



HAL
open science

Intégration des modèles in vitro dans la stratégie d'évaluation de la sensibilisation cutanée

Elodie Clouet

► **To cite this version:**

Elodie Clouet. Intégration des modèles in vitro dans la stratégie d'évaluation de la sensibilisation cutanée. Toxicologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS003 . tel-01850196

HAL Id: tel-01850196

<https://theses.hal.science/tel-01850196>

Submitted on 27 Jul 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Intégration des modèles *in vitro* dans la stratégie d'évaluation de la sensibilisation cutanée

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique : du fondamental à
l'appliqué
Spécialité de doctorat: Immunotoxicologie

Thèse présentée et soutenue à Chatenay-Malabry, le 26 Janvier 2018, par

Elodie Clouet

Composition du Jury :

Dr. Bernard Maillère Directeur de Recherche, CEA (Immunochimie de la réponse immunitaire cellulaire)	Président
Pr. Armelle Baeza Professeur des Universités, Paris Diderot (BFA UMR CNRS 8251)	Rapporteur
Dr. Patricia Rousselle Directeur de Recherche, IBCP Lyon (FRE 3310, CNRS)	Rapporteur
Dr. Elena Giménez-Arnau Chargé de Recherche, Université de Strasbourg (UMR 7177)	Examineur
Dr. Hervé Groux Directeur de recherche, Immunosearch	Examineur
Pr. Saadia Kerdine-Römer Professeur des Universités, Université Paris-Sud (INSERM UMR-S 996)	Directrice de thèse
Dr. Pierre-Jacques Ferret Directeur de la Toxicologie et de la Cosmétovigilance, Pierre Fabre	Co-Encadrant

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	3
LISTE DES TABLEAUX	5
LISTE DES ABREVIATIONS	6
AVANT-PROPOS	9
INTRODUCTION	13
I. L'allergie cutanée	15
1. Définitions de l'allergie et de l'hypersensibilité	15
2. Les différents types d'allergie	17
3. La dermatite de contact allergique	19
3.1 Epidémiologie de la dermatite de contact allergique	20
3.2 La physiopathologie de la dermatite de contact allergique.....	22
3.2.1 Structure cutanée de la peau	22
3.2.1.1 Epiderme	24
3.2.1.2 Derme.....	27
3.2.1.3 Hypoderme	30
3.2.2 Les molécules allergisantes	30
3.2.2.1 Les différents types d'haptènes.....	30
3.2.2.1.1 Les haptènes vrais.....	31
3.2.2.1.2 Les pré-haptènes	32
3.2.2.1.3 Les pro-haptènes	35
3.2.2.2 Pénétration et hapténisation aux protéines.....	36
3.2.3 Les mécanismes immunologiques de la dermatite de contact allergique	40
3.2.3.1 La phase de sensibilisation.....	41
3.2.3.2 La phase d'élicitation	53
3.3 Aspects cliniques de la dermatite de contact allergique	60
3.4 Traitement de la dermatite de contact allergique	61
4. Méthodes d'évaluation <i>in vivo</i> de la sensibilisation cutanée.....	62
4.1 Les tests chez l'homme	62
4.1.1 Tests cliniques	62
4.1.2 Repeated Open Application Test.....	65
4.1.3 Human Maximization Test.....	67
4.1.4 Human Repeated Insult Patch Test	67
4.2 Les tests expérimentaux sur les animaux.....	69
4.2.1 Les tests mesurant la phase de révélation	69
4.2.1.1 Le test de Buehler	70
4.2.1.2 Guinea Pig Maximization Test.....	70
4.2.2 Les tests mesurant la phase de sensibilisation.....	71

4.2.2.1	Local Lymph Node Assay et ses variantes	71
II.	Les produits cosmétiques et la dermatite de contact allergique	77
1.	Définition du produit cosmétique	77
2.	Contexte réglementaire et évaluation des produits cosmétiques	77
2.1	De la Directive cosmétique 76/768/CEE au nouveau Règlement n°1223/2009	77
2.2	Les groupes de travail européen sur la sensibilisation cutanée et les étapes d'évaluation et de validation des méthodes alternatives	80
3.	L'Adverse Outcome Pathway de la sensibilisation cutanée	87
3.1	Définition de l'Adverse Outcome Pathway	88
3.2	L'Adverse Outcome Pathway dédiée à la sensibilisation cutanée	90
3.3	Les méthodes <i>in silico</i>	93
3.4	Les tests alternatifs associés aux différents événements clés	97
3.4.1	La réactivité chimique	98
3.4.2	L'activation du kératinocyte	105
3.4.3	L'activation de la cellule dendritique	114
3.4.4	La prolifération des Lymphocytes T	123
3.4.5	Résumé des méthodes alternatives actuellement validées ou en cours de validation	126
III.	Les nouvelles stratégies pour l'évaluation de la sensibilisation cutanée	128
1.	Les différentes stratégies d'évaluation proposées	128
2.	Les difficultés et les limites des méthodes alternatives	143
	PRESENTATION DU TRAVAIL	149
	RESULTATS	153
	ARTICLE 1	155
	ARTICLE 2	159
	DISCUSSION.....	163
	CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.....	173
	BIBLIOGRAPHIE	179
	COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	207
	ANNEXES	211

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Classification des hypersensibilités selon la nomenclature de l'Académie européenne d'allergie et d'immunologie clinique	16
Figure 2 : Classification des hypersensibilités selon Gell & Coombs.....	17
Figure 3 : Coupe transversale de la peau	23
Figure 4 : Structure de l'épiderme	24
Figure 5 : Les différentes populations cellulaires dans l'épiderme et le derme	29
Figure 6 : L'activation des différents types d'haptènes	31
Figure 7 : Groupes fonctionnels les plus communs des haptènes électrophiles	32
Figure 8 : L'oxydation du <i>d</i> -limonène conduit à divers produits allergisants	34
Figure 9 : Oxydation de la <i>p</i> -phénylènediamine en benzoquinone diimine, puis hydrolyse en benzoquinone.....	34
Figure 10 : Activation métabolique potentielle de l'alcool cinnamique dans l'épiderme humain reconstitué conduisant à la formation des produits (A) et (B).....	36
Figure 11 : Formation de liaisons covalentes par réaction électrophile-nucléophile (a) et radicalaire (b)	38
Figure 12 : Exemples de complexes de coordination du nickel II.....	40
Figure 13 : Mécanismes d'activation de la réponse cellulaire par les haptènes.....	41
Figure 14 : Vue schématique des différentes étapes de la phase de sensibilisation	42
Figure 15 : Séquence d'événements après contact avec l'haptène.....	48
Figure 16 : La synapse immunologique entre la cellule dendritique et le lymphocyte T.....	50
Figure 17 : Polarisation de la réponse lymphocytaire et différentes sous-populations de LT.....	52
Figure 18 : Vue schématique des différentes étapes de la phase d'élicitation.....	54
Figure 19 : Lésions de la dermatite de contact allergique	61
Figure 20 : Principe du prick-test	63
Figure 21 : (A) Patch tests et (B) interprétation du patch test.....	64
Figure 22 : Les tests sur le cobaye.....	69
Figure 23 : Protocole du test du Local Lymph Node Assay (LLNA).....	73
Figure 24 : Les dates clés pour l'interdiction des expérimentations animales en cosmétique	79
Figure 25 : Schéma conceptuel des principales caractéristiques d'une AOP.....	89
Figure 26 : Représentation schématique des étapes associées à l'AOP de la sensibilisation cutanée..	90
Figure 27 : Méthodes d'essai non animales et leur correspondance à l'AOP de la sensibilisation cutanée.....	98

Figure 28 : Réactions principales entre les haptènes et les protéines.....	99
Figure 29 : Mesure de l'événement moléculaire initiateur (ou événement clé (KE1)) selon l'AOP ...	100
Figure 30 : Principe du Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA).....	102
Figure 31 : Vue générale de l'induction de la voie Nrf2 par les allergènes cutanés	106
Figure 32 : Mesure de l'activation du kératinocyte selon l'AOP	107
Figure 33 : Principe du KeratinoSens™.....	108
Figure 34 : Mesure de l'activation de la cellule dendritique selon l'AOP	115
Figure 35 : Principe du test U-SENS™	115
Figure 36 : Principe du test h-CLAT	117
Figure 37 : Principe du test GARD	121
Figure 38 : Mesure de la prolifération lymphocytaire selon l'AOP	124
Figure 39 : Modèle de prédiction de Bauch <i>et al.</i> (2012).....	134
Figure 40 : Artificial neural network de Shiseido	137
Figure 41 : Bayesian network ITS3	139
Figure 42 : Perspectives pour l'évaluation de la sensibilisation cutanée pour un ingrédient et le produit fini.....	177

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples de fragrances montrées expérimentalement comme étant pré- et/ou pro-haptènes.....	33
Tableau 2 : Fonctions chimiques électrophiles des haptènes, mécanismes de réaction associés en présence d'un nucléophile (Nu) et adduits formés.....	39
Tableau 3 : Comparaison des différentes méthodes de patch tests.....	66
Tableau 4 : Les différentes catégories de puissance des allergènes.....	68
Tableau 5 : Les différents tests <i>in vivo</i> pour évaluer la sensibilisation cutanée	76
Tableau 6 : Méthodes alternatives sélectionnées pour les évaluations	85
Tableau 7 : Outils <i>in silico</i> pour l'évaluation de la sensibilisation cutanée	96
Tableau 8 : Modèle prédictif du Direct Peptide Reactivity Assay	103
Tableau 9 : Modèle prédictif du SENS-IS	112
Tableau 10 : Statut de validation et d'adoption des méthodes <i>in chemico/in vitro</i> pour la sensibilisation cutanée	126
Tableau 11 : Résultats de prédictivité obtenus pour les différentes méthodes <i>in vitro</i>	131
Tableau 12 : Tableau des résultats obtenus pour 43 molécules testées par Cosmetics Europe	132
Tableau 13 : Résultats obtenus selon le modèle de prédiction de Bauch <i>et al.</i> (2012).....	134
Tableau 14 : Modèle de prédiction de Natsch <i>et al.</i> (2013).....	135
Tableau 15 : Modèle de prédiction de Urbisch (2015) basé sur l'analyse 2 sur 3	136
Tableau 16 : Les différentes ITS proposées.....	140
Tableau 17 : Résumé de l'ensemble des tests intégrés au sein des ITS proposées	141
Tableau 18 : Ensemble des critères retenus pour la comparaison des méthodes	166
Tableau 19 : Influence de la formulation sur le potentiel sensibilisant	168

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ADCC: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ADN: Acide DésoxyriboNucléique
Ag: Antigène
AGEP: Acute Generalised Exanthematous Pustulosis
AMP: Peptide Anti-Microbien
AMPc: Adénosine monophosphate cyclique
ANN: Artificial Neuronal Network
AOP: Adverse Outcome Pathway
ARE: Antioxydant Response Elements
ATP: Adénosine triphosphate

B

BMDC: Bone-Marrow Dendritic Cells
BPL: Bonnes Pratiques de Laboratoire
Breg: LB régulateurs

C

CCL: CC-chemokine Ligand
CCR2: C-C chemokine receptor type 2
CGL: Cellules de ganglions lymphatiques
CLP: Classification, Labelling, Packaging
CinA: Cinnamaldéhyde
CLA: Cutaneous Lymphocyte Antigen
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène
CREM: Cyclic adenosine monophosphate-Responsive Element Modulator
CTL: LT cytotoxique
CTLA4: Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen-4
Cul3-Keap1: Cullin 3/ Kelch-like ECH-associated protein 1
CXCL: CXC-chemokine Ligand
CYP450: Cytochrome P450

D

DAMP: Danger-Associated Molecular Patterns
DC: Cellules Dendritiques
DCA: Dermatite de contact allergique
DCI: Dermatite de contact irritative
DC-SIGN: DC-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin
DDC: Cellules Dendritiques Dermales
dLN: draining Lymph Node
DMF: Diméthyl Fumarate
DNFB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzène

DNFB: Dinitrofluorobenzène
DNTB: Dinitrothiocyanobenzène
DPM: Désintégrations Par Minutes
DPRA: Direct Peptide Reactivity Assay
DPT: Diagnostic du Patch Test
DRESS: Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms

E

EC(3): Effective Dose Concentration
EC25%: Concentration entraînant 25% de déplétion en peptides
ECHA: European Chemicals Agency
ECOPA: European Consensus-Platform for Alternatives
ECVAM: European Centre for the Validation of Alternative Methods
EPAA: European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing
EpCAM: Epithelial-cell adhesion molecule
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
ERO: Espèces Réactives de l'oxygène
ESAC: ECVAM Scientific Advisory Committee

F

Fas-L: Fas-Ligand (Apoptosis Stimulating Fragment)
FITC: Isothiocyanate fluorescéine
FLG: Filaggrine
FoxP3: Forkhead box P3
FRO: Formes Réactives de l'Oxygène

G

GAPDH: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPMT: Guinea Pig Maximization Test
GSH: Glutathion
GHS: Global Harmonization Standard
GST: Glutathione S-Transférase

H

HA: Hyaluronic acid
h-CLAT: Human-Cell Line Activation Test
HCA: Hexylcinnamaldéhyde
HLA: Human Leukocyte Antigen
HMT: Human Maximization Test

HO-1: Hème Oxygenase-1
HPLC-UV: High pressure liquid chromatography
HRIPT: Human Repeated Insult Patch Test
HSC: HyperSensibilité de Contact
hTCPA: human T Cell Priming Assay

I

IATA: Integrated Approaches on Testing and Assessment
IFN: Interféron
IHCP: Institut of Health and Consumer Protection
Ig: Immunoglobuline
IL: Interleukine
Imax: Taux d'induction maximal
IP: Iodure de propidium
ITS: Integrated Testing Strategy
IVTIP: In Vitro Testing Industrial Platform

J

JRC: Joint Research Centre

K

KC: Kératinocytes
KE: Key Event
Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1
KGF: Keratinocyte Growth Factor

L

LB: Lymphocytes B
LC: Cellules de Langerhans
LD: Ligne Directrice
LLNA: Local lymph Node Assay
LPS: Lipopolysaccharide
LRSS: Long Range Science Strategy
LT: Lymphocytes T
LTh1: Lymphocyte T helper 1

M

Ma: Macrophages
mAb : Monoclonal Antibody
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases
MCP-1: Monocyte-Chemotactic Protein 1
MEC: Matrice Extra-Cellulaire
MFI: Mean Fluorescence Intensity
MIE: Molecular Initiating Event
MIP-1: Macrophage Inflammatory Protein-1
MIT: Méthylisothiazolinone
MMP: Matrix MetalloProtéinase
MoDC: DC humaines issues de monocytes

N

NFκB: Nuclear Factor kappa B
Ni: Nickel
NICEATM: NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods
NK: Natural Killer
NKT: Natural Killer T
NLR: Nod-Like Receptor
NQO1: NAD(P)H; Quinone Oxidoréductase-1
Nrf2: Nuclear Factor erythroid-2-Related Factor 2
nTreg: Treg naturels

O

OCDE: Organisation de coopération et de développement économiques
OMS: Organisation Mondiale de la Santé

P

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Patterns
PD-1: Programmed cell Death-1
pDC: Cellule Dendritique plasmacytoïde
PDL-1: Programmed cell Death Ligand 1
PGE2: Prostaglandines E2
p-i concept: pharmacological interaction concept
PKC: Protéine Kinase C
PM: Poids Moléculaire
PN: Polynucléaire Neutrophile
pPD: para-PhénylèneDiamine
PPRA: Peroxidase Peptide Reactivity Assay
PRR: Pattern Recognition Receptors

Q

QSAR: Quantitative structure-activity relationship

R

3R: Reduction, Raffinement et Remplacement
RANK: Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B
RANTES: Regulated on Activation, Normal T
REACH: Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals
RFI: Relative Fluorescence Intensity
RHE: Reconstructed human epidermis
RLU: Unités relatives de luminescence
RMN HRMAS: High Resolution Magic Angle Spinning Spectroscopy
ROAT: Repetead Open Application Test

S

SAR: Structure-activity relationship
SCCS: Scientific Committee for Consumer Safety
SEURAT: Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing
SI: Stimulation Index
SLS: Sodium Lauryl Sulfate
SN2: Substitution nucléophile bimoléculaire
SNAr: Substitution nucléophile aromatique
STTF: Skin Tolerance Task Force

T

tBHQ: tert-Butylhydroquinone
TCFS: Test Clinique Final de Sécurité
TCR: T Cell Receptor
TEFF: Lymphocyte T effecteur
TEM: Lymphocyte T mémoire effecteur
TFH: T Follicular helper
TGF: Transforming Growth Factor
Th: T helper
TLR: Toll Like Receptor
Treg: Lymphocyte T régulateur
TNBS: 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid
TNCB: Trinitrochlorobenzène
TNF: Tumor Necrosis Factor
TNF-R: Récepteur au TNF

U

UE: Union Européenne
UV: Ultra-Violets

W

WoE: Weight of Evidence

AVANT-PROPOS

Avant-propos

La dermatite de contact allergique est une réaction inflammatoire cutanée d'origine immunitaire dirigée contre une molécule chimique appelée allergène de contact. Elle est relativement répandue au sein des maladies professionnelles des pays industrialisés et en ce sens, son impact socioéconomique est important. Il est donc indispensable de garantir la sécurité des travailleurs et des consommateurs en évaluant le potentiel allergisant de nouvelles molécules. Traditionnellement, les toxicologues basaient leur évaluation du risque sur des données animales issues de tests réglementaires *in vivo*, tels que le test du Local Lymph Node Assay (LLNA) réalisé chez la souris, capable de prédire et quantifier le potentiel allergisant de molécules chimiques.

Depuis l'entrée en vigueur le 11 Mars 2013 du nouveau Règlement n°1223/2009 portant entre autre sur l'interdiction de l'expérimentation et de la commercialisation des produits cosmétiques testés sur les animaux, la capacité d'identifier et de classer les ingrédients selon leur potentiel allergisant cutané est devenue un enjeu majeur pour l'industrie cosmétique.

Parallèlement, les principales phases du processus biologique de sensibilisation cutanée font l'objet d'un consensus général. Les connaissances sur les mécanismes chimiques et biologiques associés à la sensibilisation cutanée sont résumées sous la forme d'une voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables (AOP, Adverse Outcome Pathway) allant de l'événement moléculaire initiateur jusqu'aux effets indésirables sur la santé que sont la dermatite de contact allergique, en passant par les étapes intermédiaires (OECD, 2012). Ainsi, pour pallier l'interdiction des tests sur les animaux, des méthodes d'essai de type mécanistique ont été développées et permettent d'évaluer le risque de sensibilisation en modélisant les événements précoces de la dermatite de contact allergique. Ces tests simples comparativement à la complexité des mécanismes immunologiques mis en jeu dans l'allergie, ont montré leur efficacité pour la détection des molécules allergisantes. Certains d'entre eux sont aujourd'hui validés par l'Organisation de Coopération et de Développement économiques (OCDE) ou en pré-validation au Centre Européen de Validation des Méthodes Alternatives (ECVAM). Cependant, selon un consensus scientifique, un seul de ces tests alternatifs n'est pas suffisant pour couvrir les différents événements clés définis par l'Adverse Outcome Pathway (AOP) de la sensibilisation cutanée et il est actuellement recommandé d'associer à *minima* 3 tests couvrant les 3 premiers événements clés de la sensibilisation. Toutefois, la quantification du potentiel allergisant reste encore limitée et certains paramètres

actuellement limitant au sein des batteries de tests (pénétration, métabolisme, inflammation,...) pourraient permettre une appréciation plus quantitative de ce potentiel.

Le premier objectif de ce travail consiste en une revue bibliographique des différents éléments relatifs à notre travail. Après une description de la peau, nous aborderons les principaux événements cellulaires impliqués dans la dermatite de contact allergique. Nous détaillerons ensuite les différents tests *in vivo* utilisés par le passé pour l'évaluation de la sensibilisation cutanée. Enfin, nous présenterons le concept de l'Adverse Outcome Pathway de la sensibilisation cutanée ou voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables et la traduction de cette connaissance dans les tests *in vitro* correspondants. Ceci nous amènera à exposer les différentes stratégies adoptées pour l'évaluation de la sensibilisation cutanée, avec leurs avantages et limites respectives.

Le second objectif de ce travail a été d'étudier en particulier la stratégie adoptée au sein des laboratoires Pierre Fabre, par sélection et comparaison de 3 méthodes alternatives. Ceci nous a ensuite amené à identifier et combiner, au sein d'un même type cellulaire, différents tests représentatifs de l'Adverse Outcome Pathway de la sensibilisation cutanée dans le but de caractériser le danger d'un produit chimique.

INTRODUCTION

I. L'allergie cutanée

1. Définitions de l'allergie et de l'hypersensibilité

Le terme « allergie » a été introduit pour la première fois en 1906 par Clemens Von Pirquet (1874-1929) (Kay, 2000). Ce pédiatre autrichien voulait décrire un changement d'état général sur le plan qualitatif, quantitatif et temporel de la réactivité de l'organisme. Cependant, c'est en 1911 que la « maladie allergique » a été pour la première fois décrite par Coca et Cooke (Dubuisson *et al.*, 2002). Durant des années, le mot « allergie » a été utilisé pour décrire l'allergie sous toutes ses formes, incluant notamment les réactions aux médicaments et aliments.

L'allergie se définit comme une réaction d'hypersensibilité du système immunitaire en réponse à des substances normalement inoffensives. Deux types d'allergies existent, immédiate ou retardée. Elle peut se produire à la suite de l'ingestion, de l'inhalation ou du contact avec la peau d'une molécule, appelée allergène. Elle peut se manifester au niveau de différentes parties du corps comme la peau, les yeux, les voies digestives ou encore les voies respiratoires. Les symptômes et l'intensité varient selon l'endroit où celle-ci se déclare et est fonction de plusieurs facteurs (terrain atopique par exemple), propres à chaque individu. Ils peuvent être discrets, comme l'apparition de rougeurs sur la peau, ou potentiellement mortels, comme le choc anaphylactique (Nicolas, 2015).

Au cours des deux dernières décennies, le mot « allergie » a été utilisé pour décrire non seulement l'allergie telle que définie ci-dessus, mais toutes sortes de réactions inattendues au niveau de la peau et des muqueuses, incluant aussi tous types d'effets adverses controversés liés à l'alimentation ou aux additifs alimentaires. Il a donc été proposé que l'expression « hypersensibilité » soit utilisée comme terme générique, et que le terme « allergie » soit réservé aux réactions cliniques dans lesquelles un mécanisme immunologique est prouvé ou fortement impliqué. L'hypersensibilité recouvre donc l'ensemble des réactions présentées en Figure 1 et correspond à l'ensemble des symptômes ou signes objectivement reproductibles, initiés par l'exposition à un *stimulus* défini à une dose normalement tolérée par des sujets sains (Johansson *et al.*, 2004).

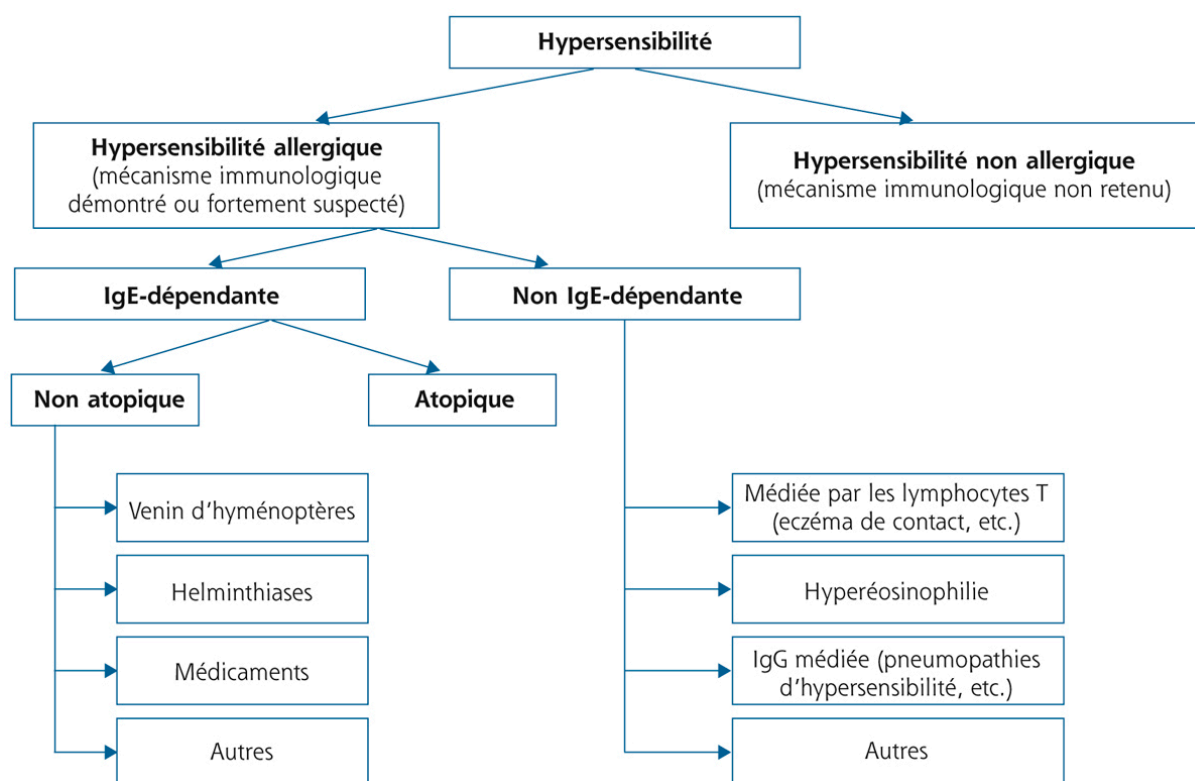


Figure 1 : Classification des hypersensibilités selon la nomenclature de l'Académie européenne d'allergie et d'immunologie clinique (Johansson *et al.*, 2004)

Il est important de distinguer l'hypersensibilité allergique qui implique le système immunitaire de l'hypersensibilité non allergique, indépendante du système immunitaire. L'hypersensibilité allergique est une réponse immunitaire disproportionnée par rapport à la dangerosité de l'allergène, impliquant l'immunité adaptative (l'immunité cellulaire et humorale sont alors activées). Le patient allergique a été préalablement sensibilisé et a développé une réponse médiée par les lymphocytes T spécifiques de l'allergène avec ou sans anticorps. La réaction allergique est due aux lymphocytes T spécifiques et/ou soit aux anticorps, selon la classification modifiée de Gell et Coombs. Dans l'hypersensibilité non allergique, le patient est quant à lui non sensibilisé, faisant appel au système immunitaire inné. Le système immunitaire inné comprend des cellules (granulocytes, phagocytes,...) et des mécanismes permettant la défense de l'organisme contre des allergènes de façon immédiate, à l'inverse du système immunitaire adaptatif qui confère une protection plus tardive mais plus durable. L'hypersensibilité non allergique est de loin la plus fréquente (90% des accidents) et dans la majorité des cas bénigne (Nicolas, 2015). Parmi les hypersensibilités allergiques, deux sous-catégories existent : les allergies médiées par les immunoglobulines E (IgE) et celles non

médiées par les IgE (IgG, IgM). La concentration de ces isotypes est souvent assez élevée dans le sérum et est corrélée au degré d'exposition à l'allergène. Les hypersensibilités allergiques non médiées par les IgE dépendent d'une action cellulaire, comme pour la dermatite de contact allergique (DCA), dans laquelle les lymphocytes T jouent un rôle majeur.

2. Les différents types d'allergie

Les diverses hypersensibilités allergiques sont donc des réponses adaptatives se faisant de façon exagérée ou inappropriée et provoquant des lésions tissulaires. Ces réactions sont caractéristiques de l'individu et apparaissent seulement lors d'un deuxième contact avec l'allergène. La classification de Gell et Coombs (1968) répartit l'hypersensibilité en quatre types (I, II, III et IV), selon le type d'effecteur de l'immunité en cause et le temps de réponse. Elle est venue remplacer l'ancienne classification française basée sur le temps d'apparition des symptômes après contact avec l'allergène : immédiate, intermédiaire, retardée. Les trois premières sont médiées par des anticorps, la quatrième par les cellules T et les macrophages. Les connaissances récentes sur le rôle des lymphocytes T dans les maladies ont subdivisé le type IV en 4 sous-types. Bien qu'ancienne, cette classification reste la meilleure et la plus simple classification pour les hypersensibilités allergiques (Figure 2).

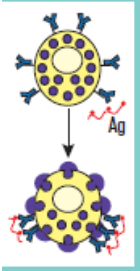
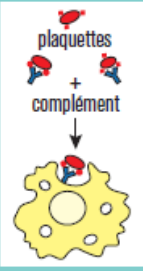
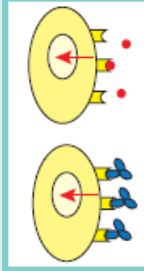
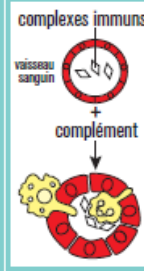
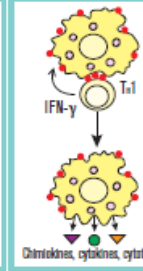
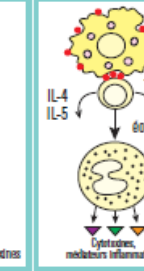
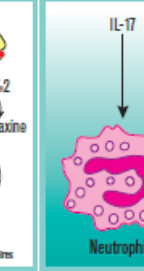
TYPE I	TYPE II		TYPE III	TYPE IV			
IgE	IgG		IgG	CD4 Th1	CD4 Th2	CD4 Th17	CD8 cytotoxique
Ag solubles	Ag cellulaires ou matriciels	Récepteurs cellulaires	Ag solubles	Ag solubles	Ag solubles		Ag cellulaires
Mastocyte	Complément, phagocytes, NK	Ac altérant la signalisation	Complément, phagocytes	Macrophages	Éosinophiles	Neutrophiles	Cytotoxicité
							
EXEMPLES DE MALADIES							
Rhinite, asthme, anaphylaxie	Réaction transfusionnelle, anémie hémolytique	Thyroidite, myasthénie	Lupus érythémateux, maladie sérique	Rejet de greffes, arthrite, diabète psoriasis (intradermoréaction à la tuberculine)	Asthme chronique, rhinite chronique, eczéma atopique	Psoriasis, polyarthrite, sclérose en plaques, maladie de Crohn	Rejet de greffes, diabète de type I, eczéma de contact, vitiligo, pelade

Figure 2 : Classification des hypersensibilités selon Gell & Coombs (Nicolas, 2015)

Hypersensibilité de Type I ou hypersensibilité immédiate : elle correspond à l'ensemble des pathologies induites par la présence d'IgE spécifiques d'un allergène. Elle est causée par la dégranulation des mastocytes induite par des anticorps de type IgE spécifiques entraînant la libération de médiateurs vasoactifs. Elle se caractérise par une apparition immédiate des symptômes. Généralement, ce type d'allergie touche la peau et les muqueuses et, les allergènes concernés sont majoritairement des protéines. La rhinite allergique et l'asthme allergique sont deux manifestations respiratoires qui entrent dans ce cadre. En nombre, les allergies de type I sont les plus courantes (OMS, 2004).

Hypersensibilité de Type II ou hypersensibilité cytotoxique : causée par la reconnaissance par des anticorps d'antigènes à la surface cellulaire ou de composants tissulaires de l'organisme, entraînant une activité cytolytique anticorps dépendante (ADCC) et l'activation du système du complément. Les anticorps sont libres dans le sérum alors que l'antigène est fixé à la surface de certaines cellules ou est un composant de la membrane cellulaire elle-même. Quand les anticorps réagissent avec l'antigène, il se produit, *via* une activation du complément, la détérioration de la cellule, voir sa lyse. Ces allergies, beaucoup plus rares peuvent être illustrées par les cytopénies dites immuno-allergiques (Nicolas, 2015).

Hypersensibilité de Type III ou hypersensibilité à complexes immuns : causée par le dépôt de complexes antigènes-anticorps (IgM ou IgG) produits en grande quantité et qui ne peuvent être éliminés par les macrophages ou d'autres cellules du système réticulo-endothélial. Ces complexes antigènes/anticorps solubles circulants se déposent dans certains tissus et y provoquent des lésions dues à l'inflammation et l'activation du système du complément qu'ils génèrent. L'hypersensibilité de type III semble rare et s'exprime par des pseudo-maladies sériques (Nicolas, 2015). C'est un des mécanismes impliqués dans la pneumopathie d'hypersensibilité (poumon de fermier, poumon des éleveurs d'oiseaux).

Hypersensibilité de Type IV ou hypersensibilité retardée : elle est médiée par les lymphocytes T qui reconnaissent un allergène. Elle est impliquée dans certaines allergies comme la DCA, certaines allergies médicamenteuses ou les pneumopathies d'hypersensibilité (également appelées alvéolites allergiques extrinsèques, hypersensibilités de type III et IV) aux substances chimiques comme les résines époxy où ce mécanisme intervient. Deux formes sévères

d'allergie médicamenteuse retardée sont le syndrome de DRESS (Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms) et la pustulose exanthématique aiguë généralisée (AGEP, pour Acute Generalised Exanthematous Pustulosis). Tous les médicaments peuvent théoriquement être impliqués, mais certains plus fréquemment, comme les pénicillines, les sulfamides, l'allopurinol et les antiépileptiques (carbamazépine, lamotrigine et phénytoïne).

3. La dermatite de contact allergique

La peau, comme les muqueuses respiratoires, représente une interface avec le milieu extérieur et peut ainsi être exposée à une multitude d'allergènes. Selon le niveau d'exposition et la sensibilité individuelle, différentes formes d'allergies cutanées qui revêtent des aspects très divers comme l'urticaire, l'eczéma, la dermatite atopique, la photoallergie ou même l'allergie médicamenteuse peuvent se développer. Parmi les allergies cutanées, l'eczéma ou dermatite de contact est une maladie inflammatoire cutanée fréquente qui survient au niveau du site de contact avec des molécules chimiques non protéiques (xénobiotiques) (Nosbaum *et al.*, 2010). Les dermatites de contact comportent deux grandes entités à ne pas confondre, les dermatites de contact irritative (DCI) et DCA. Les DCA se présentent comme des eczémas aigus, subaigus ou chroniques qui ont des caractéristiques permettant de les différencier dans leur forme typique. Les mécanismes à l'origine de l'eczéma sont différents dans les deux types de dermatites, du moins dans les étapes d'initiation de l'inflammation cutanée. Les DCI sont des dermatoses inflammatoires non spécifiques, principalement dues à la toxicité directe des produits chimiques sur les kératinocytes (KC) qui induisent une inflammation par activation de l'immunité innée. Les DCA, au contraire, correspondent à une réponse immunitaire adaptative de type hypersensibilité retardée dont l'inflammation induite est secondaire à l'activation dans la peau des lymphocytes T (LT) spécifiques du xénobiotique (Nosbaum *et al.*, 2010). Les deux types d'eczéma impliquent les cellules de l'immunité mais la DCI est secondaire à l'activation de l'immunité innée alors que la DCA est le résultat de l'activation de l'immunité adaptative et de l'induction de LT spécifiques. En pratique, les deux types d'immunité sont très souvent associés et intimement liés. C'est ainsi que l'induction d'une immunité spécifique de bonne qualité nécessite l'activation de l'immunité innée dont le résultat principal est la maturation des cellules dendritiques (DC) en cellules présentatrices d'antigène professionnelles (CPA) ; l'irritation cutanée fait donc le lit de l'allergie (Nosbaum *et*

al., 2010). Il a aussi été montré que l'exposition aux irritants augmente le risque de sensibilisation ; les personnes atteintes de DCI courent donc un plus grand risque de développer une DCA (Engebretsen and Thyssen, 2016). De la même manière, un contact cutané avec un irritant ne pourra induire qu'une DCI alors qu'un allergène pourra lui induire soit une DCI soit une DCA. La DCA ne se développera que si l'individu a été sensibilisé antérieurement à cette même substance chimique.

3.1 Epidémiologie de la dermatite de contact allergique

Les réactions allergiques sont classées au quatrième rang mondial des maladies selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). L'augmentation constante de la prévalence aux allergies touche environ 30% de la population mondiale. Une forte proportion de cette augmentation survient généralement pendant l'enfance (Pawankar *et al.*, 2011). La prévalence de la DCA est difficile à préciser par manque de détection de tous les cas d'allergie. En effet, un bon nombre de personnes se savent allergiques aux bijoux, au sparadrap sans avoir jamais fait de tests épicutanés. Cependant, selon les études réalisées, la prévalence de la DCA augmente régulièrement au niveau mondial (Kohl *et al.*, 2002; Lunder and Kansky, 2000; Nguyen *et al.*, 2008) et concerne 19,5% de la population générale (1966-2007) allergique au minimum à un allergène (Calderon *et al.*, 2012; Peiser *et al.*, 2012; Thyssen *et al.*, 2007). Les DCA sont deux fois plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes et débutent généralement relativement tôt (prévalence de 15% chez les 12-16 ans) (Thyssen *et al.*, 2007). Plus de 4 350 molécules sont connues pour être des allergènes de contact (Esser and Martin, 2017). Les allergènes les plus communs sont les ions métalliques tels que les ions nickel Ni^{2+} ou les ions cobalt Co^{2+} et leurs sels métalliques tels que le NiSO_4 et le CoCl_2 , les parfums (liste des 26 allergènes), les colorants et les conservateurs (isothiazolinones, méthyl dibromoglutaronitrile, formaldéhyde et libérateurs de formol).

Le nickel, métal très répandu dans la vie courante (bijoux fantaisie, boucle de ceinture...) est l'un des allergènes majeur au niveau mondial. Bien que l'Union Européenne (UE) ait restreint son utilisation dans les produits de consommation en 1994 (Off J Eur Union, 1994), sa prévalence demeure toutefois élevée, affectant 8 à 16% de la population générale dans l'UE, selon les pays et l'exposition à cette molécule (Ahlström *et al.*, 2017). Une tendance à la baisse de la prévalence de l'allergie au nickel a été observée dans certains pays de l'UE (Allemagne (Schnuch and Uter, 2003), Suisse (Lindberg *et al.*, 2007), Danemark (Jensen *et al.*, 2002)), bien

que la prévalence chez les jeunes femmes reste élevée (Ahlström *et al.*, 2017). En absence d'une telle législation (comme par exemple aux Etats-Unis), la prévalence des allergies au nickel est toujours en augmentation, notamment chez les femmes (Nguyen *et al.*, 2008), et les nouvelles sources d'exposition sont nombreuses (téléphone portable, piercing,...).

La méthylizothiazolinone (MIT), autre allergène, est un agent conservateur appartenant à la famille chimique des isothiazolinones et qui a été au cœur de nombreuses polémiques ces dernières années. Ses utilisations sont multiples, à la fois cosmétiques et industrielles. Dans les années 80, des réactions cutanées à des crèmes de jour avaient été rapportées suite à des allergies à un mélange (ayant comme nom commercial le Kathon CG) de MIT (1:3) et de méthylchloroisothiazolinone (MCI) (2:3). Le potentiel sensibilisant du mélange a été principalement attribué au dérivé chloré MCI, qui s'est avéré être le sensibilisant le plus fort, la MIT non chlorée étant considérée comme un allergène beaucoup plus faible (Debeuckelaere *et al.*, 2016). Ce mélange de MCI/MIT avait été restreint aux produits rincés, comme les savons liquides et shampooings, dont le temps de contact avec la peau est court, diminuant la prévalence à environ 2% après les années 90 (Debeuckelaere *et al.*, 2016). Plus tardivement, la polémique engendrée par des campagnes largement diffusées sur le risque perturbateur endocrinien des parabènes, conservateurs efficaces largement utilisés dans les cosmétiques, a poussé les industriels à les supprimer de leurs produits et de les remplacer par la MIT. Ainsi, la MIT seule a commencé à être utilisée comme conservateur au début des années 2000 dans les produits industriels et en 2005 dans les cosmétiques dans tous les produits rincés et non rincés, mais à des concentrations plus élevées que dans le mélange MCI/MIT, en raison de son potentiel moindre de conservateur. En conséquence, au cours des dernières années, il y a eu une augmentation alarmante de la prévalence de la DCA causée par la MIT en France comme en Europe. Le nombre de patients sensibilisés à la MIT a plus que triplé en 3 ans, passant de 1,5% en 2010 à 3,3% en 2011 et 5,6% en 2012 ($p < 0,001$), et jusqu'à 5 à 7% dans les études les plus récentes (Anses, 2016). Des réactions d'allergie ont par ailleurs été observées chez des personnes exposées à des concentrations très faibles de MIT (< 15 ppm). Depuis 2015, le Scientific Committee for Consumer Safety (SCCS) recommande aux industriels de ne plus utiliser la MIT dans les produits cosmétiques non rincés et de limiter la concentration dans les produits rincés à des niveaux garantissant l'absence de réactions d'élicitation (0,0015% soit 15 ppm) (SCCS, 2015). De plus, l'UE a réglementé la MIT qui est interdite dans les produits sans rinçage depuis le 12 février 2017 et qui sera limitée aussi à

0,0015% dans les produits à rincer courant 2018.

