

SENSIBILISATION

PARTIE I : INTRODUCTION | PARTIE II : ÉVALUATION DU POTENTIEL DE SENSIBILISATION CUTANÉE & ÉVALUATION DES RISQUES

INTRODUCTION



La fréquence des phénomènes allergiques ne cesse d'augmenter depuis quelques années dans le monde. En France, 25 à 30 % de la population générale présente des phénomènes allergiques (source Ameli). Le phénomène biologique conduisant au développement d'une allergie se réalise à partir de 2 phases successives : une phase initiale de « sensibilisation » asymptotique (=sans symptôme, donc invisible) et une 2e phase de « réaction allergique » symptomatique (=avec symptômes). Quels sont les mécanismes impliqués ?

La sensibilisation : premier contact

Cette phase commence au moment où l'individu entre pour la première fois en contact avec l'allergène. Celui-ci est alors reconnu et considéré comme une substance "dangereuse" par certaines cellules du système immunitaire présentes en grande quantité par exemple au niveau de la peau et de l'ensemble des muqueuses. Lors d'un contact ultérieur entre l'allergène et l'organisme « sensibilisé », l'allergène va alors entraîner la réaction indésirable. Ces allergènes peuvent pénétrer par ingestion, par inspiration de l'air ou par contact épidermique.

Si l'on prend comme exemple la sensibilisation cutanée, celle-ci (et particulièrement dans le cadre d'une hypersensibilité de type IV) est ainsi une réaction du système immunitaire provoquée à la suite d'un contact local répété avec une substance sensibilisante. Cette substance peut provenir de l'environnement, d'un produit cosmétique, d'un parfum ou encore d'un médicament

La dermatite allergique de contact (ACD) est ainsi la conséquence d'une réaction d'hypersensibilité retardée de type IV. La phase aiguë de l'ACD se manifeste par une rougeur de la peau, l'apparition de petites vésicules suintantes, et de démangeaisons au niveau de la zone de contact. La sensibilisation cutanée est irréversible et ne peut être guérie, mais les symptômes peuvent diminuer si l'exposition est évitée.

Plus précisément, dans un premier temps, la substance (allergène) peut interagir avec les protéines cutanées. Le système immunitaire est alors stimulé, avec l'activation et la production de médiateurs inflammatoires conduisant à l'activation des lymphocytes T. La "signature" de l'allergène est alors mise en mémoire par ces lymphocytes T.

Dans un second temps, lorsque la même substance entre en contact avec la peau d'une personne déjà sensibilisée, le système immunitaire reconnaît cet allergène via ces lymphocytes T mémoires, ce qui provoquera la réaction cutanée, tels que décrite auparavant.

Adverse Outcome Pathway

De façon encore plus approfondie, l'ensemble des mécanismes impliqués entraînant ces effets peuvent être décrits par l'Adverse Outcome Pathway (AOP) qui pourrait être traduit par 'La signature pouvant conduire aux effets indésirables', cette signature étant une représentation structurée des événements impliqués. L'AOP détaille ainsi les effets connus d'une substance donnée à différentes échelles; moléculaire, biochimique, cellulaire, au niveau des organes et enfin au niveau des organismes. Il relie les connaissances existantes le long d'une série d'événements clés (Key events, KE) causalement liés entre deux points - un événement d'initiation moléculaire (Molecular Initiating Event ; MIE) et les effets indésirables au niveau de l'organisme (AO).



La ligne directrice 168 (TG) de l'OCDE aborde les 5 événements clés (KE) de l'une des voies d'activation des effets indésirables de la sensibilisation cutanée.

