

RAPPORT D'ÉTUDE

16/04/2009

N°INERIS-DRC-09-94380-01323A-

Programme EAT-DRC08

**Valeurs toxicologiques de référence et
méthodes de construction pour les effets
sensibilisants pour une exposition cutanée**

INERIS

maîtriser le risque |
pour un développement durable |

**Valeurs toxicologiques de référence et méthodes de construction
pour les effets sensibilisants pour une exposition cutanée**

EAT-DRC 08 - Opération A

INERIS

Direction des Risques Chroniques
Pôle Dangers et Impact sur le Vivant
Expertise et Evaluations en Toxicologie
Verneuil en Halatte

Client : MEEDDAT

Liste des personnes ayant participé à l'étude : S. Vivier

PREAMBULE

Le présent rapport a été établi sur la base des informations fournies à l'INERIS, des données (scientifiques ou techniques) disponibles et objectives et de la réglementation en vigueur.

La responsabilité de l'INERIS ne pourra être engagée si les informations qui lui ont été communiquées sont incomplètes ou erronées.

Les avis, recommandations, préconisations ou équivalent qui seraient portés par l'INERIS dans le cadre des prestations qui lui sont confiées, peuvent aider à la prise de décision. Etant donné la mission qui incombe à l'INERIS de par son décret de création, l'INERIS n'intervient pas dans la prise de décision proprement dite. La responsabilité de l'INERIS ne peut donc se substituer à celle du décideur.

Le destinataire utilisera les résultats inclus dans le présent rapport intégralement ou sinon de manière objective. Son utilisation sous forme d'extraits ou de notes de synthèse sera faite sous la seule et entière responsabilité du destinataire. Il en est de même pour toute modification qui y serait apportée.

L'INERIS dégage toute responsabilité pour chaque utilisation du rapport en dehors de la destination de la prestation.

	Rédaction	Vérification	Approbation
NOM	Stéphanie VIVIER	Sylvie TISSOT	Eric THYBAUD
Qualité	Ingénieur à l'Unité ETSC	Responsable de l'unité ETSC	Responsable du pôle VIVA
Visa			

RESUME

Lors de la réalisation d'évaluations des risques sanitaires en France, l'exposition cutanée n'est pas prise en compte, en raison de l'absence de valeurs toxicologiques de référence (VTR) et de méthodologie d'élaboration. De même, dans le milieu professionnel, aucune méthode n'est développée pour quantifier les effets induits après une exposition cutanée. Ainsi, l'INERIS a récemment travaillé sur la prise en compte de la voie cutanée et a proposé une méthode de construction de VTR pour des effets sensibilisants pour une exposition de la peau (INERIS, 2007).

La méthode proposée était une première approche. L'objet du présent document est d'ajuster la proposition de l'INERIS en prenant notamment en compte les recommandations du document guide développé pour la mise en œuvre du règlement REACH relatif à une méthodologie d'établissement des DNEL (Derived No Effect Level) pour les effets sensibilisants.

Deux approches ont été suivies en fonction des tests utilisés pour l'établissement de la DNEL : LLNA, test préconisé et le seul recommandé selon la méthodologie DNEL ou GPMT, test largement employé au cours des 30 dernières années.

La méthodologie a été appliquée à trois substances sensibilisantes : l'hydroquinone, substance pour laquelle deux types de tests étaient disponibles (LLNA et GPMT) qui présentait ainsi une bonne étude de cas pour la méthodologie et le benzoapyrène, substance couramment retrouvée en évaluation des risques. Le 3-méthyleugénol, faiblement sensibilisant, a également été étudié dans l'objectif d'avoir un aperçu sur l'étendue possible des valeurs des DNEL. Les études de cas ont permis de mettre en évidence l'applicabilité de la méthodologie.

TABLE DES MATIÈRES

1. GLOSSAIRE.....	7
2. INTRODUCTION	8
3. DEMARCHE SUIVIE.....	9
4. VOIE CUTANEE ET SENSIBILISATION CUTANEE	10
4.1 RAPPELS SUR LA CONSTITUTION DE LA PEAU.....	10
4.1.1 <i>L'épiderme</i>	11
4.1.2 <i>Le derme et l'hypoderme</i>	13
4.2 SENSIBILISATION CUTANEE	13
4.2.1 <i>Considérations générales</i>	13
4.2.2 <i>Mécanisme</i>	14
5. TESTS DE SENSIBILISATION ET DOSES CRITIQUES ASSOCIEES	15
5.1 TESTS CHEZ L'HOMME	15
5.2 TESTS CHEZ L'ANIMAL	16
5.3 TESTS IN VITRO ET AUTRES APPROCHES	18
6. EFFETS SENSIBILISANTS CUTANES ET EXTRAPOLATION DES DONNEES.....	19
6.1 ABSORPTION CUTANEE	19
6.2 INFLUENCE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES SUBSTANCES	20
6.3 VARIATIONS INTER-ESPECES : INFLUENCE DU METABOLISME DE LA PEAU ET TOXICO-CINETIQUE	20
6.4 VARIATIONS INTRA-ESPECES	21
6.5 INFLUENCE DES VECTEURS DANS LESQUELS LES SUBSTANCES SONT PRESENTES.....	22
6.6 CONDITIONS D'EXPOSITION	23
6.6.1 <i>Site d'exposition</i>	23
6.6.2 <i>Etat de la peau</i>	24
6.6.3 <i>Exposition répétée et effet réservoir</i>	26
7. METHODE D'ELABORATION DE VTR POUR LES EFFETS SENSIBILISANTS CUTANES.....	27
7.1 METHODOLOGIE DNEL	27
7.1.1 <i>Détermination des doses critiques</i>	28
7.1.2 <i>Facteurs d'incertitude à appliquer à la dose critique</i>	30
7.2 PROPOSITIONS INERIS	33
7.2.1 <i>Champ d'application des VTR pour les effets sensibilisants cutanés</i>	33
7.2.2 <i>Tests pouvant être utilisés</i>	33
7.2.3 <i>Doses critiques</i>	34
7.2.4 <i>Facteurs d'incertitude</i>	35
8. APPLICATION DE LA METHODOLOGIE	39
8.1 ELABORATION D'UNE VTR POUR L'HYDROQUINONE	39
8.1.1 <i>Utilisation du LLNA</i>	39
8.1.2 <i>Utilisation du GPMT</i>	40
8.2 ELABORATION D'UNE VTR POUR LE BENZO[A]PYRENE	41
8.3 ELABORATION D'UNE VTR POUR LE 3-METHYLEUGENOL	42
9. CONCLUSION	44
10. BIBLIOGRAPHIE.....	45

1. GLOSSAIRE

ATSDR : The Agency for Toxic Substances and Disease Registry

CE : Commission européenne

DGS : Direction Général de la Santé

DNEL : Derived No Effect Level

EC₃ : Dose critique du test LLNA

ECETOC : European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals

ELGL : Essai de stimulation local des ganglions lymphatiques

FDA : Food and Drug Administration

GPMT : Guinea Pig Maximization Test

HMT : Human Maximization Test

HRIPT : Human Repeated Insult Patch Test

InVs : Institut de veille sanitaire

IS3 : indice de stimulation

LLNA : Local Lymph Node Assay

LOAEL : Low Observed Adverse Effect

MEST : Mouse Ear Swelling Test

NOAEL : No Observed Adverse Effect Level

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

OEHHA : The Office of Environmental Health Hazard Assessment

OMS : Organisation mondiale de la Santé

QSAR : Quantitative Structure Activity Relationships

RIVM : Institut national de la Santé publique et de l'Environnement, Pays-Bas

US EPA : US Environment Protection Agency

VTR : Valeur Toxicologique de référence

2. INTRODUCTION

Certaines substances sont connues pour être facilement absorbées par la peau. Pourtant, en évaluation des risques sanitaires, l'exposition cutanée n'est généralement pas prise en compte en raison de l'absence de valeur toxicologique de référence (VTR) pour cette voie d'une part et de solution alternative d'autre part. L'Institut de Veille Sanitaire (InVS) et la Direction Générale de la Santé (DGS) ont recommandé de ne pas avoir recours aux extrapolations voie à voie pour quantifier les relations dose-effet liées à une exposition cutanée.

En effet, la possibilité d'une extrapolation à partir de la voie orale n'est pas satisfaisante scientifiquement car elle ne prend pas en compte les particularités des effets locaux cutanés, le métabolisme cutané ou les différences d'absorption cutanée en fonction des régions du corps. En milieu professionnel, il n'existe pas de valeur limite d'exposition professionnelle prenant en compte les effets nocifs après exposition par voie cutanée même si l'intoxication des travailleurs par cette voie est rapportée. Seul le potentiel d'absorption des substances est parfois disponible sous la forme d'un indice nommé "notation peau".

Dans ce contexte, une revue bibliographique concernant l'état des connaissances internationales sur les relations dose-effets pour une exposition cutanée aux substances chimiques a été réalisée par l'INERIS en 2007. Elle a souligné que les effets sensibilisants sont les mieux documentés pour la voie cutanée, notamment grâce aux travaux menés dans le domaine de la cosmétique. Sur la base de ces travaux, une méthode d'élaboration de VTR cutanée pour des effets sensibilisants après une exposition de la peau a été proposée : les doses critiques et les types de tests cutanés à retenir ont été proposés ainsi que les facteurs d'incertitude à prendre en compte. Toutefois, au vu des éléments influençant la réponse cutanée et de la complexité de cette voie, il a clairement été mentionné que le choix des facteurs d'incertitude devait être rediscuté en fonction de l'évolution des connaissances.

Le nouveau règlement européen sur les substances chimiques REACH introduit la notion de DNEL (Derived No Effect Level ou niveau dérivé sans effet). Cette valeur représente le niveau d'exposition au dessus duquel les humains ne devraient pas être exposés : il s'agit d'une VTR. L'établissement d'une DNEL s'inscrit dans la démarche d'évaluation des dangers pour la santé humaine que doivent effectuer les industriels lors de l'enregistrement de leur substance conformément aux exigences de REACH.

Ainsi, en lien avec le développement des DNEL, les travaux spécifiques aux effets sensibilisants cutanés ont été poursuivis.

3. DEMARCHE SUIVIE

La méthode d'élaboration de VTR pour des effets sensibilisants après une exposition cutanée, proposée par l'INERIS en 2007 (INERIS DRC-07-83452-12062A), était une première approche qui a été réétudiée en regard des nouvelles données disponibles et de l'évolution du contexte réglementaire.

Dans un premier temps, une mise à jour de la revue bibliographique a été initiée concernant à la fois les aspects scientifiques et réglementaires.

Le guide technique en appui au règlement REACH sur la relation dose-réponse (ECHA, 2008a) est le document support de l'étude. Les éléments spécifiques à considérer pour une exposition cutanée dans le cadre des effets sensibilisants ont été revus en s'appuyant essentiellement sur la bibliographie du guide technique, laquelle reprend en grande partie les références bibliographiques recensées par l'INERIS en 2007. La méthode de construction de valeurs de référence initialement proposée par INERIS a été mise à jour en s'appuyant sur la méthodologie DNEL.

Dans un deuxième temps, la méthode de construction a été appliquée à trois substances sensibilisantes : l'hydroquinone, substance pour laquelle deux types de tests étaient disponibles (LLNA et GPMT) qui présentait ainsi une bonne étude de cas pour la méthodologie et le benzo[a]pyrène, substance couramment retrouvée en évaluation des risques. Le 3-méthyleugénol, faiblement sensibilisant, a également été étudié dans l'objectif d'avoir un aperçu sur l'étendue possible des valeurs de DNEL.

4. VOIE CUTANEE ET SENSIBILISATION CUTANEE

4.1 RAPPELS SUR LA CONSTITUTION DE LA PEAU

La peau est un organe composé de 2000 milliards de cellules formant plusieurs couches de tissus. Elle protège notre corps des agents externes, comme par exemple des rayons UV du soleil. Elle a une surface de 2m² et pèse environ 5kg chez l'adulte. Elle est formée de trois parties : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (figures 1 et 2).

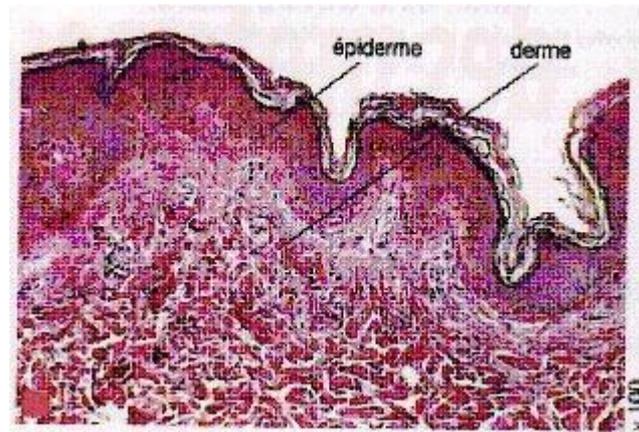


Figure 1 : Coupe de peau observée au microscope optique

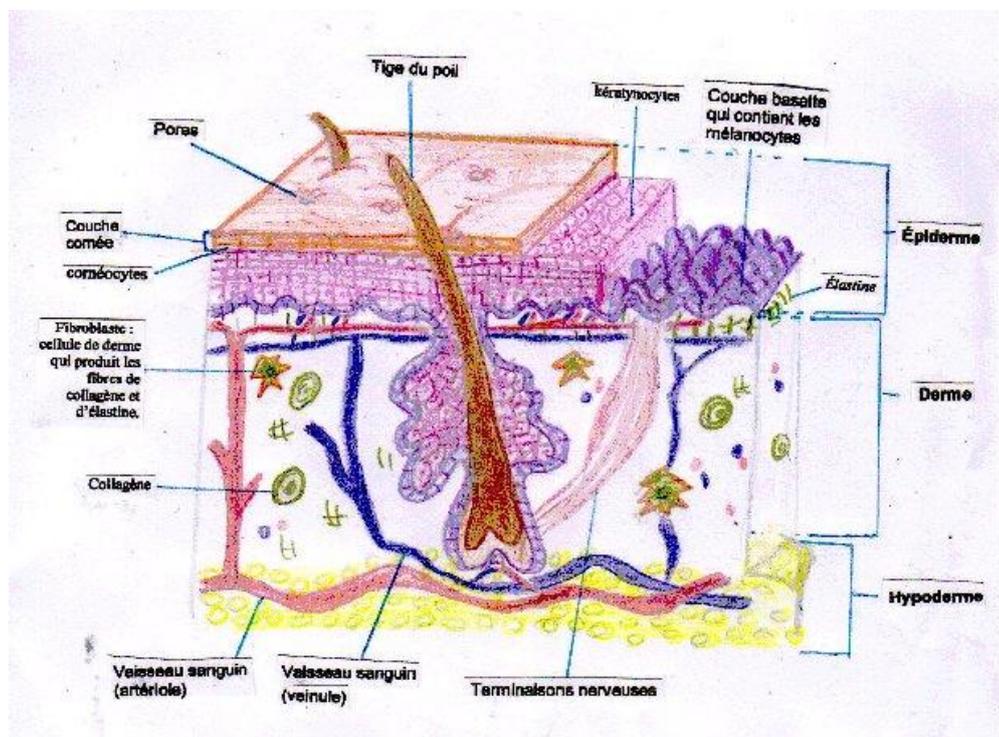


Figure 2 : Schéma d'une coupe de peau

4.1.1 L'EPIDERME

C'est la couche la plus superficielle de la peau. L'épiderme n'est irrigué par aucun vaisseau sanguin et est seulement alimenté par diffusion depuis le derme. Il contient en revanche de nombreuses terminaisons nerveuses.

