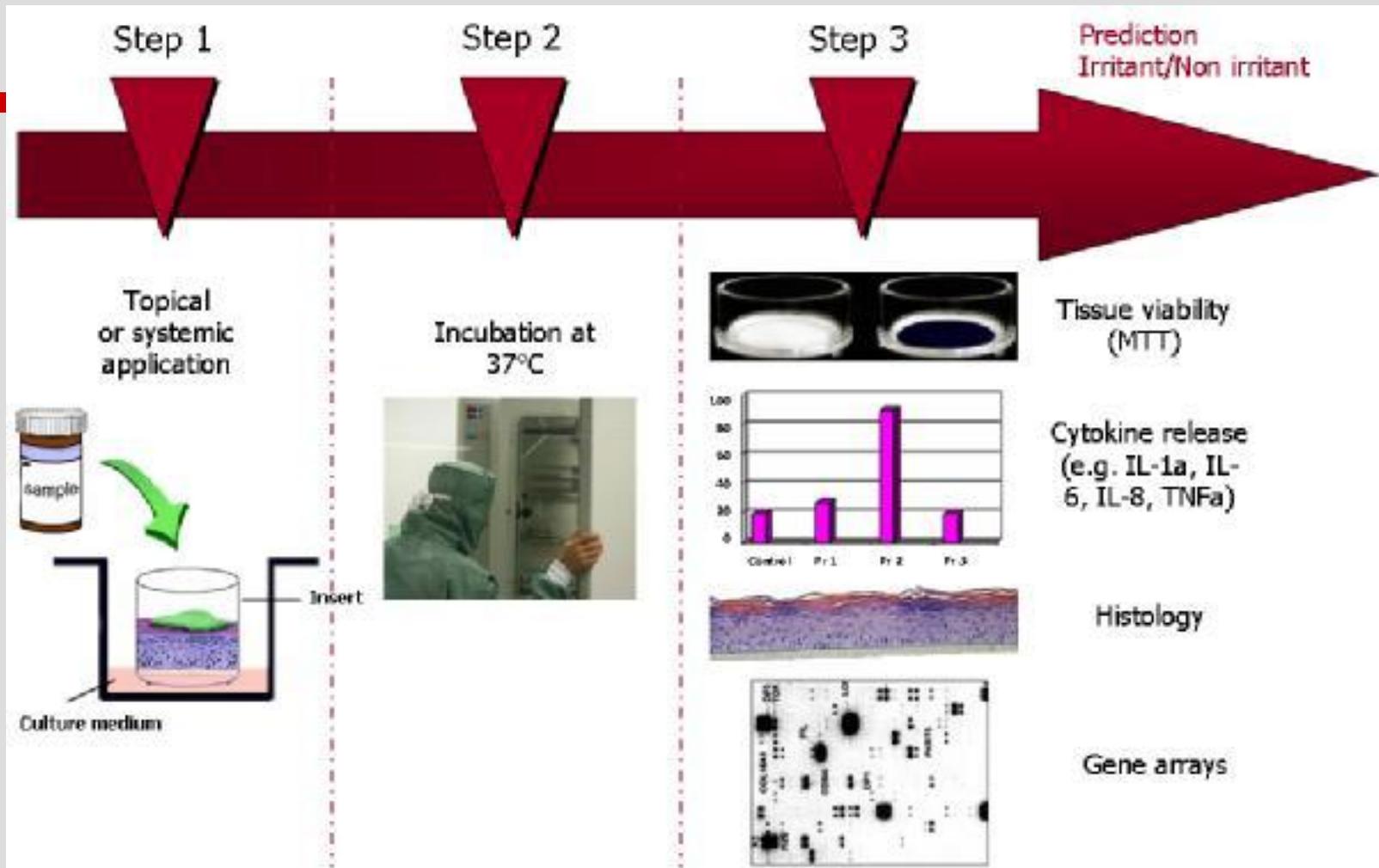
Viabilité mesurée après différents temps d'exposition (t = 3, 60 et 240 minutes)	Prévision à considérer
< 35 % après 3 minutes d'exposition	Produit chimique corrosif : • Sous-catégorie facultative 1A *
≥ 35 % après 3 minutes d'exposition ET < 35 % après 60 minutes d'exposition OU ≥ 35 % après 60 minutes d'exposition ET < 35 % après 240 minutes d'exposition	Produit chimique corrosif : • Sous-catégories facultatives 1B et 1C
≥ 35 % après 240 minutes d'exposition	Produit chimique non corrosif