Étapes clés de l'AOP de la sensibilisation:

- 1 Pénétration de l'ingrédient sensibilisant dans les couches viables de la peau. Pour cela, les molécules doivent être de faible poids moléculaire et principalement lipophiles.
- 2 Hapténation : interaction et modification des protéines de la peau par la substance sensibilisant (haptène). C'est l'événement d'initiation moléculaire (MIE).
- 3 Production de signaux de danger et de médiateurs inflammatoires par les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules dendritiques résidant dans la peau.
- 4 Le complexe haptène/protéine est reconnu et absorbé par les cellules dendritiques (DC) de l'épiderme, ce qui conduit à leur activation et maturation.
- 5 Migration des DC vers le ganglion lymphatique local
- 6 Présentation de l'antigène à des cellules T naïves spécifiques, et prolifération et différenciation subséquentes des cellules T
- 7 La génération d'une population suffisante de cellules T mémoires spécifiques à l'antigène. Cette expansion clonale de lymphocytes T est la dernière étape clé de la sensibilisation. Elle est nécessaire pour médier une réponse d'élicitation sur le site de réexposition. Chez l'homme, la réponse d'élicitation qui en résulte est observée cliniquement sous la forme d'un eczéma.

L'AOP peut ainsi offrir une base mécanique solide pour une évaluation transparente des risques. Cependant, une méthodologie de quantification est essentielle. La quantification permet d'établir une correspondance entre l'ampleur de la MIE (molecular initiating event) et la probabilité et/ou la gravité des effets indésirables.

ÉVALUATION DU POTENTIEL DE SENSIBILISATION CUTANÉE

La sensibilisation cutanée entraînant une dermatite allergique de contact est un problème croissant de santé. Par conséquent, les organismes de réglementation ont de plus en plus besoin d'identifier les produits chimiques susceptibles de provoquer une sensibilisation cutanée. L'évaluation des composés qui sensibilisent la peau se faisait principalement grâce aux tests de sensibilisation in vivo : le LLNA (Local LymphNode Assay), et le GPMT (Guinea Pig Maximisation Test). Cependant, de par la pression croissante du public pour réduire et remplacer l'expérimentation animale et l'apparition de nouvelles approches méthodologiques, la stratégie d'évaluation du potentiel sensibilisant est considérablement modifiée



Lucie Valero

*Pharmacienne - Consultante
en toxicologie*



Franck Chuzel

Toxicologue-endocrinologue



Anastasia Avdienko

*Chargée de projets
toxicologie*

Nos experts vous présenteront ensuite les
différents mécanismes d'actions et les différents
tests possibles....

SENSIBILISATION

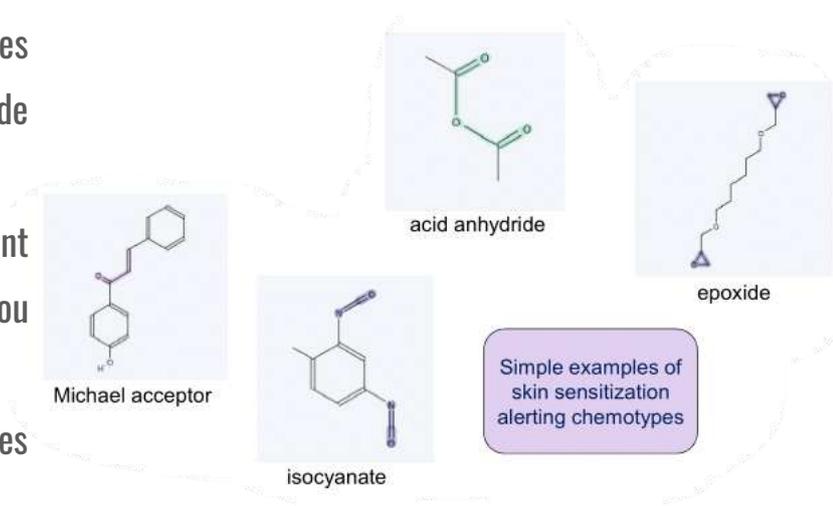
PARTIE II : ÉVALUATION DU POTENTIEL DE SENSIBILISATION CUTANÉE & ÉVALUATION DES RISQUES

1. Tests in silico

Les tests in silico sont des modèles biomathématiques qui utilisent des bases de données d'expérimentation in vivo et in vitro dans l'évaluation de risques. Les études in silico ont montré qu'il existe une relation quantitative entre structure et activité (quantitative structure-activity relationship).