L'épiderme est constitué à 95% de kératinocytes. Les cellules de Langerhans, avec les mélanocytes et les cellules de Merkel, forment les 5% restant. On peut le décomposer en quatre couches distinctes : la couche basale, la couche de Malpighi, la couche granuleuse et la couche cornée (figure 3).

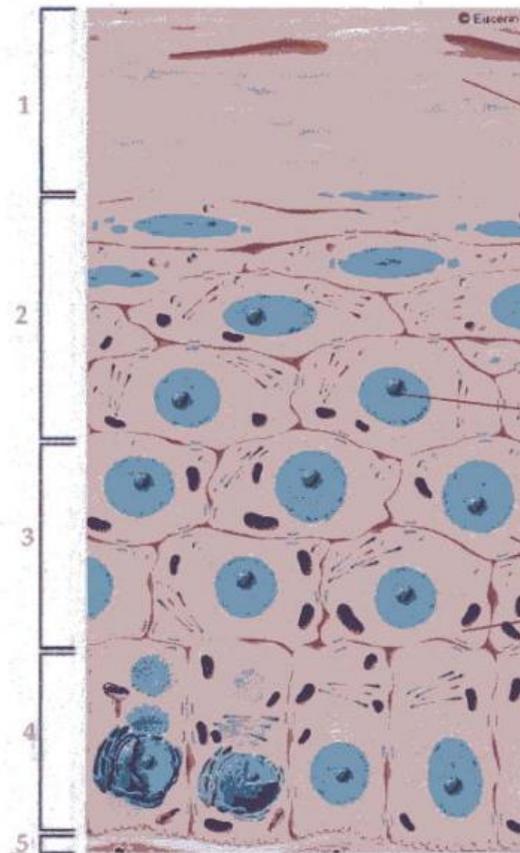


Figure 3 : Schéma de la structure de l'épiderme :

- 1 : la couche cornée
- 2 : la couche granuleuse
- 3 : la couche muqueuse (contient les cellules de Langerhans)
- 4 : la couche basale
- 5 : jonction avec le derme

a) La couche germinative ou couche basale :

C'est la couche la plus profonde de l'épiderme. Elle est composée d'une rangée de kératinocytes liés les uns aux autres et au derme par les desmosomes. Dans cette couche se trouvent aussi les mélanocytes qui ont pour fonction de synthétiser la mélanine.

b) La couche de Malpighi ou couche muqueuse :

Cette couche avec huit à quinze assises de cellules, est la couche la plus épaisse de l'épiderme. On l'appelle aussi couche de différenciation.

C'est à ce niveau que les kératinocytes vont subir des modifications morphologiques (grossissement et aplanissement) et biochimiques : les cellules vont commencer à synthétiser la kératine. Cette protéine fibreuse très résistante et représentant 95 % des protéines de l'épiderme remplira petit à petit l'ensemble de la cellule.

Cette couche muqueuse contient notamment des cellules de Langerhans. Ces cellules provenant de la moelle osseuse migrent vers l'épiderme où elles s'intercalent entre les kératinocytes sur toute la hauteur de la couche muqueuse, pour jouer leur rôle immunologique (sensibilisation).

c) La couche granuleuse :

Elle est assez mince et comprend, selon l'importance de la kératinisation, une à quatre rangées de cellules aplaties losangiques, dont le noyau peu visible est entouré de grains noirs (grains de kératohyaline, un précurseur de la kératine donnant à cette couche une teinte très foncée). C'est dans cette couche que le noyau commence à dégénérer. Les kératinocytes libèrent alors hors de la cellule un « ciment » à base de lipides qui renforce la cohésion intercellulaire permettant à la couche épidermique de remplir son rôle de barrière de protection.

d) La couche cornée (ou stratum corneum) :

C'est la couche la plus superficielle de l'épiderme. Elle est très fine (1/100ème de millimètres) sauf à des endroits spécifiques comme la paume des mains ou la plante des pieds. Les kératinocytes dans cette couche ne possèdent plus de noyau ni d'organites cellulaires, on les appelle des cornéocytes. Ces derniers sont aplatis et remplis de kératine (c'est en partie grâce à elle que la peau peut jouer un rôle protecteur) et leur superposition forme alors une couche imperméable et souple.

La couche cornée peut être subdivisée en deux parties, une partie où les cornéocytes sont encore reliés les uns aux autres grâce aux cornéodesmosomes, et une autre partie où sous l'action d'enzymes spécifiques, les cornéodesmosomes se dégradent permettant aux cornéocytes de se détacher : c'est la desquamation. Ce processus permet un renouvellement continu de l'épiderme en 40 jours (durée de vie d'un kératinocyte).

Même si les cellules de la couche cornée sont biologiquement mortes elles restent très efficaces et nous protègent ainsi des agressions. Cependant, cette couche n'est pas tout à fait imperméable car elle laisse s'évaporer de la vapeur d'eau (transpiration, qui régule la température du corps) et pénétrer certaines substances chimiques.

4.1.2 LE DERME ET L'HYPODERME

Le derme se trouve sous l'épiderme et est 10 à 40 fois plus épais que celui-ci. Sa surface, à la jonction avec l'épiderme, est recouverte par des saillies fibreuses, vasculaires et nerveuses appelées les papilles dermiques qui correspondent aux crêtes épidermiques. Cette disposition augmente la surface de contact entre le derme et l'épiderme ce qui favorise les échanges entre ces deux couches.

Le derme est constitué principalement d'eau mais aussi de fibres protéiques telles que l'élastine et le collagène assurant sa résistance, son extensibilité et son élasticité. Le collagène joue aussi un rôle cicatriciel. Contrairement à l'épiderme, il est vascularisé, ainsi il peut apporter à l'épiderme les nutriments et l'énergie dont il a besoin.

L'hypoderme est la couche la plus profonde et la plus épaisse de la peau. Il est rattaché au derme par des fibres de collagène et d'élastine. Les adipocytes sont les principales cellules de cette couche et servent à stocker les graisses. Grâce à sa richesse en vaisseaux sanguins et en graisse, l'hypoderme joue un rôle de réserves énergétiques : lors d'un effort les adipocytes fournissent des graisses à l'organisme. Cette couche adipeuse protège aussi l'organisme des variations de températures : la graisse est un isolant thermique. L'hypoderme permet aussi d'amortir les pressions auxquelles la peau est soumise.

Au cours du vieillissement cutané, certains composants de la peau s'amenuisent. Les cellules sont moins actives et la microcirculation se raréfie.

4.2 SENSIBILISATION CUTANEE

La sensibilisation est un des trois types d'effets néfastes pouvant être observés après un contact cutané avec une substance chimique toxique (irritation/corrosion, sensibilisation et effets systémiques).

4.2.1 CONSIDERATIONS GENERALES

Différentes pathologies sont connues comme étant des allergies : asthme, rhinite, ou dermatite de contact par exemple. L'allergie est une réaction anormale et spécifique de l'organisme déclenchée au contact d'une substance (allergène ou substance sensibilisante). Pour que l'allergie survienne, il est nécessaire qu'un premier contact ait eu lieu entre la substance sensibilisante et l'organisme : c'est la sensibilisation.

Le phénomène de sensibilisation peut-être lié à une exposition à des substances biologiques (par exemple, les rhinites liées à l'inhalation de pollens) ou chimiques (par exemple, l'asthme lié à l'inhalation de di-isocyanate). La sensibilisation peut être également liée à une exposition aux rayonnements ultra-violet, il s'agit alors de photosensibilisation qui n'est pas abordée ici. En effet, comme souligné dans le guide technique en appui au règlement REACh (ECHA, 2008b), le mécanisme mis en jeu n'est pas complètement élucidé.

Il convient de rappeler que le potentiel sensibilisant représente la capacité d'une substance à induire une sensibilisation. Il faut bien le dissocier de la capacité pour

une substance sensibilisante à déclencher l'allergie chez les personnes sensibilisées (dermatite dans le cas de la sensibilisation cutanée). La relation entre le potentiel sensibilisant et le potentiel déclenchant n'est pas connue. En général, la dose requise pour induire la sensibilisation est supérieure à celle requise pour déclencher une réaction allergique (Basketter *et al.*, 2005 ; ECHA, 2008a). Cependant, il est plus significatif de déterminer le pouvoir sensibilisant d'une substance par sa capacité à induire une sensibilisation (Kimber *et al.*, 2001).

Ainsi, une valeur toxicologique de référence pour les effets sensibilisants cutanés a pour objectif de protéger les individus non sensibilisés d'une sensibilisation cutanée. Elle n'a pas pour vocation de protéger les individus sensibilisés du déclenchement d'une réaction allergique.

Il est important de préciser que l'exposition cutanée inclut uniquement l'exposition de la peau. L'exposition spécifique des muqueuses et des yeux n'est pas prise en compte.

4.2.2 MECANISME

Le phénomène de sensibilisation cutanée est associé à une réaction immunitaire à médiation cellulaire (prolifération des lymphocytes T), formellement décrit comme une réaction d'hypersensibilité de type IV selon la classification de Gell et Coombs.

Dans ce type de réaction, l'allergène, après avoir traversé la couche cornée, réagit avec les protéines épidermiques pour former des adduits stables. Les protéines modifiées sont prises en charge alors par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) dans la couche muqueuse de l'épiderme, le plus souvent les cellules de Langerhans. Celles-ci quittent alors l'épiderme et migrent jusqu'au ganglion lymphatique de proximité. Au cours de la migration, les protéines modifiées sont dégradées en peptides et sont associées aux cellules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Les CPA présentent aux lymphocytes T naïfs les peptides, alors nommés épitopes, associés aux cellules du CMH. Les lymphocytes T portant le récepteur spécifique (T-cell receptor ou TCR), capables de reconnaître l'association CMH/épitopes, sont alors activés et prolifèrent. Cette phase de sensibilisation se déroule sans signes cliniques (Lepoittevin, 2008).

Lors d'une nouvelle exposition à l'allergène, les lymphocytes T spécifiques et activés infiltrent la région de contact au niveau de la peau et libèrent des cytokines et autres facteurs d'inflammation. Cette phase symptomatique (lésions érythémateuses et vésiculeuses) ou phase de révélation peut apparaître 24 heures après l'exposition (réponse retardée). Ce phénomène a fait l'objet de nombreuses études. Les laboratoires cosmétiques ont établi des valeurs seuils pour une dermatite de contact après exposition cutanée pour faire face à une exposition répétée chronique à des produits cosmétiques (INERIS, 2007).

Il est souvent supposé que la sensibilisation est un effet local (effet observé au niveau de la zone de contact) : la dermatite de contact est associée à une sensibilisation cutanée et l'asthme ou la rhinite à une sensibilisation respiratoire. En effet, la substance est impliquée dans la phase d'induction de la sensibilisation qui a lieu à proximité du point de contact entre la substance et l'organisme. Cependant, le système immunitaire est mis en jeu lors du phénomène de

sensibilisation et celui-ci agit par voie systémique (ECHA, 2008b) : les effets peuvent survenir en un site distant du point contact initial. Les effets sensibilisants ne sont donc pas des effets locaux même si à proprement parler, ils ne sont pas des effets systémiques ; un effet systémique impliquant une distribution de la substance dans l'organisme via la circulation générale (ADEME, 2009).

Compte tenu de ces considérations, la survenue d'une sensibilisation cutanée après une exposition autre que par voie cutanée est théoriquement possible. Ceci n'est pas observé en pratique et les essais toxicologiques disponibles à l'heure actuelle ne permettent pas d'identifier un tel potentiel. Toutefois, la possibilité d'une sensibilisation respiratoire avec une exposition cutanée à un allergène respiratoire a été suggérée par des données humaines et animales (ECHA, 2008b). En raison de l'état limité des connaissances sur ces possibilités d'effets croisés, l'étude de la relation dose-réponse pour la sensibilisation cutanée se limite aux effets cutanés liés à une exposition cutanée.

5. TESTS DE SENSIBILISATION ET DOSES CRITIQUES ASSOCIEES

5.1 TESTS CHEZ L'HOMME

Il existe plusieurs tests de sensibilisation utilisés chez l'homme. Ces tests varient en fonction du nombre d'applications d'un patch et de sa localisation. Les 2 tests les plus utilisés sont les suivants :

- **Le test HRIPT : Human Repeated Insult Patch Test** (Draize *et al.*, 1944 et Draize; 1959).

La concentration cutanée choisie pour la phase d'induction de la sensibilisation est déterminée en s'appuyant sur les résultats des tests préalables chez les animaux (tests de sensibilisation chez les cobayes) ou chez l'homme (études d'irritation chez l'homme), voire sur les résultats d'études épidémiologiques. Le test original « Draize HRIPT » consiste en une application consécutive de dix patchs sur un site différent de la peau pour chaque patch (bras ou dos). Chaque patch est appliqué 24 heures trois fois par semaine. Pour chaque site d'induction, l'apparition d'un érythème ou d'un œdème est observée. Deux semaines après la dernière induction, un patch est de nouveau appliqué pendant 24 heures et la réponse est immédiatement regardée et analysée. Cette dernière réponse est comparée à la première obtenue après le patch d'induction. La dose critique associée à ce test peut être un NOAEL ou un LOAEL.

- **Le test HMT : Human Maximization Test** (Kligman, 1966 ; Kligman et Epstein, 1975).

