



L'essentiel de l'information
scientifique et médicale

www.jle.com

Le sommaire de ce numéro

http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/sante_pub/ers/sommaire.md?type=text.html

Environnement & Risques Santé ERS

Volume 13 – numéro 6 • novembre-décembre 2014

Champs électromagnétiques :
30 ans après l'alerte

Prédictions par lecture croisée du potentiel
sensibilisant des substances chimiques

L'hépatotoxicité : des événements prédictifs
aux modèles *in vitro*

Méthode de sélection par *data mining* de facteurs
environnementaux morbides pour la géographie
Application aux tumeurs secondaires après
le traitement d'une leucémie



www.jle.com



Grand Prix Éditorial 2014
1^{er} prix - Meilleur compte-rendu
de congrès
Conférence Environnement Santé,
19-23 août 2013, Bâle, Suisse
Corinne Mandin et coll.

Montrouge, le 13/01/2015

Enrico Mombelli

Vous trouverez ci-après le tiré à part de votre article au format électronique (pdf) :
Prédictions par lecture croisée du potentiel sensibilisant des substances chimiques : un exercice du groupe de travail FRANCOPA sur la recherche

paru dans

Environnement, Risques & Santé, 2014, Volume 13, Numéro 6

John Libbey Eurotext

Ce tiré à part numérique vous est délivré pour votre propre usage et ne peut être transmis à des tiers qu'à des fins de recherches personnelles ou scientifiques. En aucun cas, il ne doit faire l'objet d'une distribution ou d'une utilisation promotionnelle, commerciale ou publicitaire.

Tous droits de reproduction, d'adaptation, de traduction et de diffusion réservés pour tous pays.

© John Libbey Eurotext, 2014

Prédictions par lecture croisée du potentiel sensibilisant des substances chimiques : un exercice du groupe de travail FRANCOPIA sur la recherche

ENRICO MOMBELLI¹

ALEXANDRE PÉRY¹

ISABELLE FABRE²

FANNY BOISLÈVE³

GRUPE DE TRAVAIL RECHERCHE

FRANCOPIA

MARC PALLARDY⁴

¹ Institut national de l'environnement industriel et des risques (INERIS)
Unité modèles pour l'écotoxicologie et la toxicologie (METO)
Parc Alata
BP2

65550 Verneuil en Halatte
France
<enrico.mombelli@ineris.fr>
<alexandre.pery@ineris.fr>

² Agence nationale de sécurité du médicament (ANSM)

Direction des Contrôles
635, rue de la Garenne
34740 Vendargues
France
<isabelle.fabre@ansm.sante.fr>

³ Groupe Yves Rocher
Recherche et développement

Département sécurité,
101, quai du Président
Roosevelt
92444 Issy-les-Moulineaux
Cedex
France
<fanny.boisleve@yrnet.com>

⁴ Universud

Tirés à part :
E. Mombelli

Article reçu le 4 août 2014,
accepté le 22 septembre 2014

Résumé. Les méthodes prédictives par analogie structurale représentent une alternative reconnue à l'expérimentation animale en (éco)toxicologie. Parmi ces méthodes, les prédictions par « lecture croisée » sont particulièrement intéressantes car elles peuvent être argumentées au cas par cas sur la base d'un avis d'expert sans avoir recours à des modèles QSAR (Relations quantitatives structure à activité) dont l'interprétation nécessite des connaissances spécifiques en modélisation moléculaire et statistique.

De plus, les prédictions par lecture croisée peuvent être réalisées à partir d'un nombre réduit de substances chimiques dont le profil toxicologique a été déterminé expérimentalement. Par conséquent, cette approche peut être appliquée à des effets toxicologiques pour lesquels il n'y a pas de modèle QSAR disponible, mais seulement quelques substances qui sont considérées comme étant similaires à celle d'intérêt. Cependant, les prédictions par lecture croisée ne sont pas encadrées par des principes de validation comme ceux qui assurent l'application correcte et l'interprétation des prédictions élaborées par les modèles QSAR.

Suivant ces constats, le groupe de travail recherche de la plateforme française FRANCOPIA dédiée au développement, à la validation et à la diffusion de méthodes alternatives en expérimentation animale a conduit un exercice qui se propose d'analyser la pertinence des approches par lecture croisée pour la prédiction du potentiel de sensibilisation cutanée des substances chimiques. Les résultats de l'exercice montrent que, grâce à des connaissances mécanistiques et à des critères empiriques de similarité, il est possible de sélectionner des substances chimiques pertinentes permettant la mise en place d'une aide à la prédiction par analogie structurale.

Mots clés : QSAR ; sécurité chimique ; tests cutanés.

Abstract

Using read-across to predict the sensitising potential of chemicals: an exercise by the FRANCOPIA research working group

Predictive methods that use structural analogy are recognised alternatives to animal testing in (eco)toxicology. Among these methods, read-across predictions are particularly interesting because they can be derived by an expert on a case by case basis without using QSAR (quantitative structure activity relationship) models that require specific knowledge in molecular and statistical modelling for their interpretation.

In addition, read-across predictions can be obtained by using a small number of chemicals characterised by an experimentally determined toxicological profile. Hence, this approach can be applied to the prediction of toxicological effects for which no QSAR models are available and only a few chemicals are deemed similar to the chemical of interest. These predictions are not, however, regulated by validation principles such as those that ensure the correct application and interpretation of QSAR predictions.