Tableau 5 : EpiDerm™ SCT et SkinEthic™ RHE

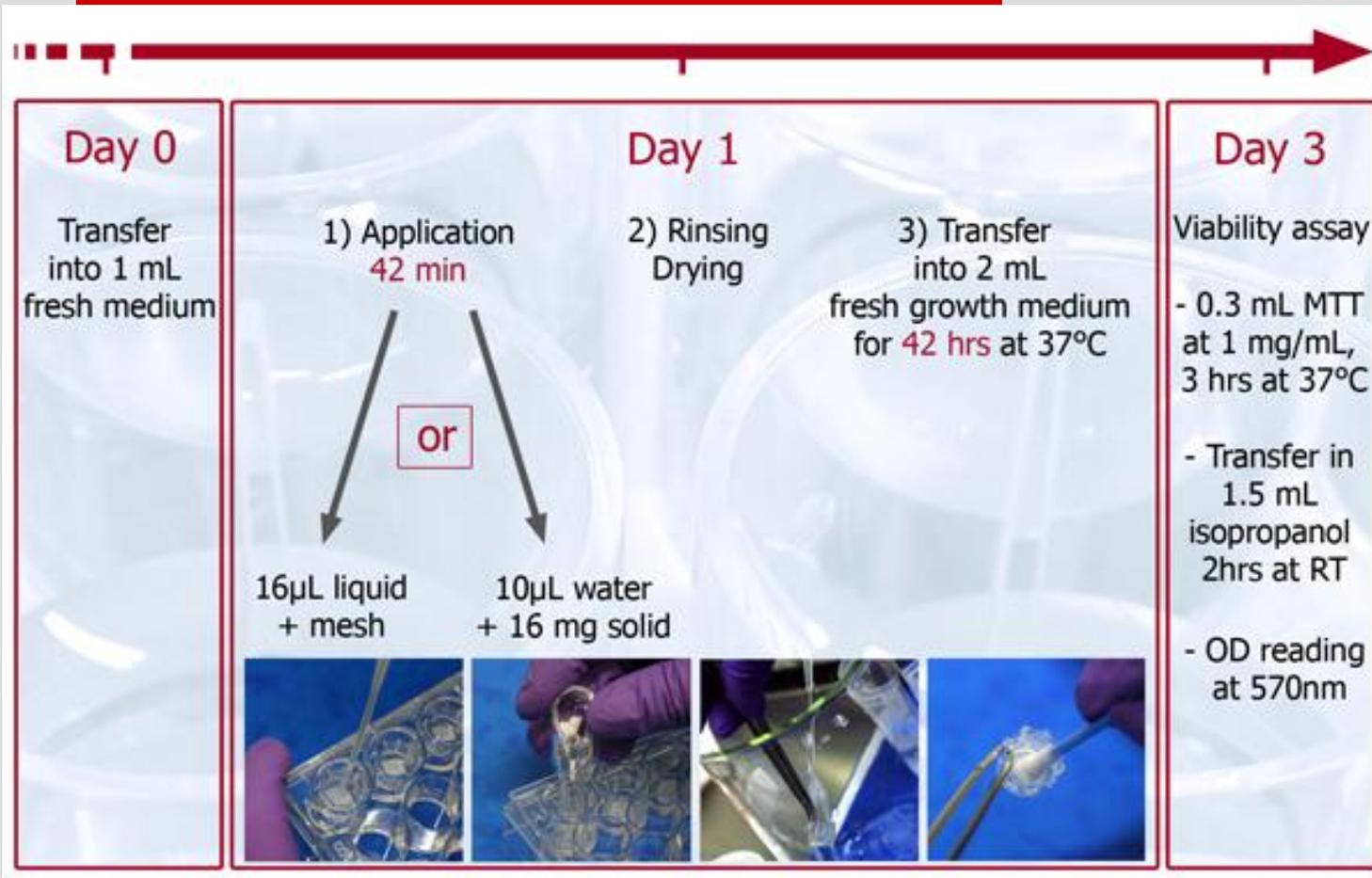
Viabilité mesurée après différents temps d'exposition (t = 3 et 60 minutes)	Prévision à considérer
< 50 % après 3 minutes d'exposition	Produit chimique corrosif : • Sous-catégorie facultative 1A **
≥ 50 % après 3 minutes d'exposition ET < 15 % après 60 minutes d'exposition	Produit chimique corrosif : • Sous-catégories facultatives 1B et 1C
≥ 50 % après 3 minutes d'exposition ET ≥ 15 % après 60 minutes d'exposition	Produit chimique non corrosif