Le test HMT inclut 5 applications de patchs sous occlusion pendant 48 heures au niveau du même site de la peau avec une période de coupure de 24 heures entre les applications successives. Les substances qui ont un potentiel irritant sont appliquées à une concentration induisant un érythème modéré. Pour les substances non irritantes, la surface de peau exposée est pré-traitée pendant 24 heures par application d'un patch de lauryl sulfate de sodium à 5 % sous

occlusion. Après une période de latence de 2 semaines après la dernière induction, la sensibilisation est évaluée par l'application d'un patch pendant 48 h sous occlusion avec la concentration maximum non irritante de la substance à tester. Après 24 à 48 heures d'observation, on note l'indice de sensibilisation. Le test HMT peut produire des effets néfastes graves sur la peau. Pour cette raison, il est considéré aujourd'hui comme non-acceptable.

5.2 TESTS CHEZ L'ANIMAL

Le règlement européen sur les méthodes d'essai (CE, 2008), en reprenant les lignes directrices OCDE n°406 et n°429 (OCDE 1992, 2002), présente les différents tests menés chez l'animal qui sont utilisés pour évaluer le potentiel sensibilisant des substances.

Pendant des décennies, le cobaye a été l'animal de prédilection pour les essais visant à prévoir le seuil de sensibilisation. Parmi les différents tests disponibles, le test de maximisation réalisé chez le cobaye (Magnusson et Kligman, 1969) (**GPMT** : Guinea Pig Maximization Test) était le plus utilisé.

Récemment, dans l'objectif d'améliorer le bien-être des animaux, des méthodes d'évaluation du potentiel de sensibilisation chez la souris ont été mises au point offrant l'avantage d'un essai de plus courte durée et d'un traitement minimal d'animaux. Deux types d'essai ont été développés : l'essai de gonflement de l'oreille de souris (MEST : mouse ear swelling test) et l'essai de stimulation locale sur les ganglions lymphatiques (**LLNA** : Local Lymph Node Assay ou ELGL : essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques).

LLNA

Le test LLNA réalisé chez la souris permet d'évaluer le potentiel de « sensibilisation » cutanée (ou dermatite de contact) d'une substance, et spécialement l'induction de la phase de sensibilisation. En utilisant de la thymidine radiomarquée qui s'intègre dans l'ADN, le test LLNA mesure la prolifération des lymphocytes T induite par l'exposition cutanée à une substance sensibilisante.

Le ratio de la prolifération des lymphocytes chez les souris traitées par rapport aux souris non traitées est un indicateur du potentiel de sensibilisation.

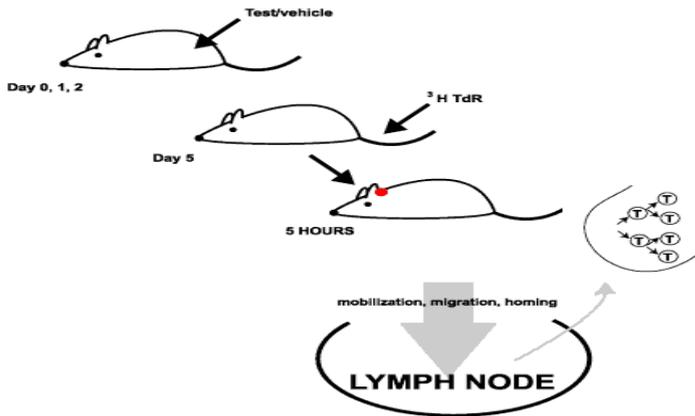


Figure 4 : Test LLNA (Local Lymph Node Assay).

Source : Caat (Center for Alternative to Animal Testing)

<http://caat.ihsph.edu/programs/workshops/20th/proceedings/kimber.htm>

En 2000, le centre européen de validation des méthodes alternatives (ECVAM) a considéré que le test du LLNA avait été suffisamment validé et accepté pour pouvoir être adopté en tant que nouvelle ligne directrice pour évaluer l'effet sensibilisant des substances. La ligne directrice n°429 de l'OCDE relative au protocole du LLNA a ainsi été adoptée et publiée en 2002 (OCDE, 2002).

Pour le test du LLNA, une méthodologie de calcul d'une dose critique a été développée par Felter *et al.* (2002) et Gerberick *et al.* (2001a et b). Le test LLNA étudie la phase d'induction de la sensibilisation cutanée et fournit des données quantitatives permettant d'évaluer l'effet en fonction de la dose. Il donne un indice de stimulation 'IS', stimulation nécessaire pour induire une prolifération des lymphocytes T. La **valeur EC₃**, dose seuil induisant une prolifération de lymphocytes 3 fois supérieure au témoin négatif (IS=3), est la dose critique du test LLNA (Basketter *et al.*, 2000 ; Gerberick *et al.*, 2001a et b).

Autres tests

Les autres tests tel que le GPMT (Guinea Pig Maximization Test) et le MEST (Mouse Ear Swelling Test) évaluent le potentiel sensibilisant par l'observation de la réponse cutanée après application d'une substance sensibilisante et sont également des tests reconnus. Toutefois, l'observation de la réponse cutanée semble être un résultat moins précis que la mesure du taux de prolifération effectuée lors du test LLNA pour calculer le potentiel sensibilisant d'une substance. De plus, le test GPMT est noté comme un essai très sensible sur-estimant parfois le potentiel sensibilisant d'une substance en raison entre autres, de l'application intradermique de la substance. Le MEST, premier test validé en alternative au test de maximalisation (GPMT), n'a jamais fait l'objet d'une ligne directrice de l'OCDE ou d'une reconnaissance par les agences réglementaires.

Enfin, un dernier test peut être utilisé pour évaluer le potentiel sensibilisant d'une substance : le Buehler Guinea Pig Test. Mais, contrairement au test GPMT, ce test sous-estime le potentiel sensibilisant d'une substance.

Pour le test du GPMT, la dose critique est une dose avec effet (plus ou moins proches du LOAEL), comme détaillé au paragraphe 7.2.3.

5.3 TESTS IN VITRO ET AUTRES APPROCHES

Les changements récents dans l'Union Européenne stimulent le développement des approches non-animales. La réglementation sur les produits cosmétiques interdit l'évaluation des effets toxiques sur les animaux (produits finis et ingrédients) depuis 2009. Le règlement REACH de 2007 vise à limiter le recours à l'expérimentation animale pour évaluer la toxicité des substances chimiques.

A l'heure actuelle, aucun test de sensibilisation *in vitro* n'est accepté réglementairement (ligne directrice OCDE ou méthode européenne) ni validé scientifiquement (ECVAM, 2009). Aucun protocole n'est en cours de validation (ECVAM, 2009) mais des méthodes sont en cours de développement sur les propriétés requises par les molécules pour induire la sensibilisation (essais *in vitro*, modèles prédictifs dits essais *in silico*) comme : (1) biodisponibilité au niveau de l'épiderme et capacité à pénétrer la couche cornée pour atteindre l'épiderme, (2) réactivité chimique et potentiel à se lier à la protéine porteuse, (3) analyses cellulaires et caractéristiques requises pour provoquer ou augmenter l'expression des cytokines nécessaires à l'induction de la réponse immunitaire (ECHA, 2008a).

Ces essais *in vitro* et *in silico* ne couvrent qu'une partie spécifique du processus de sensibilisation et ne peuvent être utilisés qu'en support à d'autres types de données sur le potentiel sensibilisant d'une substance (ECHA, 2008a), soit, en d'autres termes, comme axe d'orientation. Ils ne peuvent être retenus lors de l'élaboration de DNEL. A noter toutefois que Maxwell et Mackay (2008) ont développé un modèle mathématique, à partir de 500 articles, pour évaluer la contribution relative de chacun des mécanismes à l'ensemble du processus comme par exemple la prolifération spécifique des lymphocytes T dans le ganglion lymphatique. Cette plate-forme d'intégration doit permettre de fournir une justification biologiquement pertinente pour l'interprétation des différents types de données prédictives et pourrait se révéler être un outil utile. Jowsey *et al.* (2006) ont également proposé d'attribuer un score aux résultats des essais : alerte structurale, biodisponibilité, réactivité, maturation des cellules dendritiques et prolifération des lymphocytes T afin de calculer un indice du pouvoir sensibilisant (Index of Sensitising potency ou ISP).

6. EFFETS SENSIBILISANTS CUTANES ET EXTRAPOLATION DES DONNEES

Lors de l'extrapolation d'une donnée expérimentale (dose critique) pour établir une VTR ou DNEL, c'est-à-dire une dose¹ maximale d'exposition à ne pas dépasser chez l'homme, il faut considérer plusieurs aspects. Par exemple, toute modification de métabolisation d'une substance peut modifier la dose effective, c'est-à-dire la dose interne nécessaire au déclenchement de l'effet (sensibilisation ici).

Les différentes méthodologies d'élaboration de VTR existantes pour les effets systémiques par voie orale et respiratoire (OMS, US EPA, ATSDR, RIVM, Santé Canada, OEHHA, DNEL selon REACH) prennent en compte ces aspects. En effet, pour les effets à seuil, la démarche consiste en :

- L'identification d'une dose critique servant de point de départ pour l'élaboration de la VTR (avec ajustement de cette dose le cas échéant)
- La détermination de facteurs d'incertitude permettant d'obtenir un niveau de sécurité acceptable pour l'homme.

Dans le cadre d'une VTR pour la voie cutanée, il est important de distinguer : les incertitudes pouvant être prises en compte par les facteurs existant dans le cadre des effets systémiques (liées à l'extrapolation de résultats expérimentaux) et les incertitudes pouvant nécessiter une attention particulière pour les effets sensibilisants cutanés.

Les différents aspects liés à la voie cutanée ont été exposés dans le rapport INERIS de 2007. Ils ont été revus ici afin de les mettre en perspective avec la nécessité ou non d'appliquer un facteur d'incertitude spécifique pour des effets sensibilisants cutanés. La discussion s'appuie ainsi sur la revue bibliographique du rapport INERIS de 2007 et sur l'ouvrage intitulé Absorption and Toxicity Assessment (Roberts and Walters, 2008a), en particulier les chapitres sur l'absorption et la toxicité cutanée (Roberts and Walters, 2008b et c). Toutes les références du document INERIS de 2007 n'ont pas été revues mais ont été citées pour plus de facilité sur l'origine de la donnée.

6.1 ABSORPTION CUTANEE

L'absorption cutanée estimée à partir de tests chez l'animal est considérée comme plus élevée que celle chez l'homme (US EPA, 1992 ; ECETOC, 1993 ; Stevenson *et al.*, 1994). Ainsi, la peau des animaux de laboratoire notamment celle du rat, du cobaye et du lapin peut être considérée comme plus perméable que la peau humaine pour la majorité des molécules, même si la peau des singes semble similaire à celle des hommes (Vecchia et Bunge, 2005 ; OCDE, 2004 ; ECETOC, 1993).

Dans la méthodologie DNEL pour les effets systémiques, la proposition par défaut est de considérer l'absorption chez l'homme et chez l'animal comme similaires. Si des données sur les différences d'absorption entre l'animal et l'homme pour une substance spécifique sont disponibles, elles peuvent être utilisées pour ajuster la

¹ Dose ou concentration. Le terme dose s'entend au sens de "seuil".

dose critique. Cette approche paraît pertinente également pour les effets sensibilisants cutanés, l'utilisation des données obtenues chez la souris (test LLNA) étant à considérer comme conservatrice.

En conclusion : l'influence de l'absorption cutanée ne nécessite pas l'application d'un facteur spécifique dans le cas des expositions cutanées.

6.2 INFLUENCE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES SUBSTANCES

Lors d'une exposition par voie cutanée, il est souvent fait état de l'importance des propriétés physico-chimiques sur l'absorption : la lipophilie, le poids moléculaire, la structure électronique (les espèces ionisées pénètrent mal à travers la peau) ou la polarité ont été identifiés comme facteurs influençant l'absorption cutanée (INERIS, 2007). Comme présentées au paragraphe précédent, les différences d'absorption (au niveau cutané ou systémique) ne sont pas prises en compte par un facteur mais sont étudiées au cas par cas, si des données pour une substance spécifique sont disponibles.

Par ailleurs, les propriétés physico-chimiques peuvent avoir un impact sur la production de cytokines et ainsi la réponse immunitaire. Toutefois, les propriétés physico-chimiques influencent d'une manière générale la toxicité. Or, pour les effets systémiques, l'influence des propriétés physico-chimiques ne fait pas l'objet d'un facteur spécifique.

En conclusion : l'influence des propriétés physico-chimiques ne nécessite pas l'application d'un facteur spécifique dans le cadre des effets sensibilisants cutanés.

6.3 VARIATIONS INTER-ESPECES : INFLUENCE DU METABOLISME DE LA PEAU ET TOXICO-CINETIQUE

Il existe encore de nombreuses incertitudes et questions en ce qui concerne l'importance du métabolisme cutané pour estimer le risque systémique lié à l'exposition cutanée à des substances chimiques (INERIS, 2007). Dans le cadre de la relation dose-réponse, la question qu'il convient de se poser est : le métabolisme cutané est-il différent chez l'animal et chez l'homme ? La différence est-elle supérieure à celle prise en compte pour les effets systémiques et nécessite-t-elle donc un facteur spécifique ?

Les différences de métabolisme représentent la majeure partie du facteur d'incertitude lié aux variations inter-espèces. Le métabolisme hépatique est évidemment inclus mais aussi les métabolisations locales : tractus gastro-intestinal lors de l'exposition voie orale ou muqueuse oro-nasale dans le cas d'une exposition par inhalation. Peu d'information est disponible sur ces métabolisations locales mais un facteur inter-espèces d'une valeur de 10 a couramment été employé lors de l'extrapolation de données de l'animal à l'homme. La peau est un organe métaboliquement actif qui contient de nombreuses enzymes mais en très faibles concentrations : la capacité métabolique de la peau a été estimée à 2% de

celle du foie. Par ailleurs, il a été suggéré que la nature de l'activité enzymatique était similaire à l'activité hépatique (IGHRC, 2006).

Il a été montré que les molécules chimiques qui pénètrent rapidement à travers la peau (conséquence de leurs propriétés physico-chimiques) sont moins métabolisées au niveau cutané (Lockley *et al.*, 2004) que les substances qui se lient fortement aux molécules de la peau ou qui sont retenues (ex : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques) mais la capacité de rétention de la peau est discutée ultérieurement (§ 6.5.3).

En ce qui concerne le cas des effets sensibilisants, Felter *et al.* (2002) et Griem *et al.* (2003) ont considéré que les différences de métabolisme entre les espèces ne jouaient pas un rôle significatif dans les variations inter-espèces en raison de l'implication d'un métabolisme local seulement (absence de passage systémique et de métabolisme hépatique). Par conséquent, ces auteurs ont proposé l'application d'un facteur inter-espèces réduit par rapport à celui appliqué dans le cadre des effets systémiques. Cette hypothèse avait été retenue initialement par l'INERIS.