Pour citer cet article : Mombelli E, Péry A, Fabre I, Boislève F, Groupe de travail recherche FRANCOPIA, Pallardy M. Prédictions par lecture croisée du potentiel sensibilisant des substances chimiques : un exercice du groupe de travail FRANCOPIA sur la recherche. *Environ Risque Sante* 2014 ; 13 : 467-75. doi : 10.1684/ers.2014.0744

INSERM UMR 996
Faculté de
Pharmacie
Université Paris-Sud
5, rue Jean-Baptiste
Clément
92296 Chatenay-Malabry
Cedex
France
<marc.pallardy@u-psud.fr>

Prompted by these observations, we (the research working group of the French FRANCOA platform for the development, validation and dissemination of alternatives to animal testing) devised an exercise designed to evaluate the relevance of read-across approaches for predicting the skin sensitising potential of chemicals. The results show that the knowledge of mechanisms and use of empirical similarity criteria make it possible to select pertinent chemicals for which predictions based on structural analogies can be formulated.

Key words: chemical safety; QSAR; skin tests.

Dans le cadre du règlement REACH sur l'(éco)toxicité des substances chimiques, les propriétés toxicologiques des substances chimiques peuvent être évaluées sans avoir recours à l'expérimentation animale ou à des études *in vitro*, grâce aux prédictions par lecture croisée (aussi connue sous l'anglicisme de « *read across* ») [1]. Le concept de lecture croisée se fonde sur une hypothèse structure-toxicité selon laquelle des molécules similaires induisent des effets toxicologiques similaires. Afin de prédire par lecture croisée, il est donc essentiel d'identifier des molécules similaires à la substance à toxicité inconnue (analogues structuraux) sous l'hypothèse que les substances identifiées et la substance ciblée se comportent de la même manière [2].

Lors de l'élaboration d'une prédiction par lecture croisée, l'information toxicologique manquante peut être estimée grâce à quatre approches en fonction de la toxicité expérimentale des analogues structuraux :

- un analogue est utilisé pour estimer la toxicité d'une substance chimique ;
- deux ou plusieurs analogues sont utilisés pour estimer la toxicité d'une substance chimique ;
- un analogue est utilisé pour estimer la toxicité de plusieurs substances chimiques ;
- deux ou plusieurs analogues sont utilisés pour estimer la toxicité de deux ou plusieurs substances chimiques.

D'un point de vue pratique, la toxicité pour la substance d'intérêt peut être dérivée en fonction de la toxicité expérimentale qui caractérise les analogues structuraux grâce, par exemple, au calcul d'une moyenne arithmétique des toxicités des analogues ou l'adoption de la valeur la plus représentée (mode) si les toxicités sont exprimées en fonction de deux ou plusieurs classes de toxicité (ex. substance toxique ou non toxique). En cas d'utilisation d'un seul analogue structural, la prédiction coïncide avec la toxicité expérimentale de l'analogue.

Les prédictions par lecture croisée sont appréciées par les décideurs institutionnels car, généralement, leur interprétation ne nécessite pas de connaissances pointues en modélisation moléculaire et statistique qui sont souvent nécessaires pour interpréter la plupart des résultats issus d'un modèle QSAR (modèles statistiquement validés et basés sur la même hypothèse structure-toxicité que les approches par lecture croisée). Cependant, les prédictions

par lecture croisée ne sont pas encadrées par des principes de validation comme ceux qui assurent l'application correcte des modèles QSAR [3].

En effet, lors de l'élaboration d'une prédiction par lecture croisée plusieurs choix cruciaux sont laissés à l'expert qui doit les argumenter un par un :

- la définition de similarité qui détermine le choix des analogues structuraux ;
- la qualification des données toxicologiques ;
- le nombre d'analogues structuraux à considérer ;
- l'opération logique qui permet de dériver les prédictions en fonction des toxicités expérimentales qui caractérisent les analogues structuraux.

Pour toutes ces raisons, les prédictions par lecture croisée peuvent être particulièrement incertaines. L'exercice détaillé dans cet article se propose d'examiner la fiabilité des approches par lecture croisée en l'appliquant à la prédiction de l'allergie cutanée appelée aussi « sensibilisation cutanée ».

Cet effet a été retenu car il y a une quantité importante de données expérimentales disponibles et que le mécanisme toxicologique qui induit un eczéma de contact a été, en grande partie, élucidé [4].

Une substance sensibilisante ou allergisante est un agent chimique qui est capable de provoquer une réaction d'hypersensibilité de type eczéma de contact qui se manifeste par une dermatite, déclenchée par une réaction immunitaire spécifique du produit appliqué sur la peau. La liaison covalente d'une substance chimique aux protéines du microenvironnement cutané de l'épiderme représente l'événement initiateur de cette réponse immunitaire [4].

Les substances chimiques pouvant induire une réaction eczéma de contact sont des molécules électrophiles de petite taille (< 1 000 Da) dénommées haptènes. Leur petite taille et des propriétés lipophiles leur permettent de traverser la barrière cutanée et leur caractère électrophile d'interagir avec les sites nucléophiles des protéines (tels que ceux présents sur les cystéines et lysines). Il semblerait qu'un haptène interagisse avec de multiples protéines endogènes générant soit un signal de stress (ex. stress oxydatif) facilitant une réponse inflammatoire et/ou une activation des cellules épidermiques, soit un complexe immunogène qui sera reconnu par le système

immunitaire via sa présentation par les cellules dendritiques présentes au niveau cutané.

Les cellules dendritiques activées migrent alors de la peau vers les ganglions lymphatiques proximaux où elles vont sélectionner les lymphocytes T naïfs spécifiques de l'haptène, aboutissant à la prolifération des lymphocytes T et à la différenciation de lymphocytes T mémoires. Cette phase d'initiation dite de sensibilisation est cliniquement muette. C'est lors de contacts ultérieurs de l'haptène avec la peau qu'une réaction inflammatoire se manifestera. Elle est déclenchée par l'activation des lymphocytes T mémoires spécifiques produits dans la phase d'induction [4].