La DCA compte également parmi les premières maladies professionnelles dans de nombreux pays avec un taux d'incidence annuelle de 0,5-1,9‰ (Diepgen *et al.*, 2003; Diepgen and Coenraads, 1999) et est la première maladie professionnelle chez les ouvriers du bâtiment (eczéma du cimentier). Elle touche également les artisans (coiffeurs), les métallurgistes, les agents d'entretien ou encore le milieu médical. Dans le domaine professionnel, les substances allergisantes rencontrées sont les composants des ciments, le formaldéhyde, les amines aliphatiques et aromatiques, les résines, les acryliques, les époxydes, les plantes et les agents de conservation (Nicholson *et al.*, 2010). A titre d'exemple, chez les coiffeurs, les allergies cutanées aux ions chromates ou à la *p*-phénylènediamine (PPD) sont très fréquentes.

De même, les allergènes ne sont pas tous égaux entre eux. Par exemple, le DNCB (1-chloro-2,4-dinitrobenzène) est connu pour sensibiliser dès la première application 100% des individus tandis que le nickel, malgré une forte exposition, induit une DCA chez 10 à 15% des femmes et 2 à 5% des hommes (Crépy, 2010), et le plus souvent seulement après plusieurs contacts.

3.2 La physiopathologie de la dermatite de contact allergique

3.2.1 Structure cutanée de la peau

La peau, enveloppe du corps, est une barrière anatomique vivante, interface entre l'environnement extérieur et l'organisme. Elle constitue un tissu de revêtement en continuité avec les muqueuses et recouvrant les cavités naturelles de l'organisme. Organe le plus étendu et le plus lourd du corps humain, d'un poids variable d'environ 5 kg et d'une surface entre 1,5 à 2 m² chez un adulte, elle est la première barrière de protection de notre organisme (McLafferty *et al.*, 2012).

Ce tissu polyvalent assure de multiples fonctions afin de maintenir l'homéostasie corporelle (Thèse de Biliana Todorova, 2014) :

- **une fonction protectrice** : la peau forme une enveloppe qui protège les tissus internes des agents chimiques et biologiques de l'environnement extérieur. Elle limite les agressions des rayons UV et participe à l'homéostasie hydrique,
- **une fonction régulatrice** : la peau participe au maintien de la température corporelle par vasodilatation ou vasoconstriction du réseau vasculaire cutané, ou grâce à la transpiration qui permet d'évacuer la chaleur excessive,
- **une fonction sécrétoire** : grâce aux glandes sudoripares, la peau participe à la constance du

- milieu intérieur, en éliminant de l'eau, des sels minéraux et certaines toxines de l'organisme,
- **une fonction sensorielle** : la peau est richement innervée ce qui permet de réagir à la chaleur, au froid, à la douleur ou à la pression,
 - **une fonction métabolique** : afin d'éliminer plus facilement les molécules xénobiotiques lipophiles, des processus enzymatiques multi-étapes sont chargés de les transformer en molécules hydrosolubles, plus faciles à excréter. Ces systèmes enzymatiques, présents dans la peau, constituent les systèmes métaboliques de détoxication. Pour des raisons fonctionnelles, ces systèmes de détoxication sont particulièrement développés dans la peau (enzymes de phase I, comme le cytochrome P450 et enzymes de phase II). La peau participe aussi à la production de vitamine D et au métabolisme de certains lipides (phospholipides, céramides, triglycérides),
 - **une fonction immunitaire** : étant constamment exposée à des microorganismes et des antigènes du milieu environnant, la peau est l'organe le mieux équipé pour répondre à une stimulation immunologique.

Elle est composée de 2 000 milliards de cellules organisées en trois couches tissulaires superposées : au niveau de la surface, le *stratum corneum* et l'épiderme, en dessous une couche plus épaisse, le derme et la couche la plus profonde, l'hypoderme (Figure 3). Ces trois couches sont traversées par des terminaisons nerveuses ainsi que par différents appendices, tels que le follicule pileux et la glande sébacée que nous ne détaillerons pas ici.

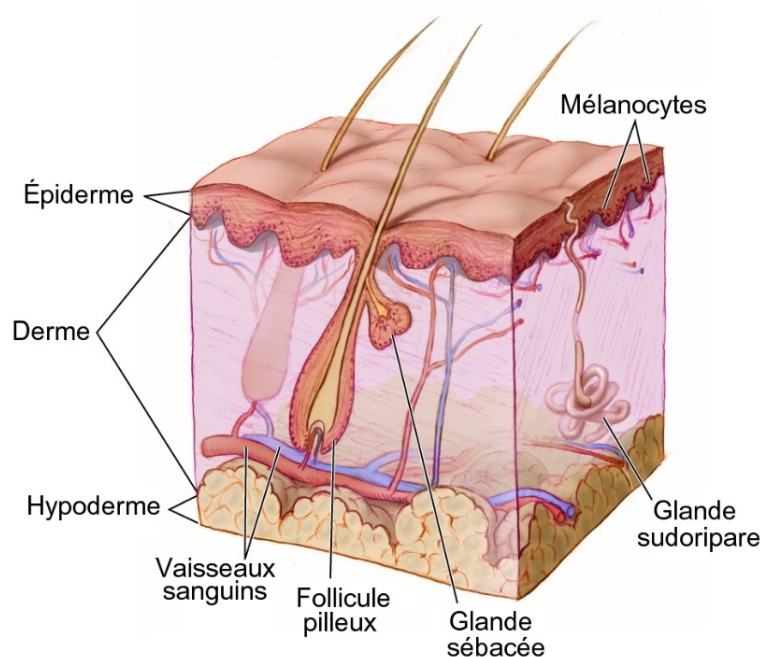


Figure 3 : Coupe transversale de la peau (D'après Don Bliss, 2010)

3.2.1.1 Epiderme

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau dont la surface est formée de cellules mortes kératinisées, qui se desquament. Il s'agit d'un épithélium de revêtement, stratifié, pavimenteux comportant principalement des kératinocytes produisant la kératine et qui est organisé en cinq strates cellulaires superposées : couche basale (*stratum germinativum*), la couche épineuse ou de Malpighi (*stratum spinosum*), la couche granuleuse (*stratum granulosum*), la couche claire (*stratum lucidum*) et la couche cornée (*stratum corneum*) (Figure 4). L'épiderme assure une protection mécanique, chimique (sueur et sébum) et physiologique contre les agressions physiques (rayonnement solaire), chimiques ou infectieuses.

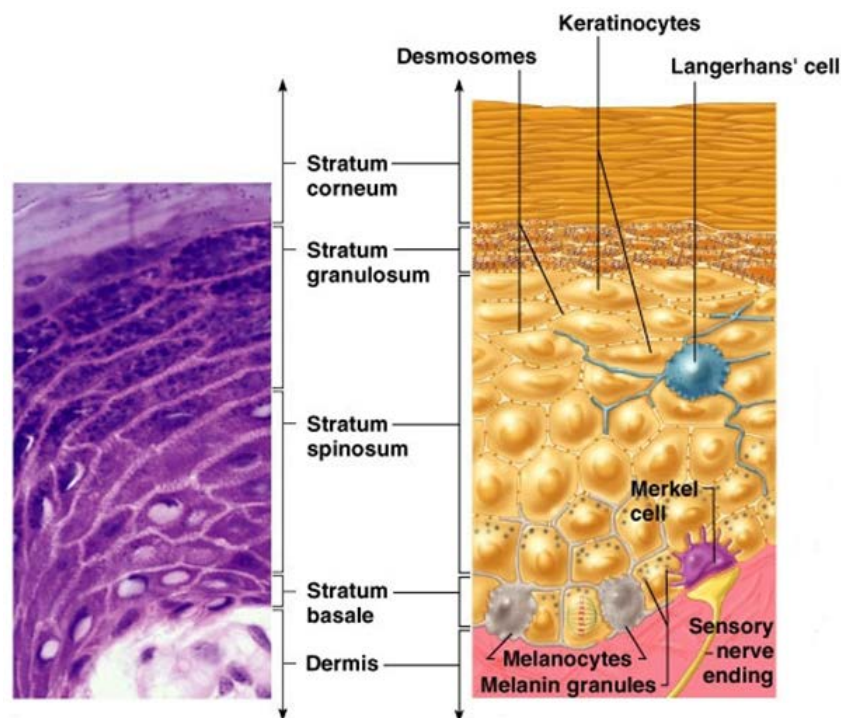


Figure 4 : Structure de l'épiderme (D'après Pearson, 2004)

Plusieurs types cellulaires constituent l'épiderme :

- **Les kératinocytes**

Les kératinocytes (KC) représentent entre 85-95% des cellules épidermiques. Ils forment la première ligne de défense de l'organisme en assurant la cohésion et l'imperméabilité de l'épiderme afin de lutter contre les agressions extérieures (microorganismes, chaleur, radiations ultra-violettes (UV) et déshydratation). Au cours de leur différenciation, les KC migrent de la couche basale vers la couche cornée où ils meurent par apoptose et sont



éliminés par desquamation. Les KC produisent de la kératine, une protéine fibreuse, particulièrement concentrée dans la couche cornée, lui conférant une forte résistance. La couche cornée est composée de KC dont les noyaux ont dégénéré, les cornéocytes. Ces cellules sont plates, anuclées et attachées les unes aux autres par les cornéodesmosomes. Ceux-ci sont liés entre eux par un ciment intercellulaire composé de cholestérol, de céramides et d'acides gras libres, assurant la cohésion et la souplesse de l'ensemble (Proksch *et al.*, 2008).

Au-delà de former la barrière physique primaire, les KC contribuent également activement à la barrière immunologique de la peau et jouent un rôle central dans l'immunité innée ainsi que dans le développement des réactions inflammatoires (Clausen and Stoitzner, 2015; Williams and Kupper, 1996). Ils expriment la plupart des récepteurs Toll (TLR) qui leurs permettent de reconnaître les composants bactériens et viraux exceptés les TLR7 et TLR8 (Clausen and Stoitzner, 2015). Les molécules allergisantes cutanées tout comme les irradiations UV activent l'inflammasome dans les KC (H. Watanabe *et al.*, 2007). Suite à l'activation de la voie des TLR et de l'inflammasome médiée par le récepteur Nod-Like Receptor (NLR), les KC sécrètent des peptides anti-microbiens (antimicrobial peptides, AMPs), les cathélicidines et les β -défensines, qui assurent une première ligne de défense en agissant directement sur les pathogènes extérieurs (Lai and Gallo, 2009). En plus des AMPs, les KC sécrètent constitutivement ou après induction, diverses interleukines incluant l'IL-1, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-18 et le tumour necrosis factor (TNF), ainsi que de nombreuses chimiokines telles que CC-chemokine ligand 20 (CCL20), CXC-chemokine ligand 1 (CXCL1), CXCL8, CXCL10 et CXCL11. Les KC ainsi activés peuvent recruter des polynucléaires neutrophiles (PN) dans l'épiderme inflammé des patients atteints de psoriasis en produisant CXCL1 et CXCL8 (IL-8). En outre, les KC régulent le trafic des précurseurs de cellules de Langerhans vers l'épithélium à travers l'expression de CCL20 (Nestlé, 2009). Au-delà de ces médiateurs, lorsqu'ils sont stimulés par l'interféron- γ (IFN- γ), les KC peuvent exprimer le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) qui leur confère des caractéristiques de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et leur permet, en plus du CMH-I, de présenter les antigènes aux lymphocytes T (LT) (Nestlé *et al.*, 2009). Ainsi, les KC sont des cellules effectrices pro-inflammatoires stratégiquement positionnées dans les couches superficielles de la peau, prêtes à réagir en temps opportun aux pathogènes ou aux effets nocifs par la production coordonnée d'AMPs, de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines.

- **Les mélanocytes**

Les mélanocytes sont la deuxième population cellulaire de l'épiderme et représentent 8% des cellules épidermiques. Ils sont principalement localisés dans les couches profondes. Ils interviennent dans sa pigmentation grâce à la synthèse de la mélanine et participent à sa protection contre les rayons UV. Les mélanocytes rentrent en contact avec les KC par leurs prolongements longs et minces afin de leur transférer la mélanine. La mélanine ainsi absorbée s'accumule dans les KC et forme une barrière pigmentaire qui protège les cellules des rayons UV (McLafferty *et al.*, 2012).

- **Les cellules de Langerhans**

Les cellules de Langerhans (LC) représentent 3 à 5% des cellules épidermiques (Merad *et al.*, 2013) et sont une sous-population de DC. Localisées dans les couches basales et supra-basales de l'épiderme, elles forment un réseau contigu avec celui-ci et assurent ainsi une surveillance immunitaire (Hoath and Leahy, 2003). Leur présence continue dans l'épiderme est aussi due à leur prolifération locale (Czernielewski and Demarchez, 1987; Stingl *et al.*, 1978). Leur corps cellulaire en forme étoilée se prolonge par de longues dendrites qui leur permettent d'entourer les KC et de capturer les corps étrangers qui auraient franchi la barrière cutanée (*stratum corneum*). Les LC sont caractérisées par l'expression d'un récepteur de lectine C de type II, la Langerine (CD207), et par une forte expression des molécules de surface CD1a, CD1c et CD11c, du marqueur hématopoïétique CD45 (antigène leucocytaire commun, également connu sous le nom de LY5), du CMH-II ainsi que par la présence de granules de Birbeck (Merad *et al.*, 2008). La formation des granules de Birbeck dépend de la présence de Langerine, suggérant leur implication dans les mécanismes d'endocytose des antigènes (Seré *et al.*, 2012). Les principales fonctions des LC sont l'internalisation, le transport et la présentation des antigènes rencontrés dans la peau (Breatnach, 1988; Romani *et al.*, 2003). De plus, les LC expriment constitutivement des molécules d'adhésion telles que l'E-cadhérine, l'epithelial-cell adhesion molecule (EpCAM) et la β 1-intégrine qui leur permettent de s'ancrer aux KC (Merad *et al.*, 2008). Les LC expriment également de manière constitutive le CD205, également connu sous les noms de DEC205 et LY75, une lectine impliquée dans la capture et l'apprêtement des antigènes (Merad *et al.*, 2008).

Les LC jouent un rôle crucial dans l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative (Bangert *et al.*, 2011). Après avoir détecté un antigène, les LC sont capables de le capturer, enclenchant

ainsi leur processus de maturation. L'expression de la E-cadhérine va alors être diminuée au profit de l'expression du CMH-II, de molécules de co-stimulation telles que le CD40, CD80 et CD86, ainsi que des récepteurs aux chimiokines comme CCR7, indispensables à la migration des LC jusqu'aux ganglions lymphatiques drainants (dLN) afin de présenter l'antigène (Ag) aux LT et d'initier une réponse immunitaire spécifique de l'Ag (Kaplan *et al.*, 2012).

Bien que leur rôle immunogène soit aujourd'hui bien établi, de nouveaux paradigmes décrivant un rôle tolérogène des LC voient le jour depuis la dernière décennie. Chez des souris déficientes en LC, l'application cutanée de faibles doses de la molécule allergisante dinitrofluorobenzène (DNFB) entraîne une réponse inflammatoire d'origine allergique plus forte que chez les souris possédant des LC (Bobr *et al.*, 2010).

De même, les LC issues de souris ayant reçues une application cutanée de dinitrothiocyanobenzène (DNTB) et transférées chez des souris receveuses protègent ces dernières contre l'allergie cutanée induite par le DNFB. Cette étude a permis ainsi de montrer que cette protection implique une absence de prolifération des LT CD8⁺ appelée anergie et une activation des LT régulateurs (Treg) en réponse au DNTB (Gomez de Agüero *et al.*, 2012). Les LC peuvent donc induire des Treg à l'état d'équilibre ou des LT CD8⁺ lors d'un test de provocation par un pathogène comme *Candida albicans* (Sparber, 2014). Il apparaît que les LC sont capables d'intervenir aussi bien dans l'immunité que dans la tolérance.

- **Les cellules de Merkel**

Entre les KC basaux, se situent les cellules de Merkel qui sont des cellules neuroendocrines portant des marqueurs neuronaux et épithéliaux. Les cellules de Merkel sont les cellules les moins nombreuses de l'épiderme et sont situées dans la couche la plus profonde de l'épiderme, en contact avec les terminaisons nerveuses (Tortora and Derrickson, 2014). Elles sont comparées à des mécanorécepteurs car elles sont fortement impliquées dans la perception de stimulations mécaniques, en contribuant à la formation d'une synapse nerveuse (Ma, 2014). Ces cellules sont donc particulièrement abondantes dans les régions sensibles au toucher telles que les lèvres, les extrémités des mains et les plantes des pieds.

3.2.1.2 Derme

Le derme est la seconde couche de la peau correspondant à un tissu conjonctif de soutien, dix à quarante fois plus épais que l'épiderme. Il est séparé de l'épiderme par la jonction dermo-

épidermique. Contrairement à l'épiderme, le derme est vascularisé et également innervé et joue un rôle important dans la thermorégulation.

Le derme est composé majoritairement de fibroblastes et est riche en fibres de collagène et d'élastine qui lui confèrent ses caractéristiques mécaniques (élasticité, résistance à la traction et aux tensions) (Tortora and Derrickson, 2014). Les fibroblastes produisent les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) (collagène et élastine), les protéines d'adhésion (laminine et fibronectine), et la substance fondamentale (les glycosaminoglycanes tels que l'acide hyaluronique (HA) et les glycoprotéines). Les fibroblastes participent à divers processus physiologiques tels que la cicatrisation des plaies mais sont aussi impliqués dans l'inflammation (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014).

Le derme est également constitué de cellules de l'immunité dont différentes sous-populations de DC (les DC du derme (DDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC)), de mastocytes, de macrophages, de LT, de cellules Natural Killer T (NKT) ou encore de granulocytes. Les DC sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles, dérivant de la lignée hématopoïétique de la moelle osseuse (progéniteurs CD34⁺), qui rejoignent ensuite l'épiderme ou le derme *via* le flux sanguin (Dieu *et al.*, 1998; Wilson and Villadangos, 2004). Ces cellules sentinelles sont définies par leur capacité à percevoir les signaux de danger et capter les antigènes de leur environnement (Gallucci and Matzinger, 2001), apprêter et transporter ces antigènes vers les organes lymphoïdes secondaires, les présenter aux LT naïfs et stimuler ces derniers. Les DC constituent un véritable lien entre les systèmes immunitaires inné et acquis en participant à l'élaboration d'une réponse adaptative qui se traduira soit par réponse immune tolérogène soit par une réponse immune effectrice (Banchereau and Steinman, 1998).

Les DC du derme (DDC) constituent une autre sous-population de DC résidentes dans la peau et représentent 3% de la population totale des DC. Ces cellules sont continuellement renouvelées par recrutement à partir de progéniteurs de la moelle osseuse et se caractérisent surtout par l'expression du CD11c, du CD45, du CMH-II, et de la sous-unité A du facteur XIII de coagulation (FXIIIa). Contrairement aux LC, elles n'expriment pas de granules de Birbeck (Bangert *et al.*, 2011).

Concernant les DC plasmacytoïdes (pDC), elles circulent du sang vers les zones T des organes lymphoïdes ou vers les tissus enflammés. Ces pDC ne sont pas présentes dans un derme sain mais sont retrouvées dans la peau au cours des pathologies cutanées inflammatoires comme

le psoriasis ou l'eczéma de contact. Les pDC expriment seulement les TLR7 et TLR9 et jouent un rôle important dans l'immunité antivirale par leur capacité à produire de l'IFN de type I tels que l'IFN- α et l'IFN- β (Bangert *et al.*, 2011).

Le derme est également le lieu de transit de LC migrant de l'épiderme pour rejoindre les vaisseaux lymphatiques ainsi que des précurseurs de LC migrant vers l'épiderme. Les parois des vaisseaux sanguins et lymphatiques du derme sont constituées de cellules endothéliales, impliquées dans de nombreux processus physiologiques de la peau. Les cellules endothéliales peuvent augmenter la perméabilité des vaisseaux ou induire la migration de cellules immunitaires en produisant des gradients de chimiokines (Weber *et al.*, 2013). Les autres populations cellulaires telles que les macrophages, les LT et les mastocytes, présentes dans le derme, peuvent également intervenir dans les réponses immunitaires cutanées.

Les différentes populations cellulaires présentes dans l'épiderme et le derme sont schématisées en Figure 5.

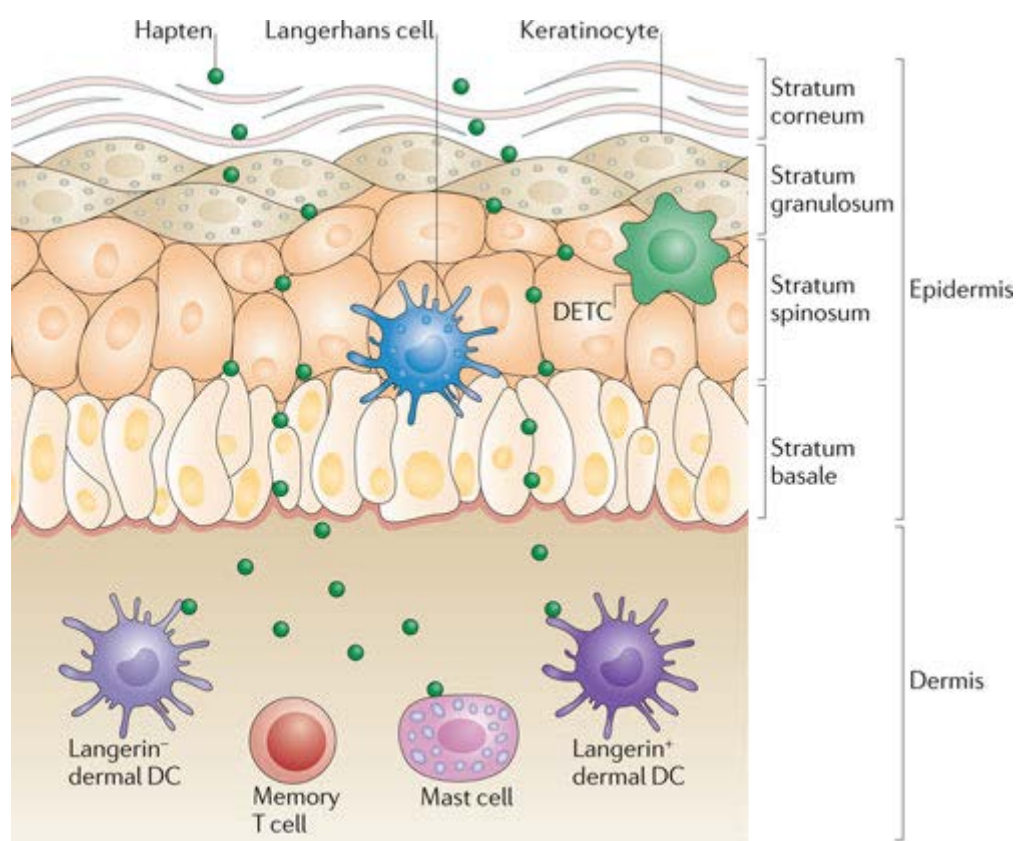


Figure 5 : Les différentes populations cellulaires dans l'épiderme et le derme (Kaplan *et al.*, 2012)

L'épiderme est une couche épithéliale stratifiée composée principalement de kératinocytes qui forment un *stratum corneum* imperméable à l'eau. Le derme est une couche stromale pauvre en cellules en dessous de l'épiderme. Différents types de cellules de l'immunité résident dans la peau. Le schéma représente la peau de la souris, bien que les types de cellules dans la peau humaine soient similaires. Les cellules de Langerhans (LC) sont la seule population de cellules dendritiques (DC) résidant dans l'épiderme. Dans le derme, il y a au moins deux sous-ensembles de DC, qui se distinguent sur la base de l'expression de la langerine. Le derme contient également des mastocytes et des cellules T mémoires. Les cellules T épidermiques dendritiques (DETCs) ont des récepteurs invariables des cellules T $\gamma\delta$ (TCR). Ils sont présents dans l'épiderme de la souris mais pas chez l'homme. Les haptènes, représentés par des points verts, pénètrent à travers l'épiderme et le derme et sont disponibles pour tous les types de cellules présentés.

3.2.1.3 Hypoderme

Rattaché au derme par des fibres de collagène et d'élastine, l'hypoderme est la couche la plus épaisse et profonde de la peau. Elle joue un rôle énergétique important mais également d'isolant thermique (Dreno, 2009). Il est constitué d'un réseau collagénique définissant des alvéoles renfermant des lobules graisseux produits par des cellules appelées adipocytes. Par l'hypoderme arrive un réseau vasculaire important (veineux, artériel et lymphatique). Ce tissu, richement vascularisé, contient en fonction de leur localisation des tissus adipeux plus ou moins nombreux.

Chaque couche de la peau a donc ses caractéristiques propres, avec ses différentes populations cellulaires qui lui permettent d'assurer une protection de l'organisme en permettant une réponse immunitaire efficace en cas d'agression.

3.2.2 Les molécules allergisantes

Un allergène de contact est une substance chimique possédant le potentiel intrinsèque (ou non) de provoquer une réponse allergique au niveau cutané chez certains sujets susceptibles après des expositions répétées. Cette réaction inflammatoire, lorsque l'individu est exposé ultérieurement à la même substance chimique, est à l'origine d'un tableau clinique de DCA. A ce jour, plus de 4 350 allergènes de contact sont connus (Esser and Martin, 2017). Le risque de développer une DCA dépend du schéma d'exposition et du mode de vie personnel et professionnel. En effet, l'exposition professionnelle à des allergènes de contact conduit fréquemment au développement d'une DCA qui peut être une cause majeure d'incapacité de travail (celle-ci étant reconnue maladie professionnelle). Par ailleurs, les habitudes personnelles peuvent influencer le risque de développer cette pathologie. La prévention et le traitement de la DCA reposent essentiellement sur l'identification de l'allergène de contact responsable et l'éviction de ce dernier. Il est donc essentiel d'avoir une bonne connaissance des différentes réactivités chimiques mises en cause afin de prédire ou non le potentiel allergisant d'une molécule.

3.2.2.1 Les différents types d'haptènes

La plupart des composés chimiques organiques et inorganiques responsables de DCA sont des composés de faible poids moléculaire (< 500-1000 Da), appelés haptènes. Etant trop petits

pour être immunogènes, les haptènes doivent se lier à des protéines porteuses, appelées « carrier » pour former une structure antigénique reconnaissable par le système immunitaire. Il existe trois types d'haptènes (Figure 6).

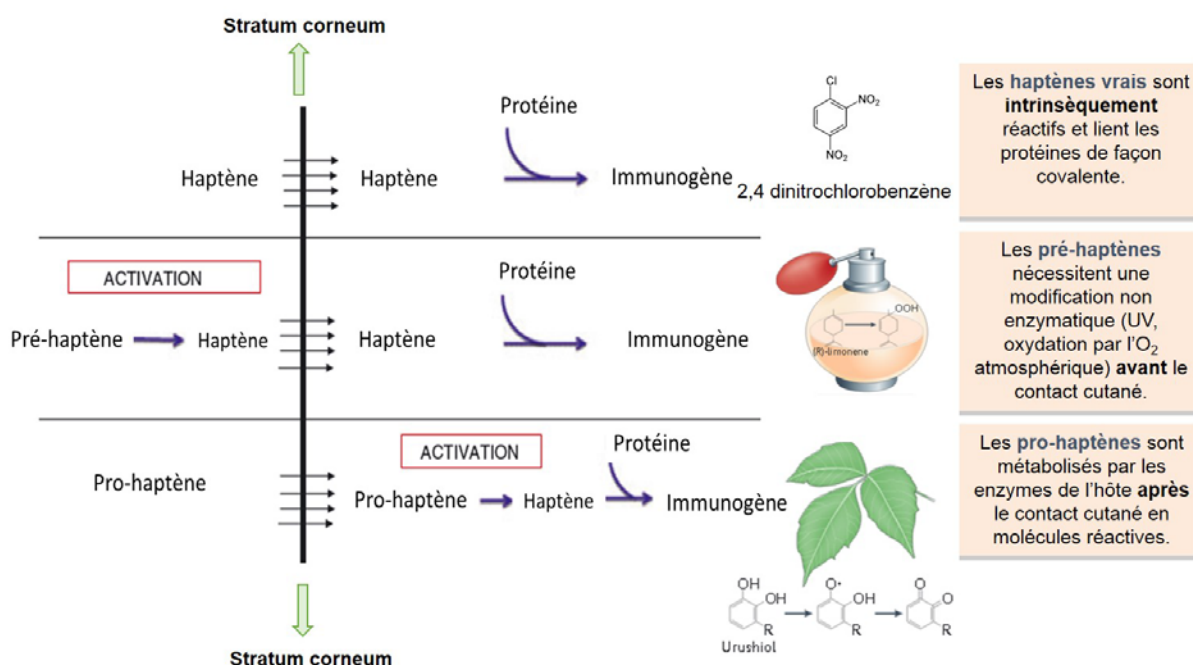


Figure 6 : L'activation des différents types d'haptènes (d'après Kaplan *et al.*, 2012; Karlberg *et al.*, 2013)

3.2.2.1.1 Les haptènes vrais

L'origine du concept de l'haptène provient des études de Karl Landsteiner et de John Jacobs en 1935 (Landsteiner and Jacobs, 1935), qui furent les premiers à identifier une relation entre la réactivité des allergènes chimiques électrophiles envers les résidus nucléophiles des protéines et leur potentiel allergisant, c'est-à-dire leur capacité à provoquer une réponse immune adaptative.

La grande majorité des haptènes vrais sont des molécules électrophiles intrinsèquement réactives qui sont capables d'induire une DCA en se liant de façon covalente aux résidus nucléophiles des protéines de l'environnement cutané (Divkovic *et al.*, 2005). Ces molécules sont suffisamment lipophiles pour être capables de pénétrer la couche cornée de la peau, mais trop petites pour être immunogènes par elles-mêmes. Elles sont ainsi capables de générer un nouveau déterminant antigénique (complexe haptène-protéine) en se liant aux protéines de l'épiderme. Ce complexe antigénique formé est à l'origine du phénomène de sensibilisation puisqu'il sera pris en charge par les CPA et présenté aux LT engendrant ainsi

une réponse immunitaire. La Figure 7 représente les groupes fonctionnels majoritairement retrouvés au sein des structures hapténiques réagissant directement avec les groupements nucléophiles.

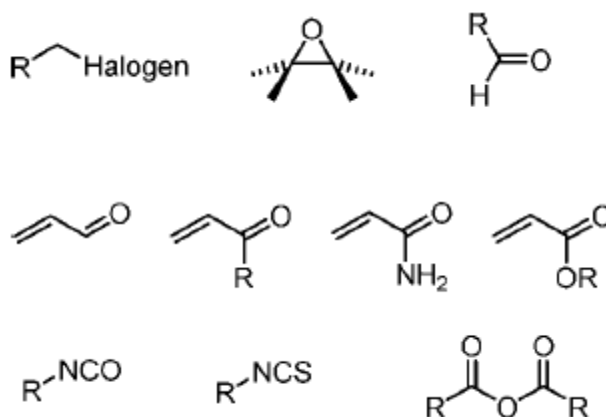


Figure 7 : Groupes fonctionnels les plus communs des haptènes électrophiles (Karlberg, 2008)

3.2.2.1.2 Les pré-haptènes

Le terme de pré-haptène, introduit par Lepoittevin (2006), désigne des molécules initialement non réactives vis-à-vis des protéines et qui n'ont pas besoin d'être prises en charge par un système métabolique pour devenir des haptènes vrais (Lepoittevin, 2006). Ces molécules inertes sont transformées par des mécanismes non enzymatiques, comme l'oxydation à l'air ou la photoactivation, en dérivés radicalaires très réactifs (époxydes, hydroperoxydes). Dans la majorité des cas, l'activation du pré-haptène est réalisée par oxydation lente *via* une exposition prolongée à l'air ambiant.

L'oxydation à l'air ou auto-oxydation est une réaction en chaîne de radicaux libres dans laquelle la substitution d'atomes d'hydrogène combinée à l'addition d'atomes d'oxygène peut former des radicaux peroxydes. La réaction montre une sélectivité pour des positions où des radicaux stables et très réactifs, produits primaires d'oxydation, qui sont généralement des hydroperoxydes, peuvent être formés (Karlberg *et al.*, 2013). L'identification des produits d'oxydation dans le mélange d'oxydation montre que les hydroperoxydes s'oxydent davantage, formant des produits d'oxydation secondaires, conduisant finalement à des composés polymères. Une fois les hydroperoxydes formés, ils peuvent former des antigènes spécifiques et agir comme des sensibilisants cutanés (Karlberg *et al.*, 2013). Les produits d'oxydation secondaires tels que les aldéhydes et les époxydes peuvent aussi être allergisants, augmentant ainsi le potentiel allergisant des mélanges d'auto-oxydation (Karlberg *et al.*,

2008). De nombreuses fragrances couramment utilisées dans les parfums ou les produits cosmétiques agissent comme des pré- ou des pro-haptènes, parfois même les deux (Tableau 1). En effet, bien que les mécanismes soient assez différents, l'auto-oxydation et la bioactivation de certaines fragrances peuvent générer les mêmes produits (Karlberg *et al.*, 2013).

Fragrance	Activation par oxydation par l'air	Bioactivation (oxydation)
Alcool cinnamique	Oui	Oui
Eugénol	Non	Oui
Géranial	Oui	Non
Géraniol	Oui	Oui
Isoeugénol	Oui	Oui
Limonène	Oui	Non
Linalool	Oui	Non
Acétate de linalyle	Oui	Non
α -Terpinène	Oui	Oui

Tableau 1 : Exemples de fragrances montrées expérimentalement comme étant pré- et/ou pro-haptènes
(D'après Karlberg *et al.*, 2013)

A titre d'exemple simple, de nombreux terpènes non allergisants présents dans les agrumes, comme le *d*-limonène, peuvent donner des hydroperoxydes sensibilisants après oxydation par l'air (Karlberg *et al.*, 1994; Matura *et al.*, 2002; Raffalli *et al.*, 2017) (Figure 8).

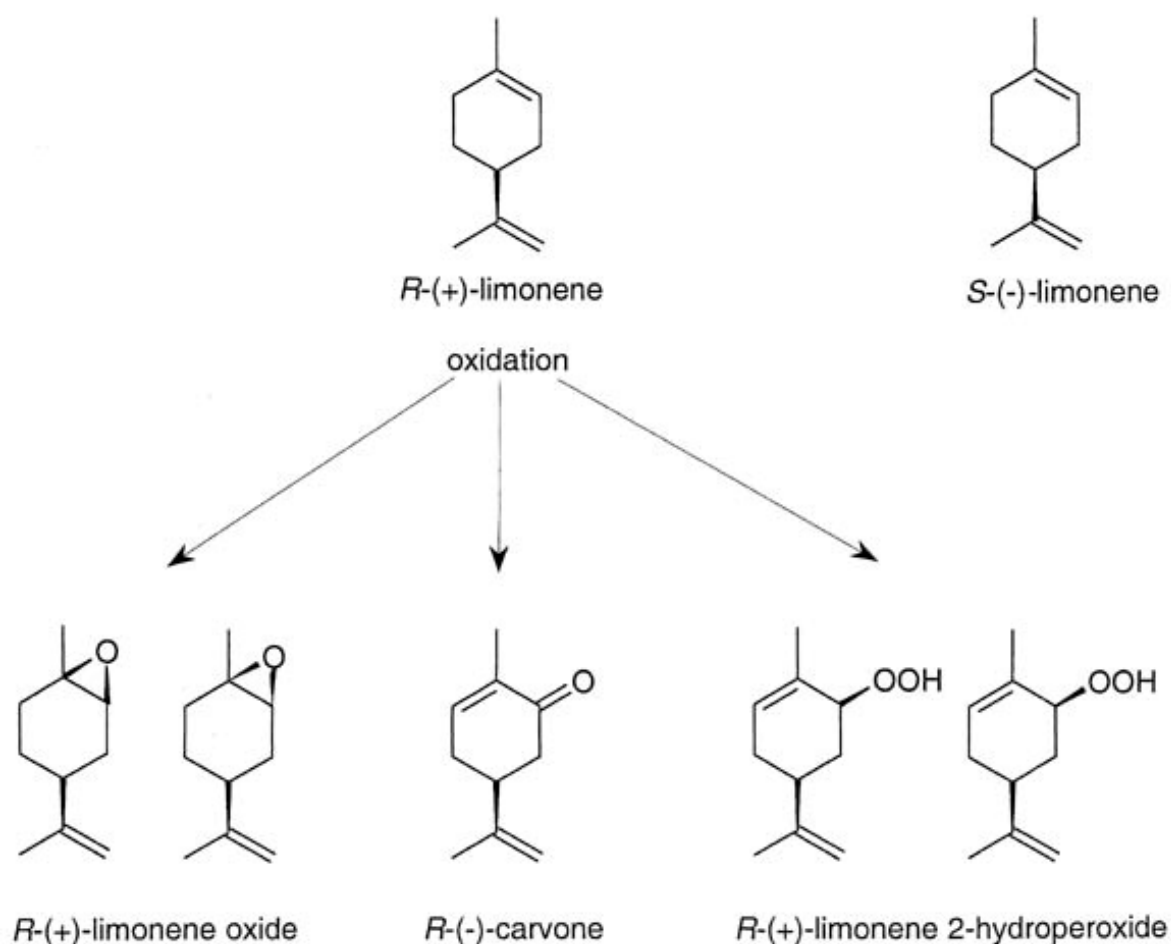


Figure 8 : L'oxydation du *d*-limonène conduit à divers produits allergisants (Matura *et al.*, 2002)

Un autre exemple plus complexe est le cas de la *para*-phénylènediamine (PPD), utilisée dans la composition de colorants comme les teintures capillaires, les colorants pour textiles et les colorants incorporés dans les caoutchoucs, qui est rapidement oxydée à l'air favorisant la formation d'un ensemble de molécules réactives (Figure 9).

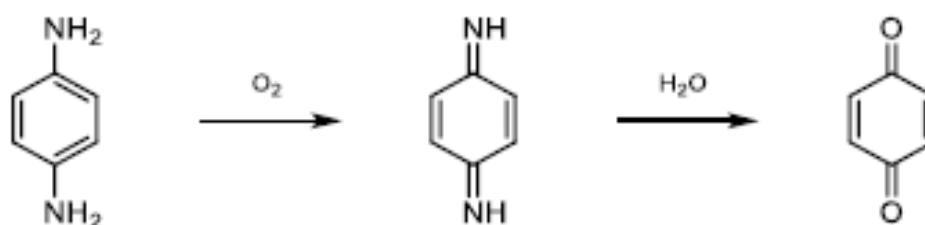


Figure 9 : Oxydation de la *p*-phénylènediamine en benzoquinone diimine, puis hydrolyse en benzoquinone (Eilstein *et al.*, 2007, 2006)

3.2.2.1.3 Les pro-haptènes

Les pro-haptènes sont des allergènes nécessitant au préalable, une activation métabolique pour se lier ensuite aux protéines de la peau. La peau humaine exprime des systèmes enzymatiques capables de métaboliser les xénobiotiques, en modifiant leur structure chimique afin d'augmenter leur hydrophilie pour en faciliter l'élimination du corps. Les enzymes cutanées de phase I telles que les cytochromes P450 (CYP450) (un système d'oxydation des composés), les alcool- et aldéhydes- déshydrogénases, les monoamines oxydases, les monooxygénases et les enzymes hydrolytiques (Karlberg *et al.*, 2013) initient la métabolisation des xénobiotiques. Les cellules cutanées telles que les LC, les fibroblastes, les KC et les mélanocytes expriment de nombreux CYP450. Les KC expriment tout particulièrement les CYP1A1, 1B1, 2B6, 2E1 et 3A (Baron *et al.*, 2001) et les DC expriment les CYP1A1, 2D6, 2C9, 2C19, et 2E1 et constitutivement le CYP1B1 (Sieben *et al.*, 1999). Les enzymes de phase II prennent généralement le relais de la métabolisation et l'élimination des produits générés par les enzymes de phase I. Elles sont également retrouvées dans la peau et incluent les acyltransférases, les glutathion-S-transférases, les UDP-glucuronosyltransférases et les sulfotransférases (Karlberg *et al.*, 2013). Ces enzymes de phase I et II peuvent donc être responsables de la formation d'intermédiaires très réactifs (Divkovic *et al.*, 2005). La substance qui était au départ non allergisante devient alors un haptène vrai.

L'alcool cinnamique, très utilisé en parfumerie et retrouvé dans la composition du Fragrance MIX I, a longtemps été considéré comme un modèle de pro-haptène. La théorie dominante était que l'alcool cinnamique était oxydé par voie enzymatique par une alcool déshydrogénase en aldéhyde cinnamique (cinnamaldéhyde), molécule qui contient une fonction aldéhyde réactive. Or, Moss *et al.* (Moss *et al.*, 2016), ont montré que les métabolites de l'alcool cinnamique formés dans un épiderme 3D reconstruit de peau humaine (RHE) sont en fait un alcool epoxy et un sulfate allylique (Figure 10). Ces données suggèrent que l'alcool cinnamique induit une DCA par une voie indépendante de celle impliquant le cinnamaldéhyde et doit donc être considéré comme un haptène vrai.