En conclusion : l'application d'un facteur supplémentaire pour les variations inter-espèces dans le cas des effets sensibilisants cutanés n'est pas appropriée. Même si les effets sensibilisants ne sont pas à proprement parler des effets locaux (§4.2.2), la métabolisation (cutanée) est locale et l'application d'un facteur d'incertitude inter-espèces réduit peut ainsi être évoquée. Les données disponibles sur la nature et la capacité de l'activité enzymatique de la peau, en comparaison à celles du foie, conforte l'application d'un facteur d'incertitude réduit pouvant couvrir les variations liées au métabolisme de la peau.

6.4 VARIATIONS INTRA-ESPECES

Les variations intra-espèces regroupent les variations liées à l'âge, aux différences de sexe, au polymorphisme des espèces (différences génétiques) ou aux variations ethniques.

Très peu de données sont disponibles sur l'importance de chacune des composantes d'une manière générale et leur influence sur la sensibilisation a été peu étudiée. Les quelques données disponibles sont par ailleurs contradictoires. Dans un article de 1999, Robinson présente les différentes études ayant mis en évidence que les origines ethniques, le sexe et l'âge du sujet pourraient avoir une influence sur le phénomène de sensibilisation.

Dans le cas de l'âge par exemple, certaines études montrent que la fonction de barrière de la peau augmente avec l'âge des individus (Roskos *et al.*, 1989) et que la sensibilité chez les personnes âgées (> 60 ans) est réduite comparée aux jeunes adultes (Robinson, 1999, Lejman *et al.*, 1984). Il est rapporté que l'intégrité de la peau n'est pas fonctionnelle chez les nourrissons prématurés (Barker *et al.*, 1987 ; US EPA, 1992). Cependant, ils développent une barrière compétente dès 4 semaines après leur naissance (Kalia *et al.*, 1996). Par ailleurs, plusieurs études décrivent que les jeunes enfants seraient moins susceptibles au pouvoir sensibilisant des substances que les adultes (Cassimos *et al.*, 1980 ; Epstein *et al.*, 1961 ; Lejman *et al.*, 1984).

Pour ce qui est de l'influence du sexe, il a été montré qu'il n'existe aucune différence nette entre l'homme et la femme dans l'intégrité de la barrière cutanée (Reed *et al.*, 1995) même si certains articles ont rapporté que les femmes, présentant une peau plus fine, semblaient avoir une plus grande perméabilité cutanée que les hommes (Leyden *et al.*, 1977 ; Jordan *et al.*, 1977 ; Rees *et al.*, 1989). Certaines études indiquent que chacun serait plus sensible pour des allergènes différents, alors que d'autres études ne montrent aucune différence entre l'homme et la femme dans la réponse à l'exposition à des substances sensibilisantes (INERIS, 2007).

Les variations génétiques sont intrinsèquement et clairement identifiées comme ayant une influence sur les réactions des individus et donc les variations intra-espèces. Dans le cas de la sensibilisation, un défaut génétique de métabolisation de la peau peut ainsi influencer l'absorption cutanée (Smith *et al.*, 2001; Dupuis *et al.*, 1979). Les variations génétiques peuvent aussi avoir un impact sur la capacité des lymphocytes T à reconnaître l'épitope conjugué compte tenu de la variabilité potentielle du T-cell receptor (Büdingner *et al.*, 2001). Toutefois, les facteurs génétiques sont encore peu connus.

Dans le cas des origines ethniques, plusieurs rapports anciens montrent que les peaux pigmentées auraient une plus faible susceptibilité à la sensibilisation (Epstein *et al.*, 1961 ; Rostenberg *et al.*, 1941) mais dans les travaux de Kligman (1966), la différence est légère et non significative. Il n'y a pas plus d'information disponible.

Pour les variations intra-espèces, de nombreuses études supportent la proposition d'un facteur de 10 afin de protéger les populations les plus sensibles (Friedmann et Moss, 1985 ; Moss *et al.*, 1985 ; Friedman *et al.*, 1990 ; White *et al.*, 1986) et couvrir la majeure partie de la population (Felter *et al.*, 2002). La contribution de chacune des composantes liées à l'âge, aux différences de sexe, au polymorphisme des espèces ou aux origines ethniques sur les variations intra-espèces n'est pas connue.

En conclusion : l'influence de chacune des composantes (âge, sexe, génétique, ethnie) sur les variations intra-espèces dans le cas des expositions cutanées et des effets sensibilisants est difficile à évaluer et peu pertinente. Les données sont rares et ne permettent pas d'affirmer la nécessité d'un éventuel facteur supplémentaire (spécifique) pour les expositions cutanées et les effets sensibilisants.

6.5 INFLUENCE DES VECTEURS DANS LESQUELS LES SUBSTANCES SONT PRESENTES

La diffusion d'une substance à travers la peau est fonction de ses propriétés physicochimiques mais aussi de la nature du solvant/surfactant dans lequel elle est présente. Celui-ci peut interagir avec la couche cornée de la peau et modifier sa fonction de barrière.

Au cours des essais chez l'animal, la substance testée est incorporée dans un véhicule. Les véhicules sont choisis de manière à maximiser les concentrations de l'essai et la solubilité ainsi qu'à produire une solution ou une suspension se prêtant

à l'application de la substance d'essai. Les véhicules recommandés sont, par ordre de préférence : mélange acétone/huile (4:1 v/v), le diméthylformamide, la méthyléthylcétone, le propylène glycol et le diméthylsulfoxyde. Ces véhicules sont connus pour déclencher une réaction constante (CE, 2008). D'autres véhicules peuvent également être utilisés le cas échéant si le choix est justifié (par exemple, solvant dans lequel la substance est commercialisée).

Les différences inter-laboratoires existant sur les résultats des tests LLNA sont rapportées comme étant liées notamment au véhicule utilisé (ainsi qu'à la souche de souris). Toutefois, Kimber *et al.* (2002) ont également montré que les différents véhicules utilisés (solvants) n'influençaient pas la valeur EC₃. De plus, les variations inter-laboratoires ne sont pas supérieures à un facteur 2 ou 3 (Dean *et al.*, 2001 ; Warbrick *et al.*, 1999a,b).

L'incertitude à prendre en compte concerne ainsi l'exposition chez l'homme qui est souvent plus complexe et qui peut notamment concerner plusieurs substances simultanément. Cette exposition concomitante peut mettre en jeu des substances possédant un pouvoir irritant ou améliorant la pénétration cutanée et pouvant alors jouer un rôle de vecteur pour la substance sensibilisante.

En conclusion : la notion de véhicule affectant les propriétés de barrière de la peau est retenue de manière spécifique à la voie cutanée.

6.6 CONDITIONS D'EXPOSITION

6.6.1 SITE D'EXPOSITION

Zone d'exposition

De nombreuses études démontrent que l'absorption cutanée varie chez l'homme en fonction de la région exposée (Maibach *et al.*, 1971 ; Wester *et al.*, 1985 ; Feldmann et Maibach, 1967 et 1969 ; Wester et Maibach, 1999). Le coude, la paume des mains et la plante des pieds sont les régions les moins perméables du corps, au contraire du visage, du cou et surtout des zones génitales qui sont les zones les plus perméables.

Des études animales montrent qu'il existe également des différences d'absorption cutanée en fonction des régions du corps chez la souris (Kalish *et al.*, 1996).

En conclusion : la notion de zone d'exposition est retenue de manière spécifique à l'étude des effets sensibilisants cutanés.

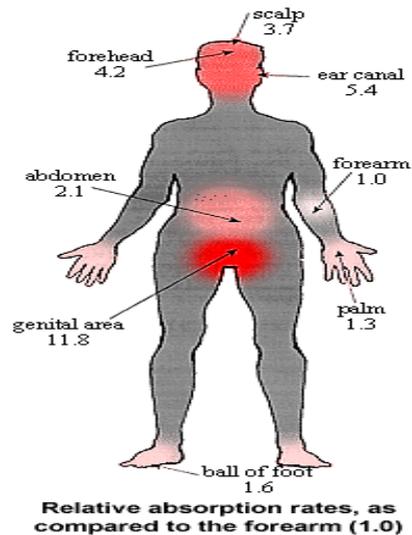


Figure n° 2 : Taux d'absorption en fonction des régions du corps

Source : www.agf.gov.bc.ca/pesticides (consulté en janvier 2009)

Surface de peau exposée

La surface de la peau exposée influence l'absorption : une plus grande surface de peau exposée implique une plus grande absorption potentielle, dans la mesure où le taux d'absorption n'est pas saturé. Il est reconnu que le potentiel sensibilisant dépend de la quantité d'allergène par unité de surface cutanée et non de la quantité totale de substance appliquée (Kimber *et al.*, 2001) ; la VTR est exprimée en mg/cm², l'influence de la surface de la peau sur le taux d'absorption n'est donc pas à prendre en compte dans le calcul de la VTR. La surface de la peau exposée est à prendre en compte lors de l'estimation de la dose d'exposition et non dans le calcul de la VTR (INERIS, 2007).

6.6.2 ETAT DE LA PEAU

Les différents états de la peau influencent particulièrement la fonction de barrière de la peau. En effet, la perméabilité de la peau augmente en fonction de facteurs :

- liés au sujet ;
- liés aux conditions environnementales.

Certains défauts génétiques, comme des défauts de métabolisation lipidique ou protéique de la couche cornée, entraînent une diminution de la fonction de barrière de la peau (Madison, 2003 ; Williams *et al.*, 2000). Les inflammations de la peau telles que le psoriasis ou la dermatite atopique entraînent une diminution des capacités de barrière de la peau conduisant ainsi à une augmentation de la perméabilité (Schaefer *et al.*, 1977 ; Humbert, 2003). **Ces différences de sensibilité et de génétique sont prises en compte par le facteur intra-espèces classique.**

De nombreux facteurs environnementaux altèrent la fonction de barrière cutanée (US EPA, 1992 ; Choi *et al.*, 2005) :

- Dommages physiques (brûlure, irritation...),
- Dommages chimiques (détergents, solvants,...),
- Occlusion de la peau (vêtements trop serrés, port des gants,...),
- Augmentation de l'hydratation (par exemple lavage de mains accru)
- Autres facteurs de stress.

La température de la peau augmente également le taux de pénétration des molécules chimiques (Danon *et al.*, 1986). Une température élevée affecte le flux sanguin des vaisseaux de la peau et peut donc augmenter l'absorption cutanée des substances (Roberts and Walters, 2008c). L'augmentation de la température peut également affecter la structure de la couche cornée de la peau, particulièrement la structure cristalline des lipides, conduisant à une augmentation de la perméabilité (Pilgram *et al.*, 1999 ; De Jager *et al.*, 2004).

De même, Hosoi *et al.* (2000) ont montré que le taux d'humidité avait une influence sur la réponse immunitaire des souris, le nombre de cellules de Langerhans étant augmenté avec une faible humidité. Par conséquent, l'absorption des allergènes serait augmentée. Certaines études montrent que la peau serait plus sensible à certaines substances irritantes lors d'une faible humidité en hiver par rapport à l'été (Basketter *et al.*, 1996).

Ces altérations possibles de la peau sont à prendre en considération comme spécifique de la voie cutanée et pouvant influencer la sensibilisation lors de l'élaboration de la VTR.

A noter qu'il est possible de pondérer l'influence de l'occlusion dans le cas de l'essai chez le cobaye car celui-ci est réalisé en conditions occlusives ou semi-occlusives. En outre, il convient de préciser le cas de l'irritation. Les travaux de Malten *et al.* (1981) suggèrent que la peau est agressée tous les jours par des composés irritants. L'extension des dommages dépend du temps d'exposition et du potentiel irritant des substances. Quand les agressions cessent, la peau se reconstruit. Cependant, s'il existe un contact avec une substance ayant un fort potentiel d'irritation et que le processus de réparation n'est pas terminé, il peut exister une accumulation des effets qui vont réduire le seuil de sensibilisation. A ce stade les dommages sont dits sub-cliniques, donc non visibles. Cependant, les dommages peuvent encore s'accumuler de telle sorte que le seuil de sensibilisation soit atteint et par conséquent les dommages deviennent visibles. La peau perd alors ces fonctions de barrière. Si le contact avec la substance irritante s'arrête, la peau peut alors se reconstruire et revenir en apparence normale, mais elle gardera une certaine vulnérabilité et le seuil de sensibilisation sera toujours inférieur au seuil initial. Il est donc nécessaire d'éviter tout contact avec un irritant afin que la peau ait le temps de se reconstruire avant une nouvelle agression. Lors d'une lésion cutanée, comme la dermatite, si le sujet continue à être exposé à un irritant, les effets continuent à s'accumuler, et si le point de non-retour est atteint, la peau perd toute sa capacité à se réparer d'elle-même (Packham, 2007). Ainsi, la pertinence de résultats de sensibilisation positifs issus de tests de sensibilisation réalisés avec une substance irritante peut être remise en question (IGHRC, 2006). **Cette notion de contact et d'agression avec une substance**

irritante est spécifique des effets sensibilisants cutanés. Elle est cependant redondante avec l'incertitude liée au vecteur déjà évoquée.

6.6.3 EXPOSITION REPETEE ET EFFET RESERVOIR

Les données concernant les effets suite à des expositions répétées et leur influence sur l'absorption cutanée sont controversées (Roberts and Walters, 2008c).

Néanmoins, les études de Ford *et al.* (1988), de Friedmann *et al.* (1990) et de Vandenberg et Epstein (1963) montrent qu'une exposition répétée sur une longue durée augmenterait le risque de sensibilisation.

Effet réservoir

De nombreuses études ont montré que la peau est un réservoir potentiel pour les molécules chimiques et qu'elle peut relarguer ultérieurement les substances mises en réserve (INERIS, 2007). En d'autres termes, l'absorption est potentiellement plus importante, après exposition répétée, pour les substances concernées par ce phénomène de réserve et de relargage. Par conséquent, l'induction de la sensibilisation après exposition répétée peut théoriquement survenir à des doses inférieures à la dose seuil déterminée expérimentalement (administration unique). Cette possibilité a déjà été rapportée (ECHA, 2008a ; RIVM 2005 ; Griem, 2003).

En conclusion : cette notion d'effet réservoir, en lien avec les expositions répétées, est considérée comme spécifique de la voie cutanée pouvant influencer la sensibilisation.

7. METHODE D'ELABORATION DE VTR POUR LES EFFETS SENSIBILISANTS CUTANES

En 2007, en absence de méthodologie reconnue, l'INERIS a proposé une méthode d'élaboration de VTR pour les effets sensibilisants cutanés. Aujourd'hui, il existe la méthodologie européenne DNEL publiée dans le guide technique européen en appui au règlement REACH et présentée ci-après.