Sur la base de toutes ces considérations, le groupe de travail sur la recherche de la plateforme FRANCOPA [5] sur la recherche a élaboré un exercice dans l'optique d'apporter des éléments de réponse aux quatre questions suivantes :

- Les approches par lecture croisée appliquées à la sensibilisation cutanée sont-elles prédictives ?

- L'identification d'analogues structuraux en fonction de critères de toxicologie mécanistique améliore-t-elle la fiabilité des prédictions par lecture croisée ?
- L'introduction de contraintes d'interpolation physico-chimiques améliore-t-elle la fiabilité des prédictions par lecture croisée ?
- Les prédictions par lecture croisée en fonction d'un seul analogue structural sont-elles fiables ?

Méthodes

Un jeu de données (*tableau 1*) composé de 123 substances chimiques (89 substances sensibilisantes et 34 substances non-sensibilisantes) dont le potentiel sensibilisant a été expérimentalement caractérisé grâce au test LLNA (*local lymph node assay*) a été qualifié par le groupe de travail recherche du FRANCOPA sur la base de

Tableau 1. Jeux de données utilisés lors de l'exercice sur les prédictions par lecture croisée. Le jeu de données #1 rassemble les analogues structuraux qui permettent la dérivation des prédictions. Le jeu de données #2 rassemble les substances qui ont été assimilées à des substances à toxicité inconnue lors de l'exercice.

Table 1. Datasets used for the read-across exercise. Dataset #1 contains the structural analogues that enable the predictions to be derived. Dataset #2 contains the chemicals targeted by read-across predictions.

Jeu de données #1				Jeu de données #2							
CAS RN ¹	PS ²	CAS RN	PS	CAS RN	PS	CAS RN	PS	CAS RN	PS	CAS RN	PS
93-99-2	Faible	1166-52-5	Fort	8001-54-5	Négatif	119-84-6	Modéré	104-54-1	Faible	118-58-1	Modéré
39236-46-9	Faible	95-55-6	Fort	110-27-0	Négatif	100-69-6	Modéré	110-86-1	Faible	2111-75-3	Modéré
97-90-5	Faible	108-31-6	Fort	68-12-2	Négatif	5231-87-8	Modéré	514-10-3	Faible	2785-87-7	Modéré
107-75-5	Faible	127-65-1	Fort	3810-74-0	Négatif	6728-26-3	Modéré	78-70-6	Faible	104-27-8	Modéré
62-53-3	Faible	55406-53-6	Fort	874-23-7	Négatif	93-51-6	Modéré	144-62-7	Faible	94-36-0	Extrême
106-24-1	Faible	111-12-6	Fort	99-76-3	Négatif	106-47-8	Modéré	13706-86-0	Faible	2682-20-4	Extrême
140-67-0	Faible	151-21-3 ³	Négatif	107-15-3	Modéré	96-27-5	Modéré	106-50-3	Fort		
103-95-7	Faible	71-36-3	Négatif	101-86-0	Modéré	764-85-2	Modéré	123-31-9	Fort		
94-09-7	Faible	108-90-7	Négatif	149-30-4	Modéré	5910-85-0	Modéré	5307-14-2	Fort		
2426-08-6	Faible	56-81-5	Négatif	97-54-1	Modéré	112-67-4	Modéré	27072-45-3	Fort		
120-51-4	Faible	67-63-0	Négatif	2634-33-5	Modéré	97-00-7	Extrême	112-05-0*	Négatif		
431-03-8	Faible	50-21-5	Négatif	122-57-6	Modéré	15646-46-5	Extrême	99-96-7	Négatif		
61-33-6	Faible	119-36-8	Négatif	141-05-9	Modéré	106-51-4	Extrême	57-55-6	Négatif		
103-41-3	Faible	94-13-3	Négatif	5392-40-5	Modéré	886-38-4	Extrême	121-32-4	Négatif		
19317-11-4	Faible	69-72-7	Négatif	80-54-6	Modéré	100-11-8	Extrême	63-74-1	Négatif		
140-88-5	Faible	84-66-2	Négatif	818-61-1	Modéré	1154-59-2	Extrême	94-02-0	Négatif		
111-25-1	Faible	92-48-8	Négatif	90-15-3	Modéré	93-91-4	Extrême	91-64-5	Négatif		
1118-71-4	Faible	124-07-2	Négatif	111-80-8	Modéré			81-07-2	Négatif		
50-00-0	Fort	121-33-5	Négatif	591-27-5	Modéré			75-35-4	Négatif		
104-55-2	Fort	100-52-7	Négatif	101-39-3	Modéré			107-22-2	Modéré		
111-30-8	Fort	65-85-0	Négatif	108-46-3	Modéré			122-78-1	Modéré		
85-44-9	Fort	109-65-9	Négatif	111-40-0	Modéré			97-53-0	Modéré		
121-79-9	Fort	923-26-2	Négatif	552-30-7	Modéré			109-55-7	Modéré		
35691-65-7	Fort	9005-65-6	Négatif	93-53-8	Modéré			137-26-8	Modéré		
100-39-0	Fort	100-06-1	Négatif	17369-59-4	Modéré			122-40-7	Modéré		

¹ CAS RN = numéro CAS qui identifie les substances chimiques.

² PS = Potentiel Sensibilisant (LLNA).

³ Faux positifs lors de l'essai LLNA.

Tableau 2. Classification LLNA : le potentiel de sensibilisation cutanée est classé en fonction de la concentration critique EC3.

Table 2. LLNA classification: skin sensitisation potential is categorised according to the critical concentration of EC3.