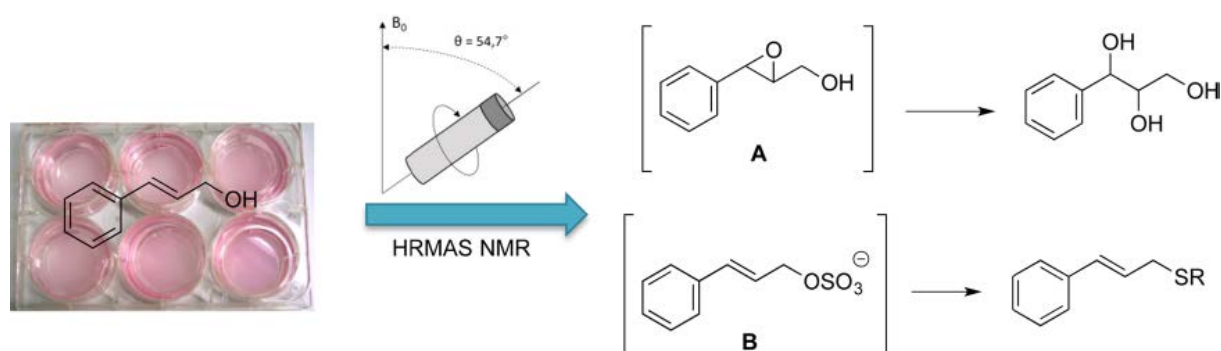


Figure 10 : Activation métabolique potentielle de l'alcool cinnamique dans l'épiderme humain reconstitué conduisant à la formation des produits (A) et (B) (Moss, 2016)

(A) Alcool-époxy
(B) Sulfate allylique

Il a été observé que les personnes présentant une activité métabolique réduite, présentaient un risque réduit de sensibilisation aux pro-haptènes (Schnuch *et al.*, 1998). Des substances comme le géraniol peuvent aussi agir à la fois comme pro- et pré-haptène (Esser and Martin, 2017). Ce changement potentiel de réactivité d'une substance peu ou pas sensibilisante en un sensibilisant puissant est un facteur de risque important qui doit être considéré dans les tests épicutanés et les tests *in vitro* pour l'identification des allergènes de contact.

3.2.2.2 Pénétration et hapténisation aux protéines

La première étape clé dans l'initiation d'une DCA est la pénétration percutanée de l'haptène. La filaggrine (FLG), protéine présente dans le *stratum corneum*, a un rôle majeur dans la fonction de barrière de la peau. L'absence ou la mutation de cette protéine conduit à l'altération de la fonction de barrière cutanée et est un fort facteur de prédisposition à l'eczéma de contact chez la souris (Moniaga *et al.*, 2010) et chez l'Homme (Novak *et al.*, 2008). Elle jouerait aussi un rôle important dans le développement de la DCA (Esser and Martin, 2017). Les jonctions serrées, composées de diverses protéines telles que les claudines et les occludines, forment une seconde barrière à la pénétration cutanée des antigènes (Honda *et al.*, 2013). Une autre prédisposition génétique associée à la sensibilisation de la DCA est une mutation du gène Claudin-1, jouant un rôle majeur dans la formation des jonctions serrées et donc dans la formation d'une barrière cutanée efficace (Esser and Martin, 2017). Il a cependant été décrit que les LC activées par des cytokines peuvent allonger leurs dendrites à travers ces jonctions pour capturer les antigènes (Kubo *et al.*, 2009). De même, des anomalies de la barrière cutanée sont associées à la DCA. En effet, une étude montre que les patients

atteints de DCA présentent une fonction de la barrière cutanée réduite, même dans les régions cutanées non lésionnelles présentant une récupération retardée de la barrière due à une production insuffisante de céramides (Esser and Martin, 2017). Par ailleurs, le degré de perméabilité de la peau varie selon son état physiologique et selon les propriétés physico-chimiques des composés appliqués ; toute altération de la couche cornée entraîne une pénétration des substances exogènes (Honda *et al.*, 2013). Le vieillissement, l'irritation, la sécheresse et le stress altèrent l'état physiologique cutané et peuvent contribuer à la diminution de sa perméabilité (Proksch *et al.*, 2006).

En parallèle, les caractéristiques physico-chimiques des molécules, à savoir leur poids moléculaire et leur lipophilie influencent leur pénétration cutanée. Pour diffuser rapidement à travers la couche cornée (dont le fort taux lipidique confère une certaine étanchéité), les molécules doivent donc être de faible poids moléculaire (inférieur à 1000 dalton) et principalement lipophiles (Log P ou coefficient de partition octanol/eau entre -1,4 et 4, avec une pénétration optimum pour les Log P entre 1 et 2) (Aptula *et al.*, 2007; Chipinda *et al.*, 2011). Plus le poids est faible et la lipophilie élevée, plus l'haptène pénétrera l'épiderme rapidement. Les sensibilisants peuvent être des ions métalliques ou des produits chimiques de faible poids moléculaire.

Deux études récentes ont abordé la question de savoir si un seuil de masse moléculaire (PM) inférieur à 500 Da, rapporté précédemment comme étant un pré-requis pour un produit chimique sensibilisant, était vrai ou non (Fitzpatrick *et al.*, 2017; Roberts *et al.*, 2013). Les deux études réfutent cette hypothèse car les auteurs montrent que des substances à plus haut poids moléculaire (jusqu'à 2285,61 Da) sont classées comme potentiellement sensibilisantes. De même, la notion selon laquelle les substances hautement hydrophiles, c'est-à-dire ayant un $\text{LogKow} \leq 1$, ne pénètrent pas efficacement pour induire une sensibilisation, a récemment été remise en question et jugée non valide (Fitzpatrick *et al.*, 2017).

Les composés ionisés, quant à eux, pénètrent difficilement l'épiderme (Lepoittevin, 2006). Un haptène peut pénétrer dans l'épiderme *via* deux voies : la voie intercellulaire (passage entre les cellules) et/ou la voie transcellulaire (passage au travers des cellules), plus rapide (Milpied-Homsy *et al.*, 2009). Durant le passage à travers l'épiderme, les haptènes peuvent devenir immunogènes en se liant aux protéines de l'environnement cutané et générer des complexes pris en charge par les cellules de l'immunité. La réactivité de l'haptène envers les protéines est donc un facteur majeur de la sensibilisation. La pénétration de l'haptène lipophile dans le

stratum corneum de la peau est facilitée par son faible poids moléculaire (< 500- 1000 Da) ainsi que sa lipophilie (Bos and Meinardi, 2000).

La formation du complexe haptène-protéine implique la création de liaisons plus ou moins fortes mettant en œuvre soit des liaisons covalentes pour les molécules organiques, soit des liaisons de coordination pour les ions métalliques (Bal *et al.*, 1995; Divkovic *et al.*, 2005).

- **Liaisons covalentes**

L'étude chimique d'un grand nombre d'allergènes comme le 2,4-dinitrofluorobenzène (DNFB), le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (DNCB) ou encore l'hexylcinnamaldéhyde (HCA) indique que dans la grande majorité des cas, une liaison covalente se forme entre l'haptène et la protéine, selon un mécanisme classique à deux électrons du type nucléophile-électrophile (Figure 11).

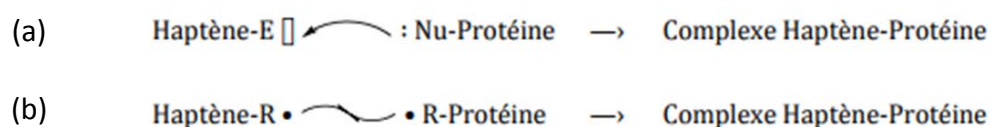


Figure 11 : Formation de liaisons covalentes par réaction électrophile-nucléophile (a) et radicalaire (b)
(Aptula *et al.*, 2007)

De nombreux acides aminés constituant les protéines possèdent sur leurs chaînes latérales des groupes nucléophiles riches en électrons, susceptibles d'interagir avec les haptènes. Les plus couramment cités sont la lysine (Lys) avec leurs groupes amines (-NH₂) et la cystéine (Cys) avec leurs groupements thiols (-SH), mais l'histidine, la méthionine, la tyrosine, le tryptophane ou l'arginine, possédant tous des hétéroatomes nucléophiles, peuvent également être impliqués dans ce type de réaction (Karlberg *et al.*, 2008).

Le Tableau 2 synthétise les principales fonctions chimiques électrophiles des molécules allergisantes, le mécanisme de réaction avec les fonctions nucléophiles des protéines et les différents adduits susceptibles de se former. Ainsi, les principales réactions impliquées dans la formation de liaisons covalentes entre les haptènes et les résidus protéiques peuvent être classées en 3 groupes :

- les réactions de substitution nucléophile sur un centre saturé (dérivés halogénés, époxydes) ou insaturé (dérivés halogénés aromatiques, esters) (Divkovic *et al.*, 2005),
- les réactions d'addition sur une fonction carbonyle ou réaction de condensation (dérivés carbonylés) (Tracey and Shuker, 1997),

- les réactions d'addition nucléophile de type Michael 1, 4 (systèmes α - β insaturés).

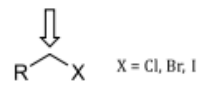
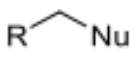
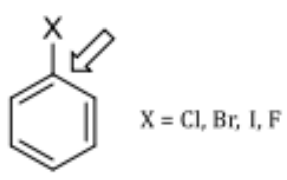
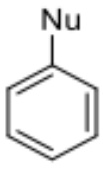
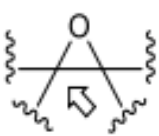
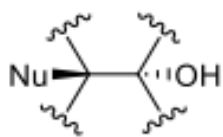
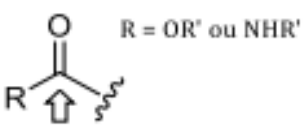
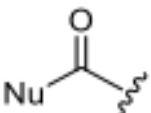
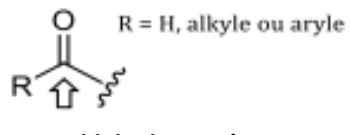
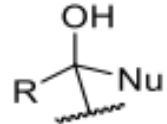
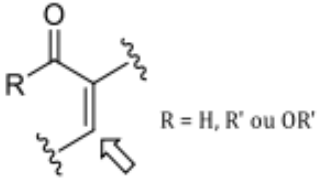
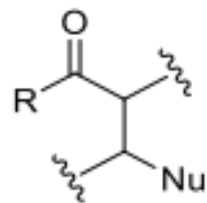
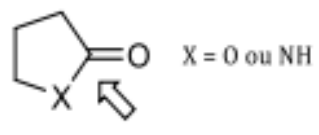
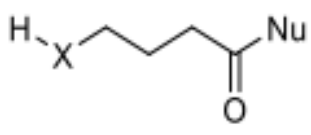
Sites réactifs électrophiles	Mécanismes de réaction	Adduits formés
 <p>Dérivé halogéné</p>	Substitution nucléophile sur un centre saturé	
 <p>Dérivé halogéné aromatique</p>	Substitution nucléophile aromatique (S _N Ar)	
 <p>Epoxyde</p>	Substitution nucléophile sur un centre saturé	
 <p>Ester ou Amide</p>	Substitution nucléophile sur un centre insaturé	
 <p>Aldehyde ou Cétone</p>	Addition nucléophile	
 <p>Systèmes carbonyle α-β insaturés</p>	Addition nucléophile de type Michael	
 <p>Lactone, lactame</p>	Substitution sur un centre insaturé	

Tableau 2 : Fonctions chimiques électrophiles des haptènes, mécanismes de réaction associés en présence d'un nucléophile (Nu) et adduits formés (d'après Divkovic, 2015)

Les flèches indiquent les sites réactifs électrophiles ; Nu : résidus nucléophiles d'acides aminés.

Il a également été montré que des liaisons covalentes peuvent être formées par des réactions mettant en jeu des espèces radicalaires (Karlberg *et al.*, 2008).

- **Liaisons de coordination**

Les métaux, comme le nickel, cobalt, ou encore le chrome forment des liaisons de coordination suffisamment stables pour être reconnues par le système immunitaire (Thierse *et al.*, 2005). Ces liaisons sont de faible affinité et réversibles avec 4 ou 6 électrons donneurs. Le nickel possède en effet six sites de coordination dont trois sont connus pour former un pont entre le récepteur spécifique TCR des LT et les molécules du CMH des DC (Gamerding *et al.*, 2003) (Figure 12).

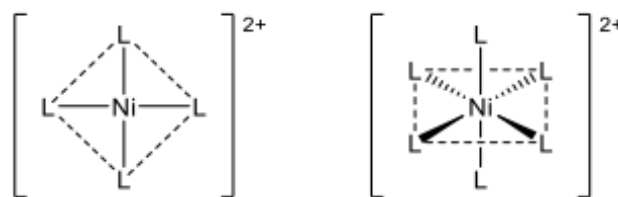


Figure 12 : Exemples de complexes de coordination du nickel II

Ainsi, nous venons de décrire les différents mécanismes physico-chimiques conduisant à la formation d'un complexe haptène-protéine antigénique qui induira par la suite une réponse immune spécifique de l'haptène.

3.2.3 Les mécanismes immunologiques de la dermatite de contact allergique

La dermatite de contact allergique est constituée de deux phases bien distinctes qui sont la phase de sensibilisation (ou phase d'induction) et la phase d'élicitation (ou de révélation). La phase de sensibilisation nécessite au moins 3 jours à plusieurs semaines tandis que la phase d'élicitation se développe en seulement 1 à 2 jours. Les deux phases ainsi que les étapes clés sont représentées dans la Figure 13.

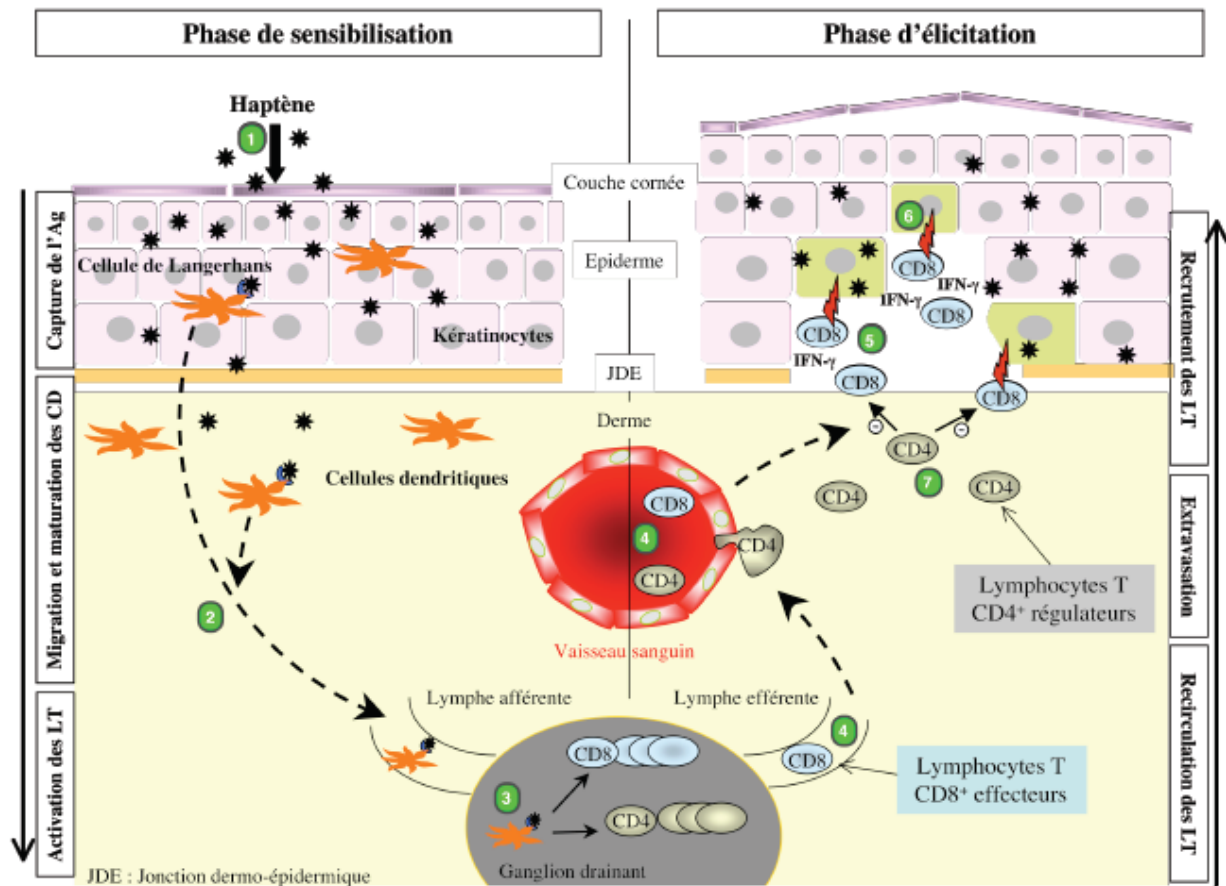


Figure 13 : Mécanismes d'activation de la réponse cellulaire par les haptènes

(D'après Saint-Merard *et al.*, 2004)

L'application épicutanée d'une molécule allergisante induit une activation du système immunitaire inné cutané (étape 1) associée à la migration et la maturation des cellules de Langerhans (LC) et des cellules dendritiques (DC) du derme qui présentent l'haptène en tant qu'Ag aux LT dans le ganglion drainant (étape 2). Ces DC activent des populations de LT spécifiques CD8⁺ effectrices et CD4⁺ régulatrices (étape 3) qui vont ensuite re-circuler en périphérie (étape 4). Lors d'un deuxième contact avec le même haptène, les LT CD8⁺ spécifiques sont recrutés dans la peau et activés (étape 5). De par leur cytotoxicité et leur production d'IFN- γ , les LT CD8⁺ effecteurs sont responsables de la mise en place de l'inflammation et de la lésion d'eczéma (étape 6) qui va être résolue lors de l'arrivée secondaire de LT CD4⁺ régulateurs sécrétant des cytokines anti-inflammatoires (étape 7).

3.2.3.1 La phase de sensibilisation

La phase de sensibilisation est également décrite comme la phase afférente ou phase d'induction. Elle survient lors du premier contact de l'haptène avec la peau et dure entre 10 à 15 jours chez l'homme (contre 5 à 7 jours chez la souris) mais reste silencieuse sur le plan clinique. Elle aboutit à la production de LT mémoires spécifiques de l'haptène qui migrent ensuite dans la peau (Vocanson *et al.*, 2009). La prolifération de ces LT mémoires dépendra à la fois de la nature de l'haptène, de la dose initiale, de la voie d'administration, de la durée du contact avec l'haptène et de l'intensité de la réponse inflammatoire à la phase initiale. La phase de sensibilisation est schématisée dans la Figure 14.

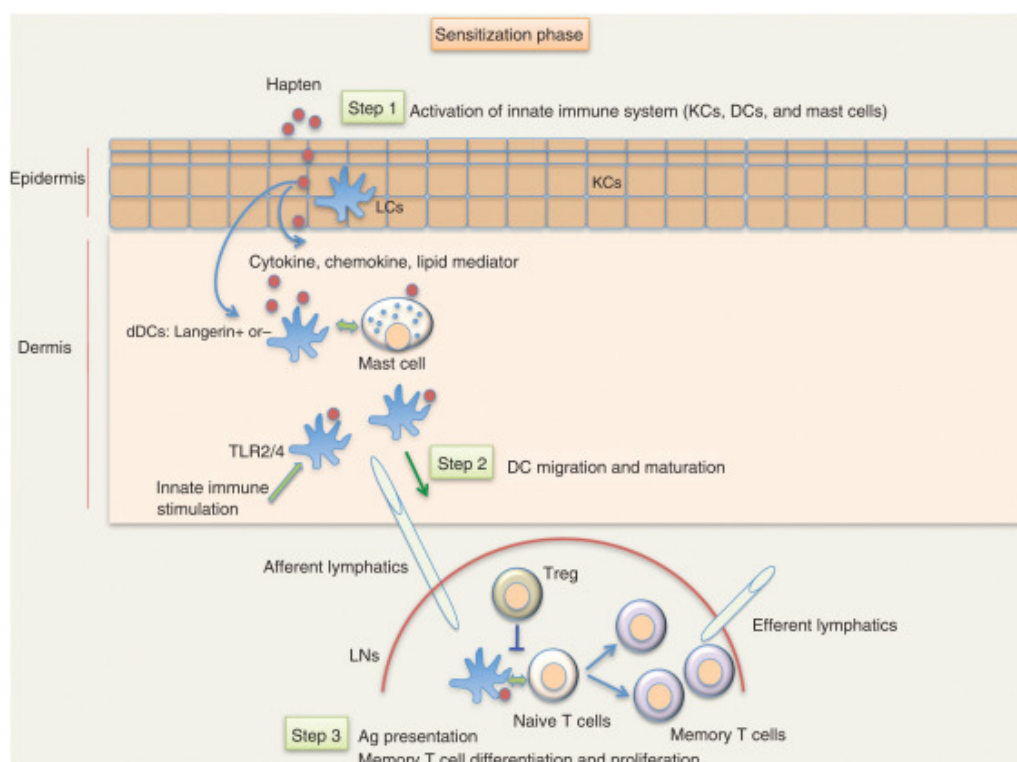


Figure 14 : Vue schématique des différentes étapes de la phase de sensibilisation (Honda *et al.*, 2013)

Étape 1 : Les haptènes activent les kératinocytes (KCs) et les mastocytes directement ou indirectement *via* le système immunitaire inné. Les KC activés et les mastocytes produisent divers médiateurs chimiques qui activent les cellules dendritiques cutanées (dDCs).

Étape 2 : Les DC activées capturent les antigènes, commencent leur maturation et migrent vers les ganglions lymphatiques drainants (dLN) *via* les vaisseaux lymphatiques afférents.

Étape 3 : Les DC matures présentent l'antigène aux lymphocytes T naïfs dans les dLN. Les clones spécifiques de l'antigène se différencient et prolifèrent en lymphocytes T effecteurs. Les Lymphocytes T régulateurs (Treg) ont un rétrocontrôle négatif sur la fonction de la DC et donc un rôle suppresseur dans la génération des lymphocytes T effecteurs.

❖ Apprêtement de l'haptène et maturation des cellules dendritiques

L'haptène, au contact des cellules de l'épiderme, et *via* sa réactivité peut se lier à des protéines endogènes pour former un complexe immunogène qui est internalisé par les LC et les DC comme tout autre antigène d'origine virale ou pathogène. La plupart des haptènes provoquent une inflammation locale en activant les récepteurs de l'immunité innée. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les voies de signalisation liées à l'immunité innée et au stress oxydant sont importantes dans la phase d'induction (Martin *et al.*, 2011; Natsch, 2009; Vandebriel *et al.*, 2010). L'activation de ces voies de signalisation induit la production de formes réactives de l'oxygène (FRO) ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires et chimiokines. Cet ensemble constitue des « signaux de danger » reconnus par le système immunitaire. Ces signaux de danger sont produits lors de dommages tissulaires, d'une réaction inflammatoire ou d'un stress ou bien d'une mort cellulaire par nécrose. Ainsi, la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-1 β), la libération de protéases

(métalloprotéases), de nucléotides intracellulaires (ATP, UTP), de protéines de choc thermique (HSP70) (Vabulas *et al.*, 2002) ou de FRO par les cellules voisines des DC participent à la maturation complète des DC (Gallucci and Matzinger, 2001). Ces signaux de danger produits dans le tissu cutané sont nécessaires pour le développement d'une réponse immunitaire adaptative (lors de la phase d'élicitation) (Martin *et al.*, 2011).

Cette production cytokinique pro-inflammatoire est un pré-requis essentiel lors de la phase de sensibilisation de la DCA. A titre d'exemple, le DNTB sensibilisant très faible devient un puissant immunogène par addition d'IL-12 (Riemann *et al.*, 2005). Sans l'activation complète des DC immatures *via* ces signaux de danger, aucune activation efficace des LT naïfs en LT spécifiques ne se produit.

L'activation des DC et la production des cytokines induites en réponse à un haptène peut dépendre de l'activation directe ou indirecte des voies de signalisation toll-like receptor (TLR), de la NF- κ B et de la voie des MAPK. Les haptènes métalliques comme le Co^{2+} et le Ni^{2+} lient directement le TLR4 humain et induisent une signalisation spécifique *via* ce TLR4 (Raghavan *et al.*, 2012). La signalisation induite par les TLR activés va conduire à l'activation de la voie NF- κ B, de la voie des MAPK qui conduira à la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines.

Par ailleurs, ces mêmes molécules vont générer des FRO qui contribuent à la dégradation de HA de la MEC et génèrent des fragments pro-inflammatoires importants pour l'activation et la migration des DC (Muto *et al.*, 2014). D'autre part, les FRO augmentent l'activité des hyaluronidases *via* p38 MAPK participant à la génération de fragments de HA (Monzon *et al.*, 2010). Ainsi, lorsqu'une activité hyaluronidase est induite, les FRO conduisent à la dégradation de HA à haut poids moléculaire en fragments HA à faible poids moléculaire pro-inflammatoires. Ces fragments agissent comme des Danger-Associated Molecular Patterns (DAMP) en activant les TLR 2 et 4. Par conséquent, les molécules allergisantes de contact agissent par une activation indirecte de la signalisation des TLR ainsi que de l'inflammasome et conduisent à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et IL-18 (Esser and Martin, 2017; Martinon, 2010; Matsuzawa *et al.*, 2005). Tous ces mécanismes sont nécessaires à l'activation des DC et permettent de déclencher la phase de sensibilisation (Martin, 2015). En utilisant une approche knock-out (KO), il a été montré que la reconnaissance du cholestérol par le récepteur de la lectine de type C du système immunitaire inné, Mincl (Clec4e), joue un rôle important dans la génération d'un milieu cytokinique pro-

inflammatoire et donc dans la pathogenèse de la DCA. L'expression de Mincle est surexprimée à la fois après une blessure des tissus et après l'application de DNFB, renforçant encore l'hypothèse que le stress et les dommages tissulaires sont impliqués de façon cruciale dans la DCA.

De plus, les sensibilisants de contact induisent la libération d'ATP dans l'espace extracellulaire, conduisant à une activation du récepteur P2X7. Par la suite, l'inflammasome NLRP3 est activé, entraînant l'activation de la caspase-1 et l'épissage de la pro-IL1 β et de la pro-IL18 en formes actives. Ces deux cytokines jouent un rôle clef dans l'activation des DC lors de la phase de sensibilisation.

L'ajout d'un irritant tel que le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) conduit à un effet synergique du nickel dans la DCA en améliorant les réponses d'hypersensibilité de contact (HSC) spécifiques au nickel, facilitant en parallèle l'immunogénicité du DNTB dans ce même modèle d'HSC. Ainsi, l'augmentation de la mort cellulaire médiée par des irritants et la libération d'ATP dans l'espace extracellulaire augmenteraient également les réponses d'HSC (Esser and Martin, 2017). Les KC ont aussi un rôle crucial dans l'initiation de l'inflammation *via* la sécrétion d'IL-24 suite à l'activation du récepteur au TNF (TNF-R) (Pasparakis *et al.*, 2014). L'épiderme met en place un gradient d'IL-34 et de Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) qui attirent les progéniteurs sanguins des LC, permettant ainsi leur renouvellement après qu'ils aient quitté l'épiderme suite à la capture de l'haptène (Wang *et al.*, 2012). De façon concomitante, les DC, les KC et les fibroblastes produisent des cytokines de la famille de l'IL-1 et du TNF. Lors de leur activation, les DC régulent négativement l'expression de l'E-Cadherine leur permettant ainsi de se détacher des KC (Wang *et al.*, 2003). De même, les DC ne sont plus retenues dans l'épiderme puisque l'expression à la surface des DC de CCR1, CCR2, CCR5 et CCR6, récepteurs des chimiokines CCL3, CCL4 et CCL20 produites par la peau est fortement diminuée (Dieu *et al.*, 1998). L'induction de l'expression du récepteur CCR7 permettra aux DC de répondre au gradient de chimiokines CCL21 et CCL19, et de se déplacer par chimiotactisme (Schwarzenberger and Udey, 1996). En parallèle, les KC expriment aussi des facteurs chimiotactiques (CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11) et CC-chemokine ligand 20 (CCL20). Tous ces médiateurs modulent la réponse immunitaire en favorisant le recrutement de l'infiltrat cellulaire dans la peau (Casati *et al.*, 2005a; Gaspari, 1997). En plus de ces cellules, lors d'une inflammation, les monocytes CCR2⁺ circulants en provenance du sang, sont rapidement recrutés dans la peau pour se différencier en DC.

Parallèlement, de nouvelles molécules d'adhésion permettant aux DC de se fixer à la MEC et aux cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques sont induites. Par exemple, l'expression d'ICAM-1/CD54 à la surface des DC semble essentielle à leur migration puisque des souris ICAM-1^{-/-} développent une HSC au DNFB beaucoup plus faible que des souris sauvages (Slich *et al.*, 1993). Pour pouvoir gagner le derme, les DC doivent ensuite franchir la jonction dermo-épidermique. La production par les DC de métalloprotéases (MMP) et notamment des MMP-2 et 9, qui dégradent les composants de la MEC comme le collagène IV, permettent aux DC de traverser la lame basale et le derme (Ratzinger *et al.*, 2002). Le rôle des MMP dans la DCA a été mis en évidence chez des souris déficientes pour MMP-9, pour lesquelles la migration des DDC en réponse à divers molécules allergisantes (oxazolone, rhodamine B, DNFB) est fortement diminuée (Kobayashi *et al.*, 1999; Ratzinger *et al.*, 2002).

L'internalisation des Ag est réalisée *via* différents mécanismes : la macropinocytose (capture et ingestion de gouttelettes de liquide extracellulaire) et la phagocytose (capture et ingestion de particules solides) peu spécifiques, ainsi que l'endocytose faisant intervenir des récepteurs membranaires tels que les lectines de type C (CD206, langerine, CD205, CD209, dectine-1) ou les récepteurs « scavenger » (CD36) (Jiang *et al.*, 1995; Valladeau *et al.*, 2000). Les DC possèdent également une machinerie enzymatique au niveau des endosomes et des lysosomes qui leur permet de dégrader les Ag capturés en fragments de quelques dizaines d'acides aminés (peptides antigéniques). Ainsi, de par leurs propriétés physico-chimiques, les molécules allergisantes peuvent modifier à la fois des protéines extra et intracellulaires et peuvent donc être présentées par les deux types de CMH.

Dans certains cas, les haptènes peuvent se lier directement au complexe peptide-CMH présent à la surface des DC, sans passer par le système d'apprêtement des cellules. C'est le cas des métaux qui entreprennent des liaisons de coordination entre le TCR et la molécule de CMH (Romagnoli *et al.*, 1991), de certains médicaments qui interagissent avec le TCR de manière pharmacologique (concept du « p-i » pour « Pharmacological interaction with Immune receptor ») (Pichler *et al.*, 2006) ou enfin du DNCB qui réagit de manière covalente directement avec le peptide présenté par une molécule du CMH (Pickard *et al.*, 2007). Au-delà de la modification de la protéine, l'haptène par lui-même ou *via* la génération de médiateurs, induit au sein de la peau un signal de danger conduisant à une maturation phénotypique et fonctionnelle des DC. Les LC sont par ailleurs capables de capturer les Ag nanoparticulaires appliqués à la surface cutanée (Vogt *et al.*, 2006). Cependant, lors d'une injection

intradermique, l'Ag est majoritairement pris en charge par les DDC, présentes au niveau du site d'injection (Bond *et al.*, 2009). Bien que plusieurs populations cellulaires soient capables de capturer des Ag (DC, LB, macrophages, KC), seules les DC peuvent assurer leur transport jusqu'aux ganglions lymphatiques drainants (dLN) afin de les présenter aux LT naïfs et induire une réponse immunitaire primaire.

❖ Migration des cellules dendritiques

Les DC une fois activées quittent la peau et migrent vers le paracortex des ganglions lymphatiques proximaux, *via* les canaux lymphatiques afférents (Figure 15). Des études de migration des DC suite à l'application d'un haptène naturellement fluorescent, le FITC (isothiocyanate fluorescéine), montrent que 12 à 48 heures après, des DC fluorescentes sont observées dans les ganglions drainants (Kripke *et al.*, 1990; Macatonia *et al.*, 1987, 1986) et se positionnent au niveau de la zone paracorticale, riche en LT. Au cours de leur migration, les DC évoluent du statut de cellules immatures capables de capturer l'Ag en CPA professionnelles, capables de stimuler les LT naïfs. Comme détaillé ci-dessus, cette maturation se traduit par un changement dans l'expression de certains marqueurs intra et extracellulaires (CMH-II), de molécules de co-stimulation (CD40, CD80 et CD86) ou de maturation (CD83), ainsi que dans la sécrétion de cytokines (IL-1 β , TNF- α).

Deux cytokines principales déclenchent la mobilisation des DC : le TNF- α et l'IL-1 β . La seule présence d'une de ces deux cytokines induit la migration des DC, malgré l'absence d'autre *stimulus* (Cumberbatch *et al.*, 1997). Par ailleurs, l'IL-1 β et le TNF- α participent à la diminution de l'expression de la E-cadhérine à la surface des LC, molécule d'adhésion qui permet leur interaction avec les KC et leur rétention dans l'épiderme (Tang *et al.*, 1993). En parallèle, l'expression de CCR7, récepteur des chimiokines CCL19 et CCL21, est augmentée (Jiang *et al.*, 2007). CCL-19 est produite par les zones T des dLN, et CCL21 est produite par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques et les cellules stromales. Ces deux chimiokines concourent donc à attirer les DC au niveau des dLN où elles vont pouvoir interagir avec des LT naïfs (Forster *et al.*, 1999). Le couple récepteur/ligand CCR7/CCL21 joue un rôle important dans la DCA puisqu'il a été montré que l'administration d'un anticorps anti-CCL21 au moment de la sensibilisation de souris au DNFB inhibe la HSC (Engeman *et al.*, 2000) et d'autre part, que des souris CCR7^{-/-} ne déclenchent pas d'HSC en réponse au FITC (Forster *et al.*, 1999). Les LT naïfs présents dans le sang circulent en permanence au niveau de cette zone ganglionnaire.

Les DDC migrent plus rapidement vers les ganglions drainants que les LC de l'épiderme, respectivement un à deux jours et quatre jours après l'application de l'haptène (Kamath *et al.*, 2002; Kissenpfennig *et al.*, 2005), suggérant un rôle important des DDC dans la sensibilisation. Les LC activées produisent également des enzymes protéolytiques MMP-2 et MMP-9, qui vont leur permettre de traverser l'épiderme et de dégrader le collagène du derme afin de faciliter la migration interstitielle des LC et des DDC vers les vaisseaux lymphatiques (Ratzinger *et al.*, 2002). Ce processus est dépendant de l'axe CXCL12-CXCR4. CXCR4 est un récepteur exprimé sur la DC, tandis que CXCL12 est produit par les fibroblastes pour permettre la migration des LC de l'épiderme jusqu'au derme (Ouwehand *et al.*, 2008). Cette étape supplémentaire pourrait expliquer que les LC arrivent aux dLN environ 48h à 72h après reconnaissance de l'Ag, tandis que les DDC arrivent précocement (environ 24h après) (Kissenpfennig *et al.*, 2005). Une fois dans les vaisseaux lymphatiques, les DC sont transportées par le flux de lymphes afférentes et arrivent au niveau du sinus sous-capsulaire du dLN. A l'intérieur du dLN, leur localisation sera déterminée par deux gradients distincts de chimiokines : CXCL13, synthétisée par les DC folliculaires, oriente les DC vers les follicules B, tandis que les fibroblastes réticulaires sécrètent CCL19/CCL21 orientant les DC vers le paracortex riche en LT (Forster *et al.*, 2012). Récemment, plusieurs nouveaux facteurs influençant la migration des DC et ainsi l'induction des réponses à l'HSC ont été rapportés, soulignant l'importance de la migration fonctionnelle des DC de la peau vers les ganglions lymphatiques. Le médiateur lipidique résolvine E1 qui dérive d'acides gras polyinsaturés ω_3 , intervient dans le blocage de la signalisation du leucotriène B₄ (LTB₄)-leucotriène B₄ récepteur (BLT1). De ce fait, il inhibe la polymérisation de l'actine de la DC, ce qui se traduit à la fois par une diminution de la motilité de la DC à l'état stable et dans des conditions inflammatoires où il exerce ses effets anti-inflammatoires (Sawada *et al.*, 2015).

Ainsi, suite à un contact avec un haptène, plus de 40% des DC deviennent actives (Richters *et al.*, 1994; Weinlich *et al.*, 1998), quittent l'épiderme et migrent *via* les vaisseaux lymphatiques afférents vers les ganglions lymphatiques drainant la zone de contact (Jakob *et al.*, 2001). Le profil des cytokines produites par les DC dans les ganglions drainants est en effet déterminant pour l'orientation de la réponse immunitaire. En particulier, une production d'IL-12 au niveau des ganglions, suite à l'application d'un allergène de contact a pu être mise en évidence (Dearman *et al.*, 1999; Warbrick *et al.*, 1999). Martin *et al.* (2008) a montré deux mécanismes possibles d'induction de la DCA : une voie de signalisation dépendante de l'IL-12 et une autre

indépendante, passant par les TLR 2/4 (Martin *et al.*, 2008). En effet, la DC mature est capable de produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, menant ainsi à la génération de Treg (Saei and Hadjati, 2013).

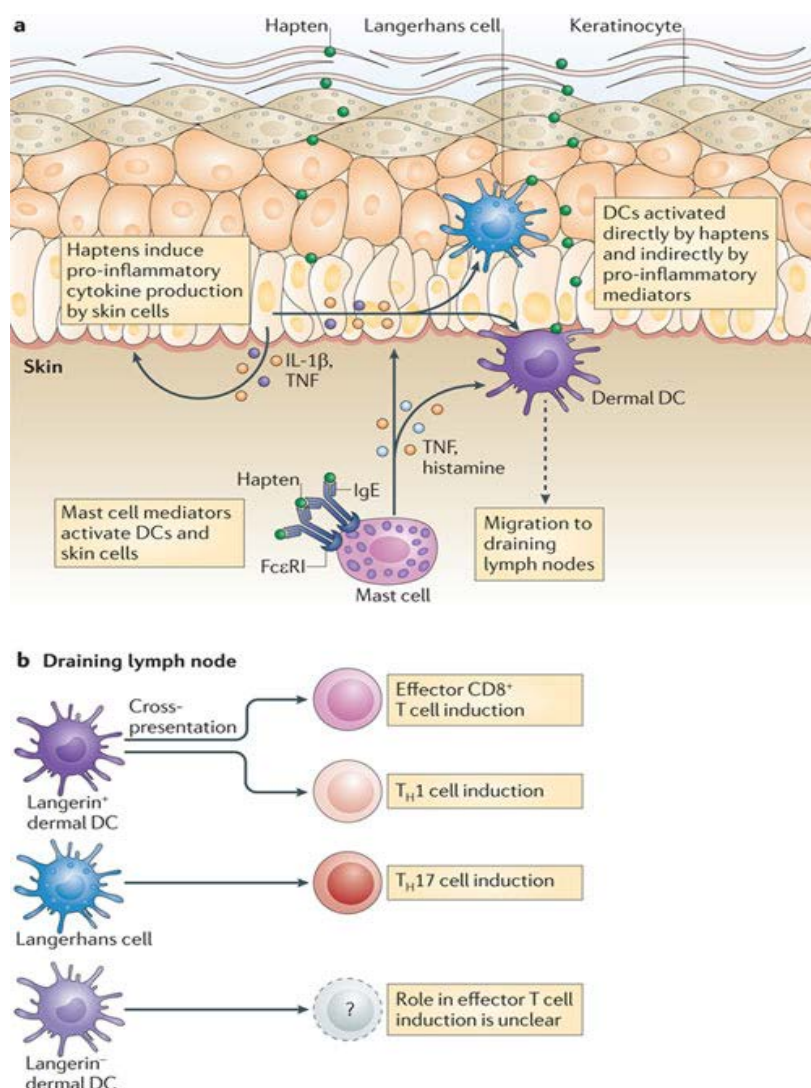


Figure 15 : Séquence d'événements après contact avec l'haptène (Kaplan *et al.*, 2012)

a | Bien que la séquence des événements qui se produisent peu après une rencontre avec un haptène ne soit pas complètement établie, il est clair que la plupart des cellules de la peau participent à la reconnaissance innée des haptènes. Les kératinocytes sécrètent un grand nombre de facteurs, y compris des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 β (IL-1 β) et le facteur de nécrose tumorale (TNF). De même, les mastocytes dans le derme sécrètent également de nombreux facteurs, y compris le TNF et l'histamine. Ces médiateurs pro-inflammatoires activent les cellules voisines, amplifiant ainsi la réponse immunitaire. Les cellules dendritiques (DC) ont également la capacité intrinsèque de détecter les haptènes, sécréter des cytokines pro-inflammatoires et participer probablement à l'escalade de la cascade inflammatoire. La détection directe de l'haptène combinée à un environnement inflammatoire provoque l'activation des cellules de Langerhans dans l'épiderme et des DC dans le derme, entraînant leur migration vers les dLN.

b | Dans le ganglion lymphatique, les DC migratrices présentent des antigènes acquis dans la peau à des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, naïfs et mémoires. Étant donné que l'importance relative des sous-ensembles DC résidant dans la peau lors de l'établissement de réponses immunitaires adaptatives spécifiques de l'haptène reste controversée, ce modèle est basé sur des données provenant d'infections cutanées. Les DC Langerine⁺ dermiques sont le seul sous-ensemble de DC dérivant de la peau spécialisé dans la présentation croisée d'antigènes aux lymphocytes T CD8⁺. Ces DC présentent également des antigènes aux cellules T CD4⁺ naïfs et favorisent la différenciation de ces cellules en cellules effectrices de type T helper 1 (Th1). La présentation des antigènes par les cellules de Langerhans aux cellules T CD4⁺ naïfs favorise la différenciation de ces cellules en cellules effectrices de type Th17.