La **QSAR Toolbox** est un exemple d'outil pour collecter des données et les analyser en utilisant différents modèles et permettant ainsi :

- d'identifier les caractéristiques structurales cibles pertinentes et le mécanisme ou mode d'action potentiel.
- d'identifier d'autres produits chimiques qui ont les mêmes caractéristiques structurales et/ou mécanismes d'actions.
- d'utiliser les données expérimentales existantes pour combler les lacunes dans les données.

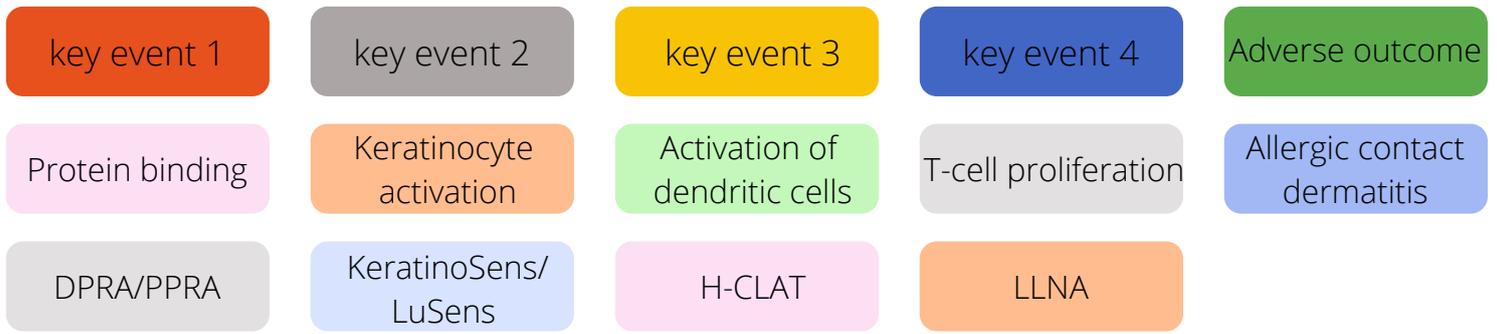


Devant le grand nombre de tests possibles, le toxicologue doit adapter une stratégie complexe afin de savoir comment agit chaque molécule, et interpréter les résultats obtenus afin de procéder au classement de la molécule comme sensibilisante ou non sensibilisante.

2. Tests in vitro

Les méthodes in vitro approuvées par la réglementation sont aujourd'hui toutes basées sur un des trois événements clé (KE) d'AOP.

La première approche reflète le KE1 - l'hapténation des protéines de la peau et évalue la capacité des produits chimiques à se lier de manière covalente aux protéines. C'est le test DPRA : Direct Peptide Reactivity Assay. La seconde approche reflète le KE2 - la génération de signaux de danger par les kératinocytes, qui est évalué par des tests KeratinoSens et LuSens. Enfin, la troisième approche représente le KE3 - l'activation des cellules dendritiques mesurée par l'expression élevée des molécules de surface et des cytokines inflammatoires. Ce sont des tests h-CLAT et U-SENS.



Il n'existe pas encore de test *in vitro* qui puisse mimer les deux dernières étapes d'induction de la sensibilisation (migration des cellules dendritiques et prolifération des lymphocytes T), ils ne peuvent être étudiés que dans le test *in vivo* LLNA.

La sensibilisation étant un phénomène complexe, un seul test n'est pas suffisant pour classer un produit. De plus, ces tests *in vitro* sont des tests à critère d'évaluation unique; ils cherchent donc à identifier les allergènes en fonction d'un seul événement clé dans l'AOP, par conséquent, aucun d'entre eux ni aucun autre test n'a été reconnu comme un test autonome qui pourrait remplacer les tests *in vivo*. La combinaison de plusieurs tests reste ainsi nécessaire pour adresser le potentiel sensibilisant.