Bien que les deux méthodologies s'appuient sur les deux mêmes études de Felter *et al.* (2002) et de Griem *et al.* (2003), elles reposent sur des interprétations et des hypothèses de travail différentes quant au choix des doses critiques et des facteurs d'incertitude adéquats. Certaines hypothèses proposées par l'INERIS en 2007, comme les tests éligibles à la relation dose-réponse, ont été ajustées avec la méthodologie DNEL.

Ainsi, après avoir exposé le cadre méthodologique d'établissement des DNEL, des propositions INERIS pour l'établissement de VTR seront présentées avec notamment la démarche à suivre en l'absence de test LLNA.

7.1 METHODOLOGIE DNEL

L'évaluation du potentiel sensibilisant évoquée dans le guide technique européen suit l'approche suivante :

- Une approche qualitative par catégorisation pour définir les mesures de maîtrise des risques (MMR ou RMM pour Risk Management Measures) et les conditions opératoires (OC pour operational conditions) appropriées ;
- Une approche quantitative avec l'élaboration d'une DNEL pour évaluer la probabilité résiduelle de risque après la mise en place des RMM et OC.

Concernant l'approche qualitative, le guide technique renvoie à celui sur la caractérisation du risque et aux approches qualitatives (ECHA, 2008c). Celui-ci expose dans un premier temps, la nécessité d'affecter une substance sensibilisante (classée R43) à une des deux catégories suivantes :

- Catégorie "danger important" pour les substances dont les résultats des études sont "extrêmement sensibilisant" ou "fortement sensibilisant"
- Catégorie "danger modéré" pour les substances dont le résultat des études est "modérément sensibilisant"

Si les résultats des études ne permettent pas de placer une substance dans une des deux catégories, il convient de placer la substance dans la catégorie "danger important", laquelle implique les RMM et OC les plus restrictives.

Dans les cas où la base de données fournit des informations fiables sur la relation dose-réponse, une DNEL peut être établie pour évaluer la probabilité des risques résiduels après la mise en œuvre des RMM et OC. Sur la base de cette probabilité, le déclarant peut affiner la façon dont il utilise ou recommande l'utilisation de la substance et réviser les scénarios d'exposition.

7.1.1 DETERMINATION DES DOSES CRITIQUES

7.1.1.1 DONNEES ANIMALES

Le test du LLNA et les tests sur le cobaye (GPMT et Buehler Test) fournissent des informations sur le potentiel sensibilisant et sur la relation dose-réponse mais le test du LLNA est considéré comme plus performant.

Afin d'affecter les substances dans une des deux catégories préalablement citées, "danger important" ou "danger modéré", les résultats des tests LLNA, GPMT et Buehler Test doivent être utilisés pour déterminer si la substance est extrêmement, fortement ou modérément sensibilisante. Pour le test du LLNA, le potentiel sensibilisant s'appuie sur les valeurs d'EC₃.

Tableau 1 : Résultats du test LLNA et potentiel sensibilisant

Catégorie	EC ₃ (%)*
Extrêmement sensibilisant	≤ 0,2
Fortement sensibilisant	> 0,2 - ≤ 2
Modérément sensibilisant	> 2

* Souvent exprimé en %, l'EC₃ doit être converti en µg/cm² par la relation suivante :

EC₃ [%] * 250 [µg/cm²/%] = EC₃ [µg/cm²] en considérant une dose de 25 µL sur une surface de 1 cm² et supposant une densité du liquide de 1².

S'agissant de la dose critique, le guide technique propose l'EC₃ issue du LLNA pour l'élaboration d'une DNEL sensibilisante. L'EC₃ est considérée comme un LOAEL pour l'induction de la sensibilisation.

Si des données humaines fiables sont disponibles (NOAEL/LOAEL), elles doivent être prises en compte en parallèle pour la détermination de la dose critique.

7.1.1.2 DONNEES HUMAINES

D'une manière générale, les données chez l'homme prévalent à celles chez l'animal mais la fiabilité des études dans la population humaine doit être attentivement étudiée. Les données chez l'homme peuvent être écartées notamment lorsqu'elles sont issues d'anciennes études. Le nombre d'individus inclus dans les études doit également faire l'objet d'une attention particulière. Par ailleurs, pour des raisons éthiques, les tests chez l'homme ne sont plus réalisés et seules des données historiques peuvent être utilisées.

Les données humaines, si fiables et disponibles, peuvent être exploitées en corrélation avec le LLNA pour définir la dose critique. Il s'agit de l'approche par le poids de la preuve ou Weight of Evidence (WoE).

Les tests chez l'homme pouvant fournir des informations sur le potentiel sensibilisant sont le HRIPT et le HMT. Lorsqu'un test HRIPT est utilisé, le NOAEL observé dans l'étude serait à retenir en priorité par rapport à un EC₃ (LLNA) ou au NOAEL issu d'un test HMT.

- Si les valeurs des NOAEL/LOAEL d'une étude chez l'homme et l'EC₃ sont cohérentes alors la plus faible doit être retenue comme dose critique.

² Voir commentaire INERIS sur cette hypothèse au chapitre suivant.

- Si les valeurs divergent d'un ordre de grandeur ou plus alors :
 - Le NOAEL issu d'un test HRIPT peut être retenu lorsqu'il correspond à la valeur la plus faible ;
 - Si le NOAEL issu d'un test HRIPT est supérieur à l'EC₃, l'utilisation du NOAEL doit être rigoureusement justifiée (étude robuste) pour passer outre la valeur de l'EC₃

Il est possible d'exposer dans un tableau récapitulatif les propositions du guide technique (implicites ou explicites) selon différentes situations de WoE.

Tableau 2 : WoE avec données humaines (HRIPT et HMT) et LLNA et détermination de la dose critique pour les effets sensibilisants cutanés

Tests disponibles	Test et dose critique à retenir	Condition/Remarque
HRIPT ou HMT	Non applicable	Test du LLNA à réaliser et WoE
HMT et LLNA	HMT, NOAEL ou LOAEL	EC ₃ > NOAEL/LOAEL
	LLNA, EC ₃	EC ₃ < NOAEL/LOAEL
HRIPT et LLNA	HRIPT, LOAEL	EC ₃ > LOAEL
	LLNA, EC ₃	EC ₃ < LOAEL
	HRIPT, NOAEL	EC ₃ > NOAEL ou EC ₃ < NOAEL seulement si justification rigoureuse et étude robuste (<i>A fortiori</i> si les valeurs EC ₃ et NOAEL sont divergentes*)
		EC ₃ < NOAEL sauf si justifié ci-dessus
	LLNA, EC ₃	EC ₃ < NOAEL sauf si justifié ci-dessus

* Divergente : écart entre les valeurs supérieur d'un ordre de grandeur

Lorsque les données humaines et le LLNA sont utilisés pour déterminer la dose critique, aucun facteur d'incertitude liée à l'extrapolation de l'animal à l'homme ne sera nécessaire lors de l'élaboration de la DNEL (même si EC₃ retenue comme dose critique).

7.1.1.3 DONNEES IN VITRO

Aucun test n'est officiellement adopté par l'OCDE ou la Communauté européenne.

7.1.1.4 AUTRES DONNEES

Différents modèles QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) sont disponibles dans la littérature permettant l'identification du potentiel sensibilisant. Certains permettent également d'estimer une valeur d'EC₃ pouvant servir de dose critique mais chaque modèle doit être validé avant d'être utilisé.

L'utilisation d'informations sur le potentiel sensibilisant de substances dont la structure chimique est similaire peut être une approche lorsque peu d'informations sont disponibles. L'incertitude sur l'utilisation de données provenant d'une autre

substance pourra au cas par cas être pondérée d'un facteur d'incertitude spécifique lors de l'élaboration de la DNEL à partir de la dose critique.

L'utilisation de QSAR est également envisageable pour prédire la probabilité d'un potentiel sensibilisant en comparant la réactivité de la substance à celle de sensibilisants connus.

7.1.2 FACTEURS D'INCERTITUDE A APPLIQUER A LA DOSE CRITIQUE

Les différents facteurs à appliquer à la dose critique sont présentés dans le tableau 3. Parmi ces facteurs, certains sont communs à ceux établis dans le cadre des autres effets toxicologiques et ont précédemment fait l'objet d'un rapport de l'INERIS (2008) : facteurs d'incertitude inter-espèces, intra-espèces ainsi que ceux liés à la relation dose-réponse (utilisation d'un LOAEL) ou à la qualité des données. Deux autres facteurs d'incertitude, spécifiques des effets sensibilisants cutanés, sont à appliquer :

- Facteur lié à l'effet de la matrice³ (véhicule)
- Facteur lié aux conditions d'exposition

7.1.2.1 FACTEUR LIE A L'EFFET DU VEHICULE OU DE LA MATRICE

Les expositions cutanées chez l'homme en situation réelle impliquent fréquemment une matrice plus complexe que celle des études conduites conformément aux protocoles standardisés. Or, l'exposition dans une matrice complexe peut augmenter le potentiel sensibilisant d'une substance, notamment lorsque l'exposition est concomitante à un irritant ou à une substance améliorant la pénétration cutanée.

Un facteur compris entre 1 et 10 doit être envisagé au cas par cas, selon les informations à disposition relatives à l'exposition chez l'homme et la matrice concernée :

- Facteur de 3 lorsque l'exposition chez l'homme est supposée en l'absence d'irritant ou de substance améliorant la pénétration cutanée
- Facteur de 1 lorsque la matrice de l'exposition est supposée similaire à celle utilisée dans l'étude expérimentale et qu'elle n'entraîne pas d'augmentation du potentiel sensibilisant

En absence d'information, il est implicitement supposé que le facteur doit être de 10.

³ Il n'y a pas de définition de la matrice ou du véhicule dans le guide. Nous assimilerons la matrice au support permettant d'acheminer la/les substance(s) à l'organisme. Ainsi, il peut s'agir du véhicule dans le cadre des protocoles chez l'animal (LLNA) et cela englobe également le terme de vecteur. Le terme matrice est donc entendu au sens de vecteur/véhicule mais avec une notion supplémentaire qui peut être qualifiée "d'enveloppe complexe" que ne possède pas les termes de vecteur ou de véhicule.

7.1.2.2 FACTEUR LIE AUX CONDITIONS D'EXPOSITION

Ce facteur, d'une valeur de 1 à 10, est à prendre en considération lorsque les conditions établies expérimentalement diffèrent de l'exposition réelle envisagée chez l'homme. Il s'agit notamment des parties du corps exposées, de l'intégrité de la peau liée aux activités humaines, de l'occlusion de la peau ou de différences dans la fréquence d'exposition.

L'exposition répétée est importante à prendre en compte car elle peut conduire à l'induction d'une sensibilisation à des niveaux d'exposition inférieurs au seuil établi expérimentalement. Ce phénomène a été rapporté dans des études animales ou humaines mais le mécanisme mis en jeu n'est pas connu, même si l'effet réservoir de la peau, précédemment évoqué, pourrait être impliqué. Le nombre de substances concernées n'est pas connu non plus.

Tableau 3 : Facteurs d'incertitude à appliquer par défaut pour établir une VTR pour les effets sensibilisants cutanés selon la méthodologie DNEL

(Test LLNA)

Facteurs d'incertitudes				Valeur par défaut
Facteurs généraux	Inter espèces	Test LLNA utilisé seul	Correction pour les différences de taux métabolique par poids corporel Différences résiduelles	AS ^a 2,5
		Test LLNA et test chez l'homme	-	1
	Intra espèces	Travailleur		5
		Population générale		10
	Dose-réponse	Problèmes liés à la fiabilité de la relation dose - réponse, à l'extrapolation LOAEL/NOAEL et la sévérité de l'effet		1 à 10 ^b
	Qualité des données	Problèmes liés à la complétude et à la consistance des données disponibles		1 à 10 ^b
Facteurs spécifiques	Sensibilisation cutanée	Effet du véhicule ou de la matrice		1 à 10 ^b
		Effet lié aux différences de conditions d'exposition		1 à 10 ^b

^aAS = facteur d'ajustement allométrique, lié au poids corporel de l'espèce. Il est de 7 chez la souris et 3 chez le cobaye.

^b Valeur de 1 à 10, au cas par cas, selon jugement d'expert, sans précision sur les valeurs. En général, il s'agit de 1 - 3 ou 10. La valeur par défaut est de 1 en l'absence d'incertitude particulière. Par exemple, pour la relation dose-réponse, si un NOAEL est utilisé, le facteur est de 1. La valeur intermédiaire couramment employée est 3. Par exemple, il est suggéré d'appliquer la valeur de 3 pour le facteur sur la relation dose-réponse lorsqu'un LOAEL est utilisé, ce qui est le cas lors de l'exploitation du LLNA (ECHA, 2008a). La valeur maximale recommandée est de 10 et est appliquée pour la qualité des données par exemple si le profil toxicologique de la substance n'est pas connu. Une valeur supérieure à 10 peut être appliquée si justifié.

7.2 PROPOSITIONS INERIS

7.2.1 CHAMP D'APPLICATION DES VTR POUR LES EFFETS SENSIBILISANTS CUTANES

L'induction de la sensibilisation peut se produire après une seule exposition. Ainsi, les VTR pour les effets sensibilisants sont définies pour une exposition aiguë et unique. En outre, l'exposition répétée et son potentiel impact sur l'abaissement du seuil d'induction de sensibilisation est prise en compte par un facteur d'incertitude. Ainsi, les VTR peuvent être utilisées, le cas échéant, pour une exposition d'une durée sub-chronique et chronique.

7.2.2 TESTS POUVANT ETRE UTILISES

Le test LLNA est le test préconisé par le guide technique DNEL. Il s'agit en effet du seul test qui permette l'étude d'une relation dose-réponse.

Proposition INERIS

Pour de nombreuses substances, les données du LLNA ne sont pas disponibles mais il existe d'autres données :

- test GPMT ;
- test Buehler ;
- test MEST ;

Ces tests présentent deux inconvénients majeurs :

- L'effet observé est la phase d'allergie, laquelle fait suite aux deux phénomènes de sensibilisation : induction et déclenchement. L'évaluation du potentiel sensibilisant (induction) n'est donc pas directe.
- Une seule dose de substance est utilisée pour la phase d'induction comme pour la phase de déclenchement (possibilité de plusieurs doses dans le cas du MEST, selon l'allergène étudié).