❖ Présentation antigénique et activation des cellules T mémoires spécifiques de l'haptène

Une fois parvenues aux dLN, les DC matures ont la capacité d'induire une activation des LT spécifiques de l'haptène. Chez les individus non sensibilisés, la fréquence de contact entre l'allergène présenté par les DC matures et les LT naïfs spécifiques de l'allergène est très faible, au environ de 0,9% (Haig *et al.*, 1999; Rustemeyer *et al.*, 1999). Cependant, les LT naïfs séjournant préférentiellement dans l'aire para-corticale possèdent une large surface d'interaction, rendant fortement probable leur rencontre avec l'allergène et cela même avec seulement quelques DC matures présentant l'haptène complexé aux CMH (Crivellato *et al.*, 2004; Itano and Jenkins, 2003).

Selon sa nature, un antigène sera présenté aux LT différemment. En général, les Ag intracellulaires cytoplasmiques ou nucléaires seront présentés *via* le CMH-I aux LT CD8⁺, tandis que les Ag exogènes tels que les haptènes seront présentés par le CMH-II aux LT CD4⁺. Toutes les cellules nucléées expriment le CMH-I mais seules les CPA (macrophages, DC, LB), expriment constitutivement le CMH II.

En dehors de ces deux voies classiques de présentation des Ag, il existe une troisième voie : la présentation croisée, connue sous le terme de « cross-presentation ». Cette voie permet la présentation d'Ag exogènes *via* le CMH-I, ou la présentation d'Ag cytoplasmiques générés par autophagie par le CMH-II (Crotzer and Blum, 2010). La présentation croisée par le CMH-I joue un rôle important en permettant l'induction d'une réponse cytotoxique CD8⁺ antivirale contre les virus qui n'infectent pas directement les CPA. La présentation croisée par le CMH-I permet également de générer une réponse antitumorale lorsque les Ag ne sont pas exprimés au sein des CPA (Joffre *et al.*, 2012). Toutes les DC ne sont pas capables d'effectuer une présentation croisée : les DDC Langérine⁺ ont cette capacité, contrairement aux LC (Figure 15). Après l'application cutanée d'un haptène, celui-ci est pris en charge par les DDC et les LC. Les DDC Langérine⁺ et Langérine⁻ capturent l'haptène, migrent jusqu'aux dLN, mais seules les DDC Langérine⁺ sont requises pour effectuer une présentation croisée aux LT CD8⁺ et participer ainsi à l'induction d'une réponse LT cytotoxique (Wang *et al.*, 2008).

Après avoir capturé et endocyté l'haptène, acquies un phénotype mature et migré jusqu'aux ganglions drainants, les DC vont interagir avec les LT naïfs pour leur présenter l'haptène. Cette interaction est appelée synapse immunologique entre DC et LT.

Une combinaison de trois signaux distincts est nécessaire à l'activation des cellules T (Figure 16). Le premier signal est constitué par l'interaction entre le TCR et le CMH, le deuxième signal par l'interaction des molécules de costimulation et le troisième signal par la sécrétion de cytokines par la DC, nécessaires à la différenciation des LT naïfs vers une réponse T helper (Th) de type Th1, Th2, Th9, Th17, ou Th22.

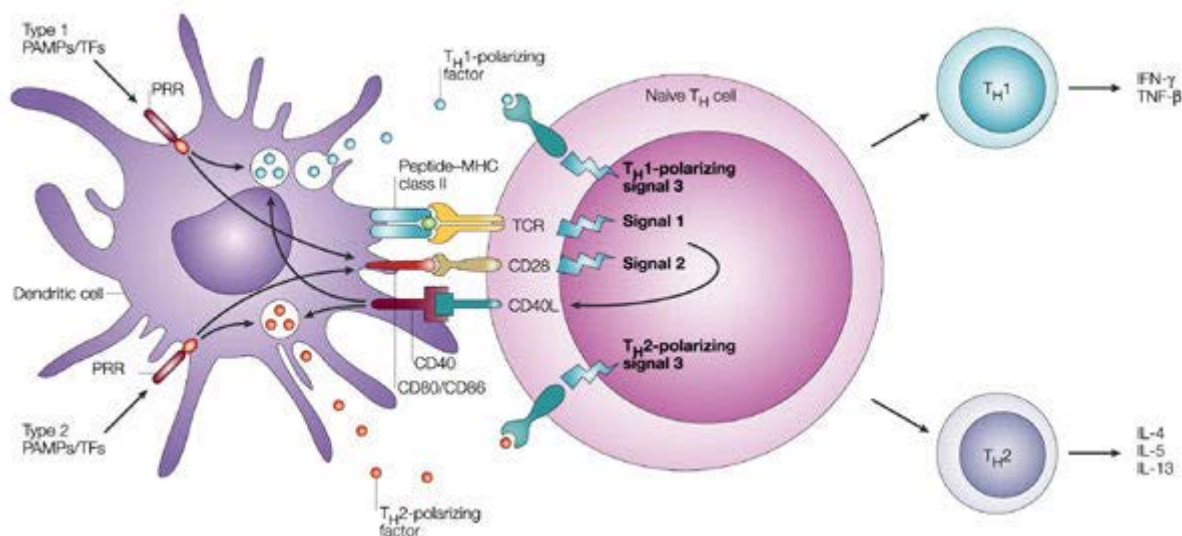


Figure 16 : La synapse immunologique entre la cellule dendritique et le lymphocyte T (Kapsenberg, 2003)

Le premier signal est donné par une interaction entre le CMH de la DC et la chaîne ξ du TCR du LT permettant la formation de la synapse immunologique. Ce signal de transduction se traduit par une cascade d'événements biochimiques, incluant la phosphorylation des protéines, l'augmentation cytosolique en Ca^{2+} (Cantrell, 1996; Gascoigne and Zal, 2004) et l'activation de facteurs de transcription permettant l'activation de gènes (Kuo and Leiden, 1999). Des études *in vitro* ont montré que les deux classes de CMH sont déterminantes dans la présentation de l'allergène (Kohler *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1992). L'activation des TCR par le complexe haptène-CMH I/II lors de ce premier signal est à lui seul suffisant pour activer les LT. L'interaction du CMH I/II (associé à l'haptène) avec le TCR entraîne la suractivation des DC qui vont sécréter des molécules de costimulation.

Ainsi, le deuxième signal d'activation est donné par les molécules de costimulation de la famille B-7 (CD86, CD80) et leurs ligands respectifs exprimés par les LT (CD28, CTLA4). La liaison de CD80/CD86 au CD28 est indispensable au développement de la DCA puisque des souris déficientes pour CD28 présentent une réaction au DNFB et à l'oxazolone diminuée (Kondo *et al.*, 1996). De plus, l'utilisation d'anticorps bloquants anti-CD86 a montré qu'en l'absence de CD86, l'activation des LT CD4^+ et CD8^+ est bloquée et la DCA ne se développe plus

(Xu *et al.*, 1997). D'autres couples de ligands/récepteurs participent à l'activation des LT : (TNF)/TNF-R; RANK/RANK-L (« Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B/Ligand ») et CD40/CD40L. Leurs interactions conduisent à l'augmentation d'Ox40-L sur les DC qui, en interagissant avec la molécule Ox40, exprimée par les LT, induit la surexpression de CD80 et CD86 et ainsi amplifie l'activation des LT. A l'inverse, pour éviter une activation excessive des LT, des signaux de rétrocontrôle négatif sont également délivrés lors de l'interaction DC-T. L'engagement des molécules CD80-CD86/CTLA et PDL1-PDL2/PD1 permet un contrôle de la réponse (non présenté dans la figure 16) (Greenwald *et al.*, 2005; Kim and Surh, 2006).

Un troisième signal déterminant dans la réponse immunitaire et son orientation vers une tolérance ou vers une réaction effectrice est l'équilibre de différents signaux (cytokines et médiateurs lipidiques) produits par les DC. Concernant les cytokines, le TGF- β différencie les cellules T en LT régulateurs (Treg) (produisant IL-10 et TGF- β), l'IL-12 différencie des cellules T naïves en LT de type Th1 (Th1 « LT helper » /Tc1 « LT cytotoxiques ») produisant de l'IFN- γ , IL-2 et TNF- α ; l'IL-4 conduit à des cellules de type 2 (produisant IL-4, IL-13 et IL-5) et l'IL-1 ou un cocktail d'IL-6/IL-21/IL-23 \pm TGF- β conduit à des cellules de type 17 (produisant IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22). Les principaux acteurs dans la DCA sont des LT CD8⁺ Tc1/Tc17 (Vocanson *et al.*, 2009) bien que les LT CD4⁺ Th1 /Th17 semblent également jouer un rôle (Kim *et al.*, 2016; Wakabayashi *et al.*, 2005). Suivant l'état d'activation des DC et les cytokines présentes dans le microenvironnement, un LT CD4⁺ naïf peut se différencier en LT helper (Th) Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 ou en T follicular helper T_{FH}, qui sécréteront à leur tour des cytokines spécifiques (Akdis *et al.*, 2012). L'ensemble des cytokines générant ces populations, leurs rôles ainsi que les cytokines sécrétées est résumé dans la figure 17.

La polarisation lymphocytaire de type 1 (Th1) est cruciale pour le développement de LT effecteurs spécifiques et une réaction d'HSC optimale.

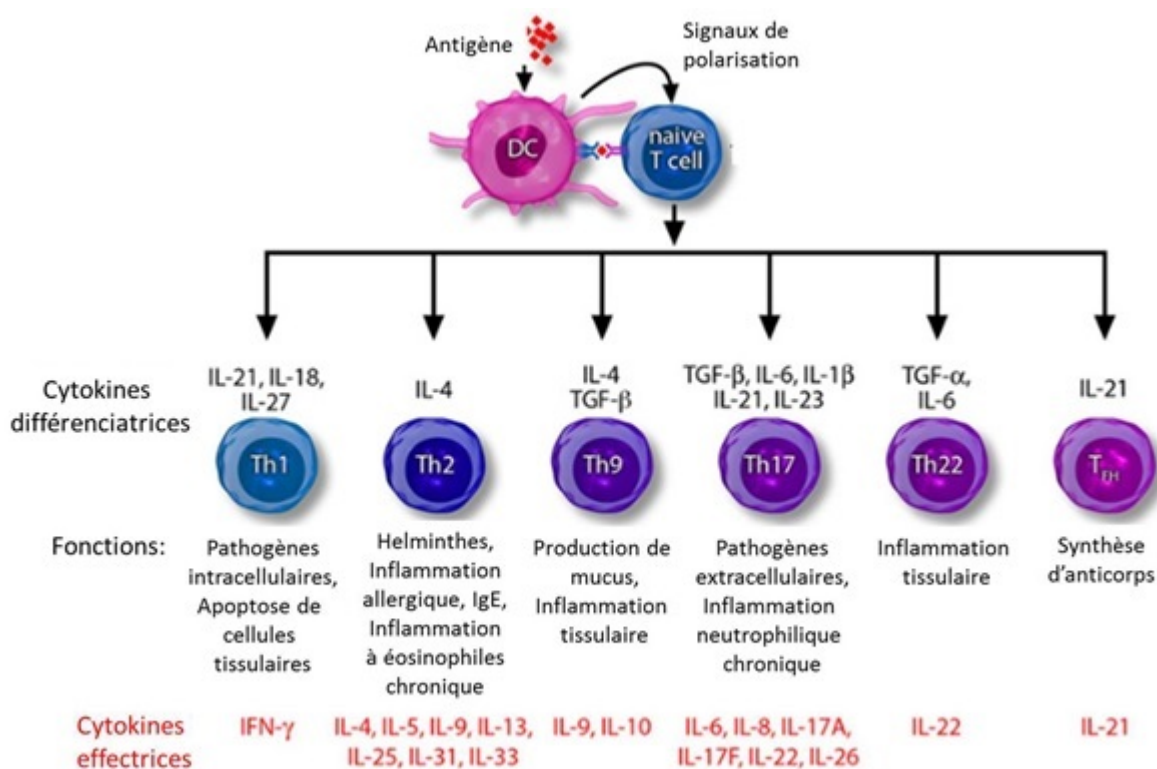


Figure 17 : Polarisation de la réponse lymphocytaire et différentes sous-populations de LT (Akdis *et al.*, 2012)

Tout comme les LT CD4⁺, les LT CD8⁺ peuvent être orientés selon la nature des cytokines présentes vers une polarisation Tc1 associée à une production d'IFN- γ , ou une polarisation Tc2, associée à la production d'IL-4 et d'IL-10 (Croft *et al.*, 1994). La quasi-totalité des haptènes testés dans les modèles expérimentaux a permis de mettre en évidence que la réponse inflammatoire cutanée est médiée par des cellules CD8⁺ Tc1 (Vocanson *et al.*, 2009). L'injection d'IL-12 pour induire une polarisation de type 1 au moment de la sensibilisation favorise la différenciation de LT CD8⁺ et augmente la réaction d'HSC (Gorbachev *et al.*, 2001). En revanche, l'utilisation d'IL-4 ou d'un anticorps monoclonal anti-IFN γ pour polariser une réponse LT de type 2 altère le priming des LT CD8⁺ et diminue la réaction d'HSC (Gorbachev *et al.*, 2001).

Il s'en suit une expansion clonale spécifique de l'allergène permettant la génération de deux principales populations : les LT CD8⁺ Tc1/Tc17 qui résident dans la peau et les LT CD4⁺ Th1/Th17 qui pénètrent dans la circulation sanguine (Freudenberg *et al.*, 2009; Kimber *et al.*, 2002; Vandebriel and Loveren, 2010; Vocanson *et al.*, 2009). Les LT ainsi activés quittent ensuite le nœud lymphatique *via* les canaux efférents, rejoignent le canal thoracique puis la circulation sanguine. Le sujet est désormais sensibilisé à l'haptène : lors d'une nouvelle

application, ces cellules pourront ainsi migrer vers les tissus et en particulier la peau. Leur migration dans le tissu cutané est facilitée par l'expression de molécules comme le Cutaneous Lymphocyte Antigen (CLA) qui permet aux LT de séjourner dans la peau. De plus, les LT sont également capables de revenir dans les ganglions lymphatiques *via* les vaisseaux lymphatiques afférents. Cette phase dure entre 10 et 15 jours et il n'y a pas de signe clinique visible à moins que la substance soit aussi irritante (Aiba, 2005; Casati *et al.*, 2005b; Cumberbatch *et al.*, 2003; Ryan *et al.*, 2005).

3.2.3.2 La phase d'élicitation

La phase d'élicitation, également appelée phase de révélation (ou de challenge) survient après une seconde exposition de l'hôte au même haptène (ou non, *via* une réaction croisée) que celui de la phase de sensibilisation et constitue l'expression clinique de la DCA. Cette phase symptomatique ou efférente est due à un infiltrat dermique et épidermique de diverses populations cellulaires dont des LT mémoires spécifiques de l'haptène.

Cette phase d'élicitation se déroule en trois étapes (Figure 18) : (1) le recrutement précoce des LT CD8⁺ effecteurs activés au cours de la sensibilisation environ 2h après réexposition à l'haptène, *via* l'activation de l'endothélium suite à l'inflammation cutanée induite par l'haptène, (2) la production subséquente de cytokines/chimiokines conduit à l'activation des cellules résidentes de la peau, engendrant la libération de nouveaux médiateurs de la réaction inflammatoire, (3) le recrutement des leucocytes, et tout particulièrement des neutrophiles, des macrophages et des LT, qui induisent progressivement les changements cliniques et morphologiques caractéristiques de la DCA (Honda *et al.*, 2013; Vocanson *et al.*, 2009).

La DCA nécessite un certain laps de temps pour se développer. En effet, la migration des LT spécifiques de l'allergène des vaisseaux du derme et la production locale de cytokines nécessitent plusieurs heures. Cette seconde phase va provoquer une mort cellulaire ainsi qu'une forte réaction inflammatoire aboutissant à l'apparition d'un eczéma de contact dans les 6 à 72 heures suivant l'exposition (contre 24 à 48 heures chez la souris). La phase d'élicitation avec ses différentes étapes est schématisée en Figure 18.

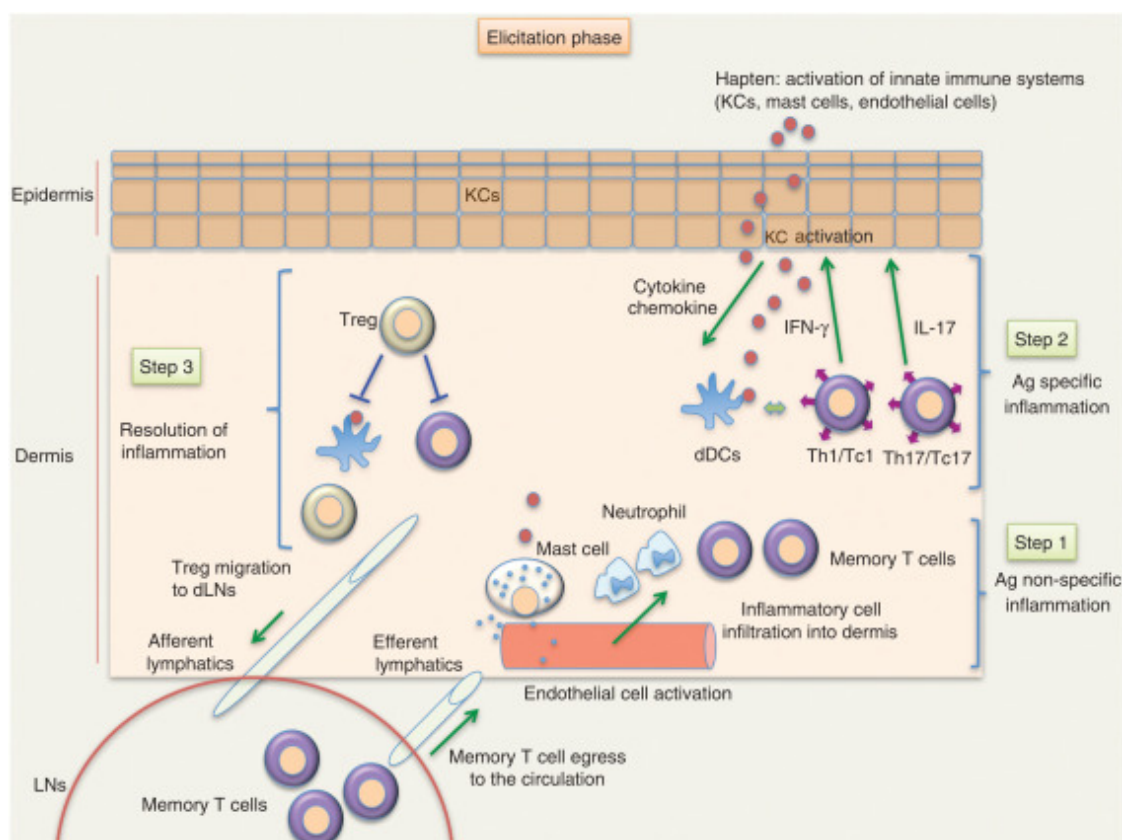


Figure 18 : Vue schématique des différentes étapes de la phase d'élicitation (Honda *et al.*, 2013)

Étape 1 : Après réexposition aux haptènes, les kératinocytes (KCs) et les mastocytes sont activés et produisent divers médiateurs chimiques, qui activent les cellules endothéliales et provoquent une infiltration cellulaire inflammatoire, comprenant notamment des cellules T spécifiques de l'antigène.

Étape 2 : Les lymphocytes T effecteurs spécifiques de l'antigène sont activés et infiltrés. Ils produisent des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines qui activent les KCs, induisant une infiltration cellulaire inflammatoire.

Étape 3 : En plus des LT effecteurs, les Tregs infiltrent le site de l'inflammation et exercent une fonction suppressive. Certains Tregs infiltrés reviennent au niveau des ganglions lymphatique (LNs) et peuvent contribuer à la résolution de l'inflammation.

❖ Inflammation et recrutement des cellules T

Plusieurs populations cellulaires vont intervenir lors de la phase de révélation et notamment les KC. En effet, il a été démontré que ces cellules sont capables de présenter les antigènes *via* leurs molécules de CMH de type I et II (Albanesi *et al.*, 2005; Nestle *et al.*, 2009). De plus, une fois activées par l'IFN- γ , les KC produisent des molécules de co-stimulation (CD80) et sont capables d'avoir la fonction de CPA et de faciliter l'activation des LT spécifiques de l'haptène (Casati *et al.*, 2005a; Gaspari, 1997). Par l'activation de leurs TLRs, les KC sont capables de produire un ensemble de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires qui vont permettre le recrutement des DC (Lebre *et al.*, 2007).

La liaison de l'haptène aux molécules et cellules de la peau (CPA ou KC) va induire, de la même façon que lors de la phase de sensibilisation, une libération de TNF- α et d'IL-1 β (Enk and Katz, 1992), suivie de la production de cytokines et chimiokines inflammatoires (CCL2, CCL5, CCL20,



CCL22, CCL17) qui induisent le recrutement des LT mémoires spécifiques de l'haptène du sang vers le derme et l'épiderme. Les LT activés produisent les cytokines spécifiques des Th1 et Th17 telles que l'IFN- γ , l'IL-12, l'IL-17 et l'IL-23 (Kimber *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2009). Les cytokines produites par les LT comme l'IFN- γ et l'IL-17 activent ensuite les cellules résidentes de la peau. Ces cellules activées sécrètent ensuite des cytokines et chimiokines, aux propriétés chimiotactiques, qui vont permettre le recrutement cellulaire au niveau du site d'exposition. L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans l'infiltration des leucocytes dans les tissus inflammatoires, mais également impliquée dans la production de diverses cytokines et chimiokines comme MCP-1, MIP-1 et l'IL-10 (He *et al.*, 2009). Les souris invalidées pour le gène codant pour *il-17* ou pour *ifn* ne développent pas d'HSC en réponse au DNFB et l'infiltrat de cellules inflammatoires (PN, LT CD8⁺) au niveau cutané est diminué (Kish *et al.*, 2009). L'IL-17 est produite en grande quantité par les LT CD8⁺. Les LT CD8⁺ producteur d'IL-17 et les LT CD8⁺ producteur d'IFN- γ sont deux sous-populations bien distinctes. L'IL-17 et l'IFN- γ sont nécessaires pour la phase de révélation de la DCA mais agissent par des mécanismes différents (He *et al.*, 2009). De plus, d'autres cellules (basophiles, mastocytes et éosinophiles) impliquées dans le développement de l'inflammation sont recrutées grâce à leur récepteur chemoattractant (CCR3, CCR4, CCR8). Le recrutement continu de cellules circulantes engendre une infiltration cutanée cellulaire et la persistance de l'inflammation pendant plusieurs jours. Dans un premier temps, ce sont les LT effecteurs CD8⁺ de type 1 qui sont recrutés, suivis des autres populations régulatrices (Akiba *et al.*, 2002). Askenase *et al.* (2008) ont également rapporté une contribution des lymphocytes B et des cellules NKT au recrutement des LT effecteurs (T_{EFF}) sur le site du challenge (Campos *et al.*, 2006; Kerfoot *et al.*, 2008). Une fois les LT recrutés dans la peau, ces derniers reconnaissent le complexe haptène-protéine présenté par les cellules cutanées, *via* les molécules du CMH de classes I et II. L'engagement du TCR des cellules T induit la libération d'IFN- γ et de TNF- α activant la production par la peau d'un certain nombre de cytokines/chimiokines (IL-1, TNF- α , IL-6, GM-CSF, CXCL10, CXCL11, CXCL9, CCL17, CCL18) qui amplifient la réponse inflammatoire initiée par l'haptène, et aboutit à une infiltration massive de leucocytes (neutrophiles polynucléaires, monocytes inflammatoires capables de se différencier en macrophages et dendritiques, cellules T...). Les LT de type 17 contribuent également activement et en synergie avec l'IFN- γ et le TNF- α à la production de cytokines inflammatoires par les KC (Albanesi *et al.*, 1999). En effet, un nombre important de LT produisant de l'IL-17 a pu être détecté chez des patients allergiques (Albanesi *et al.*, 2000,

1999). De plus, des souris déficientes pour cette cytokine montrent une HSC diminuée (Nakae *et al.*, 2002) et la neutralisation de la sécrétion d'IL-17 par les LT CD8⁺ lors de la phase d'élicitation inhibe la HSC chez la souris (He *et al.*, 2006). Toutefois, les mêmes observations ont pu être faites pour des souris déficientes en IFN- γ ou pour son récepteur (Wakabayashi *et al.*, 2005).

❖ **Activité cytotoxique des LT CD8⁺**

La libération d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-17 par les LT CD8⁺ n'est cependant pas suffisante pour le développement complet de la réaction de DCA. En effet, l'activité cytotoxique des LT CD8⁺, événement majeur du processus, est indispensable, puisqu'il a été montré que des souris déficientes pour les deux voies de signalisation Fas/Fas-L (Apoptosis Stimulating Fragment, ou fragment inducteur d'apoptose) et pour la perforine sont incapables de développer une HSC même si de l'IFN- γ est produit (Kehren *et al.*, 1999). Les LT CD8⁺ vont être différenciés en LT cytotoxiques (CTL) libérant de la perforine, protéine cytolytique qui va former des pores dans les cellules cibles, ainsi que des granzymes, sérine-protéases qui rentrent par les pores générés par la perforine, entraînant ainsi l'apoptose des cellules cibles. Des études ont montré que les LT effecteurs de la DCA correspondent aux cellules Tc1 CD8⁺ produisant de l'IFN- γ , responsable de l'apoptose des KC *via* le mécanisme de cytotoxicité direct (libération des granules cytolytiques) (Xu *et al.*, 1996). En effet, l'apoptose des KC est concomitante avec l'arrivée des LT CD8⁺ dans l'épiderme, et augmente proportionnellement avec le nombre de LT CD8⁺ infiltrés (Akiba *et al.*, 2002). Parallèlement, les LT CD4⁺ sont différenciés en cellules Th1 et vont également produire de l'IFN- γ , du TNF- α ainsi que de l'IL-2 (Kaech and Cui, 2012). Les lymphocytes T CD8⁺ participent donc avec les cellules de l'immunité innée à la destruction des cellules portant l'Ag grâce à des facteurs solubles (perforine/granzyme/granulyzine) ou membranaires (Fas/Fas ligand). La libération de perforine est également associée à la production des médiateurs CCL5/RANTES (« Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted »), MIP-1 α (« Macrophage Inflammatory Protein ») et MIP-1 β qui viennent amplifier le recrutement des monocytes et granulocytes exprimant les récepteurs CCR1 et CCR5. Tous ces facteurs et cellules migrent vers la surface de la peau et entraînent une réaction inflammatoire dont le pic d'inflammation est situé généralement entre 24 à 48 heures après le contact avec l'allergène. Les modifications histologiques et cliniques de la réaction allergique sont apparentes. Les lésions d'eczéma s'installent et peuvent durer de

plusieurs jours à plusieurs mois en fonction de la persistance de l'antigène au niveau cutané et de la mise en place de mécanismes de régulation anti-inflammatoires. Il s'engage peu à peu ensuite une phase de résolution grâce à un mécanisme de rétrocontrôle négatif, limitant les dommages tissulaires et rétablissant l'intégrité de la peau.

❖ La résolution de la DCA et le rôle des T régulateurs

La réponse inflammatoire atteint son maximum 24h à 48h après la réexposition à l'haptène. La résolution de la phase inflammatoire est alors médiée par le recrutement de différentes cellules telles que les LT régulateurs CD4⁺. A l'état d'homéostasie et en l'absence d'Ag exogène, les DC induisent la prolifération de Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127⁻, maintenant ainsi une tolérance immunitaire cutanée (Seneschal *et al.*, 2012). Les Treg sont caractérisés par l'expression du CD25, du facteur de transcription Forkhead box P3 (FoxP3), de l'antigène lymphocytaire cutané CLA et du récepteur CCR4. L'expression de FoxP3 est requise pour le maintien des fonctions suppressives des Treg. Les Treg sont particulièrement induits dans le thymus où l'expression de FoxP3 est initiée par la combinaison de la reconnaissance antigénique et du microenvironnement (Liston and Gray, 2014). Cependant les Treg peuvent être différenciés à la périphérie, à partir de Treg FoxP3⁻ émigrants. Ainsi, au cours de l'inflammation, les Treg sont capables de proliférer *in situ* en présence de l'IL-15 sécrétée par les fibroblastes dermiques activés par le TNF- α . Cette cytokine peut aussi être produite par les KC durant une inflammation chronique (Clark and Kupper, 2007).

Les Treg peuvent être divisés en trois sous-populations. Parmi elles, les Treg centraux ou Treg naïfs, sont présents dans la circulation et les organes lymphoïdes secondaires. Ces cellules sont décrites comme ayant un phénotype CD62L^{high}CCR7⁺ ou CD45RA^{high}CD25^{low}.

Les Treg effecteurs ou Treg activés ont été en contact avec un Ag et sont présents à court terme dans la plupart des organes non-lymphoïdes. Ils sont caractérisés par un phénotype CD62L^{low}CCR7^{low}CD44^{high}CD103⁺KLRG1⁺ (killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1-positive) ou CD45RA^{low}CD25^{high}. Ils ont activé des Treg résidant dans les tissus et ont par ailleurs une capacité migratoire importante.

Enfin, les Treg résidant dans les tissus sont les Treg qui ont rencontré l'Ag et qui résident à long terme dans les tissus non-lymphoïdes, contrairement aux Treg effecteurs. Chaque tissu abrite une population de Treg résidents distincte. Les Treg jouent un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire.

Les LT CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ représentent 5 à 10% des LT CD4⁺ chez l'Homme et la souris. Ils sont impliqués tant dans la tolérance aux auto-Ag que dans le contrôle des réponses immunitaires contre les pathogènes, les alloAg et les allergènes (S. Sakaguchi *et al.*, 2006). Ces LT sont divisés en deux familles : les Treg naturels (nTreg) se développant dans le thymus, et les Treg inductibles iTreg, différenciés à partir de LT naïfs en présence de TGF- β se développant en périphérie.

Une étude réalisée sur des souris transgéniques FoxP3 exprimant les protéines chimériques CD2 et CD52 humaines a mis en avant l'existence de LT CD4⁺ FoxP3⁺ mémoires et naïfs à l'état basal au niveau cutané. Au cours d'une réaction d'HSC, ces Treg migrent jusqu'aux dLN puis regagnent la peau pour y réguler localement l'inflammation (Tomura *et al.*, 2010). Les LT CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ sont décrits comme étant la première ligne de contrôle de la DCA. En effet, la déplétion *in vivo* de ces cellules chez la souris par un traitement avec un mAb anti-CD25, au moment de la sensibilisation avec du DNFB, conduit à une augmentation de l'activation des LT CD8⁺ et une augmentation de la réaction d'HSC (Kish *et al.*, 2005). L'IL-2, sécrétée essentiellement par les LT CD8⁺ spécifiques de l'haptène dans les dLN durant la phase de sensibilisation, serait requise pour la régulation des T_{EFF} par les LT CD4⁺ CD25⁺ (Kish *et al.*, 2005). Le traitement de souris par de l'IL-2 conduit à une diminution de la réaction d'HSC en réponse au DNFB et une augmentation de la population de LT CD4⁺ CD25⁺ (Ruckert *et al.*, 2002). Il semblerait que les Treg CD4⁺ CD25⁺ suppriment la réaction d'HSC en bloquant l'influx de T_{EFF} dans les tissus inflammés (Ring *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'injection de Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 2h avant de sensibiliser des souris au TNCB supprime la réaction d'HSC en régulant la réponse effectrice CD8⁺ (Ring *et al.*, 2006). Récemment, Vocanson *et al.* ont identifié une nouvelle population de Treg qui exprime le marqueur ICOS : CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ICOS⁺, aux propriétés hautement suppressives, impliquée dans le contrôle de la réaction inflammatoire en réponse au DNFB. Lors de la phase de sensibilisation, ces Treg inhibent la prolifération des LT CD8⁺ spécifiques de l'haptène au sein des dLN. Cette population de Treg exprime fortement le facteur de transcription FoxP3 et CTLA-4 (molécule inhibitrice) et produit de l'IL-10, l'IL-17 et de l'IFN- γ (Vocanson *et al.*, 2010). L'expression de FoxP3 est requise pour le maintien des fonctions suppressives des Treg. Enfin, les Treg peuvent également interagir dans les dLN avec les DC *via* des « gap junctions », inhibant ainsi l'interaction des DC avec les LT CD8⁺ (Ring *et al.*, 2010). Enfin, chez l'Homme, Cavani *et al.* ont démontré que les LT CD4⁺CD25⁺ isolés de patients allergiques au nickel ont une capacité

limitée à réguler les LT spécifiques du nickel, contrairement aux LT CD4⁺CD25⁺ isolés d'individus sains (Cavani *et al.*, 2003). Ceci suggère que les individus qui développent une DCA ont une fonction Treg défectueuse.

Bien que les NKT représentent un faible taux des LT totaux (1 à 2% dans la rate de la souris et 0,01 à 2% dans le sang périphérique humain), ils sont décrits comme régulateurs négatifs de la DCA. Ils interagissent avec les CPA exprimant le CD1d, présentant préférentiellement les glycolipides aux NKT. L'exposition de LC murines aux UVB induit une augmentation de l'expression de CD1d à leur surface. Les LC CD1d⁺ assurent le transport des Ag cutanés jusqu'aux dLN, où elles activent les NKT qui vont dès lors sécréter de l'IL-4, aux propriétés anti-inflammatoires (Fukunaga *et al.*, 2010).

Les LT ne sont pas les seules cellules régulatrices de l'HSC : les LB régulateurs (Breg) sont également décrits comme pouvant intervenir durant la phase d'élicitation dans le contrôle de la DCA. Les Breg sont identifiés par leur expression CD1^{high}CD5⁺CD19 (Bouaziz *et al.*, 2008). Ils représentent 1% à 2% des cellules B220⁺ présentes au niveau de la rate (Yanaba *et al.*, 2008). La fonction régulatrice des Breg est surtout due à leur forte production d'IL-10 d'où leur nom de B10. Ainsi, les souris déficientes en LB, les souris (*cd19*^{-/-}) montrent une exacerbation de la réaction d'HSC en réponse au DNFB. Le transfert de Breg, isolés à partir de souris sauvages sensibilisées par le DNFB, chez des souris *cd19*^{-/-} normalise la réaction inflammatoire d'origine allergique (R. Watanabe *et al.*, 2007).

Ainsi nous venons de voir que la DCA est une pathologie complexe qui se situe dans différents compartiments (peau, ganglions) et qui fait intervenir un nombre important d'acteurs cellulaires et moléculaires. Dans la suite de cette partie introductive, nous allons nous intéresser à décrire les aspects cliniques de son diagnostic ainsi que les tests réglementaires utilisés chez l'homme ou anciennement chez l'animal pour prédire le potentiel allergisant des molécules.

3.3 Aspects cliniques de la dermatite de contact allergique

La DCA est la forme d'immunotoxicité ayant la prévalence la plus importante chez l'homme caractérisée par des manifestations cliniques telles que les éruptions cutanées, les démangeaisons ou bien encore des vésicules (van der Veen *et al.*, 2011). Chez des patients sensibilisés, la DCA survient 24 à 96 heures après le contact avec l'haptène. Sa localisation initiale est le site du contact (Krasteva *et al.*, 1999). Sur le plan histologique, l'événement le plus commun de la phase aiguë de l'eczéma de contact est la spongiose épidermique, qui résulte d'un oedème intracellulaire. Des vésicules se forment pouvant rompre la surface épidermique, les vaisseaux papillaires du derme sont dilatés, entourés d'infiltrats lymphomonocytaires, constitués essentiellement de lymphocytes, de macrophages et de PN éosinophiles et neutrophiles (Komura *et al.*, 1980). Quelques jours après l'application de l'haptène, les vésicules intercellulaires se rompent, provoquant un suintement épidermique. Les KC sont vacuolisés présentant des noyaux pycnotiques et leur différenciation altérée aboutit à la formation des squames. Les bords de la lésion peuvent être bien limités mais, à l'inverse de la DCI, elle peut se propager autour, voire à distance. Dans sa phase aiguë, la DCA se présente cliniquement par un érythème et un œdème suivi par l'apparition de papules, de nombreuses vésicules, d'un suintement puis de croûtes. Dans sa phase chronique, la peau devient lichénifiée, fissurée et pigmentée mais de nouveaux épisodes de vésiculation, suintements et croûtes peuvent survenir en raison de nouvelles expositions avec l'haptène (Saint-Mezard *et al.*, 2004). La DCA est généralement associée à un prurit intense (Nosbaum *et al.*, 2009) (Figure 19).



Figure 19 : Lésions de la dermatite de contact allergique (Usatine and Riojas, 2010)

(A) (B) (C) (D) : allergie au nickel contenu dans un piercing (A) dans une boucle d'oreille (B) et dans une ceinture (C, D)

3.4 Traitement de la dermatite de contact allergique

La prise en charge des maladies allergiques est globale. Néanmoins, elle débute par l'éviction des allergènes mis en évidence par les tests d'allergie, lorsque cela est possible. Cette mesure d'éviction est associée à des traitements médicamenteux (anti-inflammatoires en topique généralement) ainsi qu'à des mesures éducatives pour éviter les récurrences et les crises d'allergie. Le traitement consiste à appliquer d'abord des corticoïdes par voie topique tels que la bétaméthasone (pommade ou gel) deux fois par jour pendant deux semaines durant la phase suintante et lorsque celle-ci est achevée, le patient peut appliquer sur les lésions un émollissant gras (Cold Cream ou Cerat frais). L'application de produits topiques d'hygiène courants doit être interrompue, seule la vaseline peut être utilisée sur les zones cutanées sèches (Habif *et al.*, 2012). En cas d'aggravation de la DCA par surinfection, le médecin prescrira des corticoïdes par voie orale tels que la dexaméthasone durant 3 à 7 jours. La surinfection cutanée sera traitée par antibiothérapie générale dirigée essentiellement contre le *staphylococcus aureus* (pristinamycine [Pyostacine] ou Amoxicilline + Acide Clavulanique [Augmentin]) (Saint-Mezard *et al.*, 2004).

4. Méthodes d'évaluation *in vivo* de la sensibilisation cutanée

4.1 Les tests chez l'homme

Plusieurs tests de sensibilisation peuvent être réalisés chez l'homme. Ils varient en fonction du nombre d'application du patch et de la localisation.

4.1.1 Tests cliniques

Compte tenu des similitudes parfois entre irritation et allergie au niveau clinique, histologique, cellulaire et moléculaire, la seule possibilité de différencier formellement les deux types d'inflammation est de se baser sur les différences physiopathologiques (Nosbaum *et al.*, 2009). Le diagnostic de la DCA repose sur deux méthodes différentes : les tests cutanés dont la positivité est pour beaucoup synonyme d'allergie de contact (Saint-Mezard *et al.*, 2004) et les tests immunologiques mettant en évidence l'existence de LT spécifiques de l'allergène de contact, dans la peau ou le sang des patients. Il existe plusieurs tests afin d'identifier la molécule responsable de la DCA : les patch-tests et les tests d'application ouvert itératif (ROAT : Repeated Open Patch Test). Nous présenterons aussi succinctement le test du prick-test utilisé pour investiguer une hypersensibilité immédiate.

❖ **Le diagnostic**

Le diagnostic de la DCA repose sur les signes cliniques mais également sur l'historique personnel du patient. L'allergie est diagnostiquée par un médecin allergologue. Au-delà du diagnostic, le médecin identifiera l'allergène responsable de l'allergie. La seule preuve scientifique d'atteinte de DCA est la conduite de tests épicutanés réalisés et interprétés correctement. Les tests épicutanés visant à diagnostiquer la DCA doivent être conduits après l'analyse et la documentation complètes des substances chimiques possibles. Les tests épicutanés sont utiles uniquement s'ils portent sur les agents auxquels le patient est exposé dans son environnement.