3. Tests *in vivo*

Le test des ganglions lymphatiques locaux murins (LLNA) est un test *in vivo* de sensibilisation cutanée reconnu par les autorités européennes. Il mesure la prolifération lymphocytaire induite dans les ganglions lymphatiques chez la souris. La valeur EC3 du LLNA fournit la meilleure mesure quantitative du pouvoir sensibilisant d'une substance chimique. En interpolant la dose-réponse, la valeur EC3 permet d'estimer la concentration de substance qui serait nécessaire pour générer une triple stimulation de la prolifération dans le drainage des ganglions lymphatiques.



Human repeated insult patch test (HRIPT) est encore utilisé comme test de confirmation dans l'évaluation de risques des sensibilisants cutanés chez l'homme. Avec le HRIPT, les réactions allergiques et les allégations hypoallergéniques sont évaluées après application répétée du produit sur la peau de volontaires.

EVALUATION DES RISQUES

Une fois que le caractère sensibilisant de la substance est confirmé, d'être sensibilisant par les tests, le toxicologue doit établir un QRA. L'évaluation quantitative des risques (QRA) vise à déterminer les niveaux d'utilisation sans danger à des substances sensibilisantes. L'approche QRA est basée sur la compréhension chimique, cellulaire et moléculaire de la sensibilisation. Il suit les mêmes quatre étapes fondamentales que celles identifiées pour l'évaluation des risques toxicologiques généraux : l'identification des dangers, la caractérisation des dangers, l'évaluation de l'exposition des consommateurs, et la caractérisation des risques.

Les étapes clés sont :

1. La détermination de points de référence : NESIL (no expected sensitization induction level). C'est la dose maximale pour laquelle aucun effet secondaire n'est aperçu.
2. Extrapolation de l'exposition expérimentale à l'exposition réelle du consommateur. Ceci est réalisé par l'application des facteurs d'évaluation de la sensibilisation (SAFs) qui prend en compte trois paramètres : la variabilité interindividuelle, les effets de matrice véhicule/produit et les pratiques d'utilisation.
3. Calcul de l'exposition du consommateur (CEL) par l'utilisation du produit.
4. En utilisant ces paramètres, un niveau d'exposition acceptable (AEL) peut être calculé et comparé au CEL. Le rapport AEL/CEL doit être favorable pour permettre une utilisation sûre du sensibilisant cutané. Ce ratio doit être calculé pour les ingrédients parfumés dans chaque type de produit.

Malgré la réglementation assez stricte, d'après **ECHA**, jusqu'à 5 millions de personnes en Europe sont déjà sensibilisées aux produits chimiques, et jusqu'à 180 000 nouveaux cas de sensibilisation surviennent chaque année. Il existe plus de 14000 substances sur le marché de l'**UE** avec des indications d'un problème de sensibilisation cutanée. Par exemple, les MIT (Methylisothiazolinone) et MCIT (Methylchlorothiazolinone) sont les deux conservateurs utilisés dans des produits de cosmétiques "sans parabènes". Suite aux polémiques autour des parabènes, leur utilisation s'est répandue entre 2010 et 2016. Mais, assez vite les déclarations de cosméto vigilance ont mis en évidence de nombreux cas de dermatites allergiques associées à ces composés. L'allergie à MIT/MCIT se manifeste par des rougeurs, gonflements et suintements.

En raison de nombreux cas d'allergies, la législation européenne s'est adaptée. En utilisant les approches précédemment décrites le CSSC a modifié l'utilisation du MIT depuis 2017. Le MIT est donc totalement interdit dans les produits non rincés, et depuis avril 2018, la concentration maximale autorisée dans les produits cosmétiques à rincer passe de 0,1% à 0,0015%.