Tableau 6 : Modèle prédictif d'epiCS®

Viabilité mesurée après différents temps d'exposition (t = 3 et 60 minutes)	Prévision à considérer
< 50 % après 3 minutes d'exposition OU (≥ 50 % après 3 minutes d'exposition ET < 15 % après 60 minutes d'exposition)	Produit chimique corrosif : catégorie 1
≥ 50 % après 3 minutes d'exposition ET ≥ 15 % après 60 minutes d'exposition	Produit chimique non corrosif



Irritation cutanée – OCDE 439, EC B.46



Viability $\leq 50\%$
R38 « irritant »
H315

Viability $> 50\%$
Non irritant

Irritation oculaire – OCDE 437, EC B.48

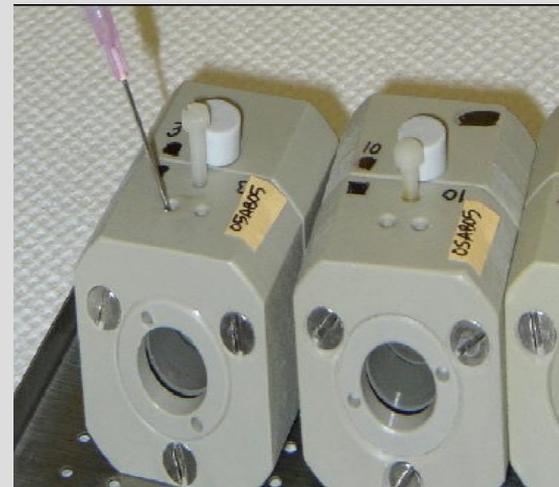
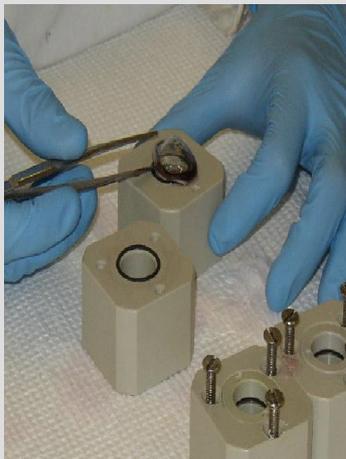
BCOP Bovine corneal opacity and permeability test