EC3 %	Classe LLNA
-	Non-sensibilisant
≥ 10	Sensibilisant faible
1-10	Sensibilisant modéré
0.1-1	Sensibilisant fort
< 0.1	Sensibilisant extrême

données disponibles dans la littérature sur la sensibilisation cutanée [6-12]. Le test LLNA évalue la prolifération lymphocytaire primaire au niveau des ganglions auriculaires suite à l'application d'une substance chimique sur l'oreille de souris. Le test LLNA évalue le potentiel sensibilisant des substances chimiques en déterminant le rapport (index de stimulation, IS) entre la prolifération des cellules du ganglion auriculaire d'un groupe de souris traitées et la prolifération du ganglion auriculaire d'un groupe de souris témoins [13]. Le potentiel sensibilisant est d'habitude quantifié par la concentration de substance qui induit un IS égal à 3 (EC3), qui détermine la classification reportée dans le *tableau 2*.

Le facteur d'incertitude qui caractérise la reproductibilité intra-laboratoire de la concentration critique EC3 est compris entre 2 et 4 [14] et celui qui caractérise la variabilité inter-laboratoire est inférieur à un ordre de grandeur [14]. Pour les objectifs de cet exercice nous avons donc considéré que la variabilité expérimentale de l'essai LLNA est égale à une classe de sensibilisation. Cette information est importante car cette limite représente aussi le niveau maximal de précision qu'il est vraisemblable d'atteindre en fonction des prédictions par lecture croisée ou toute autre approche basée sur les analogies structurales (ex. modèles QSAR).

Ce jeu de données a été séparé en deux parties : la première partie (« jeu de données #1 », 92 substances) rassemble les substances qui assureront la fonction d'analogues structuraux à toxicité connue et la deuxième partie (« jeu de données #2 », 31 substances) réunit les substances dont la toxicité sera prédite par lecture croisée et confrontée aux données expérimentales. Ces deux jeux de données ont été définis de façon à maintenir les proportions des différents potentiels de sensibilisation (extrême, fort, modéré, faible et négatif) au sein de deux ensembles de substances chimiques.

L'exercice a été réalisé grâce à la seule utilisation de la boîte à outils (QSAR de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) v3.1 (BAO-OCDE)) [15] afin de reproduire une situation de travail typique lors de laquelle un utilisateur dispose unique-

ment d'outils gratuits. La BAO-OCDE est en effet destinée à être utilisée par toutes les parties prenantes d'une réglementation sur la toxicité chimique afin de compléter, grâce aux analogies structure-toxicité, les informations manquantes et nécessaires à la caractérisation du danger chimique. La BAO-OCDE contient plusieurs bases de données et outils de calcul nécessaires pour la définition de catégories chimiques (ex. identification d'alertes structurales) et la dérivation de prédictions par lecture croisée.

Compte tenu du fait qu'une prédiction par lecture croisée peut être dérivée en fonction de plusieurs stratégies, la procédure suivante a été adoptée afin de donner une démarche logique et unique à l'étude :

1) Profilage toxicologique. Cette première étape se propose de caractériser la substance à toxicité inconnue en fonction de la présence ou de l'absence d'alertes structurales codifiées par les modules « *protein binding by OECD* » (PB-OECD) et « *protein binding by OASIS* » (PB-OASIS). L'expression anglaise « *protein binding* » signifie « liaison aux protéines ». Ces deux modules identifient les fragments moléculaires (alertes structurales) qui peuvent promouvoir la formation d'une liaison covalente entre substances chimiques et protéines du derme (événement initiateur d'une sensibilisation cutanée). Cette étape permet d'établir le « profil toxicologique » de la substance à toxicité inconnue : « aucune alerte » ou identification spécifique de l'alerte structurale susceptible de former des liaisons covalentes avec les protéines (ex. groupements aldéhyde alpha, bêta insaturés ou thiocyanates).

Plus de détails sur les modules de profilage PB-OCDE et PB-OASIS sont disponibles dans la documentation de support pour la BAO-OCDE [15]. Il y a certainement une superposition importante entre les substances qui forment le jeu de données de notre exercice sur les lectures croisées et les substances qui ont permis le développement des deux modules compte tenu de la chronologie des expérimentations toxicologiques disponibles en littérature. Cependant, il est difficile de la quantifier avec précision car l'identité des substances qui ont motivé la définition des alertes n'est pas indiquée par la documentation de support.

2) Catégorisation en fonction du profil toxicologique. Cette étape vise à identifier les analogues structuraux (jeu de données #1) qui présentent le même profil toxicologique que la substance investiguée, en utilisant les modules PB-OECD et PB-OASIS. À la fin de cette étape, les analogues structuraux retenus sont caractérisés par la présence des mêmes alertes structurales ou par l'absence d'alertes structurales connues par les deux modules. Les molécules caractérisées par la présence de la même alerte structurale devraient suivre le même mécanisme réactionnel de fixation covalente aux protéines.

3) Sous-catégorisation en fonction de la similarité chimique. Lors de cette étape, l'ensemble des substances chimiques identifiées lors de l'étape précédente est trié

en fonction de la similarité chimique entre les analogues et la substance à toxicité inconnue. Seuls les analogues structuraux dont la similarité en termes de « chemins atomiques » (« *atomic pathways* » pour la BAO-OCDE) est supérieure ou égale à 60 % (index de Tanimoto) sont retenus pour les lectures croisées. Les « chemins atomiques » sont définis comme des séquences d'atomes d'une longueur spécifiée qui peuvent être repérées à l'intérieur d'une structure moléculaire. Dans le cadre de cette étude, les atomes qui forment ces séquences ($1 \leq \text{longueur} \leq 5$) ont été caractérisés par les paramètres suivants : type atomique, hybridation des orbitales atomiques et charge électrique. Les exemples structuraux reportés sur la *figure 1* illustrent de façon visuelle ces critères de similarité. Cette définition empirique de similarité n'a aucun lien avec l'identification spécifique d'alertes structurelles.