La visite commence par un interrogatoire minutieux, visant à détailler les symptômes, les circonstances déclenchantes, les antécédents du patient et de sa famille, son environnement (condition de vie habituelle et occasionnelle, école et loisirs, exposition aux animaux domestiques, tabagisme passif) et ses habitudes de vie. La prise de médicaments, l'utilisation de produits cosmétiques, l'exposition professionnelle, ainsi que la chronologie des symptômes cliniques sont précisément renseignés. L'examen se poursuit par un examen clinique, en

particulier des poumons (écoute des sifflements), des yeux (conjonctivite, eczéma sur la paupière), du nez (aspect et couleur de la muqueuse, présence de polypes, état de l'obstruction) et de la peau. Lorsque la suspicion d'allergie est confirmée par l'interrogatoire et l'examen clinique, le médecin allergologue procède à des tests cutanés qui peuvent être soit la méthode des prick-tests ou la méthode des patch tests.

Le prick-test est utilisé pour mettre en évidence une hypersensibilité de type I ou immédiate et le patch test pour l'hypersensibilité de type IV ou retardée. Les allergènes suspectés pour le prick test peuvent être protéiques ou médicamenteux. Le prick-test est le plus souvent effectué sur la face interne de l'avant-bras (parfois dans le dos chez le nourrisson). Il consiste à piquer l'épiderme, à l'aide d'aiguilles spécifiques, *via* une goutte d'extrait allergénique préalablement déposée sur la peau. Outre les allergènes à tester, le médecin dépose une goutte d'une solution « témoin négatif » (simple solution à la glycérine) et une goutte « témoin positif » (histamine et/ou codéine). Aucune réaction ne doit se produire au niveau du témoin négatif : il permet d'écartier une allergie de frottement (dermographisme). En revanche, une réaction locale doit s'observer au niveau du témoin positif : il permet de s'assurer que le patient n'est pas ou plus sous l'effet de médicaments antiallergiques. La dernière étape du diagnostic passe par des tests de provocation. Ils permettent d'apporter la preuve d'un lien direct entre une sensibilisation et la pathologie observée, si les résultats des tests cutanés sont peu probants ou impossibles à effectuer. Les prick tests sont utilisés pour explorer toutes les manifestations atopiques (asthme rhinite ou conjonctivite allergiques, dermatite atopique, allergie alimentaire), les allergies aux latex mais aussi les urticaires avec leurs formes plus graves comme l'angioedème et le choc anaphylactique.

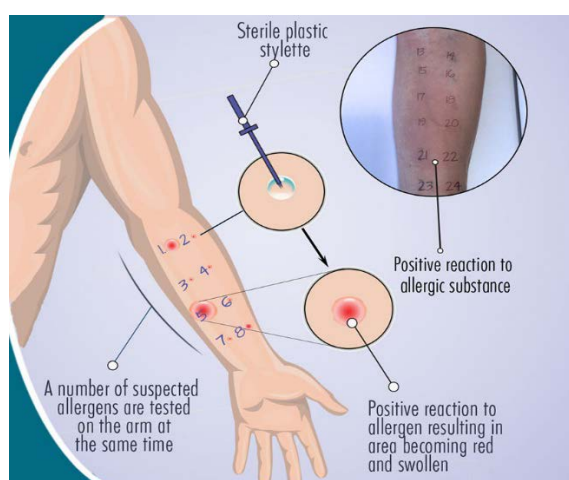


Figure 20 : Principe du prick-test

❖ Description de la technique des tests épicutanés ou « Patch tests »

Les patch tests sont utilisés pour explorer les hypersensibilités retardées cutanées médiées par les cellules dendritiques et les cellules T spécifiques d'antigène non protéique. Leur utilisation principale est l'exploration de la DCA. Le principe des patch tests est la ré-exposition de la peau à la (aux) molécule(s) que l'on suspecte comme étant en cause dans la DCA. Ils sont appliqués en occlusif sur une zone limitée, en général le haut du dos. Les conditions du patch test sont standardisées afin de pouvoir avoir des résultats comparables entre les différents dermatologues (Lachapelle *et al.*, 1997). La plupart des allergènes utilisés dans les patch tests sont bien caractérisés, en général il s'agit de la batterie standard européenne regroupant les 27 substances les plus fréquemment en cause. De nombreuses batteries spécialisées existent et permettent de proposer un bilan adapté aux expositions chimiques auxquelles est confronté le patient professionnellement ou dans sa vie privée. Après 48h d'application, la sévérité de l'érythème, de l'œdème, de la présence d'infiltrations, de papules et de vésicules est appréciée et notée 20min et 24h après le retrait du patch (Figure 21).

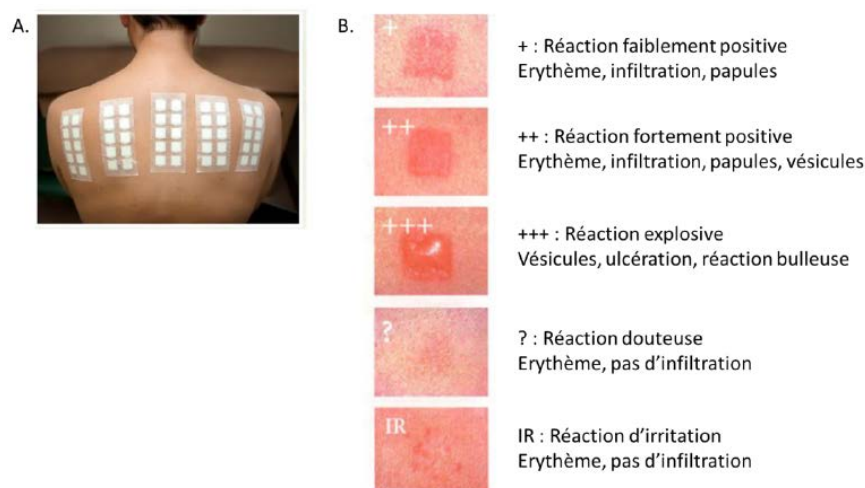


Figure 21 : (A) Patch tests et (B) interprétation du patch test

Les tests épicutanés ou patch tests nécessitent l'emploi de petites cupules en plastique ou en aluminium. Une petite bandelette de 0,5 cm imbibée de préparation d'allergène dans la vaseline, l'eau ou l'alcool est appliquée sur la cupule. Ces cupules sont conditionnées en bandelettes ou plaques adhésives. Les bandelettes sont posées sur le dos propre du patient, sous occlusion, pendant 24h à 48h. Bien que les concentrations des produits chimiques dans les patch tests soient standardisées et théoriquement non irritantes, les réactions d'irritation sont fréquentes. La pose concomitante aux patch tests d'intérêt, d'un ou de plusieurs patch

tests de chimiques irritants non allergiques (comme le Sodium Lauryl Sulfate, SLS) permet de détecter des patients à la peau particulièrement irritable et représente donc un témoin positif d'irritation (Nosbaum *et al.*, 2009). Ils sont retirés après 48h afin de procéder à une lecture préliminaire et d'en enregistrer les résultats. La lecture finale ou différée est essentielle à l'interprétation des tests. Elle est généralement effectuée après 96h ou 120h. Si la lecture n'est effectuée uniquement qu'à 48h, les résultats des tests épicutanés ne seront pas valides et ne pourront être interprétés correctement. En effet, la DCA étant une réaction d'hypersensibilité retardée, celle-ci doit faire l'objet d'une lecture différée afin de valider les résultats des tests. Il est à noter que les tests épicutanés ne doivent pas être administrés sur le dos d'un patient présentant des signes cliniques de DCA afin d'éviter les difficultés de lecture. Ainsi, la conduite des tests épicutanés peut parfois être difficile, puisque de nombreux patients souffrent de dermatite chronique. La dermatite doit être éliminée avant de procéder aux tests, soit par un congé de travail ou la prise de prednisone (corticostéroïde) à action systémique. Les bandelettes de test doivent demeurer sèches pendant toute la période de 96h ou 120h, ce qui est souvent difficile en raison de la transpiration.

4.1.2 Repeated Open Application Test

En cas de test négatif avec un allergène faible et non irritant en patch test, il peut être nécessaire de faire un test d'application ouvert et répété ou repeated open application test (ROAT). Celui-ci consiste à appliquer matin et soir sur le pli du coude et l'avant-bras, sans occlusion, sur une surface de 3 cm x 3 ou pour certains autres auteurs 5 cm x 5, le produit durant 7 à 10 jours. Le patient allergique développera en quelques jours une DCA au niveau du site d'application. Ce test peut, lui aussi, être faussement négatif, il faut alors avoir recours au test d'usage à savoir l'application du cosmétique mis en cause selon les conditions d'usage habituel et sur la zone cutanée sur laquelle il est habituellement appliqué. Les tests d'usage sont les seuls tests dont la pertinence est excellente. Les réactions d'irritation sont très limitées par rapport aux patch tests mais ils seraient cependant moins sensibles que ces derniers (Nosbaum *et al.*, 2010). Le ROAT peut aussi être utilisé pour vérifier qu'un antigène causant un patch test positif conduira à une DCA lorsqu'il est présent à la concentration d'usage dans le produit fini (Mowad *et al.*, 2016).

Hormis l'utilisation du patch test par le patient allergique qui souhaite investiguer et identifier

l'allergène responsable de sa DCA, un ensemble de tests sont utilisés afin de valider l'absence de réactions allergiques ou irritantes d'un produit fini avant sa mise sur le marché. Ils sont réalisés sur un panel de volontaires sains et sont utilisés par les industriels. Ils sont employés soit dans le cadre du développement d'un produit pour prédire ou déterminer l'absence de potentiel sensibilisant cutané d'une substance ou d'un produit cosmétique, soit dans le cadre d'un contrôle final de sécurité avant la mise sur le marché d'un produit cosmétique en vue de confirmer son absence de potentiel sensibilisant cutané. L'exposition volontaire de l'homme à des substances chimiques, afin d'en déterminer le potentiel de sensibilisation, n'est en effet plus acceptable. Néanmoins, la mise en place d'un test clinique final de sécurité (TCFS) chez l'Homme, afin de confirmer en tout dernier ressort l'innocuité d'un produit cosmétique, est envisageable. Cette exposition volontaire ne peut se faire que si un processus préalable d'évaluation du risque a été conduit en accord avec les normes actuelles de la toxicologie. Il s'agit notamment d'évaluer individuellement les différentes substances du produit (données toxicologiques, données physico-chimiques, taux de pureté, taux d'impureté, type d'impureté, stabilité, qualité, données bibliographiques...), de déterminer, dans la mesure du possible, des valeurs toxicologiques de référence, puis de mener une évaluation quantitative du risque prenant en compte le potentiel, l'exposition et les différents facteurs de sécurité (ANSM, 2008).

Différentes méthodologies de patch tests existent et sont présentées dans le Tableau 3.

- Schwartz et Peck : 1949
 - Draize : 1944/1959
 - Shelanski et Shelanski : 1957
 - Marzulli et Maibach : 1973 – 1980
 - Kligman ou test de maximalisation : 1966
- } HRIPT (Human Repeated Insult Patch Test)

Test	Nb volontaires	Site d'induction	Nb applications	Durée (h)	Fréquence	Repos (j)
Schwartz-Peck	200	Bras	1	24-72-96	-	10-14
Draize	200	Bras ou dos	10	24	3 / semaine	10-14
Draize modifié	200	Dos	10	48	Continu	14
Shelanski-Shelanski	200	Bras	15	24	3 / semaine	14-21
Marzulli-Maibach	50-100	Bras	10	48-72	3 / semaine	14
Kligman (maximalisation)	25	Avant-bras (+SLS)	5	48	3 / semaine	14

Tableau 3 : Comparaison des différentes méthodes de patch tests

4.1.3 Human Maximization Test

Le test de maximalisation ou Human Maximization Test (HMT) est un test qui a été développé par Albert Kligman en 1966. Il inclut 5 applications de patchs sous occlusion pendant 48h au niveau du même site de la peau avec une interruption de 24h entre les applications successives. Les substances ayant un potentiel irritant sont appliquées à une concentration induisant un érythème modéré. Pour les substances non irritantes, la surface de la peau exposée est prétraitée pendant 24h par un patch de SLS à 5% en occlusif. Après une période de latence de 2 semaines après la dernière induction, la phase d'élicitation est évaluée à la suite de l'application d'un patch occlusif de la substance à tester à une concentration maximale n'induisant pas d'irritation pendant 48h. L'indice de sensibilisation est relevé après 24 et 48h. Le test HMT peut cependant produire des effets néfastes graves sur la peau. Pour cette raison, il est considéré aujourd'hui comme non-acceptable (Kligman, 1966; Kligman and Epstein, 1975).

4.1.4 Human Repeated Insult Patch Test

L'objectif principal de cet essai clinique est de confirmer que l'application réitérée d'un produit cosmétique dans des conditions d'utilisation maximalisées, chez des volontaires sains, n'entraîne pas de réactions d'allergie de contact retardée. Les objectifs secondaires sont d'évaluer la compatibilité cutanée (irritation) du produit d'une part après application cutanée unique et d'autre part après utilisation réitérée (ANSM, 2008). Le test Human Repeated Insult Patch Test (HRIPT) ou Test Clinique Final de Sécurité (ANSM, 2008) a été mis en place par Draize en 1944, puis a été repris au fil du temps par différentes équipes dont Marzulli et Maibach en 1973.

Le protocole de Marzulli et Maibach est celui utilisé le plus souvent en HRIPT : la substance à étudier est appliquée en patch occlusif *via* 9 applications de 24h pendant une durée totale de 3 semaines, sur un panel de 50 à 100 voire 200 volontaires en bonne santé. Pour chaque site d'induction, l'apparition d'un érythème ou d'un oedème est observée. Après une période de 2 semaines de repos, le patient est remis en contact avec le produit lors de la phase de challenge durant 24h, sur la même zone ainsi que sur une nouvelle zone. La réponse est immédiatement observée et analysée. Cette dernière réponse est comparée à la première obtenue après le patch d'induction (Draize *et al.*, 1944; States. and States., 1959).

Excepté l'avantage de fournir des données directement relatives à l'homme, ce test soulève

des problèmes d'éthique et se révèle peu représentatif des conditions réelles d'exposition. De plus, la grande variabilité liée aux caractéristiques de la peau et à la tolérance vis-à-vis des composés chimiques en sont des limites (Basketter, 2009).

Basketter *et al.* (2014) ont décrit les critères de classification des substances testées en six catégories de puissance selon les résultats obtenus en HRIPT. Suite à cela, Api *et al.* (2017) ont fourni un tableau complet qui résume l'ensemble des résultats obtenus et nécessaires pour catégoriser les substances selon leur puissance allergisante en considérant les résultats obtenus en HRIPT et/ou HMT ainsi que les données du Diagnostic du Patch Test (DPT). L'ensemble est reproduit dans le Tableau 4.

Catégorie de puissance	NOEL obtenue du HRIPT/HMT*	Données du Diagnostic de Patch Test†	Information d'utilisation‡
1 (Extrême)	< 25 µg/cm ²	> 3% en cas clinique	Probablement faible concentration d'exposition
2 (Fort)	25-500 µg/cm ²	> 1% en cas clinique	concentration d'utilisation plus faible que la catégorie 1 ; une augmentation peut le faire changer de catégorie
3 (Modéré)	500-2500 µg/cm ²	Jusqu'à 1% en cas clinique	
4 (Faible)	> 2500 µg/cm ²	Moins fréquent/réactions positives moins fréquentes que dans la catégorie 3	Possible malgré une utilisation élevée
5 (Très faible)	> 10 000 µg/cm ²	Rarement positif sauf dans chez les patients ayant de l'eczéma	
6 (Non sensibilisant)	Négatif§	Absence de réaction positive, testé dans de nombreuses cliniques	Son utilisation peut être élevée ou faible

* Pour ce faire, les 2 types de test sur l'homme sont considérés comme équivalents; les LOEL sont utilisées uniquement comme indicateur comme étant le seuil d'induction du HRIPT. Le HRIPT est plus significatif que le HMT car la taille du panel est plus importante (typiquement 4 fois le HMT).

† Généralement issues d'informations multicliniques sur des patients consécutifs atteints d'eczéma. Cependant, les catégories de puissance inférieure peuvent s'appuyer davantage sur des cas isolés.

‡ Étant donné la grande rareté avec laquelle il existe une corrélation claire entre l'exposition et l'induction de la DCA à partir des données du DPT, les informations sur le volume total des ventes et, le cas échéant, les niveaux maximaux d'utilisation sont utilisés pour affiner les conclusions.

§ En effet, cela signifie simplement qu'une concentration d'essai élevée n'a donné aucune preuve d'induction d'une DCA.

Tableau 4 : Les différentes catégories de puissance des allergènes (Api *et al.*, 2017)

En résumé, en première intention, une catégorie préliminaire est déterminée en fonction de la dose sans effet observée (NOEL) du HRIPT ou issue du HMT prenant en compte l'effet dose-réponse. Cette catégorie préliminaire est ensuite modifiée par la comptabilisation des données du DPT quant à la quantité et la sévérité des données cliniques. Finalement, l'information d'utilisation, provenant principalement du tonnage commercialisé annuellement, est considérée essentiellement en la rapportant à la fréquence du DPT positif. L'impact de ces modifications devient évident en corrélant la NOEL issue d'un HRIPT, disponible dans Basketter *et al.* (2014) et Api *et al.* (2017), pour les différentes catégories humaines.

Bien que le processus de catégorisation des substances en HRIPT soit décrit de manière

transparente (Basketter *et al.*, 2014), il est connu que celui-ci nécessite un jugement d'expert en parallèle, dont l'analyse devra considérer la quantité, la qualité et la cohérence de l'ensemble des preuves disponibles.

4.2 Les tests expérimentaux sur les animaux

Etant donné la complexité du système que nous venons de décrire, le fort impact de cette pathologie et l'impossibilité de désensibiliser et donc de guérir les patients atteints de DCA, il demeure de la responsabilité des industriels de garantir l'innocuité de leurs produits pour éviter tout nouveau cas de sensibilisation. Pour cela, il est important d'évaluer en amont le risque qu'une molécule donnée soit allergisante. Pour répondre à cela, un certain nombre de tests réglementaires chez l'animal ont été largement utilisés afin de prédire le potentiel allergisant des produits chimiques.

4.2.1 Les tests mesurant la phase de révélation

Durant de nombreuses décennies, les tests de Buehler (Buehler, 1965) et du Guinea Pig Maximization Test (GPMT) de Magnusson et Kligman (Magnusson and Kligman, 1969) ont été utilisés comme méthodes de référence pour l'évaluation de la sensibilisation (OECD, 1992). Ces deux tests sont résumés et présentés dans la Figure 22.

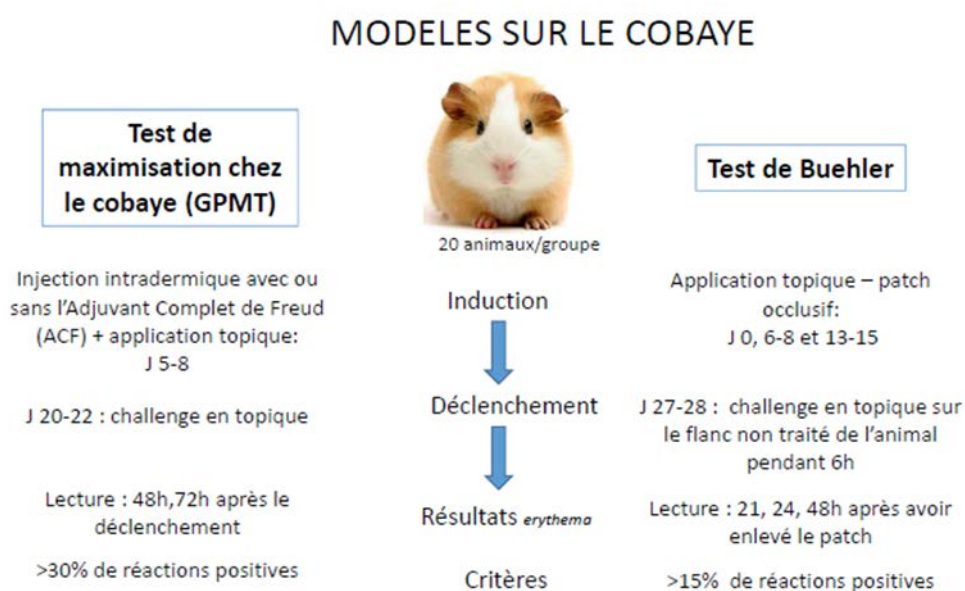


Figure 22 : Les tests sur le cobaye (OECD, 1992)

4.2.1.1 Le test de Buehler

Dans ce test, le cobaye est exposé de façon répétée à la substance par application topique, en occlusion. Après une période de latence de 12 jours (temps nécessaire à l'induction), les animaux sont de nouveau exposés par application topique en occlusion. La réaction de la peau à cette nouvelle exposition est comparée à la réaction observée chez les animaux contrôles n'ayant pas eu de phase d'exposition préalable. La concentration utilisée pour l'induction doit être la plus forte entraînant une irritation légère, évaluée lors d'un test au préalable, et pour la phase de révélation, la plus forte concentration n'entraînant aucune irritation. Un minimum de 20 animaux pour le groupe traité et de 10 animaux pour le groupe contrôle doivent être utilisés. Ce test dure entre 30 et 32 jours (OECD, 1992). Ce test a été validé en 1992 par l'OCDE sous la ligne directrice 406 (OECD, 1992).

4.2.1.2 Guinea Pig Maximization Test

Dans le test de maximisation chez le cobaye ou Guinea Pig Maximization Test (GPMT), la molécule testée est injectée par voie intradermique, associée à un adjuvant sur un groupe de cobayes, en parallèle d'un groupe contrôle non traité. Des tests préliminaires sont réalisés pour identifier la concentration de substance d'essai utilisée pour chaque exposition inductrice qui doit être bien tolérée par l'organisme et qui doit correspondre à la concentration maximale entraînant une irritation cutanée légère à modérée. La concentration utilisée pour l'exposition déclenchante doit être la concentration maximale non irritante. La substance est testée en utilisant un minimum de 10 animaux pour le groupe test et de 5 animaux pour le groupe contrôle : les animaux sont d'abord exposés de façon répétée (3 fois) à la substance par injection intradermique, puis par application topique locale en patch occlusif lors de la phase d'induction pendant 48h. Après une période de repos de 10 à 14 jours (période d'induction) au cours de laquelle peut se développer une réponse immunitaire, les animaux sont exposés à une dose déclenchante n'induisant pas d'irritation. L'étendue et le degré de la réaction cutanée à l'exposition déclenchante chez les animaux traités sont comparés à ceux obtenus chez les animaux témoins qui ont subi un traitement identique, la substance exceptée, pendant l'induction et qui ont été soumis à l'exposition déclenchante. La réaction inflammatoire est évaluée visuellement par l'opérateur qui score l'œdème, la rougeur et l'épaisseur (Magnusson and Kligman, 1969). Le test dure en tout entre 23 et 25 jours. Ce test a été validé en 1992 par l'OCDE sous la ligne directrice 406 (OECD, 1992).

Le potentiel allergisant du produit testé est classé d'après la fréquence des réponses positives des animaux et non d'après l'intensité des réponses selon 5 classes : Classe 1, très faible pour moins de 10% des animaux à classe 5, très fort pour plus de 80% des animaux ayant répondu. Ces tests qui visent à évaluer la phase d'élicitation de la DCA présentent toutefois certaines limites, puisque dans le cas du GPMT comme pour le test de Buehler (même principe que le GPMT mais sans adjuvant), l'évaluation visuelle des symptômes liée au manipulateur peut entraîner une variabilité importante. De plus, l'injection par voie intradermique de la molécule en association avec un adjuvant ne reflète pas les conditions réelles de contact et peut avoir tendance à maximaliser les effets. D'autre part, ces techniques sont consommatrices d'animaux et donc ne tendent pas à respecter la règle des 3R.

Bien que le GPMT ait été utilisé durant de nombreuses années, il a peu à peu été délaissé au profit du LLNA pour plusieurs raisons : sensibilité nulle (on ne peut conclure à une absence totale de sensibilisation), grande quantité d'animaux utilisés, une seule dose évaluée, et l'absence de seuils définis (ce test demeure un test qualitatif) (OECD, 1992; Scientific committee on consumer products, 2005).

4.2.2 Les tests mesurant la phase de sensibilisation

Dans la perspective de la règle des 3R élaborée en 1959 et constituant le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale en Europe et en Amérique du Nord, le test du Local Lymph Node Assay (LLNA) a été développé chez la souris. Les 3R correspondent à Réduire (diminution du nombre d'animaux), Raffiner (amélioration du bien être des animaux), Remplacer (pas d'utilisation d'animaux). Par rapport aux précédentes méthodes décrites, le test du LLNA ne fait appel qu'à la phase de sensibilisation de la DCA sans qu'il n'y ait de déclenchement des symptômes, réduisant ainsi considérablement le nombre d'animaux, la durée de l'expérience et n'engendrant pas de souffrance puisque les animaux sont sacrifiés avant de développer la DCA.

4.2.2.1 Local Lymph Node Assay et ses variantes

Cette méthode de réduction et de raffinement est venue substituer les précédentes méthodes réalisées sur le cobaye en 2002 sous la ligne directrice de l'OCDE 429 (OECD, 2002). Elle repose sur la mesure d'événements induits durant la phase d'induction de la sensibilisation cutanée, en particulier la prolifération des lymphocytes dans les nœuds lymphatiques, qui est la

caractéristique principale de la réponse à la sensibilisation cutanée.

❖ LLNA

En pratique, la molécule à tester ou le véhicule seul est appliqué une fois par jour pendant trois jours consécutifs sur la face dorsale des oreilles des souris. La dose maximale non irritante est au préalable déterminée par une évaluation de l'épaississement de l'oreille qui ne doit pas excéder 25%. A partir de cette dose, une gamme d'au moins trois doses est déterminée pour être testée avec un minimum de 4 animaux par groupe de dose, ainsi que dans les groupes contrôles (un positif et un négatif). Les souris sont laissées au repos pendant deux jours complets, puis une injection par la veine caudale de thymidine tritiée (ou autre traceur radioactif) est réalisée le jour suivant. Cinq heures plus tard, les souris sont sacrifiées et les ganglions drainants l'oreille sont prélevés. L'incorporation d'un élément radio marqué correspondant à la prolifération lymphocytaire est mesurée avec un compteur à scintillation qui permet de connaître le nombre de Désintégrations Par Minutes (DPM). Les résultats de radioactivité sont exprimés en indice de stimulation (Stimulation Index, SI) qui est égal au rapport de la radioactivité incorporée dans les ganglions de la souris traitée par la molécule d'intérêt sur celle incorporée dans les ganglions de la souris traitée avec le solvant seul (Basketter *et al.*, 2002; Gerberick *et al.*, 2000). Les composés qui induisent une relation effet-dose et qui ont un SI supérieur au seuil de 3 sont considérés comme sensibilisants (D. A. Basketter *et al.*, 1999; Kimber *et al.*, 1995; Loveless *et al.*, 1996). La concentration pour laquelle le SI est égal à 3 est appelé EC(3) (« Effective dose concentration »). L'EC(3) est déterminé en établissant une courbe effet-dose. Cette valeur permet de classer les substances testées en fonction de leur puissance allergisante.

Sur la base de cet EC(3), différentes classes de potentiel allergisant ont été déterminées (De Jong *et al.*, 2002; van Och *et al.*, 2000).

Ainsi, au-delà de la simple détection des sensibilisants, le LLNA permet d'évaluer leur potentiel de façon quantitative. De plus, l'EC(3) permet de déterminer une dose maximale sans effet chez l'homme par extrapolation, qui est utilisée par les toxicologues lors de leur évaluation du risque. Malgré les avantages du LLNA par rapport à la LD 406, certaines limites lui sont connues comme des résultats faussement négatifs avec certains métaux (par exemple pour le nickel car les souris possèdent un récepteur TLR4 différent de l'homme), des résultats faussement positifs avec certaines substances irritantes pour la peau et de plus un manque de sensibilité

du test pour détecter les molécules les plus faiblement sensibilisantes (D. . Basketter *et al.*, 1999; Ikarashi *et al.*, 1993). Des réponses faussement positives par rapport aux données de références cliniques peuvent être obtenues. Ces faux positifs se trouvent essentiellement parmi les tensioactifs et les surfactants qui peuvent provoquer une irritation engendrant une prolifération non spécifique dans les ganglions drainants (Garcia *et al.*, 2010; Kreiling *et al.*, 2008); la question des irritants qui sortent systématiquement faux positifs dans le LLNA fait toutefois encore débat. Cependant, Basketter et Kimber (2011) déclarent que, si l'étude est réalisée selon le critère de sélection de dose spécifiée dans la ligne directrice de l'OCDE 429, aucun résultat faux positif ne devrait être obtenu sur la seule base des propriétés irritantes de la substance (Basketter and Kimber, 2011).

Le LLNA est considéré cependant comme étant LA méthode de référence lors de la validation d'une méthode alternative *in vitro* puisque de nombreuses données ont été collectées (Anderson *et al.*, 2011). Le protocole du LLNA est schématisé dans la Figure 23.

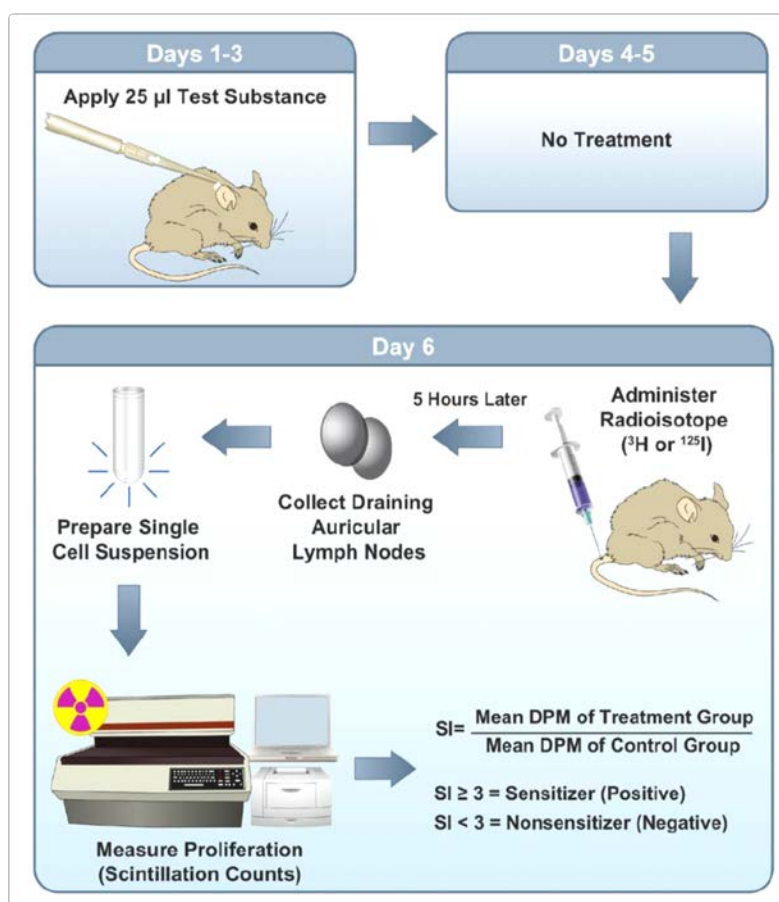


Figure 23 : Protocole du test du Local Lymph Node Assay (LLNA) (McMahon, 2011)

❖ **rLLNA**

Un LLNA réduit ou rLLNA (reduced Local Lymph Node Assay) a été mis au point et validé sous la version modifiée de la ligne directrice de l'OCDE 429 en 2010. Ce test est le même que celui du LLNA mais il permet de restreindre le nombre d'animaux de 40% et respecte donc mieux la règle des 3R. Une seule concentration est testée et moins d'animaux sont utilisés. Cette méthode de réduction est recommandée lorsqu'une confirmation d'un résultat négatif obtenu avec une autre méthode d'essai est requise. Étant donné qu'une seule dose est utilisée dans le plan d'étude, le rLLNA ne peut actuellement pas être utilisé pour estimer le potentiel de sensibilisation cutanée d'une substance (van der Veen *et al.*, 2013), même si une proposition a récemment été publiée pour prédire la puissance d'une dose unique (Roberts, 2015).

❖ **LLNA : DA**

La méthode d'essai LLNA: DA décrite dans la ligne directrice de l'OCDE 442A est une variante non radioactive du LLNA, validée en 2010 (OECD, 2010a). Cette méthode vise à identifier les substances chimiques sensibilisantes et à mesurer la prolifération lymphocytaire qu'ils induisent dans les ganglions lymphatiques auriculaires. Cette méthode, décrite chez la souris (de souche CBA/J), se base sur la quantification par bioluminescence du contenu en adénosine triphosphate (ATP), indicateur de cette prolifération. Quatre animaux au minimum sont utilisés par groupe de dose, avec au minimum trois concentrations de la substance d'essai, plus un groupe contrôle négatif traité seulement avec le véhicule, et au besoin un contrôle positif. Le protocole expérimental dure 8 jours. La teneur en ATP doit être quantifiée dans les 30 minutes qui suivent l'euthanasie. La procédure appliquée, de l'excision des ganglions lymphatiques au dosage de l'ATP, doit être identique pour chaque animal et ne doit pas excéder 20 minutes. La méthode luciférine/luciférase est appliquée pour quantifier la bioluminescence exprimée en unités relatives de luminescence (RLU). L'essai inclut des mesures (pesée, RLU) et des observations cliniques quotidiennes. Les résultats sont exprimés par le SI qui est obtenu par calcul. Une évaluation complémentaire de la substance d'essai comme sensibilisant potentiel est justifiée lorsque le SI obtenu est supérieur ou égal à 1,8. En cas de résultats positifs limités ($1,8 \leq SI \leq 2,5$), liés à la sensibilité de la méthode de détection, des informations supplémentaires peuvent être considérées telles que la relation dose-réponse, la toxicité systémique ou l'irritation excessive et, le cas échéant, les valeurs

significatives de SI sont à utiliser pour confirmer que ces résultats sont effectivement positifs.

❖ LLNA : BrdU-ELISA

La méthode d'essai LLNA: BrdU-ELISA est une variante non radioactive de la méthode du LLNA décrite dans la ligne directrice de l'OCDE 442B et validée en 2010 (OECD, 2010b). Cette méthode vise à identifier les substances chimiques sensibilisantes et à mesurer la prolifération lymphocytaire qu'ils induisent dans les ganglions lymphatiques auriculaires.

Cette méthode décrite chez la souris (de souche CBA/JN) se base sur la quantification de la 5-bromo-2-désoxyuridine (BrdU), un analogue de la thymidine dans l'ADN des lymphocytes, comme indicateur de cette prolifération. Quatre animaux au minimum sont employés par groupe de dose, avec au minimum trois concentrations de la substance d'essai, plus un groupe contrôle négatif traité avec le véhicule seul, et un contrôle positif, au besoin. Le protocole expérimental dure 6 jours. Ensuite, les animaux sont euthanasiés et une suspension unicellulaire de cellules de ganglions lymphatiques (CGL) est préparée. La procédure de dispersion des CGL est une étape cruciale, en particulier pour les ganglions lymphocytaires très petits chez les animaux du groupe contrôle négatif. Ensuite la BrdU dans l'ADN des lymphocytes est quantifiée à l'aide d'un kit de dosage ELISA. L'essai inclut des mesures (pesée, BrdU) et des observations cliniques quotidiennes. Les résultats sont exprimés par le SI obtenu par calcul à partir des indices moyens de marquage BrdU pour les différents groupes. Un SI supérieur ou égal à 1,6 permet de classer la substance d'essai comme sensibilisant potentiel. En cas de résultats positifs limites ($1,6 \leq SI \leq 1,9$), liés à la sensibilité de la méthode de détection, des informations supplémentaires peuvent être considérées telles que la relation dose-réponse, la toxicité systémique ou l'irritation excessive et, le cas échéant, les valeurs significatives de SI sont à utiliser pour confirmer que ces résultats sont effectivement positifs.

Les limitations de toutes les variantes de LLNA présentées ci-dessus sont les suivantes :

- des prédictions faussement négatives peuvent être obtenues avec certains métaux, par exemple le nickel (Schmidt and Goebeler, 2015), et des prédictions faussement positives peuvent être obtenues avec certaines substances de type surfactant (Ball *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2010; Kreiling *et al.*, 2008) ou des siloxanes (Petry *et al.*, 2012),
- la faible solubilité de la substance peut interférer avec l'exactitude des résultats. Le choix du véhicule peut affecter les résultats de certaines substances. Par exemple, le DMSO en tant que

solvant polaire peut améliorer la biodisponibilité dermique de certaines substances d'essai et le propylène glycol peut supprimer les effets prolifératifs de certaines substances d'essai (par exemple le DNCB) (Anderson *et al.*, 2011). Par conséquent, il est important de bien sélectionner le véhicule utilisé dans l'étude.

Un récapitulatif des tests sur les animaux est présenté dans le tableau 5.

TEST	Critère de positivité	Ligne Directrice de l'OCDE
Guinea Pig Maximisation Test (GPMT)	Réponse positive si $\geq 30\%$ des animaux testés	OCDE 406 (1992)
Buehler Test	Réponse positive si $\geq 15\%$ des animaux testés	OCDE 406 (1992)
Mouse local lymph node assay (LLNA)	Stimulation Index (SI) ≥ 3	OCDE 429 (2002)
Reduced Mouse local lymph node assay (rLLNA)	Stimulation Index (SI) ≥ 3	OCDE 429 (2010)
LLNA: DA	SI $\geq 1,8$	OCDE 442A (2010)
LLNA: BrdU-ELISA	SI $\geq 1,6$	OCDE 442B (2010)

Tableau 5 : Les différents tests *in vivo* pour évaluer la sensibilisation cutanée

Un certain nombre de tests *in vivo* réglementaires et notamment le LLNA qui prédit le potentiel allergisant d'une molécule, permettaient aux toxicologues d'évaluer le risque et de garantir l'innocuité des produits cosmétiques. Toutefois, le 7^{ème} amendement à la Directive cosmétique européenne 76/768/CEE adopté en 2003 (2003/15/CE) ainsi que le nouveau Règlement cosmétique n°1223/2009 entré en vigueur en mars 2009 ont interdit l'ensemble des tests sur les animaux pour les produits cosmétiques que ce soit pour le produit fini mais aussi pour l'ingrédient (depuis Mars 2013). Ainsi, il a été nécessaire et urgent de développer et mettre en place des méthodes alternatives à l'animal pour l'ensemble des études de toxicité chronique et notamment la sensibilisation cutanée. Un certain nombre de tests alternatifs ont donc été développés afin de modéliser les événements précoces pré-immuns. Ainsi, dans la prochaine partie de cette introduction, après avoir défini la notion de produit cosmétique, nous allons faire un état de l'art des méthodes *in vitro* substitutives au LLNA pour évaluer la sensibilisation cutanée.

II. Les produits cosmétiques et la dermatite de contact allergique

1. Définition du produit cosmétique

Selon l'article 2.1 du Règlement européen CE n° 1223/2009, un produit cosmétique est « une substance ou un mélange destiné à être mis en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain (épiderme, systèmes pileux et capillaire, ongles, lèvres et organes génitaux externes) ou avec les dents, en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou d'en corriger les odeurs » (European Commission, 2009a).

De plus, un produit cosmétique ne doit pas nuire à la santé humaine lorsqu'il est appliqué selon les conditions normales d'utilisation.

Par conséquent, si l'on se réfère à la définition même d'un produit cosmétique, ce dernier doit avoir une action de « surface » et n'agir qu'au niveau des « couches supérieures de l'épiderme », ce que mentionnent de très nombreuses marques sur leurs produits.

Cependant, certaines substances pénètrent à travers la peau : cette pénétration transcutanée offre l'avantage d'une activité ciblée des principes actifs qui pourront se concentrer au sein même de leur lieu d'action.

2. Contexte réglementaire et évaluation des produits cosmétiques

2.1 De la Directive cosmétique 76/768/CEE au nouveau Règlement n°1223/2009

Suite à la crise sanitaire majeure de 1972, au cours de laquelle 36 bébés sont décédés par intoxication à l'hexachlorophène suite à l'application de Talc Morhange, une loi modifiant le Code de Santé Publique a été adoptée. Elle concerne la fabrication, le conditionnement, l'importation et la mise sur le marché des produits cosmétiques et d'hygiène corporelle. Suivra la Directive 76/768/CEE du 2 juillet 1976, dont le but a été d'harmoniser la législation des Etats de la Communauté économique européenne (European Commission, 1976). Avant tout contact avec l'homme et donc la mise sur le marché, les produits cosmétiques et leurs matières premières subissaient alors des tests toxicologiques principalement sur les animaux afin d'assurer leur innocuité. Cette réglementation communautaire transposée en droit interne était codifiée dans le code de la santé publique avec l'article L5131-1 (Code de la santé publique, 2014). La Directive Européenne 76/768/CEE plusieurs fois modifiée a fait l'objet

d'une refonte en un texte unique, le nouveau Règlement cosmétique (CE) n°1223/2009 du Parlement européen et du conseil du 30 novembre 2009 qui est entré définitivement en application le 11 juillet 2013 (European Commission, 2009a).