Excise cornea from fresh eyes



Irritation oculaire – OCDE 437, EC B.48

Place in cuvette chamber - Treatment



Irritation oculaire – OCDE 437, EC B.48

Read final opacity

Quantitative change in light passage from cornea

Read Fluorescein OD at 490 nm

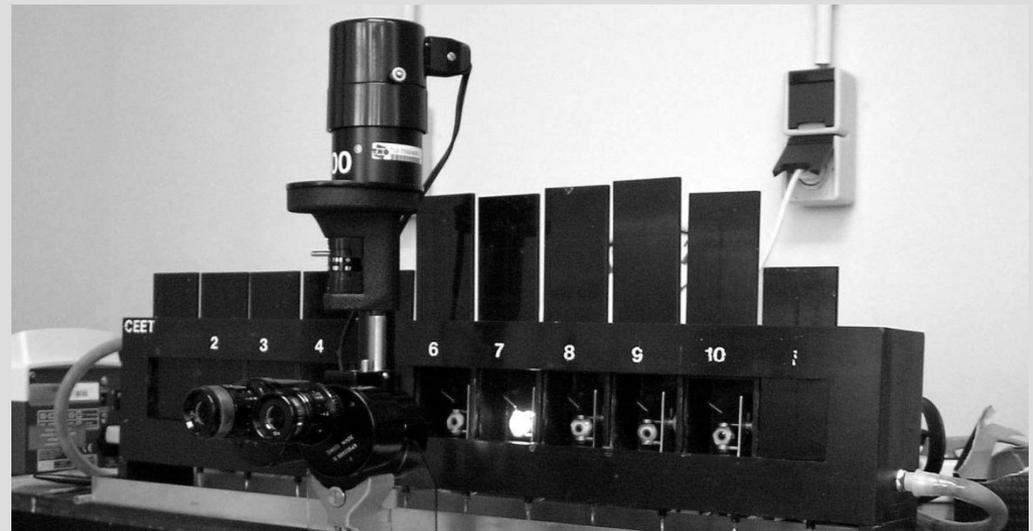
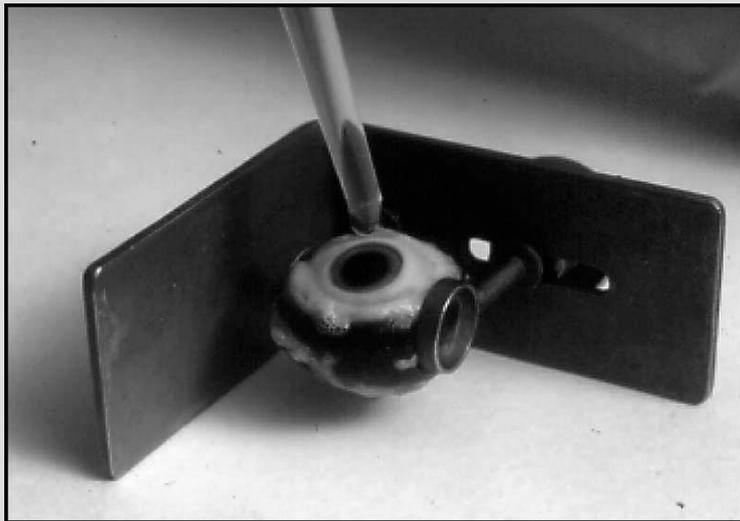
Quantitative change in the barrier properties of the epithelium to small molecules (fluorescein penetration)

In vitro score = Opacity + (15x OD₄₉₀)

IVIS > 55	Category 1 H318 (R41)
3 à 54.9	No prediction can be match
≤ 3	no Category

Irritation oculaire – OCDE 438, EC B.48

ICE ISOLED CHICKEN EYE TEST METHOD



Irritation oculaire – OCDE 438, EC B.48

Application de 300µL pendant 10s

Examen 30, 75, 120, 180, 240 min

1/Gonflement cornéen:

$$\left(\frac{\text{épaisseur de la cornée au temps } t - \text{épaisseur de la cornée au temps } = 0}{\text{épaisseur de la cornée au temps } = 0} \right) \times 100$$

2/Score opacité

3/Rétention fluorescéine

Irritation oculaire – OCDE 438, EC B.48

Gonflement moyen de la cornée (%)	Catégorie OPI
0 à 5	I
>5 à 12	II
>12 à 18 (>75 min après traitement)	II
>12 à 18 (≤75 min après traitement)	III
>18 à 26	III
>26 à 32 (>75 min après traitement)	III
>26 à 32 (≤75 min après traitement)	IV
>32	IV

Score moyen maximal d'opacité ⁺	Catégorie OPI
0.0-0.5	I
0.6-1.5	II
1.6-2.5	III
2.6-4.0	IV

Score de rétention moyenne de fluorescéine 30 minutes après traitement ⁺	Catégorie OPI
0.0-0.5	I
0.6-1.5	II
1.6-2.5	III
2.6-3.0	IV

Irritation oculaire – OCDE 438, EC B.48

<u>Classification du SGH de l'ONU</u>	<u>Combinaison des 3 variables</u>
Sans catégorie	3 x I
	2 x I, 1 x II
Aucune prédiction n'est possible	Autre combinaison
Catégorie 1	3 x IV
	2 x IV, 1 x III
	2 x IV, 1 x II*
	2 x IV, 1 x I*
	Opacité cornéenne ≥ 3 à 30 min (dans au moins deux yeux) Opacité cornéenne = 4 en un point temporel quelconque (dans au moins deux yeux) Relâchement important de l'épithélium (dans au moins un œil)