Cependant, le test du GPMT a été largement utilisé ces 30 dernières années pour évaluer le potentiel sensibilisant ce qui implique un bon recul sur l'utilisation du test et une base de données importante disponible. Par ailleurs, un protocole GPMT spécifique, avec l'application de multiples doses pour la phase d'induction, a été mis en œuvre dès 1995 par Andersen (Andersen *et al.*, 1995 ; cité dans Kimber *et al.*, 2001). Ce protocole (doses multiples) a été appliqué récemment afin de comparer les tests GPMT et LLNA pour leur capacité à hiérarchiser les substances selon leur potentiel sensibilisant. Les deux tests ont été évalués pertinents pour l'étude de la relation dose-réponse (Yamano *et al.*, 2005 ; Kreiling *et al.*, 2008 ; van Och *et al.*, 2001). Par conséquent, même si l'exploitation du test GPMT présente une grande part d'incertitude (pas d'étude de relation dose-réponse), il paraît raisonnable d'utiliser les données lorsqu'elles sont disponibles et en l'absence de test LLNA, afin de minimiser le recours à l'expérimentation animale.

Le test Buehler ayant lui été évalué comme pouvant minimiser le potentiel sensibilisant, il n'est pas retenu pour l'élaboration de VTR. Le MEST, développé après le GPMT ou le Buehler, a permis l'amélioration des connaissances sur le

mécanisme physiopathologique de l'allergie de contact (Vocanson et al., 2007) mais il n'a pas été recommandé réglementairement pour l'étude de pouvoir sensibilisant et n'est pas plus sensible que le GPMT (Kimber *et al.*, 2001). Il n'est pas retenu pour l'élaboration de VTR.

En conclusion, afin de minimiser le recours à l'expérimentation animale, il est conseillé, en l'absence de test LLNA, d'exploiter les résultats d'un test GPMT lorsque ceux-ci sont disponibles.

7.2.3 DOSES CRITIQUES

7.2.3.1 LLNA

La dose critique issue d'un test LLNA est l'EC₃.

Cette dose est exprimée en concentration (%) et doit être convertie en dose par unité de surface cutanée (µg/cm²). La formule de conversion préconisée dans le guide technique sur les DNEL est la suivante :

$$EC_3 [\%] * 250 [\mu\text{g}/\text{cm}^2/\%] = EC_3 [\mu\text{g}/\text{cm}^2]$$

Le facteur de conversion de 250 est obtenu en considérant que le volume appliqué est de 25µL (volume protocolaire) et la surface d'application (oreille de souris) est de 1cm² (estimation). Par ailleurs, la densité du liquide est supposée de 1.

Précisions INERIS en lien avec la densité du liquide (densité du mélange substance testée + véhicule)

L'hypothèse d'une densité de 1 est souvent émise comme approximation pour les liquides hydrophiles. En outre, d'une manière générale, les liquides lipophiles présentent des densités inférieures à 1. Par exemple, parmi les véhicules couramment utilisés et recommandés dans le test LLNA, le propylèneglycol ou le diméthylsulfoxyde ont des densités de l'ordre de 1 mais le diméthylformamide, la méthyléthylcétone ou encore le mélange acétone/huile d'olive, lipophiles, présentent une densité de l'ordre de 0,8.

Il paraît ainsi approprié de distinguer deux cas en fonction de la nature hydrophile ou lipophile du liquide (nature qui peut être déterminée à partir de la nature du véhicule car celle-ci est en général liée à la nature de la substance à tester). La densité pourra être approximée à 1 dans le cas de véhicules hydrophiles et devra être considérée à 0,8 dans le cas de véhicules lipophiles.

En prenant l'hypothèse d'une densité de valeur 0,8 (véhicule lipophile), le facteur de conversion est alors de 200 et le calcul de la dose critique est le suivant :

$$EC_3 [\%] * 200 [\mu\text{g}/\text{cm}^2/\%] = EC_3 [\mu\text{g}/\text{cm}^2]$$

Il convient de souligner par ailleurs que ce calcul ajusté permet une approche plus conservatrice pour la santé car le facteur de conversion est de 200 au lieu de 250 et la dose critique obtenue sera ainsi réduite.

7.2.3.2 GPMT

Le guide technique sur les DNEL ne propose pas l'exploitation des résultats d'un test GPMT.

Proposition INERIS

Selon le protocole du test GPMT, une substance est considérée comme sensibilisante si une réponse d'au moins 30% est observée lorsque l'adjuvant complet de Freund a été utilisé en phase d'induction et d'au moins 15% en l'absence d'adjuvant (CE, 2008). Comme une seule dose est testée, il n'est pas possible de définir quelle est la dose minimale requise pour atteindre ces seuils de toxicité prédéfinis (15 ou 30%). La dose critique associée est donc une dose avec effet, il s'agit de la dose pour laquelle les seuils de toxicité prédéfinis sont atteints ou dépassés. La dose critique n'étant pas une dose maximale sans effet ni une dose minimale avec effet, il est difficile de la nommer. Elle représente le point de départ à l'extrapolation : POD.

Comme dans le cas du LLNA, la dose testée est exprimée en concentration (%) et doit être convertie en dose par unité de surface cutanée ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Le facteur de conversion doit prendre en considération :

- Le volume appliqué : 100 μL suivant le protocole ;
- La surface d'application, estimée comme pour le LLNA à 1cm^2 .
- La densité : estimée à 1 pour les liquides hydrophiles et 0,8 pour les liquides lipophiles.

Les formules de conversion sont par conséquent les suivantes :

- Pour les liquides hydrophiles : $\text{POD} [\%] * 1000 [\mu\text{g}/\text{cm}^2/\%] = \text{POD} [\mu\text{g}/\text{cm}^2]$
- Pour les liquides lipophiles : $\text{POD} [\%] * 800 [\mu\text{g}/\text{cm}^2/\%] = \text{POD} [\mu\text{g}/\text{cm}^2]$

N.B. : la première phase d'induction du test GPMT est effectuée par injection intra-dermale de la substance testée (dose interne). Cette dose est assimilée à une dose externe pour établir la DNEL. Cette approximation est peu satisfaisante d'un point de vue biologique mais elle est nécessaire et il s'agit d'une approche conservatrice pour la santé. En effet, l'injection intra-dermale permet de s'affranchir de l'influence de la barrière cutanée et maximalise la dose effective supposée (c'est une des raisons pour lesquelles le test GPMT a tendance à sur-estimer le potentiel sensibilisant des substances). Aucun facteur d'incertitude ne sera par conséquent envisagé en raison de cette approximation.

7.2.4 FACTEURS D'INCERTITUDE

7.2.4.1 FACTEUR INTER-ESPECES

Pour les facteurs d'incertitudes classiques tels que le facteur inter-espèces, la méthodologie DNEL pour les effets sensibilisants cutanés renvoie à la

méthodologie générale d'élaboration des DNEL. Le facteur d'incertitude inter-espèces à appliquer n'est donc pas détaillé et il est supposé de 17,5 (données chez la souris).

Proposition INERIS

Felter *et al.* (2002) et Griem *et al.* (2003) ont considéré que les différences de métabolisme entre les espèces ne jouaient pas un rôle significatif dans la sensibilisation, en raison de l'implication d'un métabolisme local seulement. Ils ont ainsi proposé l'application d'un facteur inter-espèces réduit par rapport à celui appliqué dans le cadre des effets systémiques. Même si les effets sensibilisants ne sont pas à proprement parler des effets locaux (§4.2.2), la métabolisation (peau) est locale. Les données disponibles sur la nature et la capacité de l'activité enzymatique de la peau, en comparaison à celles du foie, laissent penser également qu'un facteur d'incertitude réduit peut couvrir les variations liées au métabolisme de la peau.

Dans le cas des effets sensibilisants, de nombreux facteurs d'incertitude sont appliqués à la dose critique et le facteur global, en occultant le facteur inter-espèces, est de 3000, ce qui représente une grande part de sécurité. L'application d'un facteur d'incertitude inter-espèces de 17,5 dans le cas d'une étude chez la souris, conduit à un facteur d'incertitude global > 50000. Ainsi, considérant que :

- les différences de toxicocinétiques ne jouent pas un rôle majeur dans le cadre des effets sensibilisants,
- de nombreux facteurs d'incertitude sont appliqués dans le cadre des effets sensibilisants et constituent une grande part de sécurité pour l'établissement d'une DNEL,

il est proposé d'appliquer un facteur inter-espèces réduit.

Selon la méthodologie générale d'élaboration des DNEL, le facteur d'incertitude inter-espèces à appliquer dans le cas des effets locaux est 2,5. **Ainsi, un facteur inter-espèces de 2,5 est proposé ici.**

7.2.4.2 GPMT ET RELATION DOSE-REPONSE

Compte tenu de l'absence de réelle relation dose-réponse, un facteur de 3 est préconisé lors de l'utilisation d'un test GPMT.

Si l'effet est observé avec une fréquence supérieure à 15 ou 30% (notamment 60%), *a fortiori* si la concentration utilisée lors de la phase d'induction (intra-dermale) est $\leq 2\%$, un facteur de 10 est recommandé⁴.

⁴ Ces valeurs (60%, concentration $\leq 2\%$) sont issues des recommandations du guide technique sur les catégories du potentiel sensibilisant (évoqué au §7.1). Elles sont susceptibles d'évoluer avec la finalisation du nouveau guide technique sur la classification et l'étiquetage.

7.2.4.3 GPMT ET QUALITE DES DONNEES

Le test GPMT évalue le potentiel de sensibilisation par l'observation de la réponse cutanée après application d'une substance sensibilisante. L'observation de la réponse cutanée semble être un résultat moins précis que la mesure du taux de prolifération effectuée lors du test LLNA. De plus, l'effet observé est l'allergie, lequel est dépendant de la phase de sensibilisation mais aussi de révélation. Néanmoins, le test GPMT peut sur-estimer le potentiel sensibilisant. Ainsi, aucun facteur spécifique lié à l'exploitation d'un test GPMT et en lien avec la qualité des données n'est préconisé.

7.2.4.4 FACTEURS LIE A LA SENSIBILISATION

7.2.4.4.1 EFFET DU VEHICULE OU DE LA MATRICE

Selon le guide technique des DNEL, un facteur compris de 1 à 10 doit être envisagé au cas par cas, selon les informations à disposition concernant l'exposition chez l'homme. Le facteur est implicitement fixé à 10 par défaut (Cf. §7.1.3.1).

Précision INERIS en lien avec la nature du véhicule

La nature du véhicule utilisé dans le protocole expérimental peut influencer la valeur du facteur appliqué. Un facteur 3 est à envisager dans le cas d'un véhicule lipophile. En effet, le caractère lipophile est un des paramètres favorisant l'absorption cutanée : les conditions expérimentales sont maximalistes lorsque le véhicule utilisé est lipophile. Un facteur 3 est également préconisé lorsque le véhicule utilisé est facilitateur d'absorption (comme le DMSO).

7.2.4.4.2 CONDITIONS D'EXPOSITION

Selon la méthodologie DNEL, un facteur de 1 à 10 peut être appliqué, au cas par cas, pour les différences liées aux conditions d'exposition.

Proposition INERIS

Les conditions d'exposition englobent plusieurs paramètres ayant une forte influence sur la sensibilisation comme le site d'exposition, les différents états de la peau et l'exposition répétée. Ainsi, il paraît justifié d'appliquer la valeur de 10 par défaut.

La valeur peut être réduite à 3 si des données spécifiques sont disponibles notamment sur l'exposition envisagée chez l'homme : protection de zones du corps perméables (visage, cou), état de la peau supposé non altéré (pas de brûlure, pas d'occlusion, ...). Néanmoins une valeur inférieure à 3 n'est pas recommandée (de nombreux facteurs environnementaux ont une influence, tous ne peuvent être définis et l'exposition répétée est toujours à considérer).

L'ensemble des facteurs d'incertitude préconisés pour l'établissement des VTR est présenté dans le tableau 4 ci-après.

Tableau 4 : Propositions INERIS concernant les facteurs d'incertitude à appliquer pour l'élaboration de VTR pour les effets sensibilisants cutanés

Facteurs d'incertitude		Test LLNA et test chez l'homme	Test LLNA seul	GPMT
Inter espèces	Influence du métabolisme local	1	2,5	2,5
Intra espèces	Travailleur	5	5	5
	Population générale	10	10	10
Dose-réponse	Problèmes liés à la fiabilité de la relation dose - réponse, à l'extrapolation LOAEL/NOAEL et la sévérité de l'effet	3 ^a	3 ^a	3 ou 10 ^b
Qualité des données	Problèmes liés à la complétude et à la consistance des données disponibles	1 ^c	1 ^c	1 ^c
Sensibilisation cutanée	Effet du véhicule ou de la matrice	3 ou 10 ^d	3 ou 10 ^d	3 ou 10 ^d
	Effet lié aux conditions d'exposition	10 ^e	10 ^e	10 ^e

a) La dose critique EC₃ est assimilée à un LOAEL, un facteur de 3 doit s'appliquer.

b) Valeur de 3 au minimum. Si incidence de l'effet largement supérieure au seuil défini (15 ou 30% selon qu'il y a utilisation de l'adjuvant), à partir de 60% par exemple, alors facteur 10.

c) Valeur de 1 à 10, au cas par cas, selon jugement d'expert, sans précision sur les valeurs. En général, il s'agit de 1 – 3 ou 10. La valeur par défaut est de 1 en l'absence d'incertitude particulière. La valeur intermédiaire couramment employée est 3. La valeur maximale recommandée est de 10, par exemple si le profil toxicologique de la substance n'est pas connu, un facteur de 10 est appliqué pour la qualité des données. Une valeur supérieure à 10 peut être appliquée si justification.

d) Le facteur préconisé est de 3 lorsque le véhicule est lipophile ou facilite l'absorption, 10 s'il est hydrophile.

e) Les différences liées aux conditions d'exposition intègrent les différents états de la peau et l'exposition répétée. Un facteur de 10 doit être appliqué par défaut.

8. APPLICATION DE LA METHODOLOGIE

La recherche des exemples s'est appuyée sur l'étude Gerberick *et al.* de 2005, présentant une compilation des substances pour lesquelles un test LLNA est disponible.

8.1 ELABORATION D'UNE VTR POUR L'HYDROQUINONE

L'hydroquinone (N°CAS 123-31-9, N°CE 204-617-8) est utilisée comme intermédiaire de synthèse en industrie pharmaceutique et photographique, comme agent stabilisateur de vernis et peintures, huiles et graisses (INRS, 2006).

Elle est classée cancérogène catégorie 3 (R40), mutagène catégorie 3 (R68), nocive par ingestion (R22), irritante (R41) et sensibilisante (R43).

Cette substance a été retenue pour sa large gamme d'utilisation et son caractère sensibilisant. Par ailleurs, des résultats sont disponibles pour le test LLNA et GPMT et cet exemple est donc une étude de cas intéressante pour comparer les DNEL.