L'ensemble des législations actuelles comme le Règlement cosmétique n°1223/2009 ou encore REACH (Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals) (European Parliament and Council of the European union, 2006) sont le reflet de l'intérêt grandissant de l'Union européenne pour promouvoir le bien-être animal, encourageant ainsi le développement des méthodes alternatives. REACH est un règlement européen adopté pour mieux protéger la santé humaine et l'environnement contre les risques liés aux substances chimiques, tout en favorisant la compétitivité de l'industrie chimique de l'UE. Il encourage également l'utilisation des méthodes alternatives pour l'évaluation des dangers liés aux substances afin de réduire le nombre d'essais sur animaux. De même, le Règlement cosmétique n°1223/2009 s'appuie sur la directive 86/609/CEE du 24 novembre 1986 concernant la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques. Cette directive établit des règles communes pour l'utilisation des animaux et fixe les conditions dans lesquelles ces expérimentations doivent être réalisées sur le territoire des Etats membres. En particulier, l'article 7 requiert que les expérimentations animales soient remplacées par des méthodes alternatives dès lors que de telles méthodes existent et soient scientifiquement acceptables.

Pour aller plus loin, le Règlement cosmétique n°1223/2009 (European Commission, 2009a) a établi deux types d'interdictions avec des dates butoirs différentes. Une première interdiction de l'expérimentation animale pour l'évaluation des produits cosmétiques finis qui s'applique depuis le 11 septembre 2004. Puis une seconde interdiction est entrée en vigueur le 11 mars 2009 concernant la mise sur le marché dans la Communauté Européenne de l'ensemble des produits finis et des ingrédients cosmétiques qui ont été expérimentés sur des animaux. Cependant, une période supplémentaire a été accordée pour les tests plus complexes n'ayant pas de méthodes alternatives substitutives comme la toxicité par administration répétée, la sensibilisation cutanée, la toxicité pour la reproduction, la toxicocinétique ainsi que la carcinogénicité. Pour ces effets spécifiques sur la santé, l'interdiction d'expérimentation totale est entrée en vigueur le 11 mars 2013, et ce indépendamment de la disponibilité des méthodes alternatives aux tests sur animaux. L'ensemble de ces différentes dates clés et étapes est représenté dans la Figure 24.

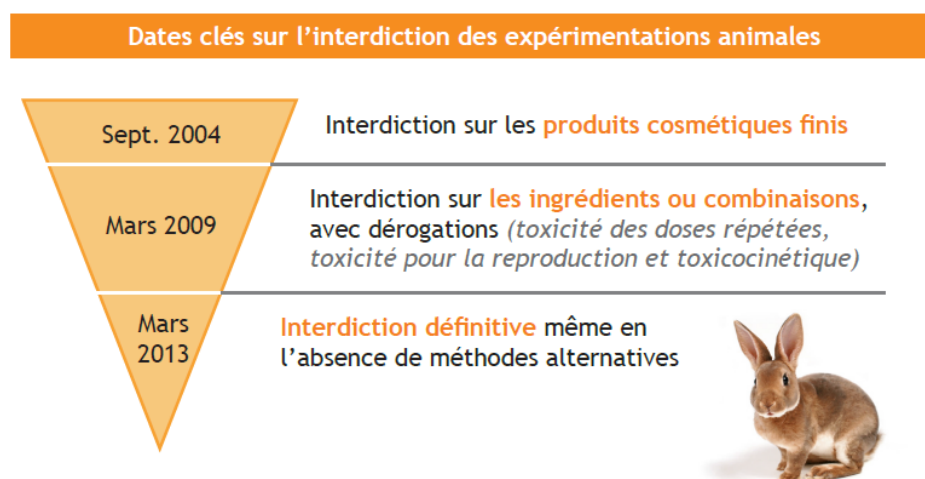


Figure 24 : Les dates clés pour l'interdiction des expérimentations animales en cosmétique

Cette nouvelle réglementation repose sur la responsabilité du fabricant concernant le produit qu'il met sur le marché. Dans cet objectif, il incombe au responsable de la mise sur le marché de garantir l'innocuité pour la santé humaine et le respect des exigences législatives et réglementaires.

Depuis mars 2013, il est donc interdit vis-à-vis du Règlement cosmétique n°1223/2009 de mettre sur le marché européen des produits cosmétiques dont un ou plusieurs des ingrédients ou matières premières ont été testés sur des animaux dans le cadre du développement ou de l'évaluation de la sécurité, et ce même en l'absence de méthodes alternatives (European Commission, 2009a). En revanche, il est possible d'utiliser ces ingrédients et matières premières dans le cadre de la conformité à une autre réglementation.

Actuellement, il n'existe pas de méthode alternative validée qui puisse à elle seule conclure sur le potentiel allergisant ou non d'une substance. Plusieurs méthodes sont validées ou en développement à des stades plus ou moins avancés. Pour cette raison, l'évaluation du potentiel allergisant par une méthode alternative aux tests sur animaux est devenue depuis plusieurs années une priorité pour l'ensemble des professionnels du domaine cosmétique (European Commission, 2013, 2009b, 2004).

Ainsi, en parallèle de l'interdiction des tests sur les animaux pour les cosmétiques, différents groupes de travail au niveau européen ont été créés ces dernières années afin de promouvoir le développement des méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Nous allons présenter succinctement le rôle des organismes de validation des méthodes alternatives ainsi que les différents projets et groupes qui se sont suivis.

2.2 Les groupes de travail européen sur la sensibilisation cutanée et les étapes d'évaluation et de validation des méthodes alternatives

- Les processus de validation et d'acceptation réglementaire au niveau européen

La validation des méthodes alternatives se décompose en deux phases. La première étant une validation scientifique réalisée par une approche d'inter-comparaison aux tests *in vivo* validés. Ce type d'analyse a pour but de démontrer l'utilité et l'applicabilité d'une méthode. Les méthodes sont scientifiquement reconnues par le processus classique de la validation par les pairs qui désigne l'activité collective de chercheurs qui jugent de façon critique les travaux d'autres chercheurs. Dans un second temps, la validation réglementaire consiste en l'examen de la méthode pour adoption par les organismes de réglementation. L'acceptation réglementaire (donc son acceptation formelle par les autorités) indique que la méthode peut être utilisée pour fournir des informations afin de répondre à une exigence réglementaire spécifique (EURL-ECVAM, 2016; EURL ECVAM, 2017). Lorsque les méthodes alternatives passent avec succès l'ensemble de ce processus, elles sont alors communément appelées des méthodes « validées ». La validation réglementaire est plus contraignante et longue que la validation scientifique dans la mesure où une méthode recevable doit apporter, outre ce qui est demandé pour la reconnaître scientifiquement valide, les preuves qu'elle est applicable de façon fiable et répétable en dehors des laboratoires de recherche (INERIS, 2013).

Le processus de validation réglementaire est régi par deux instances, l'OCDE et l'ECVAM.

❖ L'OCDE

Au niveau international, l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) joue un rôle essentiel dans la mise en place des lignes directrices sur les protocoles expérimentaux ainsi que sur la validation des méthodes alternatives. Les lignes directrices de l'OCDE sur les produits chimiques sont un ensemble de méthodes d'essai internationalement reconnues et utilisées par les gouvernements, les industries et les laboratoires indépendants pour évaluer la sécurité des produits chimiques (INERIS, 2013).

Exemple de processus de validation d'une méthode alternative

Pour accéder au statut de méthode alternative validée, les tests de sécurité mis au point font l'objet de validations scientifiques et réglementaires minutieuses par des organisations internationales spécialisées réparties en Europe, en Amérique du Sud, en Amérique du Nord

et en Asie. Un processus de validation peut durer plus de dix ans, destiné à garantir la fiabilité et la reproductibilité des méthodes d'évaluation prédictive. La validation des méthodes alternatives aux tests sur animaux implique toujours au *minimum* 3 laboratoires (généralement celui qui développe la méthode et deux autres laboratoires indépendants sélectionnés par l'organisme de validation). Aujourd'hui, cinq centres internationaux de validation des méthodes alternatives à l'expérimentation animale existent : l'ECVAM en Europe, l'ICCVAM aux Etats-Unis, le BRACVAM au Brésil, le JACVAM au Japon et le KOVCAM en Corée.

- Première étape : Vérifier la capacité d'une méthode à être reproductible (Durée de 1 à 4 ans en moyenne).

En général, cette étape consiste en une série de tests en aveugle par les trois laboratoires impliqués dans l'évaluation de la méthode. Une étape essentielle qui permettra de définir la reproductibilité d'une méthode alternative intra et inter-laboratoire.

- Deuxième étape : Valider la capacité d'une méthode à répondre aux exigences attendues (Durée de 1 à 4 ans en moyenne).

Il s'agit de vérifier que le test est efficace et performant. Dans le cas d'un test sur l'irritation cutanée, l'ECVAM peut ainsi définir, par exemple, que la sensibilité à une molécule irritante obtenue par la méthode *in vitro* (à partir d'un modèle de peau reconstruite) soit à 80% identique aux résultats obtenus *in vivo* (à partir des tests traditionnels sur le modèle animal). De même, une molécule non-irritante devra également être identifiée comme telle, de manière fiable, par le test *in vitro*. Ces résultats devront, par ailleurs, être concordants entre les laboratoires au *minimum* à 85%. Autant de vérifications qui donneront lieu à un rapport final soumis à l'examen d'experts scientifiques indépendants. En Europe, ces experts sont réunis au sein de l'ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) chargé de statuer et de déclarer si une méthode est (ou non) scientifiquement valide. Dans l'affirmative, l'opinion de l'ESAC est alors partagée et communiquée au journal officiel de la Commission Européenne.

- Troisième étape : Faire approuver la méthode d'un point de vue réglementaire (1 à 4 ans en moyenne).

Afin de satisfaire aux exigences des toxicologues, garants de la sécurité des produits, la méthode alternative doit également être approuvée d'un point de vue réglementaire. Ce processus final implique la participation d'un expert par Etat membre, d'une association d'industriels représentée à l'OCDE (le « Business and Industry Advisory Committee ») et

d'instances réglementaires nationales. Son inclusion dans une ligne directrice de l'OCDE facilite sa reconnaissance et son acceptation, l'intégrant dans le cadre d'un ensemble de méthodes agréées internationalement. A noter qu'une ligne directrice reste susceptible d'être révisée à tout moment si nécessaire.

❖ L'ECVAM

Le Centre Européen de Validation des Méthodes Alternatives (ECVAM) fait partie du Centre Commun de Recherche (Joint Research Centre, JRC) de l'UE, situé à Ispra en Italie, et dépend de l'Institut pour la santé et la protection du consommateur (Institut of Health and Consumer Protection, IHCP). Face aux besoins croissants de développement et de validation de nouvelles méthodes, l'ECVAM est devenu le laboratoire européen de référence pour les méthodes alternatives en expérimentation animale, EURL ECVAM, en 2011. En 2013, EURL ECVAM met en place et coordonne le Réseau européen de laboratoires pour la validation des méthodes alternatives (EU-NETVAL). Le Réseau accompagne le laboratoire de référence dans ses projets de validation, y compris sur les aspects formation, dissémination et identification des méthodes qui ont le potentiel de réduire, raffiner ou remplacer les animaux utilisés à des fins scientifiques. L'objectif de l'ECVAM est d'évaluer la performance de ces méthodes, leur reproductibilité et leur prédictivité. Il contribue aussi au développement de documents, guides, procédures, matériels de formation et outils de collaboration pour faciliter le développement, la validation et l'acceptation des méthodes alternatives. Le 3 juillet 2013, l'EURL ECVAM a annoncé les 14 premiers laboratoires (dont l'ECVAM lui-même) du réseau EU-NETVAL. Ces laboratoires disposent d'infrastructures de tests *in vitro* respectant les « Bonnes Pratiques de Laboratoires » (BPL). À cette date, l'INERIS est le seul institut français au sein de ce réseau. Cette instance coordonne au niveau européen l'évaluation indépendante de la pertinence et de la fiabilité des tests alternatifs à l'expérimentation animale. Enfin, l'EURL ECVAM s'appuie sur le réseau PARERE pour l'évaluation préliminaire de la pertinence réglementaire d'une nouvelle méthode alternative (INERIS, 2013).

- Les groupes de travail européen sur la sensibilisation cutanée

L'ancienne Directive cosmétique 76/768/CEE abrogée par le Règlement n°1223/2009 exige simultanément des preuves sur la sécurité pour le consommateur tout en requérant une interdiction totale des tests sur les animaux pour les produits finis et leurs ingrédients. Voici des exemples de projets dans lesquels l'UE s'est investie pour s'assurer que les hommes ainsi

que les animaux soient en sécurité.

- **Le projet Sens-it-iv**

De 2005 à 2010, le projet Sens-it-iv a permis le développement de méthodes *in vitro* pour évaluer le risque de sensibilisants cutanés ou pulmonaires potentiels. Ce projet de 13,7 millions d'euros a été financé de façon égale par l'industrie et les gouvernements, et a conduit à un ensemble de tests de remplacement pour le cobaye et la souris. Un des objectifs de ce projet était d'acquérir une meilleure connaissance des processus *in vivo*. Ce projet a permis de mettre en place la stratégie des tests à suivre pour évaluer le potentiel allergisant d'une substance chimique produite par les industries européennes ainsi que la classification et l'étiquetage qui en découle, de même que l'évaluation du risque requise par la Directive Cosmétique. L'ECVAM, l'European Cosmetics Association (ex-COLIPA devenue Cosmetics Europe en 2012), l'European Consensus-Platform for Alternatives (ECOPA), In Vitro Testing Industrial Platform (IVTIP, plateforme informelle de 46 entreprises) ainsi que l'OCDE ce sont impliqués dans ce projet. Différents acteurs industriels (l'Oréal, Unilever) et universitaires (VUB, Université Louis Pasteur) se sont aussi joints au projet Sens-it-iv.

Le projet a permis d'identifier 7 tests *in vitro* potentiels qui sont en cours d'évaluation ou ont été évalués.

- **Le projet SEURAT-1 (Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing)**

SEURAT-1 (<http://www.seurat-1.eu/>) est un projet de 50 millions d'euros financé sur 5 ans par des fonds publics et privés (Cosmetics Europe, la Commission européenne et l'industrie cosmétique). SEURAT-1 a été cofinancé par le 7^{ème} programme cadre de l'UE (le programme européen de financement de la recherche et de l'innovation pour la période 2007-2013) et par Cosmetics Europe, l'association professionnelle qui représente l'industrie des cosmétiques en Europe. Chacun des deux partenaires ont contribué au projet à hauteur de 25 millions d'euros. Ce projet s'est déroulé en partenariat avec plus de 70 universités européennes, instituts de recherche publique et entreprises qui ont commencé en Janvier 2011 à travailler sur le remplacement des tests de toxicité systémique *in vivo* à doses répétées. Il comprend six sous-projets coordonnés qui adressent, en utilisant les méthodes informatiques *in silico* et *in vitro*, tous les aspects de la toxicité systémique, tels que les dommages au foie. SEURAT-1 s'appuie sur les progrès réalisés dans les projets précédents

comme Sens-it-iv. Ce projet a permis la construction de nouveaux outils et technologies, ainsi que du cadre permettant de les relier. Remplacer les expérimentations animales traditionnelles par de la toxicologie prédictive a nécessité aussi une compréhension profonde et détaillée de la façon dont les produits chimiques provoquent des effets indésirables sur l'homme. SEURAT-1 a mis en évidence les mécanismes dits d'Adverse Outcome Pathways (AOP), avec le détail des étapes biologiques conduisant à un effet néfaste sur la santé, en commençant par l'événement moléculaire initiateur.

- **EU-ToxRisk**

SEURAT-1 a conduit à une extension, appelée EU-ToxRisk, qui sera le prochain grand programme européen sur les alternatives aux tests sur animaux ; celui-ci reprendra entre autre les conclusions du projet SEURAT-1. Cosmetics Europe va poursuivre ses efforts en matière de recherche, à la fois *via* son partenariat avec le programme EU-ToxRisk (<http://www.eu-toxrisk.eu/>) et *via* son programme Long Range Science Strategy (LRSS) (2016-2020), qui utilisera également les acquis de SEURAT-1.

- **Cosmetics Europe**

Skin Tolerance Task Force (STTF) : groupe de travail « sensibilisation cutanée »

Ce groupe de travail est composé uniquement d'industriels. L'objectif de ce groupe de travail est de faire valider certains tests ainsi que des stratégies qui permettent d'évaluer la sensibilisation cutanée sans utiliser les animaux.

La biologie complexe de la sensibilisation cutanée a conduit à la conclusion scientifique que seule une combinaison de tests alternatifs permettrait aux industriels de la cosmétique d'effectuer des évaluations de la sécurité des produits chimiques.

L'objectif de ce groupe de travail est de fournir de telles stratégies d'essai, ainsi que des données évaluées par des pairs qui sont appropriées soit pour initier, soutenir ou faciliter le processus d'acceptation réglementaire des méthodes développées.

Afin de développer des stratégies de tests alternatifs aux animaux, la « Skin Tolerance Task Force » a identifié et évalué 16 différentes méthodes d'essai *in vitro* (Tableau 6) qui, dans une mesure différente, donnent un aperçu des caractéristiques sensibilisantes des produits chimiques (Reisinger *et al.*, 2015). Les six méthodes les plus avancées ont été sélectionnées pour la Phase II du projet.

#	Method	Scening	Phase I	Phase II	Phase III
1	DPRA				
2	KeratinoSens				
3	h-CLAT				
4	U-Sens (MUSST)				
5	SENS-IS				
6	PPRA				
7	GARD				Q3 / 2016
8	VITASENS				
9	SenCeeTox				
10	SensiDerm				
11	LuSens				
12	PBMDC				
13	mMUSST				
14	AREc32				
15	NCTC 2544				
16	EE Potency				

Tableau 6 : Méthodes alternatives sélectionnées pour les évaluations

Les méthodes alternatives évaluées sont représentées ci-dessus. À partir d'un exercice de sélection, 16 méthodes ont été identifiées. Après les essais de Phase I sur un set restreint de molécules, 10 des 16 méthodes ont été classées par ordre de priorité au vu des résultats obtenus. Parmi celles-ci, les méthodes 1-6 (en noir) ont finalement été retenues pour les tests de Phase II, qui sont quant à eux finalisés. Les méthodes 7 à 9 ont été dépriorisées pour différentes raisons. Au cours de la Phase III, les essais ont été réalisés sur des produits chimiques de la plus haute importance pour les industriels de la cosmétique et se sont terminés au quatrième trimestre de 2016.

Lors de la Phase II, des informations expérimentales sur environ 130 produits chimiques ont été générées et collectées afin de parvenir à une matrice de données expérimentales complète. Les informations sur les six tests *in vitro*, ainsi que sur les données humaines, le LLNA et les données générées *in silico* ont été utilisées pour remplir une base de données AMBIT. Des partenariats externes (Integrated Laboratory Systems/NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM)) spécialisés dans l'intégration de données principalement axées sur la prédiction de la sensibilisation cutanée ont permis d'avancer. Cet exercice intègre l'utilisation d'informations déjà disponibles pour évaluer les stratégies de test existantes. Si nécessaire, le groupe de travail peut également travailler au

développement d'une stratégie de test, par exemple en y intégrant des tests comme le PPRA et/ou le SENS-IS aux approches existantes.

Parallèlement à l'évaluation des différentes stratégies, le groupe de travail a entamé des essais dits de Phase III qui se concentrent sur les produits chimiques de première importance pour les industries cosmétiques (colorants capillaires, filtres UV, mélanges, extraits de plantes ou conservateurs). Sur la base des choix des entreprises membres, une liste de 43 substances prioritaires a été testée dans une approche à deux niveaux. Dans un premier temps, quinze produits chimiques ayant des propriétés physico-chimiques complexes ont été testés dans des conditions à l'aveugle. Les données ont été examinées par le groupe de travail et il a été convenu de poursuivre les essais des substances restantes. Aucun écart majeur inattendu pour les composés cosmétiques sélectionnés n'a été identifié. Il est attendu que des chimiques aux propriétés particulières entraîneront éventuellement une adaptation des protocoles d'essai existants ou, *a contrario*, une exclusion en raison des limites de leur domaine d'application. Dans un deuxième temps, les essais sur les autres substances ont été achevés au quatrième trimestre 2016 et des discussions sur les résultats sont toujours en cours. Au regard de ces nouvelles informations, les stratégies de test existantes pourront être contestées. Cette partie du projet décrira plus en détail l'applicabilité d'une stratégie d'essai selon les produits chimiques à tester. En parallèle, afin d'exploiter les opportunités d'accélération du programme, le groupe de travail recherche des options de collaboration avec d'autres organismes menant des projets similaires. L'objectif de telles collaborations est de générer conjointement des données en utilisant les méthodes alternatives et de convenir d'un partage de celles-ci tout en évitant le travail redondant.

En Juillet 2014, le groupe de travail a signé un contrat pour un programme de recherche conjoint avec le Research Institute for Fragrance Materials (RIFM). Début septembre 2015, les données sur environ 60 parfums testés en DPRA, KeratinoSens™, h-CLAT et U-SENS® ont été partagées. Sur la base des résultats obtenus, il a été décidé de procéder à des tests dans deux autres méthodes, le SENS-IS et le PPRA.

De plus, le groupe de travail a convenu d'une coopération avec l'industrie des silicones afin de générer des données compréhensibles et complètes pour six silanes/siloxanes, dont les résultats obtenus en LLNA et *in vitro* (données limitées) ont été partagés. Le programme conjoint détaille le partage des coûts, le calendrier et la publication des résultats. L'ensemble des tests ont été finalisés au deuxième trimestre 2016.

De même, le groupe de travail STTF soutient actuellement le programme de recherche pour l'évaluation de la sensibilisation cutanée de l'European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing (EPAA). L'EPAA a évalué 12 substances complexes, sélectionnées dans leur base de données, testées sur 3 modèles utilisant les épidermes 3D reconstruits, SenCeeTox, RHE-IL-18 et SENS-IS.

Pour préparer au mieux les processus d'acceptation réglementaire, le groupe de travail STTF est désireux de maintenir une relation étroite avec les organismes de validation. Par conséquent, les scientifiques des autorités sont fréquemment mis au courant des évolutions du projet et le groupe de travail a présenté les résultats de l'évaluation des stratégies de tests lors de la réunion du SCCS WG Methodology en Octobre 2016.

De plus, des communications au sein de la communauté scientifique sont régulièrement menées. Par exemple, le travail de la STTF a été présenté lors d'un cours de formation continue à EUROTOX en 2016. Par ailleurs, deux prochaines publications sont actuellement en cours de soumission, reprenant les différentes activités du groupe :

- S. Hoffmann *et al.*; Cosmetics Europe's skin sensitisation database of non-animal test methods and human and LLNA reference data (article soumis dans Critical Reviews in Toxicology),
- N. Kleinstreuer *et al.*; Assessment of Non-Animal Defined Approaches for Predicting Skin Sensitization (article soumis dans Critical Reviews in Toxicology).

3. L'Adverse Outcome Pathway de la sensibilisation cutanée

De nombreux contextes nécessitent une évaluation des propriétés de danger des substances chimiques. En effet, les règlements européens REACH, le CLP (Classification, Labelling, Packaging) ou encore le règlement cosmétique n°1223/2009 imposent de déterminer, entres autres, les caractéristiques toxicologiques des substances concernées (European Commission, 2009a; European Parliament, 2016; European Parliament and Council of the European union, 2008). Ces propriétés sont essentiellement déterminées par une série de tests en laboratoire réalisés sur un panel d'organismes et prenant en compte un ensemble de critères d'effet. Ainsi, devant la multiplicité des substances chimiques à évaluer, la nécessité de limiter le recours à l'expérimentation animale et les développements des méthodes d'évaluation (approches *in silico*, *in vitro*), le constat a été fait du besoin de faire évoluer les concepts méthodologiques. La toxicologie s'oriente donc désormais vers la caractérisation détaillée des

voies de toxicité conduisant à des effets néfastes. Mieux connaître les mécanismes biologiques et leurs étapes successives vers la survenue d'une pathologie permettra d'anticiper les éventuelles perturbations liées à des expositions aux substances chimiques. La caractérisation du danger pourra alors se baser non plus sur l'identification d'un effet néfaste observé chez l'animal à des niveaux de dose élevés mais à partir de l'étude de ces voies biologiques sur des modèles expérimentaux *in silico* et *in vitro*.

Afin de répondre à ces problématiques, différents outils et méthodes ont été développés et ont évolué afin d'être replacés dans un cadre conceptuel : l'Adverse Outcome Pathway (AOP) ou voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables tout comme l'Integrated Testing Strategy (ITS) ou stratégie de tests intégrés. L'AOP est un concept élaboré afin d'améliorer la compréhension de la toxicité des substances chimiques. La stratégie de tests intégrés est quant à elle une des méthodes destinée à être mise en oeuvre en pratique afin de guider l'évaluateur de la sécurité sur la stratégie à appliquer pour évaluer une substance chimique. Nous allons donc définir et développer l'AOP, ainsi que son application à la sensibilisation cutanée et présenter dans un second temps, l'ensemble des méthodes *in vitro* développées qui y répondent spécifiquement.

3.1 Définition de l'Adverse Outcome Pathway

L'Adverse Outcome Pathway (AOP) est une construction conceptuelle qui représente les connaissances disponibles concernant le lien entre un événement déclencheur au niveau moléculaire (comme par exemple, une interaction moléculaire entre une substance chimique et une biomolécule spécifique) et un effet néfaste sur l'organisme. Les AOP sont généralement constituées d'une série d'événements qui ont lieu à différents niveaux de l'organisation biologique (molécules, cellules, organes, population). Les relations entre ces différents niveaux peuvent être établies à partir d'observations causales, mécaniques, par déduction ou basées sur des corrélations. Les informations sur lesquelles elles sont fondées peuvent provenir de données *in vitro*, *in vivo* ou *in silico*. La figure 25 ci-après présente les principales caractéristiques d'une AOP. Chaque AOP commence par un événement moléculaire initiateur où une substance chimique interagit avec une cible biologique (ancrage 1). Cette interaction conduit à une série d'événements à différents niveaux de l'organisation biologique puis à un effet néfaste (par exemple, un effet sur le développement ou la reproduction, ancrage 2). Les trois premières cases représentent la « voie de toxicité », c'est-à-dire, la réponse cellulaire

qui, lorsqu'elle est suffisamment perturbée et que l'organisme n'est pas capable de s'adapter, induit une toxicité et/ou une pathologie (Ankley *et al.*, 2010).

Une AOP permet donc de structurer et d'intégrer les informations sur les substances chimiques obtenues à différents niveaux et de favoriser les approches prédictives dans l'évaluation des dangers. Elle permet d'orienter la réalisation de stratégies de tests afin de développer, de prioriser, et de justifier des tests ciblés, en établissant les liens de causalité avec les effets toxiques observés. De plus, une AOP permet aussi bien de faciliter l'intégration de ces différentes données que d'identifier les incertitudes et les informations complémentaires nécessaires. Une approche par catégorie de substances chimiques peut donc être déterminée. Pour finir, une AOP permet d'identifier les similitudes et les différences entre les natures des événements initiateurs afin d'affiner les facteurs d'évaluation et mettre ainsi en place une stratégie de tests intégrés (ITS) ou une approche intégrée en matière d'essai et d'évaluation (IATA) (INERIS, 2016).

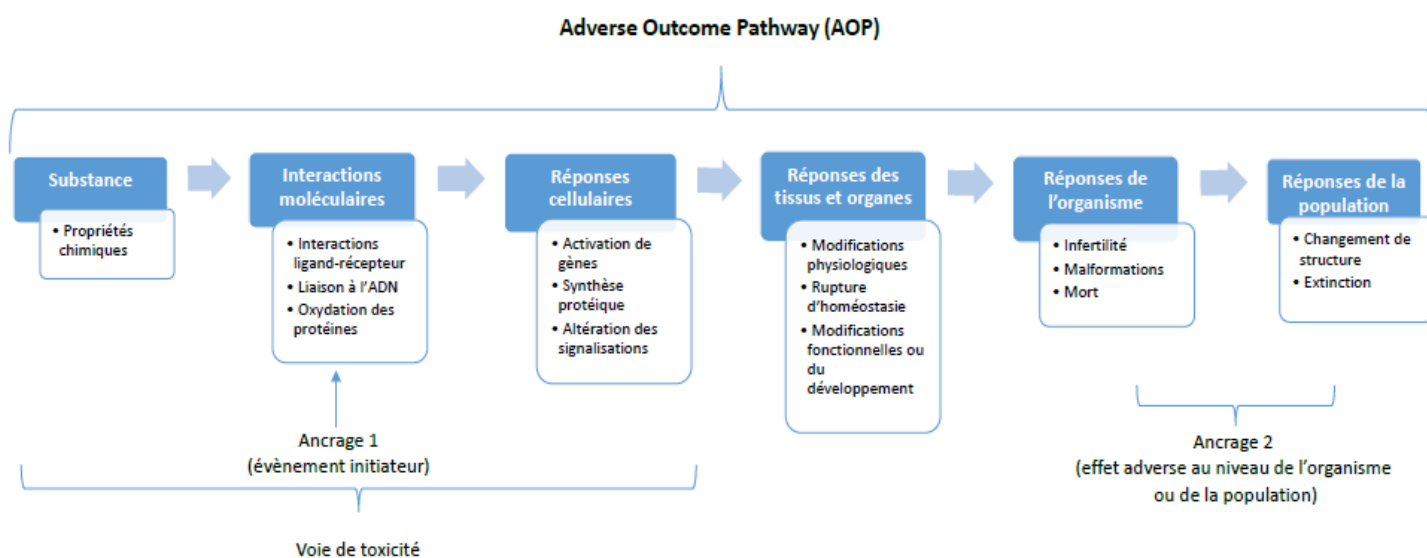


Figure 25 : Schéma conceptuel des principales caractéristiques d'une AOP (Ankley *et al.*, 2010)

Ainsi, le développement d'une AOP doit être établie à partir d'observations causales, mécaniques, mais aussi par déduction ou basée sur des corrélations. Par ailleurs, les AOP sont accompagnées d'outils disposant d'une interface conviviale et en libre accès¹, permettant un partage facilité des connaissances ainsi qu'une dissémination rapide des informations. Un

¹ <https://aopwiki.org/>

programme de travail a également été initié au niveau de l'OCDE en 2012 afin de collecter les informations et à terme de valider les AOP pour une trentaine d'effets indésirables et de voies de toxicité. A ce jour, seule l'AOP sur la sensibilisation cutanée a été validée par l'OCDE (OECD, 2012).

3.2 L'Adverse Outcome Pathway dédiée à la sensibilisation cutanée

L'Adverse Outcome Pathway (AOP) décrit de manière exhaustive les connaissances actuelles sur le processus de sensibilisation cutanée. Ces principales phases font l'objet d'un consensus général depuis l'absorption cutanée jusqu'à la prolifération lymphocytaire résumé sous la forme d'une AOP conceptuelle définie en 2012 par l'OCDE (OECD, 2012) (Figure 26).

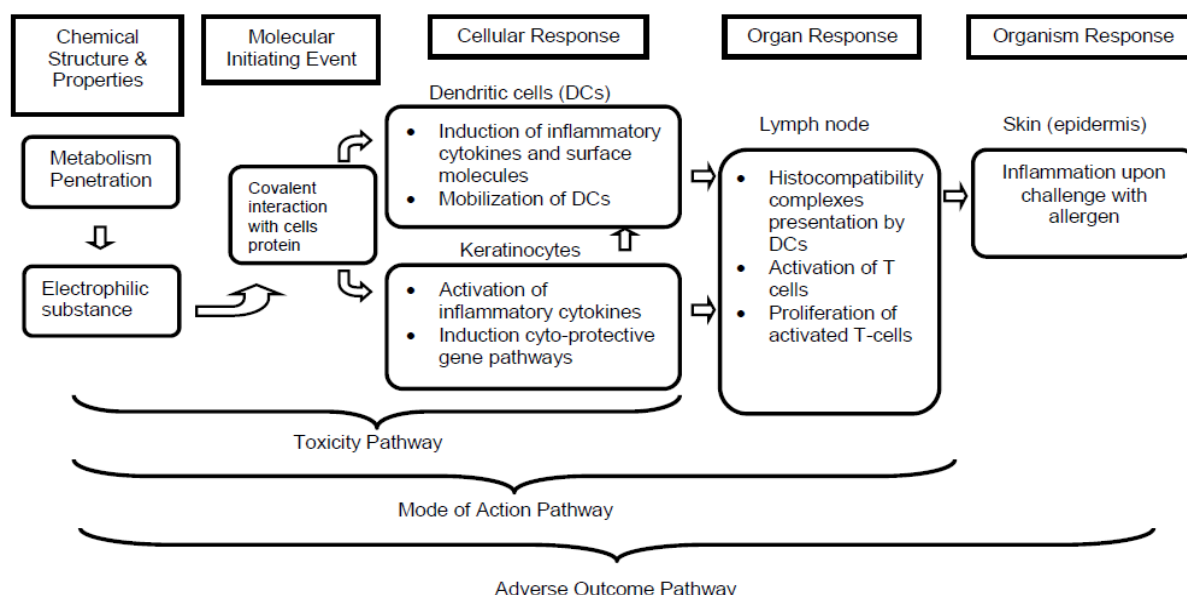


Figure 26 : Représentation schématique des étapes associées à l'AOP de la sensibilisation cutanée (OECD, 2012)

On peut distinguer 11 étapes (OECD, 2012) :

1. La substance chimique doit être biodisponible, c'est-à-dire qu'elle doit être capable de pénétrer le *stratum corneum* de l'épiderme.
2. La substance chimique est soit un haptène (intrinsèquement électrophile), un pro-haptène (initialement non réactif et qui doit être converti en un métabolite réactif électrophile par le métabolisme cutané) ou un pré-haptène (molécule intrinsèquement non électrophile convertie en un dérivé réactif électrophile par oxydation).

3. La substance chimique doit réagir avec les sites nucléophiles des protéines de l'épiderme.
4. L'événement moléculaire initiateur est la perturbation covalente des protéines de la peau qui est irréversible (formation du complexe haptène-protéine ou complexe antigénique). *In vivo*, cet événement est associé à la production de lymphocytes T mémoires spécifiques de l'allergène.
5. Les voies de signalisation biochimiques affectées par l'action définitive d'un électrophile ne sont pas entièrement connues, mais comprennent souvent des voies liées à l'inflammation, y compris la voie des kinases telles que Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) et la voie de réponse au stress oxydatif (Nrf2), en particulier dans les KC et les DC.
6. Les résultats au niveau cellulaire/tissulaire ne sont pas complètement connus mais incluent des réponses épidermiques telles que : la reconnaissance immunitaire des allergènes par les KC, les LC et les DDC ; les réponses sous la forme d'expression de marqueurs de surface cellulaire spécifiques, de molécules d'adhésion, chimiokines et cytokines (comme par exemple l'IL-1 β ou l'IL-12p70 typiques d'une maturation de la DC).
7. La réponse au niveau de l'organe inclut la migration des DC dans les ganglions lymphatiques où elles présentent les haptènes *via* leurs molécules du CMH aux LT naïfs. Cette réponse implique également la différenciation et la prolifération des LT mémoires spécifiques de l'allergène.
8. Les organes cibles sont la peau et les ganglions lymphatiques tandis que les populations cellulaires cibles sont les cellules immunes, particulièrement les LT effecteurs.
9. La réponse physiologique essentielle est l'acquisition de la sensibilité.
10. La réponse clé de l'organisme est l'inflammation dermale au niveau de la zone de contact avec l'allergène lors de la phase d'élicitation. Cette réponse est associée à la stimulation des LT mémoires spécifiques de l'allergène, produits lors de la phase de sensibilisation.
11. L'effet global est la DCA chez l'homme, et l'hypersensibilité de contact (HSC) chez le rongeur.

Parmi les 11 étapes précédemment décrites, 4 sont considérées comme des événements clés de la sensibilisation cutanée (OECD, 2012) :

1. L'événement moléculaire initiateur est l'établissement d'une liaison covalente entre les substances chimiques électrophiles et les centres nucléophiles des protéines de la peau,
2. Le deuxième événement clé se déroule dans les KC et comprend des réponses inflammatoires et des phénomènes d'expression génique, liés à des voies de signalisation cellulaire spécifiques telles que les voies dépendant de l'élément de réponse antioxydant/électrophile (Antioxydant Response Element, ARE),
3. Le troisième événement clé est l'activation des cellules dendritiques, habituellement évaluée d'après l'expression de marqueurs de surface spécifiques de la cellule ainsi que certaines chimiokines et cytokines,
4. Le quatrième événement clé est la prolifération des lymphocytes T, évaluée indirectement par l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques chez la souris (LLNA) (OECD, 2010c).

Il convient de noter que cette AOP ne couvre pas les métaux ou les allergènes d'origine biologique, mais seulement les substances qui forment une liaison covalente avec les protéines de la peau. L'action des métaux conduisant à l'activation du système immunitaire inné et, de manière concomitante, pouvant conduire à une sensibilisation n'est pas complètement connue (Martin *et al.*, 2006; Thierse *et al.*, 2005). Certains types d'ions métalliques peuvent agir comme des haptènes non classiques, ne se liant pas aux protéines mais pouvant provoquer directement ou indirectement des modifications structurelles au niveau du CMH, qui conduisent ensuite à la reconnaissance et à l'activation des LT *via* leurs récepteurs (Gamerding *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003; Templeton, 2004). Cependant, le mécanisme d'action reste encore inconnu pour d'autres types d'ions métalliques tels que le béryllium (Bowerman *et al.*, 2014). Par conséquent, la sensibilisation de la peau aux métaux doit être évaluée au cas par cas en fonction du métal et de la quantité d'informations disponibles.

L'AOP de l'OCDE ainsi définie se concentre donc sur les agents chimiques organiques et en particulier ceux réagissant avec les groupements thiols des cystéines et les amines primaires des lysines des protéines épidermiques (OECD, 2012).

3.3 Les méthodes *in silico*

Données expérimentales disponibles dans les bases de données

Avant la réalisation de tests toxicologiques *in vitro*, un ensemble d'informations pertinentes peuvent être disponibles sur la substance à tester afin de caractériser au mieux son danger potentiel. Ces données peuvent déjà être disponibles dans les dossiers d'enregistrement REACH *via* le site de l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA). Les données publiques peuvent également être trouvées dans les boîtes à outils QSAR de l'OCDE² ou dans le eChemPortal³. Les logiciels comme TIMES, Ambit, Topkat, Vitic Nexus, DEREK et d'autres sont également une source précieuse de données expérimentales. Toutes ces sources compilent des résultats hétérogènes provenant de différents tests standards et non standards. Il est très important d'évaluer comment les données originales ont été interprétées et renseignées dans ces outils et une consultation ou vérification vers les informations source est toujours recommandée, si possible.

Read-across

Le read-across, ou « lecture croisée » est une approche *in silico* qui peut être utilisée dans le cadre de REACH pour combler les lacunes de données. Les informations concernant l'effet mesuré (ou « endpoint ») d'une substance sont utilisées pour prédire le même effet mesuré pour une autre substance (substance cible), qui est considérée comme étant « similaire » basé en général sur leur similarité structurelle. Le read-across permet d'évaluer les propriétés physico-chimiques, la toxicité, l'écotoxicité et le devenir environnemental d'une substance. Il est effectué soit de manière qualitative soit quantitative. Il peut être effectué par comparaison à un analogue ou à une catégorie. Les similarités peuvent être fondées sur les éléments suivants :

- un groupe fonctionnel commun (par exemple un aldéhyde, un époxyde, un ester...),
- des constituants communs ou des classes chimiques,
- un changement progressif et constant dans la catégorie (par exemple, une catégorie de longueur de chaîne)
- la présence de précurseurs communs et/ou de produits de dégradation, par des procédés

² www.qsartoolbox.org/

³ www.echemportal.org

physiques ou biologiques donnant naissance à des substances structurellement similaires. Une approche par analogue est une catégorie limitée, généralement de deux substances : la substance cible et la substance source. La principale limite à cette approche est le choix de l'analogue ou de la catégorie. En effet, cette étape est l'étape charnière qui permettra de combler les lacunes des données. Mais si le choix d'une catégorie ou d'un analogue est inapproprié, le résultat obtenu sera alors moins fiable.

Le développement et l'évaluation du read-across pour la sensibilisation cutanée ont été discutés et illustrés dans le travail de Patlewicz *et al.* (Patlewicz *et al.*, 2015).

Les modèles (Q)SAR

Le (Q)SAR ou relation quantitative structure à activité (Quantitative structure-activity relationship, QSAR) est le procédé par lequel une structure chimique est corrélée à un effet bien déterminé, tel que l'activité biologique ou la réactivité chimique. L'activité biologique peut ainsi être exprimée de manière quantitative, comme pour la concentration de substance nécessaire pour obtenir une certaine réponse biologique. De plus, lorsque les propriétés ou structures physico-chimiques sont exprimées par des chiffres, on peut proposer une relation mathématique, ou relation quantitative structure à activité, entre les deux. L'expression mathématique obtenue peut alors être utilisée comme moyen prédictif de la réponse biologique pour des structures similaires. La forme la plus commune du (Q)SAR correspond à : activité = f(propriétés physico-chimiques et/ou structurales). Il est nécessaire de différencier les relations SAR des QSAR. Une relation structure-activité (SAR) est l'association (qualitative) entre une sous-structure chimique et le potentiel qu'un composé chimique contenant cette sous-structure démontre un effet biologique (par exemple un effet toxique). A l'inverse, une relation quantitative structure-activité (QSAR) est la corrélation statistique établie faisant le lien entre un paramètre quantitatif dérivé de la structure chimique, ou bien déterminé par mesure expérimentale, et la mesure quantitative de l'activité biologique.