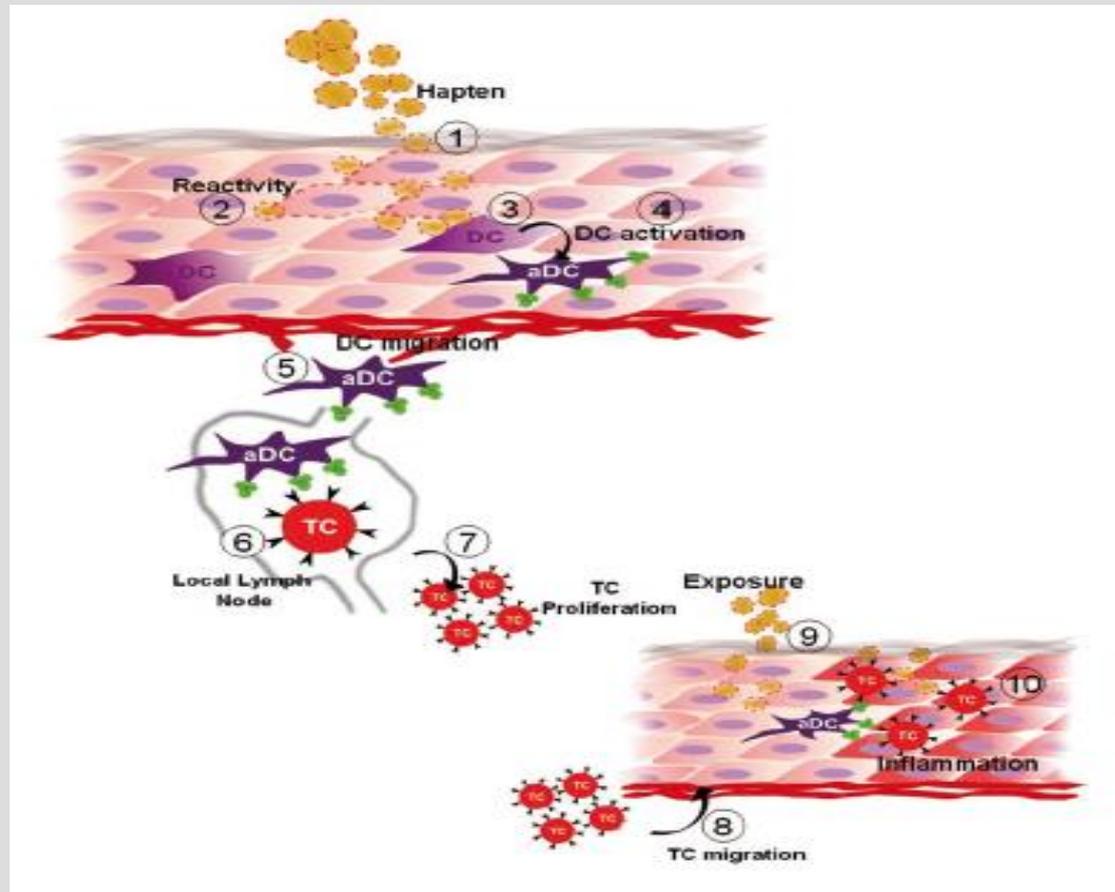
*Combinaisons moins probables.

Tests pré-validés

Sensibilisation

- Essai de liaison directe sur la réactivité peptidique («direct peptide reactivity assay» - DPRA - peptide-binding assay),
- Test de sensibilisation cutanée basé sur la myéloïde U937 («myeloid U937 skin sensitisation test» - MUSST)
& Test d'activation de la lignée cellulaire humaine («human cell line activation test» - hCLAT)
- Keratinosens