4) Identification des analogues structuraux les plus proches. Les analogues structuraux les plus proches (nombre d'analogues compris entre 2 et 5) de la substance à toxicité inconnue sont identifiés en fonction du coefficient de partage entre l'1-octanol et l'eau, le « Log P » (descripteur par défaut de la BAO-OCDE)

5) Dérivation des prédictions par lecture croisée. Les prédictions correspondent à celles de la majorité des voisins structuraux. Par exemple, trois voisins modérément sensibilisants sur cinq attribuent à la substance à toxicité inconnue un potentiel sensibilisant modéré. Si les voisins structuraux sont repartis de façon égale dans deux

classes les prédictions correspondent à la classe la plus sensibilisante. De plus, si la stratégie de sélection (points 2 à 4) identifie deux analogues structuraux ou plus, il est possible d'appliquer une contrainte d'interpolation. Cette contrainte exige que les valeurs qui définissent les caractéristiques physicochimiques de la substance sous investigation soient comprises entre la valeur la plus basse et la valeur la plus haute parmi les analogues structuraux. Deux possibilités de contrainte ont été étudiées en fonction du Log P (estimé par le module KOWIN de la BAO-OCDE) et des énergies des orbitales HOMO et LUMO (estimées par la méthode semi-empirique AM1 de la BAO-OCDE). Ces possibilités impliquent la satisfaction de la contrainte d'interpolation par : les énergies des orbitales et le log P, ou aucune propriété physicochimique.

Le coefficient de partage Log P et, surtout, les énergies des orbitales frontières (HOMO et LUMO) sont deux propriétés physicochimiques qui jouent un rôle important lors des phénomènes de sensibilisation cutanée [6].

Les prédictions par lecture croisée effectuées sur la base d'un seul analogue structural ont été mises dans une catégorie séparée, car potentiellement caractérisées par plus d'incertitude.

Résultats

L'impact des critères de catégorisation et de l'interpolation sur la fiabilité des prédictions

Quatorze lectures croisées sont possibles en fonction d'un ou plusieurs analogues structuraux pour une sélection basée sur le profilage et la similarité, vingt-trois pour une sélection basée sur le seul profilage et dix-huit pour une sélection basée sur la seule similarité (*figures 2 et 3*).

Cependant, si tous les critères d'interpolation sont appliqués, seule une minorité de lectures croisées (basées sur deux analogues ou plus) arrive à satisfaire les contraintes imposées sur le Log P et les énergies des orbitales frontières et, par conséquent, les prédictions correctes ne sont possibles que pour une partie réduite du jeu de données #2 (*figure 2*).

Les histogrammes reportés sur la *figure 2* indiquent aussi qu'une catégorisation effectuée en fonction de la seule homogénéité du profil toxicologique (deuxième groupe d'histogrammes) est caractérisée par la présence de deux prédictions dont l'erreur de prédiction est supérieur à une classe LLNA. La performance détériorée d'une catégorisation en fonction de la seule homogénéité du profil toxicologique est due essentiellement au fait que des substances qui ne contiennent pas d'alertes structurales sont groupées ensemble même si elles sont très hétérogènes en termes de structure chimique et de toxicité. Toutefois, le premier groupe d'histogrammes de

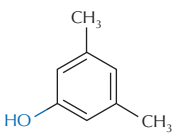

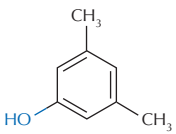
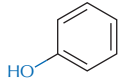
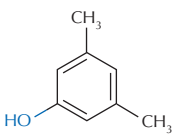
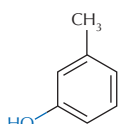
Substance 1	Substance 2	Similarité
		51%
		62%
		75%

Figure 1. Illustration des critères de similarité chimique adoptés lors de l'exercice sur les prédictions par lecture croisée.

Figure 1. Illustration of the similarity criteria used in the read-across prediction exercise.

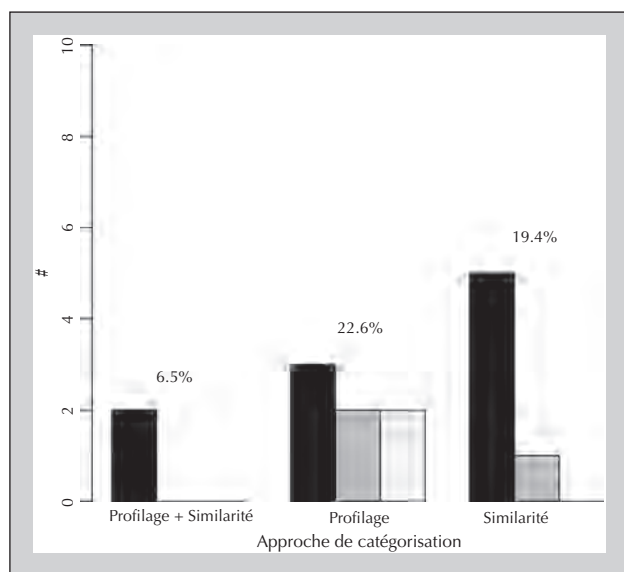


Figure 2. Nombre de prédictions correctes pour des lectures croisées qui respectent les contraintes d'interpolation pour le Log P et les énergies des orbitales moléculaires frontières. Les histogrammes noirs indiquent les prédictions correctes, les histogrammes gris foncé indiquent les prédictions qui s'écartent de la toxicité expérimentale d'une seule classe LLNA et les histogrammes gris clair indiquent les prédictions qui s'écartent de la toxicité expérimentale de deux classes LLNA ou plus. Les pourcentages sur les groupes d'histogrammes indiquent le recouvrement du jeu de données #2.

