Les épidermes humains reconstruits - Skin+®: un modèle valide pour l'évaluation *in vitro* de la phototoxicité.

Le Varlet B. [1], Leborgne E. [2], Ostinet D. [2], Nunzi F. [2], Nikoyan-Ginosian A. [3], Guillon F. [3], De Wever B. [1].

[1] ATERA S.A.S., Villeneuve-Loubet (F), [2] IDEA Lab, Martillac, (F), [3] Sterlab, Vallauris (F)

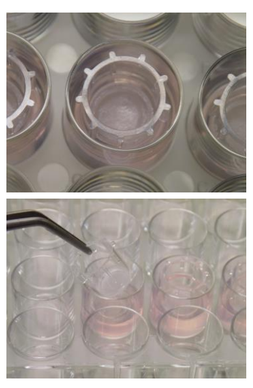
INTRODUCTION

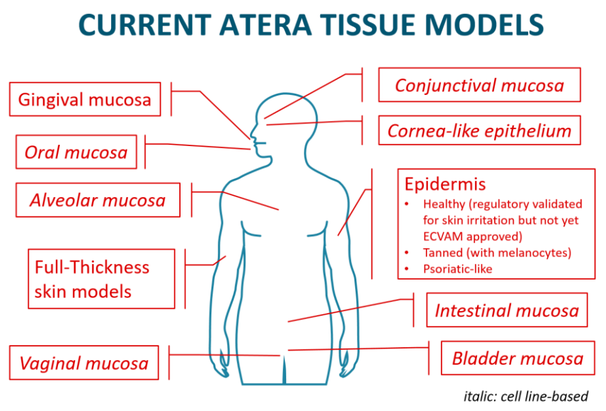
La méthode utilisée pour évaluer la photo-cytotoxicité *in vitro* de façon réglementaire (OCDE TG432 Test 3T3-NRU[1]) consiste à exposer des fibroblastes de souris Balb/c 3T3 en monocouche au produit chimique en présence ou non de lumière (UVA). Les limites de ce test sont clairement établies pour les produits non hydrosolubles. L'application d'une substance à tester à la surface de tissus EHR permet de reproduire les conditions physiologiques d'une administration cutanée par voie topique *in vivo* et d'évaluer la phototoxicité d'une large gamme de produits chimiques, dont les produits non hydrosolubles et les produits finis cosmétiques ou pharmaceutiques. Récemment, l'industrie pharmaceutique, International Council for Harmonisation (ICH), a recommandé l'utilisation de modèles de peaux humaines reconstruites pour évaluer le potentiel de phototoxicité des formulations cliniques [2]. La sensibilité de chaque méthode doit être établie de façon spécifique pour chaque modèle.

MATERIEL & METHODES

Tous les modèles de tissus humains sont produits dans l'installation de pointe Sterlab certifiée ISO 9001 / V2008. Le modèle d'Epiderme Humain Reconstruit (EHR) Skin+® commercialisé par ATERA est obtenu à partir de kératinocytes humains normaux de prépuces provenant de biopsies chirurgicales et cultivés à l'interface air-liquide dans un milieu chimiquement défini pendant 17 jours. 7 molécules de références (50µl) ont été appliquées sur Skin+® (0,5cm²) avec la Chlorpromazine comme témoin positif (CAS : 69-09-0, dilution dans le milieu de culture), selon le protocole de Bernard *et al.*[3] : Penicillin G, Lauryl Sulfate, Rouge Neutre, L-Histidine, Rose Bengal ont été dilués dans de l'eau, 5-methoxypsoralen (5-MOP) et Benzophenone-3 dans de l'huile. Après 18h d'incubation, les modèles Skin+® ont été exposés ou non aux UVA (1h ; 6 J/cm² ; 320 à 400 nm) avec l'irradiateur solaire BIO SUN RMX3W – (Vilber Lourmat). Après une nuit d'incubation, la viabilité a été évaluée par dosage du MTT et une analyse de l'histologie a été réalisée sur certaines séries. La concentration induisant 50% de cytotoxicité (IC50) est calculée avec (+UV) et sans irradiation (-UV) pour déterminer le facteur d'irritation phototoxique:

$$PIF = IC50_{-UV}/IC50_{+UV}.$$





RESULTATS

Modèle prédictif : Un ingrédient est considéré phototoxique si la valeur PIF>2 et/ou si 2 concentrations testées induisent une diminution de la viabilité >30%[3]. Une expérience est validée si le témoin positif Chlorpromazine est déterminé phototoxique. 4 lots différents de Skin+® ont été utilisés et les expériences ont été validées avec une valeur moyenne de PIF = 8 pour le témoin positif.