CUTANEOUS SENSITISATION



CUTANEOUS SENSITISATION

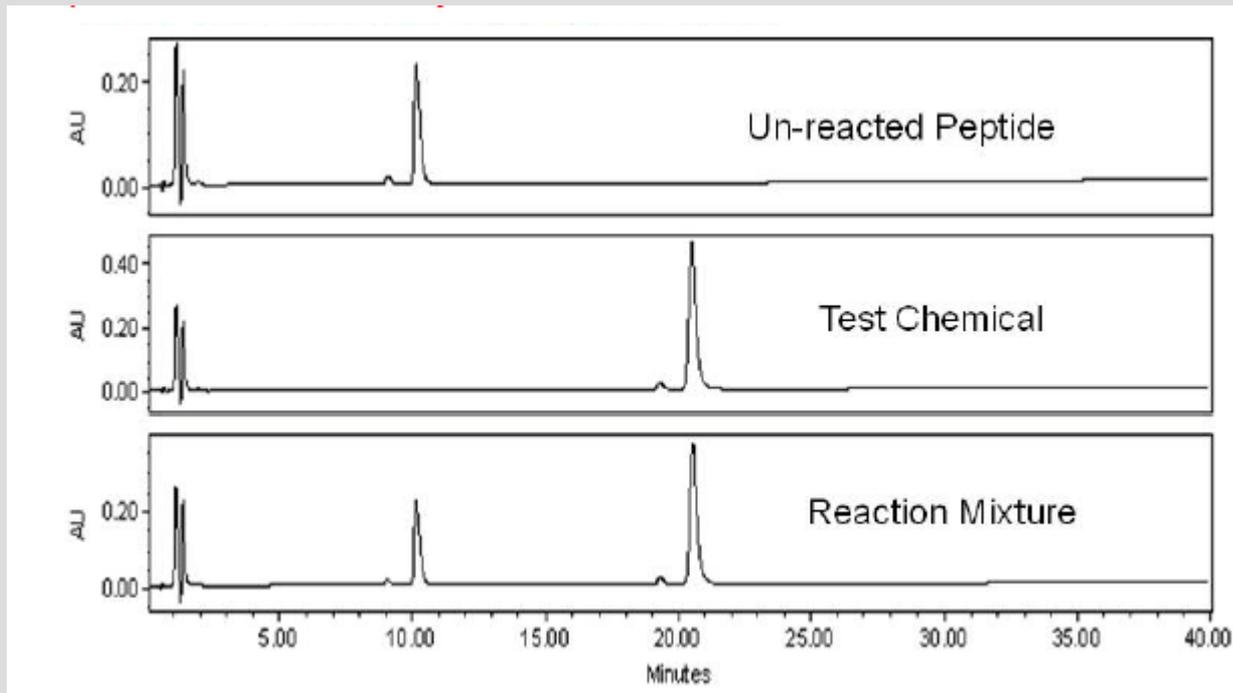
1 - DPRA : direct peptide reactivity assay (draft OECD 02-2014)

Méthode *In chemico* qui détecte l'interaction d'un haptène potentiel avec 2 modèles de peptides (contenant cystéine ou lysine)

La déplétion du peptide (marqueur de la réactivité protéique) est mesurée par HPLC - UV

CUTANEOUS SENSITISATION

DPRA : direct peptide reactivity assay (draft OECD 02-2014)



CUTANEOUS SENSITISATION

2/ MUSST ou h-CLAT : cell line activation test

La cellule dendritique présente l'antigène aux lymphocytes T présents dans les ganglions lymphatiques

Mesure la régulation de la co-stimulation des marqueurs de surfaces CD86 (musst) ou CD54 et CD86 (h-clat) comme marqueurs de l'activation des cellules dendritiques

La mesure se fait en cytométrie de flux

CUTANEOUS SENSITISATION

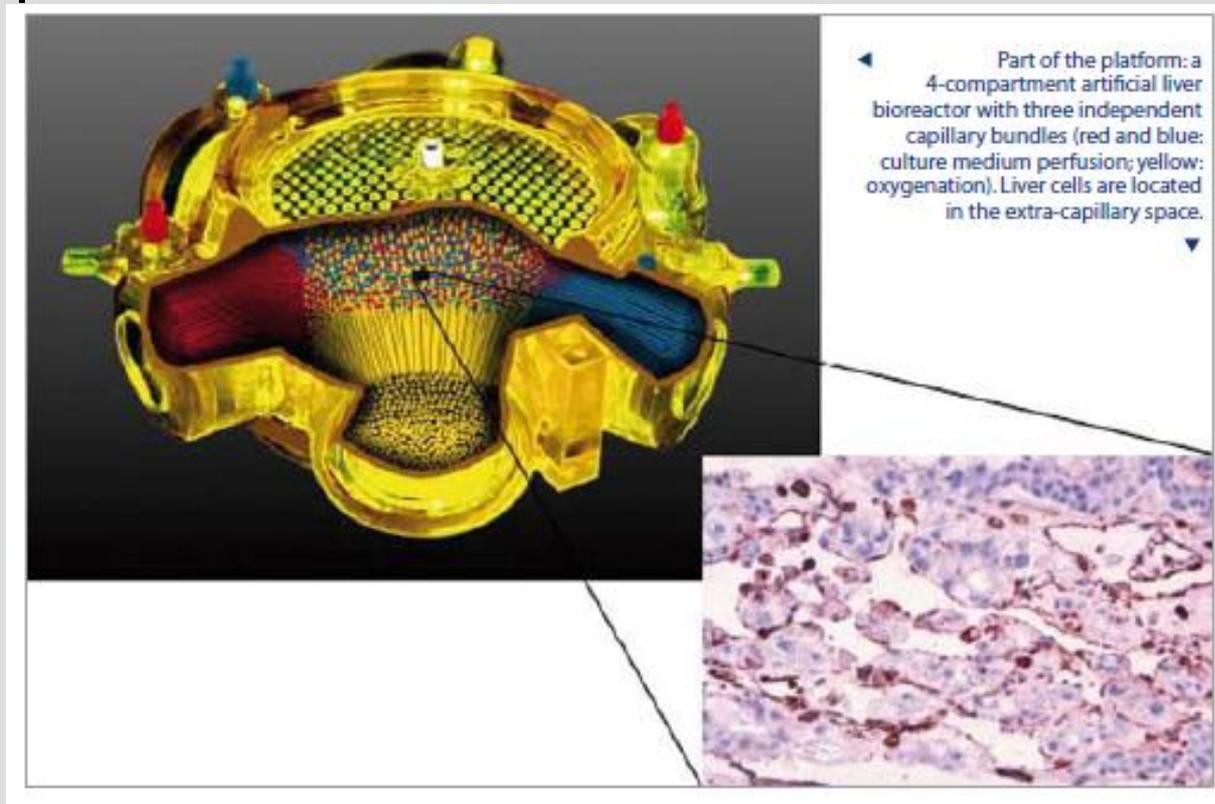
3/ Keratinosens: cell line activation test (draft OECD 02-2014)