L'OCDE a décrit les (Q)SAR comme étant « la relation (mathématique) quantitative entre la mesure numérique d'une structure chimique, et/ou une propriété physico-chimique, et un effet/une activité qui soit sur une échelle continue ou à intervalles. Dans de nombreux cas, les (Q)SAR sont des modèles quantitatifs basés sur des processus mécaniques clés et qui résultent en une activité mesurée ». En général, le processus de développement des (Q)SAR peut être décrit comme une série d'étapes définies. Un set de produits chimiques avec les données biologiques correspondantes est collecté. Les produits sont caractérisés par des

représentations numériques, appelées descripteurs, et des techniques statistiques sont ensuite appliquées pour en dériver un algorithme qui relie les informations chimiques pertinentes à l'activité biologique. L'accès à des données de bonne qualité est donc manifestement une condition nécessaire pour le développement des (Q)SAR. Le développement de (Q)SAR utiles en toxicologie provient de la disponibilité de données suffisantes pour la construction et la validation de modèles informatiques. Cependant, pour développer des bases de données de toxicité humaine pour ces modèles, la quantité et la qualité des données nécessaires pour la construction du modèle sont souvent insuffisantes. La collecte de données additionnelles de toxicité sur l'animal n'est pas toujours réalisable ni pertinente. Les différences mécanistiques entre le système testé et l'espèce humaine sont un facteur additionnel à considérer. Les données humaines sont bien plus utiles mais souvent indisponibles. Des efforts dirigés vers la construction de modèles basés sur des mesures toxicologiques moléculaires sont désormais explorés comme un moyen prometteur. Concernant la sensibilisation cutanée, de nombreux modèles quantitatifs corrélant le potentiel sensibilisant avec les paramètres chimiques ont été reportés. La plupart sont basés sur la combinaison d'un paramètre de réactivité avec un paramètre d'hydrophobicité. La formation d'une association stable avec une protéine transporteuse est le facteur clé qui détermine le potentiel allergisant d'une substance. Les mécanismes de réactivité chimique entre un électrophile et un nucléophile dans la sensibilisation cutanée les plus fréquemment rencontrés sont : les réactions de type Michael, les réactions SN₂, les réactions SN_{Ar} (substitution nucléophile aromatique), les réactions d'acylation et la formation de base de Schiff qui peuvent servir à décrire le domaine d'applicabilité d'un modèle (Q)SAR et constituer la base pour le regroupement des substances en catégorie chimique (European Chemicals Agency, 2016). Parallèlement aux modèles (Q)SAR, des systèmes informatiques dits « systèmes experts » (computer-based Expert Systems) ont été développés afin de prédire la sensibilisation cutanée. Certains sont des systèmes basés sur le savoir (comme DEREK), d'autres des systèmes statistiques (comme Leadscope, MultiCase), et enfin il existe également des hybrides entre les deux (comme Tissue Metabolism Simulator : Time-SS). La fiabilité de chaque prédiction doit être évaluée pour chaque substance en fonction de l'information sur l'applicabilité du modèle (European Chemicals Agency, 2016). Le tableau 7 reprend l'ensemble des outils *in silico* disponibles. L'ECHA recommande d'utiliser autant de logiciels différents que possible pour rassembler l'ensemble des différentes informations.

Nom commercial	Modèle	Type du modèle	Mesure finale et/ou type de données
QSAR Toolbox, gratuit http://www.qsartoolbox.org/	Profileurs de liaisons aux protéines : • OASIS v1.3 • OECD • Puissance • Alertes pour la sensibilisation cutanée par OASIS v1.3	Structures d’alerte	Liaison protéique
	Mesure finale : • Sensibilisation cutanée • Sensibilisation cutanée ECETOC • ECHA Chem	Résidence des données	Principalement le LLNA et GPMT
	Remplissage des données manquantes : • Read-across • Analyse de la tendance	Qualitative ¹ ou quantitative	Principalement le LLNA et GPMT
ToxTree, gratuit http://toxtree.sourceforge.net/skinsensitisation.html	Domaines de réactivité en sensibilisation cutanée	Structures d’alerte	Mode d’action de la réactivité
VEGA, gratuit http://www.vega-qsar.eu/	Sensibilisation cutanée CAESAR	Qualitative ²	LLNA
CASE Ultra, commercial http://www.multicase.com/case-ultra	Modèle de toxicité SkinEye	Qualitative ³	Beaucoup (GPMT, LLNA et autres)
Derek Nexus, commercial http://www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm	Sensibilisation cutanée	Qualitative ⁴	GPMT et LLNA
TIMES, commercial http://oasis-lmc.org/products/models/human-health-endpoints/skin-sensitization.aspx	Sensibilisation cutanée TIMES	Qualitative ⁵ (Simulateur métabolique+QSAR « locaux »)	Principalement le LLNA et GPMT
TOPKAT, commercial http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/qsar-admet-and-predictive-toxicology.htm	Deux modèles : • Non-sensibilisant vs. Sensibilisant • Faible/Moderate vs. Sensibilisants forts	Qualitative ⁶	GPMT
Base de données (Q)SAR Danemark http://qsar.food.dtu.dk/	Sensibilisation cutanée (CASE Ultra, Leadscope et SciQSAR)	Qualitative ⁷	GPMT et données de DCA chez l’homme

¹ Échelle OASIS dans la boîte à outils QSAR : Non-sensibilisant (EC₃ ≥50%), Sensibilisant faible (10% ≤EC₃ <50%), Sensibilisant puissant (EC₃ <10%).

² Modèle de sensibilisation cutanée pour VEGA : données issues de Gerberick *et al.*, (2005) (sensibilisants extrêmes, forts et faibles codés positifs, NC négatifs)

³ Modèle CASE Ultra provenant du LLNA : faible (EC₃ <100%), modéré (EC₃ <10%), fort (EC₃ <1%).

⁴ Les résultats de Derek qui peuvent être considérés comme des alertes «positives» sont : CERTAIN, PROBABLE, PLAUSIBLE ou EQUIVOQUE (par ordre décroissant de probabilité), car la molécule de requête contient un toxicophore qui correspond à l'une des alertes qui ont été codées. EQUIVOQUE est recommandé comme étant un résultat « positif » dans Derek parce que l'alerte est ressortie pour la molécule, mais il y a une indication qu'il y ait un(des) autre(s) aspect(s) que Derek a considéré dans son calcul (telles que les propriétés physico-chimiques).

⁵ Données provenant de différentes sources et tests convertis en trois catégories (Fort, Faible et Non sensibilisant) selon le schéma suivant : (i) Données de LLNA : extrême, fort et modéré convertis en « Fort », faible à « Faible » et non sensibilisant en « Non sensibilisant »; (ii) Données du GPMT : données GPMT fortes et modérées converties en « Fort », faible en « Faible » et non sensibilisant en « Non sensibilisant »; (iii) Les données du BfR (Schlede *et al.*, 2003) : catégorie A convertie en « forte », catégorie B en « faible », catégorie C en « non sensibilisant ».

⁶ Échelle TOPKAT (GPMT, % d'animaux positifs) : Faible (1-30%), Modérée (30-70%), Forte (70-100%).

⁷ Plusieurs facteurs ont été pris en compte dans la classification des activités, notamment : le type de test utilisé, c'est-à-dire le test de maximisation chez l'homme ou le cobaye; utilisation d'adjuvant; dose utilisée pour le challenge; et le taux de sensibilisation. Les sensibilisants faibles, modérés, forts et extrêmes ont été inclus dans l'ensemble du modèle comme positifs et les non sensibilisants ont été inclus comme négatifs.

Tableau 7 : Outils *in silico* pour l'évaluation de la sensibilisation cutanée (European Chemicals Agency, 2016)

Si les approches *in silico* sont fortement recommandées par différentes instances, elles ne sont pour autant pas clairement validées comme méthodes de remplacement.

3.4 Les tests alternatifs associés aux différents événements clés

Il a été démontré qu'un allergène de contact, pour aboutir à la maturation de la DC, induit un signal de stress et un déséquilibre de la balance redox cellulaire activant un ensemble de voies de signalisation qui vont agir de manière coopérative pour aboutir à l'expression de molécules de co-stimulation et à la production de médiateurs inflammatoires. Parmi les différents marqueurs décrits, certains ressortent de manière récurrente et concordante au travers de nombreuses études menées par différentes équipes, comme le glutathion, Nrf2, CD86, CD54 ou encore l'IL-8. Cette connaissance des mécanismes d'action des allergènes a permis de développer des tests permettant de prédire le potentiel d'une molécule à être allergisante. Les différents tests développés visent à étudier et à analyser les différentes propriétés des allergènes (pénétration au travers de l'épiderme, réactivité chimique vis-à-vis des nucléophiles, capacité à activer la réponse innée au niveau des cellules cutanées, induction de la prolifération des LT spécifiques de l'haptène...).

Parmi ces tests, plusieurs sont actuellement validés au niveau réglementaire. Dans les paragraphes suivants, un état de l'art de l'ensemble des méthodes alternatives développées sera présenté résultant de la connaissance des mécanismes d'action de l'AOP de la sensibilisation cutanée (OECD, 2012). Toutes ces méthodes alternatives développées ne permettent d'étudier qu'une étape clé à la fois et sont représentées dans la figure 27 (Reisinger *et al.*, 2015).

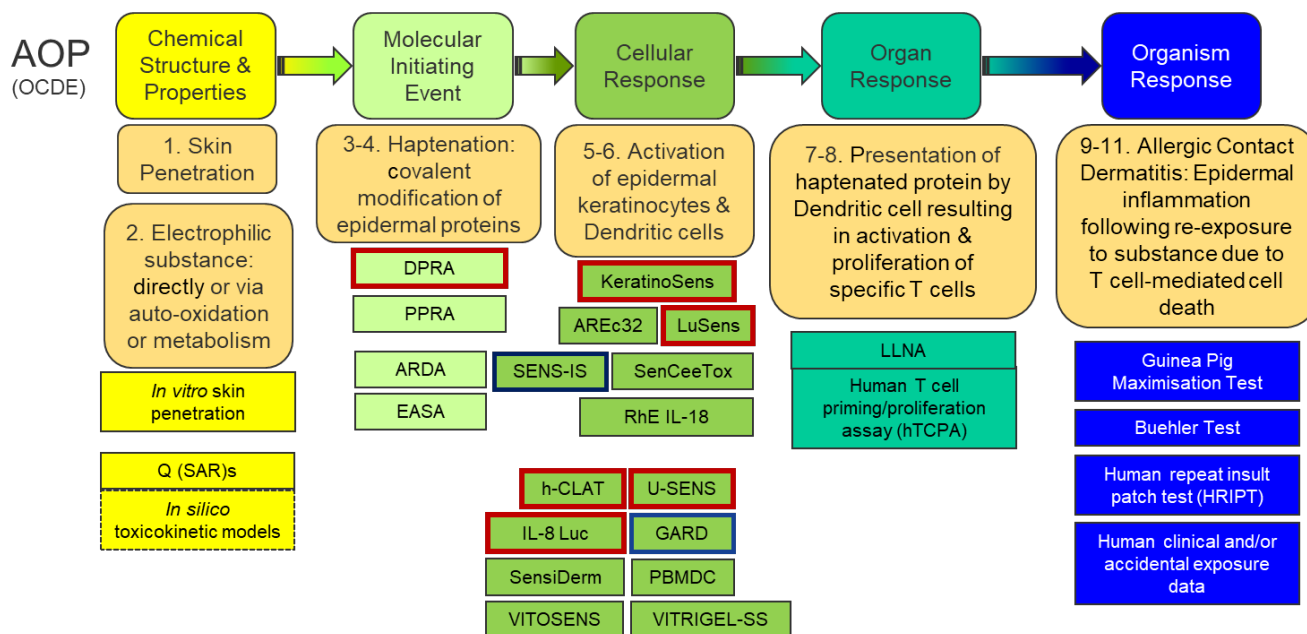


Figure 27 : Méthodes d'essai non animales et leur correspondance à l'AOP de la sensibilisation cutanée
(Reisinger *et al.*, 2015)

Les méthodes présentées dans des boîtes rouges représentent les méthodes actuellement validées par l'OCDE. Les boîtes bleues correspondent aux méthodes en cours de validation par l'ECVAM et/ou l'OCDE.

3.4.1 La réactivité chimique

La corrélation entre la réactivité chimique envers les protéines et la sensibilisation cutanée est bien établie (Lepoittevin and Cribier, 1998). En l'occurrence, si une substance est capable de réagir avec une protéine, soit directement, soit après une biotransformation adéquate, alors elle a la capacité d'agir comme un allergène de contact.

La majorité des allergènes de contact (ou leurs métabolites) ont des propriétés électrophiles et sont capables de réagir avec des nucléophiles cellulaires comme le glutathion (GSH) ou les résidus des protéines pour former une liaison covalente stable. De nombreux acides aminés de protéines sont capables de réagir avec ces allergènes électrophiles comme la lysine et la cystéine, mais d'autres acides aminés contenant des hétéroatomes électrophiles, tels que l'histidine, la méthionine, la tyrosine, peuvent aussi réagir (Ahlfors *et al.*, 2003). En l'occurrence, ces protéines possèdent plusieurs atomes donneurs d'électrons, tels que les atomes de soufre et d'azote, qui leur confèrent leur nature nucléophile. Ces atomes riches en électrons s'associent facilement aux molécules déficitaires en électrons pour former un complexe immunogène. Les principaux motifs reconnus comme étant à l'origine d'une réaction avec les protéines sont les suivants : domaine accepteur de Michael (addition nucléophile d'un carbanion sur un composé carbonyle α,β -insaturé) présenté en figure 28, domaine SNAr (Substitution nucléophile aromatique), domaine SN2 (substitution nucléophile

bimoléculaire), domaine base de Schiff (imine secondaire), domaine agent acétylant (introduction d'un groupe fonctionnel acétyle dans un composé organique). La réactivité des protéines étant une étape clé dans l'induction de la sensibilisation cutanée, il a été émis l'hypothèse que la réactivité pourrait être utilisée dans le ciblage du potentiel allergisant des produits chimiques.

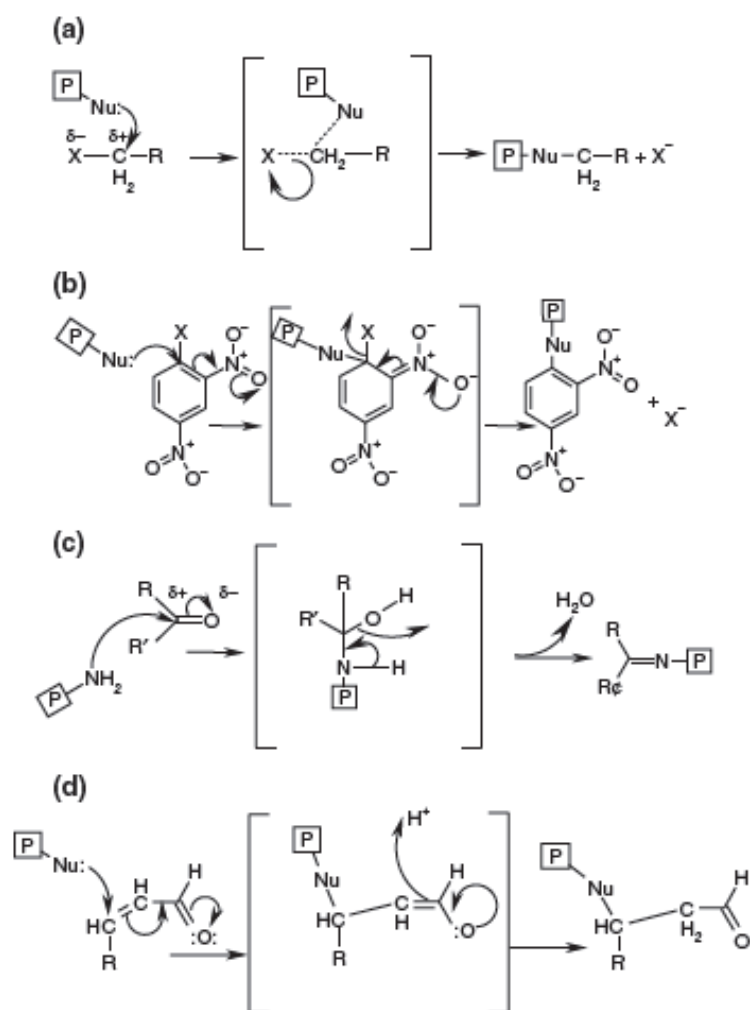


Figure 28 : Réactions principales entre les haptènes et les protéines (Divkovic *et al.*, 2005)

Cette caractéristique peut être mesurée en utilisant des tests de réactivité peptidique. Différentes méthodes existent (Roberts *et al.*, 2008) : la mesure de la réactivité en cinétique, la détermination de la dose donnant 50% de réaction à un temps donné ou encore la quantification du pourcentage de déplétion. La plupart des tests mesurent soit la disparition du nucléophile, soit la formation de l'adduit entre l'électrophile et le nucléophile, et ce par différentes méthodes analytiques dont la chromatographie liquide à haute performance (HPLC)-UV ou couplée à la spectrométrie de masse. Dans un cas le test est rapide, quantitatif

et adapté à l'évaluation en routine et dans l'autre, le test permet une connaissance plus fine de la réaction et des mécanismes réactionnels mis en jeu. Les nucléophiles souvent utilisés dans les tests sont des peptides de synthèse avec un ou plusieurs résidus lysine, histidine ou cystéine (Gerberick *et al.*, 2008, 2007, 2004; Natsch and Gfeller, 2008). Le glutathion (GSH), tripeptide et thiol le plus abondant dans les cellules est également utilisé pour mesurer la réactivité chimique (Böhme *et al.*, 2009). Les peptides modifiés seront ensuite pris en charge par les DC dans les nœuds lymphatiques, et déclencheront une réponse immunitaire adaptative. Ainsi, une possibilité pour prédire la sensibilisation cutanée basée sur des données *in vitro* est donc l'évaluation de la réactivité chimique de la substance envers les peptides et protéines, correspondant à l'étude de l'événement moléculaire initiateur (Figure 29), mis en œuvre dans le test du DPRA.

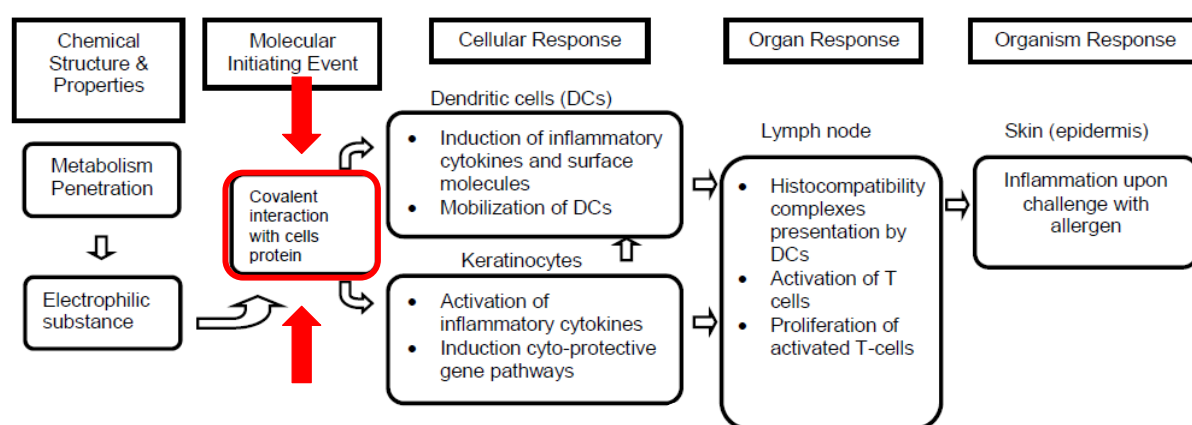


Figure 29 : Mesure de l'événement moléculaire initiateur (ou événement clé (KE1)) selon l'AOP

❖ Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)

En collaboration avec l'équipe du Pr. Lepoittevin à l'université de Strasbourg, Gerberick et son équipe (Procter & Gamble) furent les premiers à mettre au point et évaluer l'efficacité d'un test mesurant la réactivité envers les protéines (Gerberick *et al.*, 2009, 2007, 2004). En 2004, ils ont tenté de déterminer si la réactivité chimique envers les acides aminés nucléophiles avait une bonne corrélation avec le potentiel allergisant. Ils ont examiné la réactivité de différentes substances chimiques (38 molécules) ayant différents EC3 obtenus en LLNA. Ils ont ensuite évalué la réactivité envers le GSH et 3 peptides synthétiques contenant de la cystéine, lysine, et de l'histidine, chacun à des *ratios* de concentration peptide/substance chimique propre. Après une incubation de la substance avec les peptides durant 24h dans le noir et à température ambiante, les échantillons sont analysés par HPLC-UV. De cette manière, la



quantité de peptide non modifiée a pu être mesurée. La formation d'un complexe entraîne une consommation du peptide initial, qui est évaluée par intégration de l'aire du signal du peptide restant. La déplétion peptidique est alors corrélée au potentiel allergisant de la molécule. Un seuil de 10% de déplétion a été défini afin de classer la substance comme sensibilisante. Les résultats ont permis de montrer une bonne corrélation entre le potentiel allergisant et la déplétion en GSH, cystéine et lysine. Cette étude a ainsi fourni la preuve initiale de l'intérêt de continuer l'évaluation de la réactivité aux peptides pour l'évaluation du potentiel allergisant (histidine exceptée). Il est à noter qu'aucun des pro-haptènes testés n'a provoqué de déplétion supérieure à 10%.

La même équipe a approfondi l'évaluation en 2007 en étendant le nombre de substances testées à 82 (44 nouvelles substances) bénéficiant de résultats en LLNA (Gerberick *et al.*, 2007). L'histidine ne s'étant pas montrée concluante, elle fut retirée du projet. Ils ne restèrent donc plus que le GSH, la lysine et la cystéine. Pour la lysine et la cystéine, deux *ratios* de concentration peptide/substance chimique ont été testés : 1/10 et 1/50. Le temps de réaction a été établi à 24h, et la diminution en peptide toujours mesurée par HPLC-UV. Les données ont ensuite été analysées *via* une classification par arbre décisionnel afin de développer un modèle de prédiction pragmatique pour évaluer et interpréter les données du DPRA. Cet arbre décisionnel est établi sur la base d'un algorithme qui évalue toutes les diminutions peptidiques pour chacune des substances chimiques dans le contexte de sa propre catégorie de sensibilisation au LLNA. Six modèles d'arbre décisionnel ont été testés puis évalués de façon statistique. Le modèle avec la meilleure précision et le nombre de mauvaises classifications le plus faible est celui prenant en compte tous les peptides et leurs différents *ratios*. Mais un autre modèle d'une précision quasiment similaire et avec un nombre de mauvaises classifications à peine plus élevé a été retenu, de par sa simplicité de mise en œuvre. Ce modèle ne prend en compte que les résultats de la cystéine 1/10, puis de la lysine 1/50, dont les peptides ont la structure suivante :

- peptide à cystéine : Ac-RFAA**C**AA-COOH,
- peptide à lysine : Ac-RFAA**K**AA-COOH.

La réactivité ainsi mesurée dans le test du DPRA est très bien corrélée (> 80%) avec les catégories de potentiel mesurées par le LLNA.

Deux essais inter-laboratoires ont été réalisés afin d'évaluer la reproductibilité du DPRA. Le DPRA a été soumis à évaluation par l'ECVAM et leurs recommandations ont été publiées en

novembre 2013 (Aleksic *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2003; Natsch and Gfeller, 2008). Ce test a été validé par l'ECVAM pour transférabilité et fiabilité, et accepté par l'OCDE en février 2015 sous la ligne directrice 442C (OECD, 2015a). Ce test *in chemico* est donc proposé comme modèle pour l'étude de l'événement moléculaire initiateur de l'AOP de la sensibilisation cutanée. Le protocole du DPRA, développé par les équipes de Gerberick et Lepoittevin (2004), mesure le potentiel d'hapténisation et permet de quantifier la réactivité chimique par HPLC-UV vis-à-vis de deux peptides de synthèse contenant des résidus cystéine ou lysine (Gerberick *et al.*, 2007, 2004) (Figure 30). Même si on dénombre plusieurs acides aminés nucléophiles, le groupe amine ($\epsilon\text{-NH}_2$) de la lysine et le groupe thiol ($-\text{SH}$) de la cystéine sont des sites nucléophiles relativement forts, qui sont le plus souvent cités dans la littérature pour l'évaluation de la réactivité des haptènes.

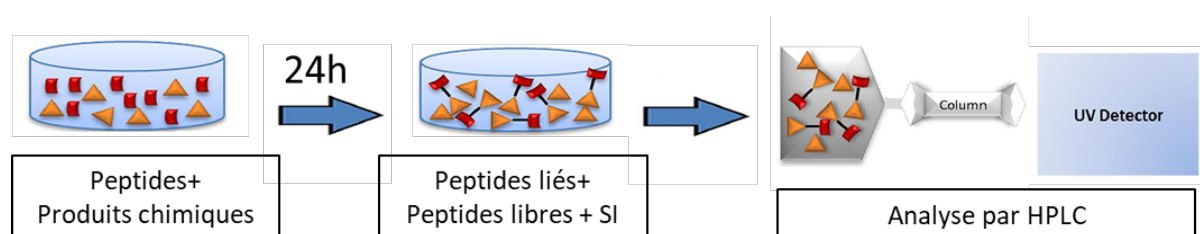


Figure 30 : Principe du Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) (Wong *et al.*, 2015)

En résumé, le protocole développé et retenu est le suivant : les substances à tester sont dissoutes et incubées avec des peptides dans des rapports de 1/10 pour le peptide à cystéine ou 1/50 pour le peptide à lysine pendant 24h à température ambiante et la concentration de peptide non épuisée restante (ou non déplétée) est déterminée par HPLC avec gradient par élution et détection UV à 220 nm. Les peptides de synthèse contiennent de la phénylalanine destinée à faciliter la détection. Les substances d'essai sans poids moléculaire spécifié sont dissoutes à une concentration de 100 mM en supposant un poids moléculaire de 375 g/mol ou 200 g/mol et une pureté de 100%. Ces substances sont incubées dans des proportions de 1/5 (pour le peptide cystéine) ou 1/24 (pour le peptide lysine) sur la base de la masse absolue. De plus, pour chacune des substances à tester, un contrôle de co-élution est effectué afin de détecter une interférence possible de la substance avec les peptides. La déplétion peptidique des échantillons incubés dans la substance d'essai est comparée à la déplétion peptidique des échantillons témoins du solvant et exprimée en tant que déplétion peptidique relative. La déplétion mesurée correspond à la baisse en nombre des peptides entiers et intacts. Le taux

de déplétion représente la diminution du nombre de peptides intacts en fonction du nombre total de peptides présents dans l'échantillon. Suite aux recommandations du développeur du test, une déplétion en peptides cystéine et lysine est rapportée pour chaque substance d'essai, et des valeurs négatives dans la plage de 0% à -10% sont considérées comme non déplétables, c'est-à-dire rapportées à 0%. Des valeurs négatives dépassant -10% sont une indication de co-élution, ces valeurs de déplétion doivent être rapportées comme étant non modifiées. Les prédictions du potentiel et de la puissance de sensibilisation sont obtenues à partir des valeurs de déplétion en utilisant l'algorithme décrit par Gerberick *et al.* (2007). Les pourcentages de déplétion de la cystéine et de la lysine sont ensuite établis par calcul et utilisés dans un modèle prédictif qui permet d'assigner le produit chimique testé à l'une des 4 classes de réactivité utilisées pour distinguer les sensibilisants des non sensibilisants (Tableau 8).

% moyen de déplétion de la cystéine et de la lysine	Classe de réactivité	Prédiction DPRA
0% < % moyen de déplétion < 6,38%	Réactivité nulle ou minimale	Non sensibilisant
6,38% < % moyen de déplétion < 22,62%	Faible Réactivité	Sensibilisant
22,62% < % moyen de déplétion < 42,47%	Réactivité modérée	
42,47% < % moyen de déplétion < 100%	Forte réactivité	

Tableau 8 : Modèle prédictif du Direct Peptide Reactivity Assay (Gerberick *et al.*, 2007)

De nombreuses variantes sont actuellement utilisées, que ce soit sur la nature des peptides utilisés, leurs nombres, les cinétiques d'incubation, d'analyse ou encore les types d'analyse (formation d'adduits, réactivité sur les thiols, oxydation du peptide...) (Aleksic *et al.*, 2008; Roberts and Natsch, 2009). De plus, des optimisations de ce test sont en cours afin d'augmenter le domaine d'applicabilité du test dans le but de pouvoir tester des molécules peu hydrosolubles (microémulsion) ou des pro-haptènes nécessitant une oxydation pour être actifs (système d'oxydation/métabolisation) (Gerberick *et al.*, 2009).

Les applications et limites du DPRA

Ce test n'est pas applicable pour les métaux ni les oxydants car ils entraînent une dimérisation de la cystéine. Il n'est pas adapté non plus pour les substances fortement hydrophobes, les substances de composition inconnue ou variable, les produits de réaction complexe ainsi que les matériaux biologiques. L'une des limites de ce test est qu'il ne contient pas de système

d'activation métabolique compétent permettant de détecter les pro-haptènes.

❖ **PPRA (Peroxidase Peptide Reactivity Assay)**

Développé à partir du DPRA par la même équipe (Procter & Gamble), ce test *in chemico* est un raffinement du DPRA permettant d'identifier les pro-haptènes et les pré-haptènes potentiels (Lalko *et al.*, 2013). Les peptides à cystéine et lysine sont incubés avec la substance chimique et une peroxydase (peroxydase de Raifort et/ou peroxyde d'hydrogène). Cette nouvelle approche consiste à utiliser le système d'oxydation « HRP/P » dans lequel on combine l'horseradish peroxydase (HRP) et du peroxyde d'hydrogène (plus connu sous le nom d'eau oxygénée). La HRP a l'avantage principal de posséder un site actif facilement accessible. Cette enzyme présente un large spectre de substrats et donc de pro-haptènes potentiels (en comparaison avec les autres peroxydases, notamment les différentes isoformes de CYP450). De plus son coût est faible, elle est facilement disponible, bien caractérisée et hautement stable. La détection des peptides intacts est réalisée de la même manière que dans le DPRA. Huit concentrations du produit chimique sont testées (au lieu d'une seule dans le DPRA). Les peptides sont incubés durant 24h en présence et en absence d'enzyme. Après incubation, les différentes concentrations sont analysées par spectrométrie de masse. A partir de la réponse de déplétion en peptide par rapport à la concentration, la concentration entraînant 25% de déplétion en peptides (EC25) est déterminée. Les substances ayant un EC25 $\geq 0,1$ mM sont considérées comme « réactives », et celles ayant un EC25 $< 0,1$ mM sont considérées comme « hautement réactives ». Les deux étant classées dans la catégorie « sensibilisants », tandis que les substances induisant moins de 15,1% de déplétion, quelle que soit leur concentration, sont considérées comme « non sensibilisantes » (Gerberick *et al.*, 2009).

❖ **Spectrométrie RMN HRMAS sur épiderme 3D reconstruit**

La stratégie *in chemico* pour la prédiction du potentiel allergisant d'une molécule chimique a été, jusqu'à présent, basée sur l'utilisation de modèles peptidiques en solution. Dans la phase précoce de la sensibilisation cutanée, un allergisant interagit avec les protéines de l'épiderme. Il est supposé que les résidus principalement électrophiles d'un allergène interagissent avec les acides aminés nucléophiles comme la cystéine ou la lysine pour conduire à l'hapténation des protéines épidermiques. Ces premiers événements sont quantifiés dans une certaine mesure par des méthodes telles que le DPRA ou le PPRA. Cependant, des limites ont pu être

observées avec le DPRA pour des molécules réactives comme les colorants capillaires oxydants. D'une part, il a été montré que la réactivité des allergènes cutanés vis-à-vis des résidus nucléophiles était très versatile et qu'un seul peptide/nucléophile ne pouvait pas être corrélé avec précision au potentiel de sensibilisation. De plus, les problèmes de solubilité ainsi que les aspects d'activation chimique et métabolique ne sont pas toujours correctement couverts. Ainsi, des études de réactivité chimique basées sur un épiderme 3D reconstruit en association avec la spectroscopie à Résonance Magnétique Nucléaire HRMAS (High Resolution Magic Angle Spinning Spectroscopy) ont montré que les allergènes chimiques modifient souvent des résidus nucléophiles autres que la lysine et la cystéine. En effet, le rôle et l'impact de telles modifications, principalement concernant l'histidine, sur le potentiel de sensibilisation des produits chimiques ne sont pas couverts par les tests *in chemico* actuels car ce résidu a une faible réactivité en solution. Ce projet pour mesurer la réactivité chimique sur les protéines tissulaires de la peau par quantification des protéines/peptides modifiés dans un épiderme 3D reconstruit est en cours de développement au sein de l'équipe du Pr. Lepoittevin à Strasbourg.

3.4.2 L'activation du kératinocyte

Les substances allergisantes arborent une haute diversité chimique et physico-chimique, mais elles ont comme unique caractéristique de partager en commun une réactivité intrinsèque envers les protéines/peptides (exception faite des pré- et pro-haptènes). En effet, les haptènes peuvent réagir avec les protéines de la surface cellulaire et activer les voies de réponse dans les KC (Weltzien *et al.*, 2009). L'absorption de l'haptène par les KC active de multiples événements, y compris la libération de cytokines pro-inflammatoires et l'induction de voies cellulaires cytoprotectrices. L'exposition des KC à des allergènes entraîne également l'induction d'une réponse antioxydante/électrophile dépendante de l'élément ARE/EpRE (Natsch and Emter, 2008). Ce mécanisme cellulaire qui reconnaît différents électrophiles a été découvert et décrit comme étant un senseur cellulaire et est représenté en Figure 31 (Dinkova-Kostova *et al.*, 2017, 2005).

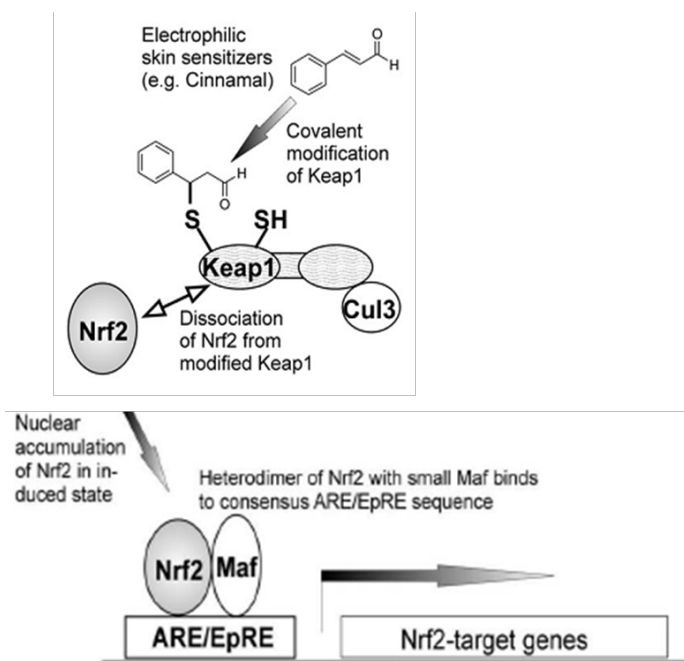


Figure 31 : Vue générale de l'induction de la voie Nrf2 par les allergènes cutanés (Natsch, 2009)

En effet, la caractéristique électrophile des composés sensibilisants leur confère une réactivité chimique particulière envers les thiols, présents dans la chaîne latérale de l'acide aminé soufré cystéine. La protéine régulatrice Keap1 (Kelch-like-ECH-associated protein 1) contient des résidus cystéines. A l'état basal, Keap1 est lié au facteur de transcription Nrf2, qui reste dans le cytoplasme et est ubiquitiné par le complexe ubiquitine ligase Cul3-Keap1, conduisant à sa dégradation par le protéasome. Des modifications covalentes des résidus cystéines par des petites molécules conduisent à la dissociation de Keap1 de son facteur de régulation transcriptionnel Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). Nrf2 s'accumule ensuite dans le noyau pour activer des gènes cibles qui ont un élément de réponse antioxydant (ARE) au niveau de la séquence promotrice. Ainsi, en intégrant un gène rapporteur comme celui de la luciférase sous le contrôle d'une séquence ARE, il devient possible de vérifier l'activation ou non de cette voie, et donc le potentiel électrophile d'une substance (Ball *et al.*, 2011). La Figure 32 représente l'événement clé n°2 mesuré par l'activation du kératinocyte.

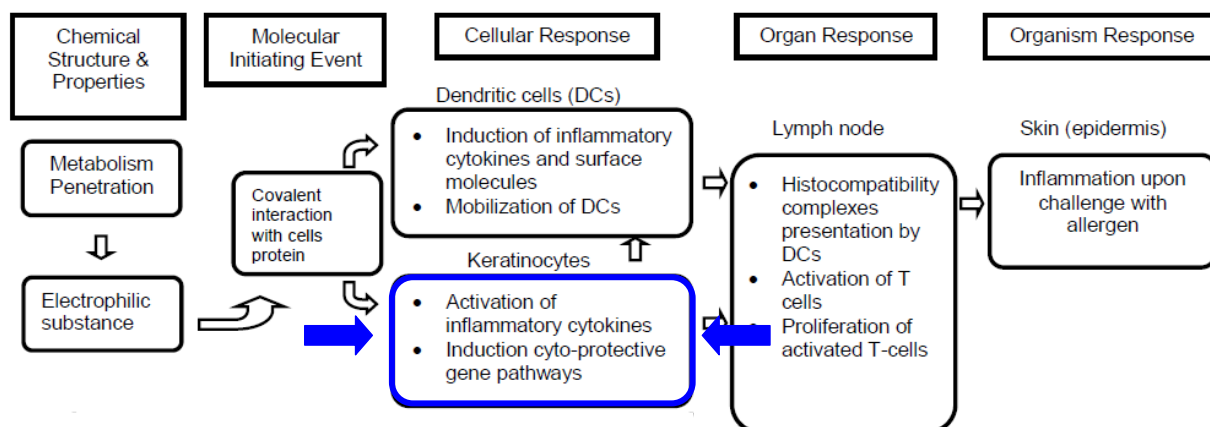


Figure 32 : Mesure de l'activation du kératinocyte selon l'AOP

❖ Test de lignée cellulaire AREc32

Ce test *in vitro*, développé par CXR Bioscience, fut la première méthode exploitant l'activation de la voie Keap1-Nrf2-ARE. Elle utilise une lignée cellulaire cancéreuse (MCF-7) qui contient un gène de la luciférase contrôlé par 8 copies de l'élément ARE cis-enhancer (Wang *et al.*, 2006). La cytotoxicité de la substance d'intérêt est étudiée en parallèle par mesure des taux d'adénosine triphosphate (ATP). L'expression de la luciférase à 50% au-dessus du véhicule contrôle est caractéristique d'une induction significative : chaque substance induisant la luciférase au dessus de ce seuil est considérée comme allergisante (Wang *et al.*, 2006). Les résultats obtenus par cette lignée cellulaire AREc32 ont été comparés au test du LLNA. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les sensibilisants agissent *via* la réactivité protéine/peptide par la modification covalente des résidues cystéine provoquant l'inactivation de Keap1. Cette étude a montré que le test AREc32 en comparaison avec les données du LLNA peut être utilisé pour évaluer les sensibilisants cutanés (Natsch and Emter, 2008). Au vu des résultats, la lignée cellulaire AREc32 peut être incluse dans une batterie de tests *in vitro* afin d'étudier la sensibilisation cutanée (Natsch *et al.*, 2009).

❖ KeratinoSens™

Ce test *in vitro*, développé par le parfumeur Givaudan, évalue aussi l'importance de la voie de signalisation de réponse au stress oxydant (voie de signalisation Keap1-Nrf2-ARE) suite à l'application d'une molécule allergisante (Emter *et al.*, 2010). Il est basé sur une lignée cellulaire de KC humains (HaCaT) transfectés de manière stable par un gène codant pour la

luciférase sous le contrôle de l'élément ARE du gène humain AKR1C2 (Andreas *et al.*, 2011; Natsch and Emter, 2008). L'induction de la luciférase est utilisée pour évaluer les sensibilisants.