Classement : Selon le modèle prédictif énoncé, les composés Penicillin G, Lauryl Sulfate, L-Histidine, Benzophenone-3 et Rose Bengal ont été classés non-phototoxiques (NP ; Tableau 1) et les composés Rouge Neutre et 5-MOP comme phototoxiques (PT). Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature[3] de façon générale. Le composé Rose Bengal a été toutefois classé PT dans l'étude de Bernard *et al.*[3] avec deux concentrations induisant plus de 30% de cytotoxicité dont une valeur à seulement 35%. De plus, le potentiel phototoxique *in vivo* de ce composé est limité. L'évaluation du potentiel phototoxique du Rose Bengal est donc délicate.

Analyse histologique : L'analyse histologique réalisée sur les tissus traités avec le composé 5-MOP avec et sans irradiation UV confirme l'effet photocytotoxique du composé (Figure 1 & 2).

Composé/N° CAS	Concentration (mg/ml)	Viabilité (%)		CI50 -UVA (mg/ml)	CI50 +UVA (mg/ml)	PIF	Diminution viabilité	Classement
		-UVA	+UVA					
Penicillin G/69-57-8	100	91	101	>100	>100	/	-11%	NP
	33,3	95	94				1%	
	11,1	94	112				-19%	
	3,7	84	102				-21%	
	1,2	88	103				-17%	
Lauryl Sulfate/151-21-3	5	10	11	1,63	1,61	1	0%	NP
	1,5	52	51				0%	
	0,5	99	104				-5%	
	0,16	106	97				8%	
	0,05	90	104				-16%	
Rouge Neutre/553-24-2	1	59	17	0,845	0,07	12	71%	PT
	0,33	93	25				73%	
	0,11	113	31				73%	
	0,037	108	66				39%	
	0,012	100	106				-6%	
L-Histidine/71-00-1	33	85	76	>33	>33	/	11%	NP
	11	71	79				-11%	
	3,7	78	76				3%	
	1,2	76	77				-2%	
	0,4	76	87				-16%	
5-MOP/484-20-8	3	109	21	>3	<0,037	>81	80%	PT
	1	103	19				81%	
	0,33	81	21				74%	
	0,11	97	22				77%	
	0,037	104	25				76%	
Benzophenone-3/131-57-7	10	102	115	>10	>10	/	-13%	NP
	3,3	92	87				5%	
	1,1	91	109				-20%	
	0,37	92	98				-6%	
	0,12	96	103				-7%	
Rose Bengal/632-69-9	3	97	91	>3	>3	/	6%	NP
	1	103	66				36%	
	0,33	70	69				2%	
	0,11	67	61				9%	
	0,037	86	86				0%	

Tableau 1. Synthèse des résultats

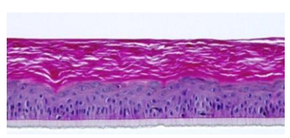


Figure 1. Histologie Skin+® (H&E)

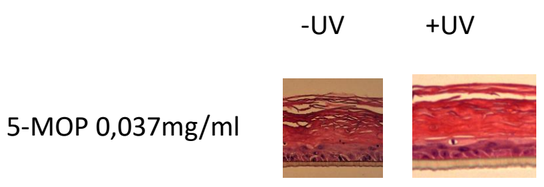


Figure 2. Images H&E Skin+® traité 5-MOP

CONCLUSION

Les résultats obtenus mettent en évidence que le modèle Skin+® commercialisé par ATERA apparait comme un modèle valide pour l'évaluation *in vitro* du potentiel phototoxique d'ingrédients chimiques et pharmaceutiques et de formulations cosmétiques. D'autres composés sont en cours d'investigation pour confirmer ces résultats préliminaires encourageants.

REFERENCES

[1]- OECD (2004), Essai n° 432: Essai de phototoxicité in vitro 3T3 NRU, OECD Publishing, Paris. DOI: http://dx.doi.org/10.1787/9789264071179-fr

[2]- ICH guidance, S10 Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals, January 2015.

[3]- Bernard FX, Barrault C, Deguercy A, De Wever B, Rosdy M. Development of a highly sensitive in vitro phototoxicity assay using the SkinEthic reconstructed human epidermis. Cell Biol Toxicol. 2000;16(6):391-400.

Cosmetic Days 3ème Edition – ***Marseille - 1 et 2 décembre 2016***

ATERA S.A.S Le Ducal, 1001 av. de la batterie 06270 Villeneuve-Loubet FRANCE - **info@ateralabs.com**

www.ateralabs.com