Figure 2. Number of correct predictions for read-across approaches that comply with the interpolation constraints for Log P and for the energies of the frontier molecular orbitals. Black histograms represent correct predictions, dark grey histograms predictions with an error within one LLNA class and light grey histograms predictions with an error greater than or equal to two LLNA classes. Percentages above the groups of histograms represent the coverage of dataset #2.

la figure 2 indique qu'une sous-catégorisation en fonction de la similarité chimique élimine ce problème.

Etant donné que le texte du règlement REACH (Annexe XI, section 1.5) sur les lectures croisées indique une préférence pour l'interpolation lors de la dérivation de prédictions, nous avons aussi analysé l'influence des interpolations sur la fiabilité des prédictions. Cette analyse a permis de quantifier l'impact qu'un abandon des contraintes d'interpolation a sur l'augmentation du recouvrement (pourcentage de prédictions possibles) du jeu de données #2 (figure 3). De plus, elle a aussi mis en évidence une augmentation des prédictions dont l'erreur est supérieure à une classe LLNA. Cette augmentation a lieu en correspondance d'une catégorisation en fonction de la seule homogénéité des profils ou de la seule similarité chimique. Cette détérioration de la performance des lectures croisées est occasionnée par l'identification d'analogues structuraux qui contiennent des alertes structurales différentes par rapport à la substance

à toxicité inconnue même si les substances en question présentent une bonne similarité entre elles.

Il est important d'observer qu'une catégorisation chimique réalisée en fonction de l'identification d'alertes structurales couplée avec une sous-catégorisation en fonction de la similarité chimique semblerait être particulièrement robuste car les erreurs de prédictions restent dans les limites des erreurs expérimentales, même si les contraintes d'interpolation ne sont pas appliquées (figure 2 et figure 3).

Les prédictions par lecture croisée en fonction d'un seul analogue

La stratégie de catégorisation basée sur l'homogénéité des profils et la similarité est particulièrement sélective et elle donne lieu à huit lectures croisées en fonction d'un seul analogue (figure 4), qui sont caractérisées par une précision comparable à celle expérimentale. Cette bonne performance est due à l'identification d'analogues structuraux qui contiennent la même alerte, qui caractérise la substance à toxicité inconnue tout en présentant un bon niveau de similarité chimique avec celle-ci ($\geq 60\%$). Ces lectures croisées ont été dérivées en fonction d'un analogue structural caractérisé par un potentiel sensibilisant faible, trois analogues non-sensibilisants et quatre analogues modérément sensibilisants. La probabilité de sélectionner par hasard des substances caractérisées par les mêmes potentiels est égale (fonction de masse multinomiale) à 1,2 %. Cette probabilité faible indique que la stratégie de sélection adoptée est particulièrement sélective.

En revanche, la détérioration de la performance prédictive pour les prédictions basées exclusivement sur des critères de similarité est due à l'identification d'analogues structuraux qui ne contiennent pas la même alerte, qui caractérise la substance à toxicité inconnue malgré une bonne similarité structurale (ex. CAS RN 63-74-1 et son analogue structural CAS RN 127-65-1). Il est donc intéressant d'observer qu'un bon niveau de similarité entre deux substances ne garantit pas une prédiction par lecture croisée correcte.

Une catégorisation basée exclusivement sur l'homogénéité des profils toxicologiques est caractérisée par une bonne précision. Ce phénomène est explicable par le fait que les analogues structuraux identifiés sont caractérisés par la présence de la même alerte structurale et par un bon niveau de similarité chimique. Cependant, cette similarité est, dans ce cas de figure, complètement fortuite car elle n'a pas été assurée par une sous-catégorisation.

Cette observation permet aussi de mettre en évidence le fait que, dans les conditions de l'exercice, la qualité des prédictions est influencée plutôt par la qualité des analogues structuraux (contiennent-ils la même alerte structurale ? Y a-t-il un bon niveau de similarité générale entre les analogues et la substance sous investigation ?)

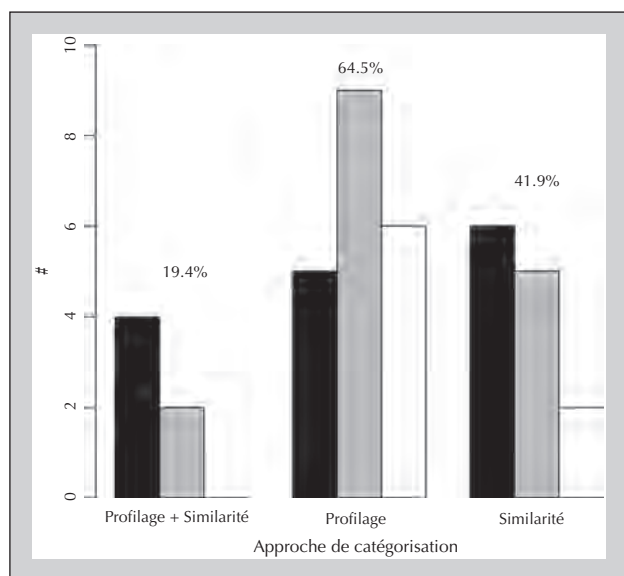


Figure 3. Nombre de prédictions correctes pour des lectures croisées dérivées sans aucune contrainte d'interpolation. Les histogrammes noirs indiquent les prédictions correctes, les histogrammes gris foncé indiquent le nombre de prédictions qui s'écartent de la toxicité expérimentale d'une seule classe LLNA et les histogrammes gris clair indiquent les prédictions qui s'écartent de la toxicité expérimentale de deux classes LLNA ou plus. Les pourcentages sur les groupes d'histogrammes indiquent le recouvrement du jeu de données #2.