8.1.1 UTILISATION DU LLNA

D'après l'étude de Gerberick *et al.* (2005), la dose critique obtenue est un EC₃ de 0,11%.

Les valeurs d'EC₃ sont toujours à confronter aux données observées chez l'homme. Chez l'homme, des effets sensibilisants ont été rapportés pour des concentrations d'hydroquinone de 0,06%, 7%, 1% dans une solution d'hydrocarbures (OCDE, 1996) mais aucune dose critique n'est disponible et ne peut être comparée à la valeur d'EC₃.

Le véhicule utilisé dans l'étude a été un mélange d'acétone et d'huile d'olive, lipophile. Par conséquent, la valeur de l'EC₃ de 0,11% est convertie en µg/cm² en utilisant le facteur de 200.

$$\begin{aligned} \text{EC}_3 [\%] * 200 [\mu\text{g}/\text{cm}^2/\%] &= \text{EC}_3 [\mu\text{g}/\text{cm}^2] \\ 0,11 * 200 &= 22 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \end{aligned}$$

La dose critique est donc EC₃ = 22 µg/cm²

Les différents facteurs d'incertitude à appliquer sont présentés dans le tableau ci-dessous (7). Le facteur d'incertitude inter-espèces à appliquer est 2,5 (absence de doses critiques disponibles chez l'homme). S'agissant de la qualité des données, un facteur 1 est appliqué. Le facteur d'incertitude pour l'effet lié au véhicule est de 3 (véhicule lipophile).

Tableau 5 : Calcul de la DNEL pour les effets sensibilisants de l'hydroquinone (LLNA)

<i>Sélection de la dose critique</i>	
Dose critique retenue	EC ₃ = 22 µg/cm ²
<i>Application des facteurs d'incertitude</i>	
Facteurs d'incertitude	
Extrapolation inter espèces	2,5
Variabilité intra espèces	10
Relation dose réponse	3
Qualité des données	1
Effets sensibilisants	30
Facteur d'incertitude global	2250
Calcul de la DNEL	= 22 / 2250 = 8,8.10 ⁻³ µg/cm ²

La DNEL est ainsi calculée à 0,0088 µg/cm² soit 9.10⁻³ µg/cm².

8.1.2 UTILISATION DU GPMT

Le résumé de l'étude de Goodwin *et al.* (1981) tel que présenté dans le document SIDS de l'OCDE (1996) a été utilisé pour élaborer la DNEL.

La dose administrée est de 2% dans une solution saline. Le facteur de conversion de 1000 doit s'appliquer pour obtenir une dose en µg/cm².

$$\text{POD [\%]} * 1000 [\mu\text{g}/\text{cm}^2/\%] = \text{POD} [\mu\text{g}/\text{cm}^2]$$

$$2 * 1000 = 2000$$

La dose est ainsi de 2000 µg/cm².

D'après le résumé de l'étude, sept animaux sur 10 ont présenté des effets sensibilisants (70%), ainsi le facteur d'incertitude sur la relation dose-réponse à appliquer est de 10.

Un facteur d'incertitude sur la qualité des données de 3 a été appliqué. En effet, l'étude suit apparemment le protocole des lignes directrices et elle est issue d'un document validé par les experts de l'OCDE mais seul le résumé a été utilisé, et très peu d'informations sont disponibles.

Le calcul de la DNEL est présenté dans le tableau ci-après (8).

Tableau 6 : Calcul de la DNEL pour les effets sensibilisants de l'hydroquinone (GPMT)

<i>Sélection de la dose critique</i>	
Dose critique retenue	POD = 2000 µg/cm ²
<i>Application des facteurs d'incertitude</i>	
Facteurs d'incertitude	
Extrapolation inter espèces	2,5
Variabilité intra espèces	10
Relation dose réponse	10
Qualité des données	3
Effets sensibilisants	100
Facteur d'incertitude global	75000
Calcul de la DNEL	= 2000 / 75000 = 2,7.10 ⁻² µg/cm ²

La DNEL est ainsi calculée à 0,027 µg/cm² soit 3.10⁻² µg/cm².

La comparaison des deux DNEL 9.10⁻³ µg/cm² et 3.10⁻² µg/cm² montre que les deux valeurs sont de même ordre de grandeur (un facteur 3 les sépare). Ainsi, la pertinence de l'élaboration d'une VTR à partir d'un test GPMT n'est pas remise en cause d'après ce résultat ; cette tendance devra être confirmée par d'autres exemples.

8.2 ELABORATION D'UNE VTR POUR LE BENZO[A]PYRENE

Le benzo[a]pyrène (CAS N°50-32-8, CE N°200-028-5) est classé en catégorie 2 pour ses effets cancérogènes (R45), ses effets mutagènes (R46), ses effets reprotoxiques (R60 et R61) et il est sensibilisant (R43). Cette substance est couramment étudiée lors d'ERS et l'exemple d'une DNEL pour une telle substance paraissait important.

D'après l'étude de Gerberick *et al.* (2005), la dose critique obtenue est un EC₃ de 0,0009%.

Les valeurs d'EC₃ sont toujours à confronter aux données observées chez l'homme mais aucune donnée n'a été identifiée.

Le véhicule utilisé dans l'étude a été un mélange d'acétone et d'huile d'olive, lipophile. Par conséquent, la valeur de l'EC₃ de 0,0009% est convertie en µg/cm² par le facteur de 200.

$$EC_3 [\%] * 200 [\mu\text{g}/\text{cm}^2/\%] = EC_3 [\mu\text{g}/\text{cm}^2]$$

$$0,0009 * 200 = 0,18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

La dose critique est donc EC₃ = 0,18 µg/cm²

Les différents facteurs d'incertitude à appliquer sont présentés dans le tableau ci-après (9). A noter que le facteur d'incertitude inter-espèces appliqué est 2,5.

S'agissant de la qualité des données, un facteur 1 est appliqué. Le facteur d'incertitude pour l'effet lié au véhicule est de 3 (véhicule lipophile).

Tableau 7 : Calcul de la DNEL pour les effets sensibilisants du benzo[a]pyrène (LLNA)

<i>Sélection de la dose critique</i>	
Dose critique retenue	EC ₃ = 0,18 µg/cm ²
<i>Application des facteurs d'incertitude</i>	
Facteurs d'incertitude	
Extrapolation inter espèces	2,5
Variabilité intra espèces	10
Relation dose réponse	3
Qualité des données	1
Effets sensibilisants	30
Facteur d'incertitude global	2250
Calcul de la DNEL	= 0,18 / 2250 = 8.10⁻⁵ µg/cm²

La DNEL est ainsi calculée à 8.10⁻⁵ µg/cm².

8.3 ELABORATION D'UNE VTR POUR LE 3-METHYLEUGENOL

Une troisième substance a été retenue d'après les résultats des tests de LLNA de l'étude de Gerberick *et al.* (2005). Il s'agissait de sélectionner une substance faiblement sensibilisante afin d'observer les gammes de valeurs de DNEL. Selon ces critères, le 3-méthyleugénol (CAS N°186743-26-0) a été retenu.

La dose critique obtenue est un EC₃ de 32 %.

Les valeurs d'EC₃ sont toujours à confronter aux données observées chez l'homme mais peu d'informations sont disponibles. Le véhicule utilisé dans l'étude a été un mélange d'acétone et d'huile d'olive, lipophile. Par conséquent, la valeur de l'EC₃ de 32% est convertie en µg/cm² par le facteur de 200.

$$EC_3 [\%] * 200 [\mu\text{g}/\text{cm}^2/\%] = EC_3 [\mu\text{g}/\text{cm}^2]$$

$$32 * 200 = 6400 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

La dose critique est donc EC₃ = 6,4.10³ µg/cm²

Les différents facteurs d'incertitude à appliquer sont présentés dans le tableau ci-après (10). Le facteur d'incertitude inter-espèces à appliquer est 2,5 (absence de doses critiques disponibles chez l'homme). S'agissant de la qualité des données, un facteur 1 est appliqué. Le facteur d'incertitude pour l'effet lié au véhicule est de 3 (véhicule lipophile).

Tableau 8 : Calcul de la DNEL pour les effets sensibilisants du 3-méthyleugénol (LLNA)

<i>Sélection de la dose critique</i>	
Dose critique retenue	$EC_3 = 6,4 \cdot 10^3$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
<i>Application des facteurs d'incertitude</i>	
Facteurs d'incertitude	
Extrapolation inter espèces	2,5
Variabilité intra espèces	10
Relation dose réponse	3
Qualité des données	1
Effets sensibilisants	30
Facteur d'incertitude global	2250
Calcul de la DNEL	$= 6,4 \cdot 10^3 /$ 2250 $= 2,84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

La DNEL est ainsi calculée à $2,84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ soit $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

9. CONCLUSION

La méthode de construction de valeurs de référence pour les effets sensibilisants cutanés initialement proposée par INERIS a été mise à jour en s'appuyant sur la méthodologie DNEL (Derived No Effect Level ou niveau dérivé sans effet).

Deux approches ont été suivies selon le test expérimental exploité pour établir la DNEL : LLNA ou GPMT.

Le LLNA est le seul test recommandé pour l'élaboration d'une DNEL selon le guide technique européen. Considérant que le test GPMT est aussi un test reconnu pour évaluer le potentiel sensibilisant des substances et qu'il a été largement employé au cours des 30 dernières années, l'exploitation des données issues d'un tel test est apparue importante afin de minimiser l'expérimentation animale. Il s'agit bien sûr d'une utilisation de 2^{ème} intention, en l'absence de test LLNA disponible. Les incertitudes liées à l'exploitation de ce test chez le cobaye (absence de relation dose-réponse, la dose critique est une dose avec effet) ont été prises en compte par l'application de facteurs d'incertitude supplémentaires à ceux appliqués lors de l'utilisation d'un test LLNA.

La méthodologie a été appliquée à trois substances sensibilisantes : l'hydroquinone, substance pour laquelle deux types de tests étaient disponibles (LLNA et GPMT) et qui présentait ainsi une bonne étude de cas pour la méthodologie, et le benzo[a]pyrène, substance couramment retrouvée en évaluation des risques. Le 3-méthyleugénol, faiblement sensibilisant, a également été étudié dans l'objectif d'avoir un aperçu de l'étendue possible des valeurs de DNEL.

Les exemples ont permis de mettre en évidence la simplicité d'application de la méthode. Dans l'exemple de l'hydroquinone, une bonne corrélation entre la DNEL issue d'une étude LLNA et celle issue du GPMT a été observée (9.10^{-3} et $3.10^{-2} \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivement), justifiant l'exploitation des données issues d'un test GPMT. Cette tendance devra être confirmée par d'autres exemples.

Les gammes de valeurs de DNEL s'échelonnant de $8.10^{-5} \mu\text{g}/\text{cm}^2$ à $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, il semble que la méthodologie permette de hiérarchiser les valeurs des DNEL en relation au potentiel sensibilisant des substances.

Toutefois, les valeurs paraissent très faibles ($10^{-5} \mu\text{g}/\text{cm}^2$) et il est difficile de savoir s'il est pertinent d'élaborer de telles valeurs en rapport avec les moyens techniques de mesure disponibles. La méthodologie pour l'élaboration de DNEL pour les effets sensibilisants cutanés étant nouvelle, les différentes utilisations des DNEL et le retour d'expérience devraient permettre par la suite de se positionner sur ce point.

A noter que l'utilisation des méthodes *in vitro* pour l'élaboration de valeurs de référence concernant les effets cutanés corrosifs a également fait l'objet d'un rapport d'étude en parallèle à celui-ci (INERIS, DRC-09-94380-0318A).

10. BIBLIOGRAPHIE

1. ADEME, 2009. Site Web de l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (> Médiathèque, > Glossaire). Consulté le 23 janvier 2009 sur <http://www2.ademe.fr/servlet/getDoc?id=11433&m=3&cid=96>
2. Arts J.H.E., Mommers C., and De Heer C. Dose-response relationships and threshold levels in skin and respiratory allergy. *Critical Review in Toxicology*, 2006; 36: 219-251.
3. Barber E.D., Teetsel N.M., Kolberg K.F. *et al.* A comparative study of the rates of in vitro percutaneous absorption of eight chemicals using rat and human skin. *Fundam Appl Toxicol*, 1992; 19: 493-497.
4. Barker N., Hadgraft J., and Rutter N. Skin permeability in the newborn. *J Invest Dermatol*, 1987; 88: 409-411.
5. Basketter DA, Andersen KE, Liden C *et al.*, Evaluation of the skin sensitizing potency of chemicals by using the existing methods and considerations of relevance for elicitation. *Contact dermatitis*, 2005, 52(1):39-43.
6. Basketter D.A., Balikie L., Dearman R., J. *et al.* Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact dermatitis*, 2000; 42: 344-348.
7. Basketter D.A., Griffiths H.A., Wang X.M. *et al.* Individual, ethnic and seasonal variability in irritant susceptibility of skin: the implications for a predictive human patch test. *Contact dermatitis*, 1996; 35: 208-213.
8. Boogaard P.J., Dennemal M.A., and Van Sittert N.J. Dermal penetration and metabolism of five glycidyl ethers in human, rat and mouse skin. *Xenobiotica*, 2000; 30: 469-483.
9. Büdinger L., Neuser N., Totzke U. *et al.* Preferential usage of TCR-Vbeta17 by peripheral and cutaneous T cells in nickel-induced contact dermatitis. *J Immunol*, 2001; 167: 6038-44.
10. Cassimos C., Kanakoudi-Tsakalidis F., Spyroglou K. *et al.* Skin sensitization to 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB) in the first months of life. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 1980; 3: 111-113.
11. CE, 2008. Règlement N° 440/2008 de la commission européenne du 30 mai 2008 établissant des méthodes d'essai conformément au règlement (CE) no 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH).
12. Choi E.H., Brown B.E., Crumrine D. *et al.* Mechanisms by which psychologic stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity. *J Invest Dermatol*, 2005; 124: 587-595. Cité dans Roberts MS and Walters KA, *Dermal Absorption and Toxicity Assessment – 2nd Edition – Londres : Informa Healthcare, 2008a. – iii-678p.*