Activation des kératinocytes (voie du facteur de transcription Nrf2)

Mesure l'augmentation de la voie d'induction via luminomètre (activité luciférase)

Toxicité sub-chronique

- Hépatotoxicité – Vitrocellomics



Toxicité sur la reproduction

- Methodes validées ECVAM
 - Whole Embryo Culture (WEC) test (strong)
 - MicroMass (MM) test
 - Embryotoxic Stem Cell Test (EST) – screening

Carcinogénicité

- Méthodes non validées
 - Cell transformation assay (CTA)
 - Gap junction communication assay
- Programme EU de recherche FP6
projet CarcinoGENOMICS - www.carcinogenomics.eu
démarrage 2008

Les méthodes alternatives

Le monde *vitro*

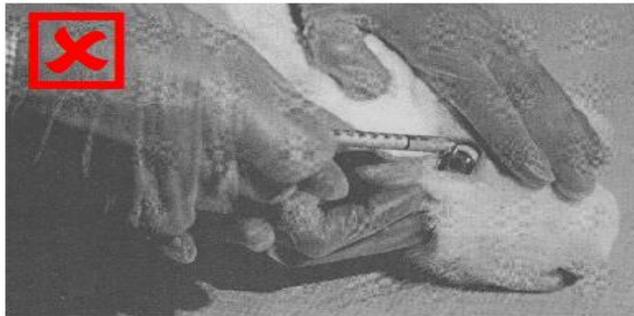


Le monde *vivo*



Les méthodes alternatives

The way forward



It is inconceivable that tests in human volunteers would replace animal tests

Les nouveaux outils

- QSAR, SAR
- In silico Toxicological sciences 107(1), 106-121 (2009)
- TTC (Threshold of Toxicological Concern) SCCP/1171/08;
Food and chemicals toxicology 47, 1246-1254 (2009)
Toxicol and Applied Pharmacol 243, 260-274 (2010)

Ne peut pas être utilisé pour des effets locaux (seulement effet systémique – classe 1 cramer)

Ne peut être utilisé que pour les familles chimiques suffisamment présentes dans les bases de données et avec une exposition disponible (pas les by-products ou contaminants)

- BMD – Benchmark dose comme alternative

Modèle mathématique ajusté aux données expérimentales dans la plage observable et estime la dose qui provoque une réponse faible mais mesurable généralement choisi à une valeur de 5% ou 10% au-dessus du contrôle

Conclusion

- Méthodes *in vitro* existantes et validées
 - Souvent plus chères
 - Certaines peu disponibles
 - Imparfaites
 - Peu discriminantes (ex irritation oculaire, cutanée)
 - Peu spécifiques (beaucoup de faux positifs)
- Amélioration des méthodes existantes
- Programmes de recherche FP5, FP6 et FP7

Phycher
Bio développement

14 allée Jacques Latrille
Technopole Bordeaux Montesquieu
33650 Martillac - France
Tel: +33 (0) 05 57 97 16 80
Contact: info@phycher.com