Figure 3. Number of correct predictions for read-across predictions regardless of any interpolation constraints. Black histograms represent correct predictions, dark grey histograms predictions with an error within one LLNA class and light grey histograms predictions with an error greater than or equal to two LLNA classes. Percentages above the groups of histograms represent the coverage of dataset #2.

que par leur quantité. En effet, toutes les prédictions erronées pour une catégorisation basée sur l'homogénéité des profils toxicologiques (figures 2 et 3) sont caractérisées par un nombre maximal (cinq) d'analogues structuraux qui sont hétérogènes en termes de structure et de potentiel sensibilisant, tandis que des prédictions basées sur un seul analogue arrivent à bien identifier le potentiel sensibilisant (figure 4) pour les raisons décrites dans les paragraphes précédents.

Il faut aussi souligner que la seule stratégie de sélection qui donne lieu à des prédictions négatives pour des substances sensibilisantes (faux négatifs) est celle basée sur le seul profilage en présence de substances qui ne présentent pas d'alertes structurales. Cette observation indique à nouveau que deux substances ne doivent pas être considérées comme des analogues structuraux sur la seule base du fait qu'elles ne contiennent pas d'alerte structurale. En ce qui concerne les prédictions positives pour des substances non-sensibilisantes (faux positifs), la stratégie de sélection basée sur la seule similarité donne lieu à quatre prédictions

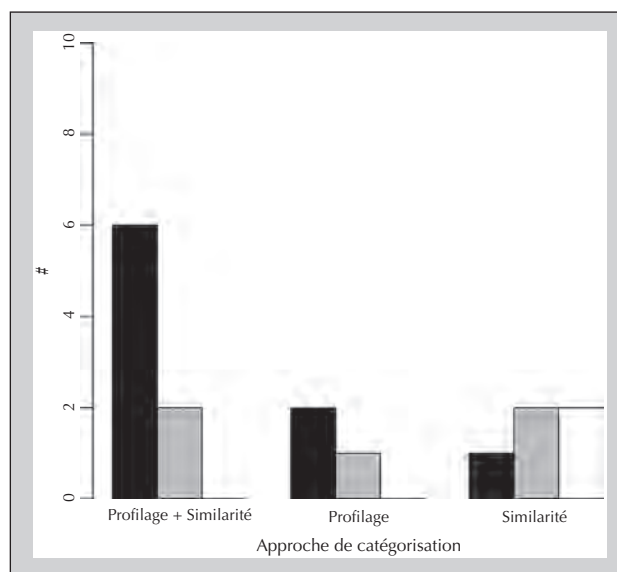


Figure 4. Nombre de prédictions correctes pour des prédictions par lecture croisée effectuées en fonction d'un seul analogue structural. Les histogrammes noirs indiquent les prédictions correctes, les histogrammes gris foncé indiquent le nombre de prédictions qui s'écartent de la toxicité expérimentale d'une seule classe LLNA et les histogrammes gris clair indiquent les prédictions qui s'écartent de la toxicité expérimentale de deux classes LLNA ou plus. Les pourcentages sur les groupes d'histogrammes indiquent le recouvrement du jeu de données #2.

Figure 4. Number of correct predictions for read-across predictions based on only one structural analogue. Black histograms represent correct predictions, dark grey histograms predictions with an error within one LLNA class and light grey histograms predictions with an error greater than or equal to two LLNA classes. Percentages above the groups of histograms represent the coverage of dataset #2.

erronées qui sont caractérisées par une hétérogénéité en termes d'alertes structurales entre analogues et substance d'intérêt. La seule stratégie de sélection qui ne présente pas de faux positifs ou négatifs est celle en deux étapes (profilage et similarité).

Conclusion

Le ratio entre le nombre de prédictions qui sont caractérisées par une fiabilité comparable à celle expérimentale et le nombre de prédictions possibles est égal à 100 % pour une stratégie basée sur le profilage et la similarité, 74 % pour une stratégie basée sur le seul profilage et 78 % pour une stratégie basée sur la seule similarité. Il apparaît donc que la majorité des prédictions qui peuvent être obtenues grâce à l'adoption de la valeur toxicologique la plus représentée parmi les analogues structuraux soient fiables. Cependant, il faut souligner que seule une approche structurée autour d'une identification d'alertes structurales et une définition empirique de la

similarité chimique, permet de dériver des prédictions qui sont fiables et interprétables d'un point de vue mécanistique (événement initiateur du phénomène de sensibilisation). Il faut aussi remarquer que cette stratégie de sélection en deux étapes a une tendance à conserver une bonne précision même si aucune contrainte d'interpolation n'est imposée lors des lectures croisées.

En parallèle, il a aussi été observé que les prédictions par lecture croisée basées sur des analogues sélectionnés sur la base de la seule présence/absence d'alertes structurales (homogénéité des profils PB-OECD et PB-OASIS) sont peu fiables si les analogues retenus ne présentent pas d'alertes structurales. En effet, cette catégorie de molécules peut être très hétérogène en termes de structure.

L'introduction de contraintes d'interpolation en fonction du Log P et des énergies des orbitales frontières semblerait améliorer la précision des prédictions (figures 2 et 3) aux dépens du nombre de prédictions possibles.