13. Danon A, Ben-Shimon S, Ben-Zevi Z. Effect of exercise and heat exposure on percutaneous absorption of methyl salicylate. *Eur J Clin Pharmacol* 1986 ; 31 (1) :49-52, *cit  dans* Roberts MS and Walters KA, *Dermal Absorption and Toxicity Assessment – 2nd Edition – Londres : Informa Healthcare, 2008c. – Chap 23, Systemic Toxicity Caused by Absorption of Drugs and Chemicals Through Skin, p.405-432.*
14. De Jager M.W., Gooris G.S., Dolbnya I.P. *et al.* Novel lipid mixtures based on synthetic ceramides reproduce the unique stratum corneum lipid organization. *J Lipid Res*, 2004; 45: 923-932.
15. Dean J.H., Twerdok L.E., Tice R.R. *et al.* ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2001; 34: 258-273.
16. Draize J.H. Dermal toxicity. Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics. *Association of food and drug officials of the United States, Texas State Department of Health, Austin, Texas., 1959.*
17. Draize J.H., Woodard G., and Calvery H.D. Methods for the study of irritation and toxicology of substances applied topically to the skin and mucous membrane. *J Pharmacol Exp Ther*, 1944; 83: 377-392.
18. Dupuis G. Studies on poison ivy. In vitro lymphocyte transformation by urushiol-protein conjugates. *Br J Dermatol*, 1979; 101: 617-624.
19. ECETOC, *Percutaneous absorption*. 1993, European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals.
20. ECHA, 2008a. Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.8: Characterization of dose [concentration]-response for human health. European Chemical Agency, Mai 2008, 150 p. Disponible sur http://echa.europa.eu/REACH_en.asp.
21. ECHA, 2008b – Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a : Endpoint specific guidance. Skin and respiratory sensitization (p.256-280), European Chemical Agency, Mai 2008, 428 p. Disponible sur http://echa.europa.eu/REACH_en.asp.
22. ECHA, 2008c – Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Part E: Risk Characterisation. European Chemical Agency, Mai 2008, 48p. Disponible sur http://echa.europa.eu/REACH_en.asp.
23. ECVAM, 2009 – Site Web consult  le 16/01/2009. <http://ecvam.jrc.it/> et <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
24. ECVAM, 2000. Statement on the validity of the local lymph node assay for skin sensitisation testing. Mars 2000.
25. Epstein W.L. Contact-type delayed hypersensitivity in infants and children : induction of Rhus sensitivity. *Pediatrics*, 1961; 27: 51-53.
26. Feldmann R.J. and Maibach H.I. Regional variation in percutaneous penetration of ¹⁴C cortisol in man. *J Invest Dermatol*, 1967; 48: 181-183.
27. Feldmann R.J. and Maibach H.I. Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J Invest Derm*, 1969; 54: 339-404.

28. Felter S.P., Robinson M.K., Basketter D.A. *et al.* A review of the scientific basis for uncertainty factors for use in quantitative risk assessment for the induction of allergic contact dermatitis. *Contact dermatitis*, 2002; 47: 257-266.
29. Ford R.A., Api A.M., and Suskind R.R. Allergic contact sensitization potential of hydroxycitronellal in humans. *Food. Chem. Toxicol.*, 1988; 26: 921-926.
30. Friedmann P.S. The immunology of allergic contact dermatitis: The DNCB story. *Adv dermatol*, 1990; 5: 175-196.
31. Friedmann P.S. and Moos C. *Quantification of contact hypersensitivity in man*. Models in dermatology, ed. Maibach H.I. and Lowe N.J. Vol. 2. 1985: Karger: 175-281.
32. Friedmann P.S., Rees J.L., White S.I. *et al.* Low dose exposure to antigen induces sub-clinical sensitization. *Clin Exp Immunol*, 1990; 81: 507-509.
33. Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS *et al.* Compilation of Historical Local Lymph Node Data for Evaluation of Skin Sensitization Alternative Methods. *Dermatitis*, 2005;16(4):157-202.
34. Gerberick G.F., Robinson M.K., Felter S.P. *et al.* Understanding fragrance allergy using an exposure-based risk assessment approach. *Contact dermatitis*, 2001a; 45: 333-340.
35. Gerberick G.F., Robinson M.K., Ryan C.A. *et al.* Contact allergenic potency: Correlation of human and local lymph node assay data. *Am. J. Contact. Dermatitis*, 2001b; 12: 156-161.
36. Griem P., Goedel C., and Scheffler H. Proposal for a risk assessment methodology for skin sensitization based on sensitization potency data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2003; 38: 269-290.
37. Hosoi J., Hariya T., Denda M. *et al.* Regulation of the cutaneous allergic reaction by humidity. *Contact dermatitis*, 2000; 42: 81-84.
38. Humbert P. Fonctionnal consequences of cutaneous lipid perturbation. *Pathol Biol*, 2003; 51: 271-274.
39. IGHRC, 2006. Guidelines on route-to-route extrapolation of toxicity data when assessing health risks of chemicals. The Interdepartmental Group on Health Risks from Chemicals, <http://www.silsoe.cranfield.ac.uk /ieh/ighrc/ighrc.html>
40. INERIS, 2008. De la méthodologie VTR à l'établissement des DNEL : Comparaison méthodologique et études de cas. Rapport N° DRC-08-94380-12195A, octobre 2008, 152p.
41. INERIS, 2007. Proposition d'une méthode de construction de valeurs toxicologiques de référence pour les expositions cutanées. Rapport N°DRC-07-83452-12062A, septembre 2007, 43p.
42. INRS, 2006. Fiche toxicologique de l'hydroquinone. FT 159. Disponible sur www.inrs.fr/
43. Jordan W.P.J. and King S.E. Delayed hypersensitivity in females. the development of allergic contact dermatitis in females during the comparaison of two predictive patch tests. *Contact dermatitis*, 1977; 3: 19-26.

44. Jowsey IR, Basketter DA, Westmoreland C *et al.*, A future approach to measuring skin sensitizing potency : a proposal. *Journal of Applied Toxicology*, 2006; 26:341-350.
45. Kalia Y.N., Nonato L.B., Lund C.H. *et al.* Development of skin barrier function in low birthweight infants. *Pharm Res*, 1996; 13: S382 (Abstract PDD 7598).
46. Kalish R., Wood J.A., Wille J.J. *et al.* Sensitization of mice to topically applied drugs: albuterol, chlorpheniramine, clonidine and nadolo. *Contact dermatitis*, 1996; 35: 76-82.
47. Kimber I., Dearman R.J., Basketter D.A. *et al.* The local lymph node assay: past present and future. *Contact dermatitis*, 2002; 47: 315-328.
48. Kimber I, Basketter DA, Berthold K *et al.*, Skin sensitization Testing in Potency and Risk Assessment, *Toxicological Sciences*, 2001, 59:198-208.
49. Kligman A.M. The identification of contact allergens by human assay. III; maximization Test: a procedure for screening and rating contact sensitizers. *J Invest Dermatol*, 1966; 47: 393-409.
50. Kligman A.M. and Epstein W.L. Updating the maximization test for identifying contact allergens. *Contact dermatitis*, 1975; 1: 231-239.
51. Kreiling R, Hareng L, Eigler D *et al.*, Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food and Chemical Toxicology*, 2008;46:1896-1904.
52. Lejman E., Stoudemayer T., Grove G. *et al.* Age differences in poison ivy dermatitis. *Contact dermatitis*, 1984; 11: 163-167.
53. Lepoittevin, JP. L'allergie de contact : un effet à seuil. Laboratoire de Dermatochimie, Clinique Dermatologique, Université Louis Pasteur, Strasbourg. Colloque ARET 2008.
54. Leyden J.L. and Kligman A.M. Allergic contact dermatitis: sex differences. *Contact dermatitis*, 1977; 3: 333-336.
55. Lockley D., J., Howes D., and Williams F., M. Percutaneous penetration and metabolism of 2-butoxyethanol. *Arch Toxicol.*, 2004; 78: 617-628.
56. Madison K.C. Barrier function of the skin: "La Raison d'être" of the epidermis. *J Invest Dermatol*, 2003; 121: 231-241.
57. Magnusson B. and Kligman A., M. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Invest Dermatol*, 1969; 52: 268-76.
58. Maibach H., Feldman R., J., Milby T., H. *et al.* Regional variation in percutaneous penetration in man. Pesticides. *Arch Environ Health.*, 1971; 23: 208-211.
59. Malten K.E. Thoughts on contacts dermatitis. *Contact dermatitis*, 1981; 7: 238-247.
60. Maxwell G, Mackay C. Application of a systems biology approach to skin allergy risk assessment. *Altern Lab Anim*. 2008 Nov;36(5):521-56. *Abstract only*.

61. Moss C., Friedmann P.S., Schuster S. *et al.* Susceptibility and application of sensitivity in contact dermatitis. *Clin Exp Immunol*, 1985; 61: 232-241.
62. OCDE, *Guidelines for the testing of chemicals. Skin sensitisation. TG 406. Adopted 17 July 1992.* 1992, Organisation for Economic Co-operation and Development: Paris. p. 1-9.
63. OCDE, *Guidelines for the testing of chemicals. Skin sensitisation :Local lymph node assay. TG 429. Adopted 24 April 2002.* 2002, Organisation for Economic Co-operation and Development: Paris. p. 1-8.
64. OCDE, *Guidelines for the testing of chemicals. Skin absorption: in vivo method. Adopted 13 April 2004.* 2004, Organisation for Economic Co-operation and Development: Paris. p. 1-8.
65. OCDE (1996). Hydroquinone, CAS N°123-31-9. SIDS Initial Assessment Profile. UNEP Publications.
<http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD/SIDS/123319.pdf>
66. Packman C. EnviroDerm Services. 2007.
67. Pilgram G.S., Engelsma-van Pelt A.M., Bouwstra J.A. *et al.* Electron diffraction provides new information on human stratum corneum lipid organization studied in relation to depth and temperature. *J Invest Dermatol*, 1999; 113: 403-409.
68. Reed J.T., Ghadially R., and Elias P.M. Skin type, but neither race nor gender, influence epidermal permeability barrier function. *Arch. Dermatol*, 1995; 131: 1134-1138.
69. Rees J.L., Friedmann P.S., and Matthews J.N. Sex differences in susceptibility to development of contact hypersensitivity to dinitrobenzene (DNCB). *Br J Dermatol*, 1989; 120: 371-374.
70. RIVM (2005). Effect of repeated and prolonged exposure to low concentrations of Low Molecular Weight chemicals on local lymph node responses. W.H.de Jong, M. ter Beek, C.Veenman, A. de Klerk, H. van Loveren. Report 340300001/2005, 20p.
71. Roberts MS and Walters KA, *Dermal Absorption and Toxicity Assessment – 2nd Edition – Londres : Informa Healthcare, 2008a. – iii-678p*
72. Roberts MS and Walters KA, *Dermal Absorption and Toxicity Assessment – 2nd Edition – Londres : Informa Healthcare, 2008b. – Chap 27, International Perspectives in Dermal Absorption, p.471-482.*
73. Roberts MS and Walters KA, *Dermal Absorption and Toxicity Assessment – 2nd Edition – Londres : Informa Healthcare, 2008c. – Chap 23, Systemic Toxicity Caused by Absorption of Drugs and Chemicals Through Skin, p.405-432.*
74. Robinson M.K. Populations differences in skin structure and physiology and the susceptibility to irritant and allergic contact dermatitis: implications for skin safety testing and risk assessment. *Contact dermatitis*, 1999; 41: 65-79.
75. Roskos K.V., Maibach H.I., and Guy R.H. The effect of aging on percutaneous absorption in man. *J Pharmacokinetic Biopharm*, 1989; 17: 617-630.

76. Rostenberg A. and Kanof N.M. Studies in eczematous sensitizations: I. A comparison between sensitizing capacities of two allergens and between two different strengths of the same allergen and the effect of repeating the sensitizing dose. *J Invest Derm*, 1941; 4: 505-516.
77. Schaefer H., Zesch A., and Stuttgart G. Penetration, permeation and absorption of triamcilonone acetonide in normal and psoriatic skin. *Arch. Dermatol Res*, 1977; 258: 241-249.
78. Smith C.K. and Hotchkiss S.A.M. *Chemical and Metabolic Mechanisms*. London., ed. Dermatitis: C. 2001.
79. Stevenson H., Opdam J.J.G., and Van Ommen B. Protocol for the estimation of dermal absorption according to a tiered approach on behalf of the risk assessment of pesticides. *Zeist The Netherlands: TNO*, 1994; 94: 129.
80. US EPA, *Dermal exposure assessment: principles and applications*. 1992, U.S. Environmental Protection Agency.
81. Van Och FMM, Vandebriel RJ, Prinsen MK *et al*. Comparison of dose-responses of contact allergens using the guinea pig maximization test and the local lymph node assay. *Toxicology*, 2001;167:207-215.
82. Vanderberg J.J. and Epstein W.L. Experimental nickel contact sensitization in man. *J Invest Dermatol*, 1963; 41: 413-418.
83. Vecchia B.E. and Bunge A. *Animal models: a comparison of permeability coefficients for excised skin from humans and animals*. in *Dermal absorption models in toxicology and pharmacology*, Riviere J.E., Editor. 2005. p. 305-365.
84. Vocanson M, Hennino A, Rozières A *et al*. Experimental models of Contact Dermatitis. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 2007 ;47:314–317.
85. Warbrick E.V., Dearman R.J., Basketter D.A. *et al*. Influence of application vehicle on skin sensitization to methylchlorothiazolinone/methylisothiazolinone: an analysis using the local lymph node assay. *Contact dermatitis*, 1999a; 41: 325-329.
86. Warbrick E.V., Dearman R.J., Lea L.J. *et al*. Local lymph node assay responses to paraphenylenediamine: intra- and inter-laboratory evaluations. *J Appl Toxicol*, 1999b; 19: 255-260.
87. Wester R.C. and Maibach H.I. *Structure-activity correlations in percutaneous absorption*. in *Percutaneous absorption: mechanisms-methodology-drug delivery*, Bronaugh R.L. and Maibach H.I., Editors. 1985; Marcel Dekker: New York. p. 107-123.
88. Wester R.C. and Maibach H.I. *Regional variation in percutaneous absorption*. in *Percutaneous absorption: drugs-cosmetics-mechanisms-methodology*, 3rd, Bronaugh R.L. and Maibach H.I., Editors. 1999a; Marcel Dekker: New York. p. 215-227.
89. White S.I., Friedmann P.S., and Stratton A. HLA antigens and Langerhans'cell density contact dermatitis. *Br J Dermatol*, 1986; 115: 447-452.
90. Williams M.L. and Ellias P.M. Ichthyosis: Where we have been; Disorders of cornification: Where we are going. *Curr Probl Dermatol*, 2000; 12: 171-176.

91. YamanoT, Shimizu M and Noda T. Quantitative comparison of the results obtained by the multiple-dose pig maximization test and the non-radioactive murine local lymph-node assay for various biocides. *Toxicology*, 2005; 165-175.