Pour certaines alertes structurales le jeu de données #1 contient une seule molécule et une attention particulière doit être portée aux prédictions par lecture croisée obtenues dans ces conditions. En effet, le nombre de prédictions correctes pour des lectures croisées basées sur un seul analogue structural n'est pas négligeable, surtout si l'analogie en question a été sélectionnée grâce à une combinaison de critères mécanistiques et de similarité. Pour cette raison, la possibilité d'utiliser des lectures croisées limitées à un seul analogue ne devrait, à priori, pas être écartée, mais elle devrait plutôt être évaluée en profondeur, en prenant en compte les propriétés physico-chimiques critiques (énergies des orbitales frontières, Log P), l'identité des groupements fonctionnels et le profil métabolique des deux substances.

Les prédictions toxicologiques par lecture croisée doivent toujours être argumentées au cas par cas en fonction de l'effet toxicologique évalué. Pour cette raison, une généralisation sur la pertinence de cette approche d'analogie structurale est assez difficile. Cependant, dans le cas de la sensibilisation cutanée, l'exercice décrit dans cet article permet de conclure que la formalisation d'alertes structurales pour la formation de liaisons

covalentes avec les protéines facilite considérablement le choix d'analogues structuraux pertinent, qui assurent une bonne pertinence prédictive. Une sous-catégorisation chimique en fonction de la similarité moléculaire semble aussi être une étape incontournable dans la procédure de catégorisation décrite dans cet article car, même en présence d'un seul analogue, elle assure une bonne évaluation.

Il est cependant important de rappeler que pour cet exercice, par manque de données toxicologiques, il n'a pas été possible de vérifier si la réaction de sensibilisation induite par des molécules non référencées dans la base de données était correctement prédite par l'approche adoptée. En effet, des substances « nouvelles » pourraient induire des phénomènes de sensibilisation grâce à des mécanismes qui ne sont pas pris en compte par les alertes structurelles et les bases de données existantes. Les études par lectures croisées dites de « *read across* » peuvent être employées comme outil de réflexion pour l'évaluateur qui veut utiliser le poids de l'évidence dans une démarche d'évaluation. Par exemple, cette approche peut être un outil d'aide à la réflexion combiné à des tests *in vitro*. Sur la base des données actuelles, il est en effet difficile d'utiliser seules les analogies structurales, en particulier si elles aboutissent à une réponse 'non sensibilisant' puisque d'autres paramètres influençant la réactivité (métabolisme, biologiques) pourraient ne pas être encore complètement intégrés dans les bases de données. ■

Remerciements

Le travail décrit dans cet article a été possible grâce au support du Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie (MEDDE) dans le cadre du programme 181 DRC47. E. Mombelli remercie les organisateurs du congrès de l'année 2013 de la Société française de toxicologie (SFT) en collaboration avec la Société de pharmacologie-toxicologie cellulaire (SPTC) pour avoir favorisé les échanges autour des approches par lecture croisée qui ont enrichi le travail présenté dans cet article.

Financement : Programme 181 DRC47 (MEDDE) ; **liens d'intérêts** : aucun.

Références

1. Parlement européen et Conseil de l'Union européenne. *Règlement REACH*, Annexe XI, section 1.5 du règlement (CE) n° 1907/2006. 2006.
2. Patlewicz G, Ball N, Booth ED, Hulzebos E, Zvinavashe E, Hennes C. Use of category approaches, read-across and (Q) SAR: General considerations. *Regul Toxicol Pharmacol* 2013 ; 67 : 1-12. doi: 10.1016/j.yrtph.2013.06.002
3. OCDE. *Guidance document on the validation of (quantitative) structure-activity relationships [(Q)SAR] models*. 2007. <http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono%282007%292>
4. OCDE. *The adverse outcome pathway for skin sensitization initiated by covalent binding to proteins, Part 1: Scientific evidence*. 2012. <http://www.oecd.org/officialdocuments/public>

displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%282012%2910/part1&doclanguage=en

5. FRANCOA. Plateforme nationale pour le développement des méthodes alternatives en expérimentation animale. 2014. <http://www.francoa.fr/web/francoa?page=home&out=txt&languageIhm=fr>

6. Roberts DW, Aptula AO, Patlewicz G, Pease C. Chemical reactivity indices and mechanism-based read-across for non-animal based assessment of skin sensitisation potential. *J Appl Toxicol* 2008 ; 28 : 443-54. doi: 10.1002/jat.1293

7. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, et al. A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: The human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern Lab Anim* 2010 ; 38 : 1-10.

8. Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, et al. Putting the parts together: Combining in vitro methods to test for skin sensitising potentials. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012 ; 63 : 489-504. doi: 0.1016/j.yrtph.2012.05.013

9. Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittevin JP. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. *Toxicol Sci* 2007 ; 97 : 417-27. doi: 10.1093/toxsci/kfm064

10. Emter R, Ellis G, Natsch A. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers

in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010 ; 245 : 281-90. doi: 10.1016/j.taap.2010.03.009

11. Natsch A, Haupt T, Laue H. Relating skin sensitizing potency to chemical reactivity: Reactive Michael acceptors inhibit NF-kB signaling and are less sensitizing than S(N)Ar- and S(N)2-reactive chemicals. *Chem Res Toxicol* 2011 ; 24 : 2018-27. doi: 10.1021/tx2003678

12. Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). *Opinion on fragrance allergens in cosmetic products*. 2012. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_073.pdf

13. OCDE. *Test No. 429: Skin sensitisation, local lymph node assay*. 2010. <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced-tg429-2010.pdf>

14. National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS). Final background review document: Use of the murine local lymph node assay for potency categorization of chemicals causing allergic contact dermatitis in humans. Appendix C. 2011. http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/immunotox_docs/llna-pot/3-appc-brd-body.pdf

15. OECD QSAR TOOLBOX. Software for grouping chemicals into categories and filling gaps in (eco)toxicity data needed for assessing the hazards of chemicals. <http://www.qsartoolbox.org/>