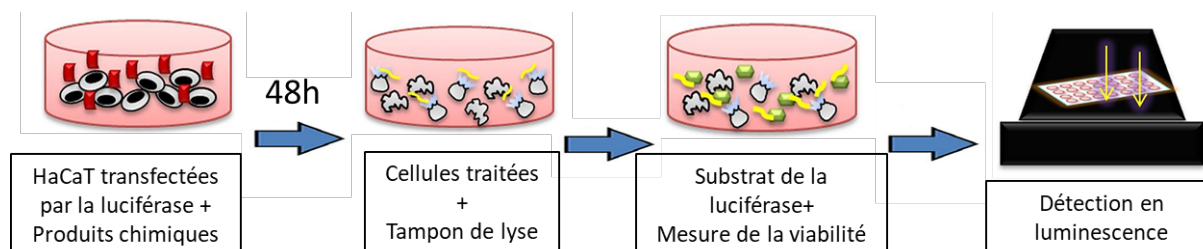


Figure 33 : Principe du KeratinoSens™ (Wong *et al.*, 2015)

En résumé, le protocole, schématisé en Figure 33, consiste à réaliser douze concentrations de la substance dissoute dans le DMSO ou le milieu de culture cellulaire (allant de 0,98 à 2000 μM). Celles-ci sont appliquées sur les cellules ensemencées en plaque 96 puits pendant 48h avec à *minima* deux répétitions indépendantes. Après lyse cellulaire, le substrat de la luciférase est ajouté, puis la détection est mesurée au luminomètre au bout de 20 min. En parallèle, la viabilité cellulaire est mesurée par le test colorimétrique du MTT (marqueur de viabilité). La cytotoxicité est exprimée par l'IC50, correspondant à la concentration induisant 50% de la cytotoxicité maximale. Pour valider le test, la viabilité cellulaire doit être supérieure à 70%. L'induction du gène de la luciférase est mesurée par luminescence et est corrélée au pouvoir allergisant de la substance testée. Les mélanges ou les substances d'essai dépourvus d'un poids moléculaire défini sont dilués en considérant un poids moléculaire *pro forma* de 200 g/mol, donnant ainsi 12 concentrations d'essai comprises entre 0,195 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. L'induction de la luciférase, mesurée pour la courbe dose-réponse entière, est donnée par l'*I*_{max} (le taux d'induction maximal utilisant le solvant comme contrôle) et l'*EC*_{1,5} (la concentration nécessaire pour induire un taux d'induction de 1,5). Un taux d'induction (*EC*_{1,5}) supérieur au seuil de 1,5 de l'activité de la luciférase (correspondant à une augmentation de l'activité du gène de 50%) est considéré comme prédictif d'une réponse positive significative. De plus, la concentration testée ayant l'induction la plus élevée est définie comme l'*I*_{max}. Une substance d'essai est identifiée comme étant positive si, dans au moins deux des trois expériences indépendantes, l'*I*_{max} présente une induction statistiquement significative (par *t* test) de 1,5 fois supérieure au contrôle. De plus, l'*EC*_{1,5} doit être inférieure à 1 000 μM (ou 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour les substances testées avec une masse molaire inconnue) tout en ayant une

viabilité cellulaire de 70% par rapport au véhicule témoin, à la concentration la plus faible entraînant une induction du gène supérieure de 1,5 fois. L'induction par la luciférase a clairement montré une relation dose-réponse. Cependant, une minorité de molécules sensibilisantes, plus spécifiquement celles réagissant avec des résidus lysine, semblent ne pas activer la voie Nrf2-Keap1 et pourraient activer une autre voie de toxicité. Cela donnerait lieu à des faux négatifs, comme avec les pré- et les pro-haptènes. Une étude interlaboratoire a permis de montrer que ce test est simple à mettre en oeuvre, transférable et reproductible (Andreas *et al.*, 2011). De même, après une étude intra- et inter-laboratoires (Andreas *et al.*, 2011; Natsch, 2009), ce test a été jugé de bonne reproductibilité et hautement prédictif. Le KeratinoSens a été validé par l'ECVAM, et les recommandations ont été publiées en février 2014. Le test du KeratinoSens a été validé par l'OCDE en février 2015 sous la ligne directrice 442D (OECD, 2015b).

Les applications et limites du KeratinoSens

Ce test n'est pas applicable pour les substances chimiques non solubles dans l'eau ou le DMSO. De même, ce test permet de détecter préférentiellement les produits chimiques sensibilisants ayant une réactivité sélective vis-à-vis des groupes nucléophiles de sulfate de cystéine. Par ailleurs, cette lignée cellulaire transfectée présente une capacité métabolique limitée et donc les pro-haptènes ne sont généralement pas détectés par ce test.

❖ LuSens

Une méthode similaire, le LuSens, a été développée en parallèle par BASF (Ramirez *et al.*, 2014). Comme les précédents tests, le LuSens est un test *in vitro* qui utilise une lignée cellulaire dérivée de KC humains dans laquelle a été inséré le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur ARE. Cet élément ARE peut provenir de différents gènes et espèces, par exemple AKR1C2 humain dans le cas de KeratinoSens™ ou NQO1 de rat dans le cas du LuSens. L'activité de la luciférase est représentative de l'activation de la voie Keap1-Nrf2-ARE. L'interchangeabilité de ce test avec celui du KeratinoSens™ est de 88%. Il a été validé pour un essai industriel pour transférabilité et fiabilité ainsi qu'en peer-reviewed (révision par des pairs) par l'ESAC. Le LuSens est en cours de validation par l'OCDE sous la ligne directrice 442D pour l'ensemble des tests utilisant la luciférase couplée à l'élément ARE-Nrf2 (OECD, 2017a, 2015b).

❖ SENS-IS

Ce test *in vitro*, développé par le groupe Immunosearch, est proposé pour l'étude du second événement clé dans l'AOP de la sensibilisation cutanée. Il permet d'évaluer la capacité des substances chimiques testées à induire spécifiquement l'expression génique de biomarqueurs de l'irritation et de la sensibilisation en utilisant un épiderme 3D reconstruit (Episkin™). Ce système se base sur l'analyse de l'expression d'un large panel de biomarqueurs représentatifs de la sensibilisation cutanée. L'utilisation d'un épiderme reconstruit permet de prendre en compte les étapes de pénétration des substances en fonction de leur solubilité et de leur état physique, mais également le métabolisme cutané.

L'application d'une substance irritante et/ou sensibilisante sur la peau induit une destruction réversible du tissu et active le système immunitaire inné et adaptatif. Ces modifications biologiques sont induites par l'expression spécifique de différents groupes de gènes. Le test SENS-IS est basé sur l'analyse de trois groupes de gènes, l'un reflétant spécifiquement le potentiel irritant du composé suite à son application sur la peau (groupe Irritant) et les deux autres corrélés avec le potentiel sensibilisant (SENS-IS et ARE). En mesurant le nombre de gènes induits dans ces trois catégories à un temps donné (6h) après l'application et en le comparant aux contrôles, le test du SENS-IS permet de déterminer le danger et d'avoir une information sur la puissance.

Le test du SENS-IS est réalisé selon le protocole décrit par Cottrez *et al.* (2015). La qualité des épidermes humains reconstruits est contrôlée (modèle Episkin™). Ils sont mis en culture pendant deux semaines avant que la substance d'essai soit dissoute dans un solvant approprié (PBS, huile d'olive ou DMSO) et appliquée (30 µL) au niveau du *stratum corneum* pendant 15 minutes à 37°C, sous 5% de CO₂. Les concentrations d'essai pour chaque substance testée sont de 0,1%, 1%, 10%, 50% et 100% v/v. Pour éviter la destruction du tissu par des substances corrosives et irritantes, le test requiert une courte durée d'exposition (15 min) suivie d'un lavage au PBS pour enlever l'excès de produit et ainsi éviter toute irritation non spécifique. L'épiderme est ensuite incubé dans les mêmes conditions pendant 6h. A la fin de la période d'incubation, l'épiderme est instantanément congelé dans de l'azote liquide et l'ARN total est ensuite extrait pour une analyse quantitative par RT-qPCR. Les quantités de transcrits pour 61 gènes sont mesurées puis normalisées par rapport à trois gènes rapporteurs spécifiquement sélectionnés. Les 61 gènes sont classés en trois groupes : 23 gènes IRR sont des indicateurs de l'irritation de la peau et permettent de déterminer la dose minimale irritante, 21 gènes SENS-

IS sont impliqués dans l'inflammation, le trafic et l'homéostasie cellulaires et 17 gènes ARE sont impliqués dans la voie de détoxification REDOX. Le premier groupe de gènes pour l'irritation est utilisé pour valider le test. En effet, le test est rejeté si la substance testée à la concentration minimale induit la surexpression de plus de 20 gènes d'irritation (supérieure à 1,25 fois la valeur du véhicule témoin). De même la valeur seuil du cycle du gène HSPAA1 est utilisée pour l'évaluation de la destruction tissulaire et doit être $\leq 110\%$ pour être acceptable. La validation du test se fait après analyse du contrôle négatif (Propylène Glycol), du contrôle irritant (5% SLS), et des deux contrôles sensibilisants (50% HCA et 1% TNBS). L'expression relative des gènes du groupe SENS-IS et ARE est utilisée pour prédire la puissance de sensibilisation de la substance d'essai. Bien que l'identité des gènes associés à l'irritation ait été publiée (Cottrez *et al.*, 2016b), l'identité de l'ensemble des gènes des deux groupes SENS-IS et ARE est actuellement brevetée.

Le test SENS-IS permet également de déterminer la puissance de la substance sensibilisante. Ainsi, en fonction de la concentration utilisée, une puissance sera attribuée allant de faiblement sensibilisant à extrêmement sensibilisant. Plus la substance est sensibilisante à une concentration faible, plus la puissance sensibilisante est importante. Pour être considérée comme sensibilisante, une substance d'essai doit induire une augmentation d'au moins 1,25 fois l'expression d'au moins 6 gènes dans le groupe SENS-IS ou ARE. La plus faible concentration répondant à ces exigences détermine la prédiction de la puissance, comme schématisée dans le Tableau 9. Si aucune des concentrations d'essai ne répond à ces critères, la substance est alors considérée comme négative. Les essais sont réalisés de façon séquentielle, en commençant par des concentrations plus faibles et en testant des concentrations plus élevées uniquement lorsque la substance donne des résultats négatifs pour les critères ci-dessus (Cottrez *et al.*, 2016b).

Positivité	# pos genes Chem A	# pos genes Chem F	# pos genes Chem B	# pos genes Chem C	# pos genes Chem D	# pos genes Chem E
Genes IRR	15< x <20	<15	<15	<15	<15	>20
Genes SENS-IS	<6	<6	<6	>6	>6	>6
Genes ARE	<6	<6	>6	<6	>6	>6
Commentaires	IRR	NS	Genes REDOX	Genes SENS-IS	Genes REDOX & SENS-IS	Irritation excessive
Classification	IRR	NS	Sensibilisant	Sensibilisant	Sensibilisant	Faux positif
Positif à 50%	IRR	NS	Faible	Faible	Faible	FP
Positif à 50%+10%	IRR	NS	Modéré	Modéré	Modéré	FP
Positif à 50%+10%+1%	IRR	NS	Fort	Fort	Fort	FP
Positif à 50%+10%+1%+0,1%	IRR	NS	Extrême	Extrême	Extrême	FP

IRR : Irritation ; FP : Faux positif ; NS : Non sensibilisant.

Tableau 9 : Modèle prédictif du SENS-IS

Cette méthode a été testée et validée sur environ 180 produits chimiques. Le test SENS-IS a été soumis à l'ECVAM en septembre 2011. Il est aussi entré dans le processus de validation réglementaire de l'OCDE depuis 2015.

❖ **SenCeeTox®**

Le test du SenCeeTox® est une association de trois tests couvrant les deux premiers événements clés de la sensibilisation cutanée. Ce test *in vitro* peut être réalisé soit sur un modèle de peau reconstruite (EpiDerm™ de MatTek) soit sur une lignée de KC humains (HaCaT). Le premier test étudie la réactivité protéique par mesure de la concentration en Glutathion libre (GSH) après incubation de ce dernier avec la substance chimique à tester. La réactivité chimique est évaluée par mesure de la déplétion en GSH : la substance à tester est dissoute dans une solution contenant du GSH, la déplétion en GSH est mesurée par fluorimétrie et le pourcentage de liaison au GSH est ainsi obtenu. Elle peut également être mesurée en utilisant des microsomes de rat isolés et traités (CYP1A1 induit). Le second et le troisième tests étudient l'expression de biomarqueurs et la viabilité cellulaire (par le test du MTT) après exposition à la substance chimique. Pour la mesure de l'expression génique, trois voies de signalisation (Keap1-Nrf2, ARNT-AhR-XRE et Nrf1-MTF-MRE) connues pour être activées par les sensibilisants sont suivies par RT-qPCR (quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) *via* la quantification relative de l'expression de 11 gènes cibles

dont l'expression est contrôlée par l'une de ces trois voies. Les paramètres physico-chimiques (masse molaire, log P, solubilité) sont également pris en compte. Enfin, un algorithme associe l'ensemble des résultats (réactivité du glutathion, expression des biomarqueurs et viabilité cellulaire) et fournit un index de prédiction de toxicité (Predicted Toxicity Index, PTI) pour la substance chimique testée.

La déplétion en GSH à elle seule ne constitue pas un test assez précis pour caractériser la substance en une catégorie de puissance. Cependant, la réactivité chimique corrélée aux profils d'expression des gènes augmente significativement la prédictivité.

L'entreprise Cyprotex a donc développé une approche intégrative, le SenCeeTox[®], qui en plus de discriminer les sensibilisants des non sensibilisants, permet un classement en plusieurs catégories de puissance (Extrême, Fort, Modéré, Faible et Non Sensibilisant). La méthode et l'algorithme ont été développés à partir d'un panel de 39 substances ayant différentes catégories de puissance en LLNA. Cependant, une évaluation supplémentaire sera nécessaire pour déterminer si le test SenCeeTox[®] est acceptable en tant que méthode seule pour la sensibilisation ou comme méthode à intégrer au sein d'une ITS. Dans tous les cas, ce modèle peut potentiellement servir d'outil de screening pour évaluer la sensibilisation cutanée (Coleman *et al.*, 2015).

❖ **NCTC 2544 IL-18 assay**

Ce test *in vitro*, développé par l'Université de Milan, est basé sur la détection de l'expression intracellulaire de l'interleukine IL-18 par la lignée de kératinocytes NCTC 2544. En effet, il a été montré qu'une substance sensibilisante induit l'expression de l'IL-18 (Corsini *et al.*, 2009; Van Och *et al.*, 2005). Dans cette méthode, 12 concentrations sont utilisées afin de déterminer la concentration induisant une viabilité cellulaire de 80% (CV80) *via* le test du MTT. La CV80 correspond à la plus haute des 4 concentrations testées dans l'expérience. Si au moins une des 4 concentrations non cytotoxiques induit une augmentation de 1,2 fois la quantité d'IL-18 intracellulaire, et que cette augmentation est statistiquement significative dans au moins 2 des 3 expériences indépendantes, la substance sera classée comme étant sensibilisante. Dans le cas inverse, elle est classée comme étant non sensibilisante (Corsini *et al.*, 2009; Galbiati *et al.*, 2011).

3.4.3 L'activation de la cellule dendritique

Lors du contact avec l'haptène et en réponse aux signaux de danger perçus, la DC est activée (*i.e.* augmentation des molécules de co-stimulation et d'adhésion, sécrétion de cytokines, perte des fonctions de capture d'antigènes). Jouant un rôle clé dans l'initiation de la sensibilisation, les DC ont rapidement été proposées et identifiées comme des candidates prometteuses pour le développement de systèmes *in vitro* dans l'étude de l'événement clé n°3 de l'AOP de la sensibilisation cutanée (Figure 34).

Au début des années 2000, plusieurs groupes ont rapporté des résultats encourageants obtenus à partir de DC humaines différenciées à partir de cellules précurseurs du sang (à partir de monocyte CD14⁺ (mo-DC) ou de cellules souches de sang de cordon CD34⁺ (CD34-DC), après exposition aux allergènes. Ces tests sont basés sur les changements phénotypiques des DC, tels que l'augmentation de l'expression du CD86 et CD54, le relargage de l'interleukine IL-1 β , l'internalisation de molécules du CMH-II. Concernant les marqueurs, la surexpression de CD86 semble être clairement identifiée comme un marqueur de la sensibilisation cutanée qui varie selon un profil dose-réponse. Mais l'augmentation simultanée de la cytotoxicité en cas de contact avec une substance sensibilisante (apoptose) ou irritante (nécrose) a fait craindre une interférence entre ces deux facteurs, crainte supprimée par le groupe Ade *et al.* (2006) qui a prouvé l'indépendance des deux facteurs (cytotoxicité et index de stimulation des CD86). Bien que de nombreuses études montrent que les DC issues de précurseurs de sang (modèle le plus pertinent physiologiquement) ont la capacité de discriminer les molécules sensibilisantes sur la base d'un set de marqueurs (dos Santos *et al.*, 2009), elles présentent un certain nombre d'inconvénients, dont le coût, l'approvisionnement et la complexité des procédures d'obtention et de préparation, ainsi que leur inhérente variabilité inter-donneurs (Casati *et al.*, 2005b). Comme possible alternative et pour pallier aux problèmes de variabilité, les lignées cellulaires myéloïdes THP-1, KG-1, U937 et MUTZ-3 sont utilisées (Casati *et al.*, 2005b). Elles représentent des candidats appropriés en tant que DC de substitution et ont démontré leur capacité à afficher un phénotype proche des DC humaines après traitement par des cytokines (dos Santos *et al.*, 2009). Kao et Shiseido (Ashikaga *et al.*, 2006; H. Sakaguchi *et al.*, 2006) ont évalué l'expression du CD86 et l'internalisation de molécules du CMH-II dans les cellules THP-1 après exposition à des substances sensibilisantes. Ils ont montré que certains sensibilisants induisent une augmentation de l'expression du CD86 après 24h d'exposition et une internalisation des molécules du CMH-II après 2h. De même, Yoshida *et al.* (Yoshida *et al.*,

2003) ont démontré que les cellules immatures THP-1 (non pré-traitées par des cytokines) répondent aux sensibilisants en modulant l'expression des marqueurs de surface CD54 et CD86. La lignée cellulaire MUTZ-3 a également été évaluée en tant que méthode *in vitro* pour l'évaluation du potentiel sensibilisant en mesurant l'expression de HLA-DR, CD54 et CD86 par cytométrie en flux. De même, les cellules U937 issues d'une lignée cellulaire myéloïde qui regroupe les cellules immunitaires telles que les monocytes, les polynucléaires et les cellules dendritiques ont aussi été choisies pour ce type de test.

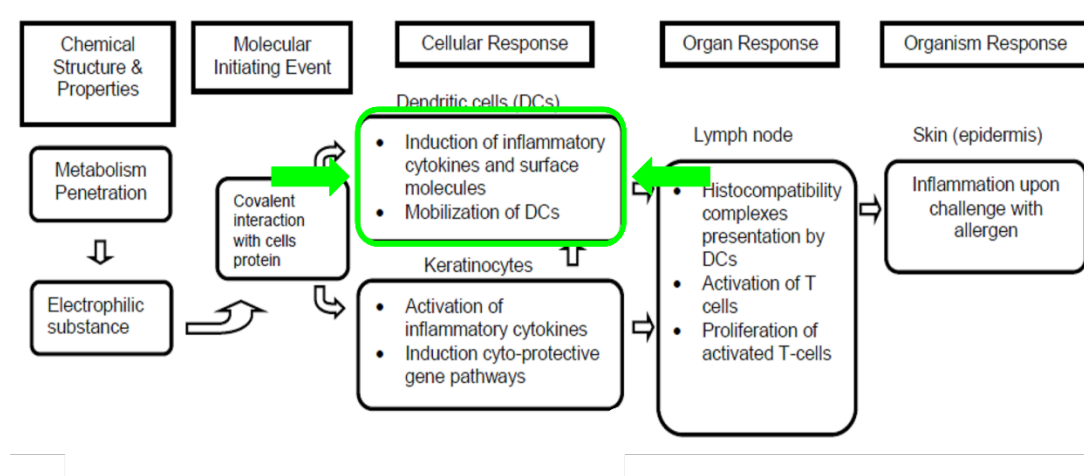


Figure 34 : Mesure de l'activation de la cellule dendritique selon l'AOP (OCDE, 2012)

❖ U-SENS™

Ce test *in vitro* permet d'évaluer la capacité d'une substance à induire l'activation des DC. La viabilité cellulaire ainsi que l'expression de la molécule de co-stimulation CD86 sont analysées en cytométrie en flux. Les protocoles basés sur la lignée cellulaire U937 ont été développés initialement par L'Oréal, Cosmital SA ainsi que Procter & Gamble (Ade *et al.*, 2006; Python *et al.*, 2007). L'Oréal a ensuite affiné le protocole comme décrit par Piroird *et al.* (2015). La détermination préalable de la CV70 (concentration induisant une viabilité cellulaire de 70%) est réalisée afin de s'affranchir de l'effet cytotoxique de la substance. Le principe du test est représenté en Figure 35.

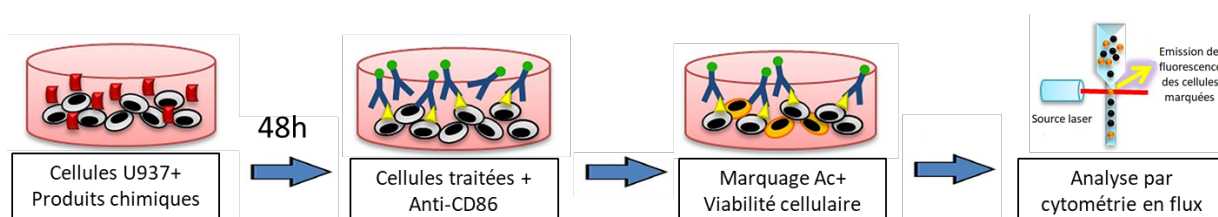


Figure 35 : Principe du test U-SENS™ (Wong *et al.*, 2015)

Les cellules de lymphome histiocytaire humaines U937 sont exposées en plaques 96 puits pendant 48h à une gamme de six concentrations de la molécule à tester (choisies en fonction de la CV70). Les cellules sont ensuite lavées et incubées avec des anticorps anti-CD86 couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et sont analysées par cytométrie en flux. La viabilité cellulaire est mesurée par exclusion à l'iodure de propidium (IP). L'IP est utilisé pour déterminer la viabilité cellulaire pour chacune des concentrations d'essai, à partir desquelles est extrapolée linéairement une CV70 (concentration ayant une viabilité de 70%). Pour les concentrations d'essai ayant une viabilité d'au moins 70%, la mesure de l'expression du CD86 sert à déterminer l'indice de stimulation (SI) par rapport au témoin solvant/véhicule correspondant. A partir de ces données, l'EC150 (concentration avec un SI de 150) est calculée par interpolation linéaire.

Une molécule est prédite sensibilisante si elle induit une augmentation du CD86 supérieure à 150% des cellules non traitées et si cette induction est dose-dépendante par rapport aux doses non toxiques (viabilité > 70%) dans au moins deux expériences indépendantes. Le test à lui seul n'est pas suffisant pour faire la discrimination entre un sensibilisant d'un non sensibilisant et doit donc s'intégrer au sein d'une ITS. De même, d'autres paramètres tels que la pénétration cutanée, la liaison aux protéines ou encore l'activation métabolique sont autant d'autres facteurs à prendre en compte.

Cosmetics Europe a jugé la reproductibilité du test U-SENS™ comme robuste après deux essais interlaboratoires. Le protocole U-SENS™ a été transféré à l'ECVAM, dont les recommandations ont été émises en 2017, et validé par l'OCDE en octobre 2017 sous la ligne directrice 442E (OECD, 2017b).

❖ **Le h-CLAT : human Cell Line Activation Test**

Ce test *in vitro* repose sur le même principe que celui de l'U-SENS™, mais sur une lignée cellulaire différente et en mesurant l'expression d'un marqueur supplémentaire. Ce test utilise la lignée THP-1 (lignée leucémique pro-monocytaire humaine) comme substitut des DC de la peau. Après incubation des cellules avec la substance chimique, l'augmentation de l'expression de marqueurs membranaires (CD54 et CD86) sur les cellules THP-1 est mesurée par cytométrie en flux. Dans une première étude de 2003, il a été trouvé que l'expression du CD86 et du CD54 dans les cellules THP-1 ou U937 (lignée cellulaire humaine de lymphome histiocytaire) était augmentée après une exposition de 24h à l'allergène. Ces lignées cellulaires

présentent l'avantage d'être faciles à garder en culture, tout en conservant un nombre de caractéristiques des cellules *in vivo*, telles que l'activité estérase, la production de lysozyme et la phagocytose. L'optimisation du protocole du h-CLAT a été réalisée en coopération par deux équipes japonaises : Kao (H. Sakaguchi) et Shiseido (T. Ashikaga). Le h-CLAT quantifie donc les changements dans l'expression des molécules de surface costimulatrices CD54 et CD86 dans les cellules THP-1 après 24h d'exposition à une substance à tester, comme présenté dans la Figure 36.

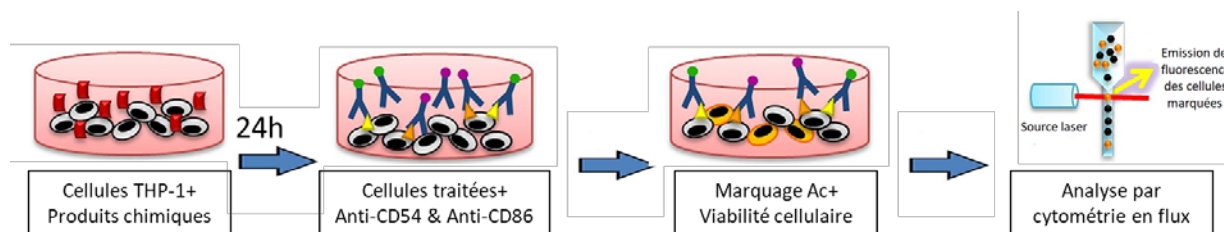


Figure 36 : Principe du test h-CLAT (Wong *et al.*, 2015)

Le protocole du h-CLAT se décompose en deux parties (OECD, 2016a). La première étape consiste à déterminer la CV75 correspondant à la concentration en substance testée entraînant une viabilité cellulaire de 75%. Cette concentration est déterminée grâce à un test de cytotoxicité qui consiste à mesurer la fluorescence de l'IP par cytométrie en flux. Dans une seconde étape, l'expression des marqueurs CD86 et CD54 est analysée par cytométrie en flux après traitement des cellules THP-1 pendant 24h par 8 concentrations différentes, proches de la CV75 (de $0,335 \cdot CV75$ à $1,2 \cdot CV75$). Les cellules sont ensuite préalablement marquées avec la FITC couplée à trois différents types d'anticorps (anticorps anti-CD54, anti-CD86 et anti-IgG1). Les anticorps anti-IgG1 (isotype de souris) ne peuvent théoriquement pas se lier aux cellules de la lignée THP-1 puisque ces dernières sont des cellules humaines. L'utilisation de ces anticorps permet de mesurer l'intensité de fluorescence moyenne du bruit de fond.

La moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence (MFI) est mesurée par cytométrie en flux. La viabilité cellulaire pour chaque concentration testée est mesurée simultanément avec l'IP (elle doit être supérieure à 75% pour que le résultat soit exploitable).

L'intensité de fluorescence relative (Relative Fluorescence Intensity (RFI)) est utilisée afin d'interpréter les résultats. Elle est calculée en déterminant l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) pour chaque type d'exposition des cellules :

$$RFI = \frac{MFI(\text{cellules traitées avec la substance}) - MFI(\text{contrôle isotypique des cellules traitées avec la substance})}{MFI(\text{cellules traitées avec le solvant}) - MFI(\text{contrôle isotypique des cellules traitées avec le solvant})}$$

La RFI du CD86 et du CD54 pour les cellules témoins positifs et les cellules traitées par la substance sont calculées.

Un modèle prédictif a été établi afin de conclure sur le potentiel sensibilisant de la substance testée (OECD, 2016a). Si la RFI du CD86 est égale ou supérieure à 150% à n'importe quelle dose testée ($\geq 50\%$ de viabilité cellulaire) dans au moins deux séries indépendantes et/ou si la RFI du CD54 est égale ou supérieure à 200% ($\geq 50\%$ de la viabilité cellulaire) dans au moins deux essais indépendants, la substance d'essai sera considérée comme positive. Sinon, celle-ci sera classée négativement.

Le test du h-CLAT a été validé par l'ECVAM pour transférabilité et fiabilité, et les recommandations de l'ECVAM ont été publiées en Mars 2015. Le test a été validé par l'OCDE sous la ligne directrice 442E en Juillet 2016 (OECD, 2016a).

Les applications et limites du h-CLAT

La capacité prédictive globale a été évaluée comme étant bonne, même si celle-ci présente néanmoins quelques faux positifs et faux négatifs. Par exemple, les produits chimiques faiblement solubles ainsi que les pré- et pro-haptènes sont source de résultats faux négatifs. De même, les produits chimiques classés comme faiblement sensibilisants en LLNA semblent peu répondre au h-CLAT et donc être aussi source de faux négatifs (comme par exemple le 1-bromohexane, le cyclamen aldehyde, le butyl glycidyl ether,...).

Ce test n'est pas applicable aux substances non solubles dans l'eau ou le DMSO (risque de faux négatifs avec les chimiques dont le $\log P > 3,5$). De même, la lignée cellulaire THP-1 ayant une capacité métabolique limitée, les pro-haptènes peuvent donner des résultats faussement négatifs.

❖ IL-8 Luc : IL-8 THP-1 /THP-G8

Les études sur les DC ont été très développées et se sont particulièrement intéressées à la recherche de biomarqueurs qui seraient exprimés uniquement après traitement par une substance sensibilisante. Ces études ont montré que les sensibilisants sont à l'origine dans les DC d'une expression modifiée des CD40, CD54, CD83, CD86, HLA-DR et CCR7, ainsi que d'une production augmentée des interleukines IL-8, IL-12p40, de TNF- α (Tumor Necrosis Factor) et d'IL-1 β (Cumberbatch *et al.*, 2003; Enk and Katz, 1992). Comme décrit précédemment, différentes lignées cellulaires ont été étudiées en tant que substituts de lignées cellulaires

dendritiques dont les THP-1, U937, KG-1 ou encore MUTZ-3. Dans la plupart de ces études, les marqueurs de surface CD54 ou 86 ont été choisis en tant que biomarqueurs spécifiques de la sensibilisation. Mais l'augmentation du taux d'ARN messager de l'IL-8 ou de sa protéine correspondante semblent également être de bons indicateurs pour discriminer les sensibilisants des non sensibilisants. Il a été établi que l'IL-8 était un peptide chimiotactique puissant que ce soit pour les neutrophiles, les lymphocytes T, les basophiles et les cellules NKT. L'équipe de Takahashi a développé en 2011 une lignée cellulaire THP-1 transfectée par un vecteur de l'IL-8 : la THP-G8. Dans ces vecteurs, l'expression des gènes codant pour la luciférase SLO (Orange) et SLR (Red) est régulée respectivement par les promoteurs de l'IL-8 et de la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Les activités transcriptionnelles sont ensuite mesurées comme l'activité de la luciférase-SLO et de la luciférase-SLR. L'expression de l'ARNm pour l'IL-8 des THP-1 et l'activité du promoteur de l'IL-8 des cellules THP-G8 ont été examinées après traitement des cellules par différentes substances, et l'équipe a confirmé la corrélation entre l'induction de l'expression d'ARNm de l'IL-8 (dans les THP-1) et l'activité promotrice de l'IL-8 (dans les THP-G8). Ce test n'est pas dose-dépendant, il est seulement qualitatif (sensibilisant ou non) (Takahashi *et al.*, 2011). Par ailleurs, sur la base des résultats obtenus lors de sa validation, le test IL-8 Luc n'est pas adapté pour tester les tensioactifs, les anhydrides ainsi que les produits chimiques interférant avec la luciférase (OECD, 2017b).

Le protocole de l'IL-8 Luc a été validé par l'OCDE en octobre 2017 sous la ligne directrice 442E (OECD, 2017b).

Le 3^{ème} événement clé de l'AOP, correspondant à l'activation de la DC suite à l'exposition à une molécule allergisante, va conduire à un ensemble de changements fonctionnels au sein de celle-ci. Par exemple, des changements dans la sécrétion de chimiokines, de cytokines et dans l'expression des récepteurs aux chimiokines (dos Santos *et al.*, 2009). De plus, au cours de la maturation des DC, le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), les molécules de costimulation et les molécules d'adhésion intercellulaires (CD40, CD86, DC11 et CD54, respectivement) sont régulées (dos Santos *et al.*, 2009; Kimber *et al.*, 2011; Vandebriel and Loveren, 2010). De même, les cascades de transduction du signal précèdent les changements dans l'expression des marqueurs de protéines de surface et dans la sécrétion de chimiokines ou de cytokines. Les composants des voies de transduction du signal sont des kinases, qui

phosphorylent et déphosphorylent une variété de substrats afin d'induire un changement dans l'expression ou la sécrétion des molécules cibles. En conséquence, l'ensemble des composants de la cascade de transduction du signal peuvent être des biomarqueurs qui vont distinguer les sensibilisants (Lambrechts *et al.*, 2010). Peu d'investigations ont examiné cette possibilité en mesurant les changements dans l'expression de la kinase dans différentes voies de transduction du signal (comme par exemple la voie p38 MAP-K, ERK, PKG et NFκB) (dos Santos *et al.*, 2009; Trompezinski *et al.*, 2008). Miyazawa *et al.* (Miyazawa *et al.*, 2008a, 2008b) ont étudié p38 MAP-K, une protéine kinase activée par un mitogène, et ERK, une kinase régulée par un signal extracellulaire dans les cellules THP-1. Il est important de noter que les sensibilisants modérés et faibles ont respectivement besoin d'une concentration d'exposition 10x et 100x plus élevée que les sensibilisants puissants pour activer les différentes voies des kinases. Des études sur le rôle possible de l'afflux de calcium en tant qu'événement précoce dans l'activation des DC suggèrent que celui-ci est un second événement après l'induction de formes réactives de l'oxygène (FRO) (Migdal *et al.*, 2010). La complexité du rôle des DC dans la sensibilisation cutanée est encore plus évidente dans les études de « crosstalk » entre les activités des kinases, l'afflux de calcium et le stress oxydant (Aeby *et al.*, 2010).

Les études génomiques et protéomiques ont également le potentiel de révéler des biomarqueurs dans les tests basés sur les DC. Des arrays spécialisés ou des PCR quantitatives de gènes sélectionnés ont été utilisés pour distinguer les sensibilisants des non sensibilisants (dos Santos *et al.*, 2009). En effet, plusieurs études génomiques ont été réalisées sur des DC (moDC, CD34-CD, lignées U937 et THP-1) afin d'identifier les sets de gènes directement induits au cours de la DCA (Cluzel-Tailhardat *et al.*, 2007; Gildea *et al.*, 2006; Python *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2004; Schoeters *et al.*, 2007). Ces études ont testées différentes molécules, de sensibilisants forts (DNFB) à faibles et modérés (eugenol, HCA, hydroxycitronellal). Même si les sets de gènes permettant de discriminer les sensibilisants diffèrent en fonction des conditions expérimentales d'études, la plupart activent des marqueurs spécifiquement modulés par les sensibilisants, qui sont des gènes cibles de Nrf2 (*nqo1*, *ho-1*, *il-8*) sous le contrôle du promoteur ARE. Actuellement plusieurs tests de prédiction issus de ces approches génomiques sont disponibles et présentent relativement de bonnes performances (Sensitiv GARD® (Johansson *et al.*, 2011), Vitosens® (Hooyberghs *et al.*, 2008; Lambrechts *et al.*, 2009)).

❖ GARD : Genomic Allergen Rapid Detection Test

Le GARD est un test développé par la société SenzaGen en partenariat avec l'université de Lund (Suède), basé sur l'activation de marqueurs de la DC utilisant la lignée cellulaire humaine myelomonocytaire MUTZ-3. Cette méthode a un intérêt particulier car elle permet d'obtenir de nouvelles informations mécanistiques et de connaître ainsi le mode d'action des molécules. Après stimulation des cellules avec la substance chimique, les niveaux d'expression de 200 gènes sont analysés, permettant d'obtenir une signature génique spécifique (GARD Prediction Signature, GPS) du potentiel sensibilisant d'une substance. Après stimulation de ces cellules par les produits chimiques pendant 24h, l'expression des gènes est analysée par RT-qPCR en temps réel. Les biomarqueurs identifiés sont impliqués dans certaines voies biologiques avec des composantes immunologiques pertinentes, telles que le stress oxydatif et la réponse induite aux xénobiotiques. Le GARD a démontré sa fonctionnalité ainsi que sa capacité à prédire avec précision la sensibilisation des produits chimiques dans des essais à l'aveugle (Johansson *et al.*, 2014). Il présente des performances prédictives élevées par comparaison avec ses homologues *in vitro* (Johansson and Lindstedt, 2014).

Le protocole dont le principe est schématisé en Figure 37 est le suivant (Johansson *et al.*, 2017, 2014, 2011).

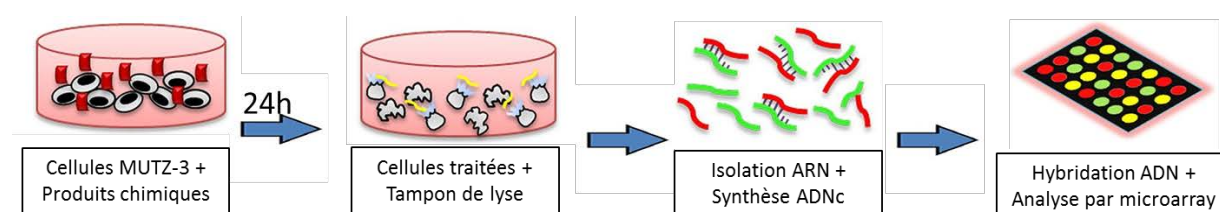


Figure 37 : Principe du test GARD (Wong *et al.*, 2015)

Les MUTZ-3 sontensemencées puis stimulées avec le chimique à tester pendant 24h à une concentration maintenant la viabilité cellulaire supérieure à 90%. Au bout de 24h, une analyse phénotypique est réalisée. L'ARN est ensuite collecté et hybridé à des puces. Les profils d'expression sont créés, puis comparés à des signatures de biomarqueurs prédictifs. Enfin, la valeur de prédictivité (sensibilisant ou non) est calculée.

❖ Peripheral Blood Monocyte-Derived Cells (PBMDs)

Devant les inconvénients de l'utilisation d'une lignée cellulaire (fonctionnalités réduites dont la capacité métabolique, l'instabilité génomique, la performance variable selon le passage cellulaire), l'utilisation d'un test stable basé sur les DC dérivées de monocytes du sang périphérique (PBMDs) a ressurgi. En effet, les PBMDs sont des cellules majoritairement exemptées de dégénération génomique qui présentent la plupart des capacités physiologiques et métaboliques des DC fonctionnelles. La variabilité interindividuelle dans le taux basal d'expression du CD86 est très limitée (possibilité de réaliser le test à partir de cellules issues d'un même donneur, sans nécessité de réaliser des pools de cellules isolées de différents donneurs). Plusieurs marqueurs d'activations ont été testés mais le plus significatif et pertinent retenu est le CD86 (Eschrich *et al.*, 2007; Guironnet *et al.*, 2000).

Le protocole de Reuter *et al.* (Beiersdorf) (Reuter *et al.*, 2011) est le suivant. Des monocytes humains de sang périphérique sont isolés, provenant de 5 donneurs. Ces monocytes sont différenciés en DC par ajout dans le milieu de culture d'IL-4 et de GM-CSF pendant 5 jours. La concentration de la substance à tester est choisie pour induire une viabilité $\geq 80\%$. Les PBMDs sont ensuite exposées pendant 48h à la substance puis analysées par cytométrie en flux afin de mesurer l'expression du marqueur d'activation CD86. Le pourcentage de cellules exprimant le CD86 est déterminé pour chaque échantillon et la différence entre les résultats obtenus dans l'échantillon traité et le contrôle négatif est calculée (ΔCD86). Une substance induisant un $\Delta\text{CD86} > 20\%$ dans le domaine cytotoxique acceptable (correspondant à une cytotoxicité $< 20\%$) est considérée comme sensibilisante. Sur 12 substances testées, seul le Benzalkonium chloride été mal classé (Reuter *et al.*, 2011).

❖ VITASENS®

Ce test utilise des progéniteurs cellulaires CD34⁺ dérivés du sang de cordon ombilical humain comme substitut aux DC. Il est basé sur la mesure quantitative du changement d'expression du gène CREM (Cyclic adenosine monophosphate-Responsive Element Modulator) modulateur sensible à la réponse à l'AMPc et le gène CCR2 (C-C chemokine receptor type 2), spécifiques de la sensibilisation, par RT-qPCR (Schoeters *et al.*, 2007). Ces DC de sang de cordon humain CD34⁺ ont montré un comportement discriminant après exposition à une substance sensibilisante.

Chaque substance à tester est mise en contact avec les DC, issues au moins de 3 échantillons

de donneurs différents, à une concentration induisant au minimum une cytotoxicité de 5% et ne dépassant pas 20% (IC20) pendant 6h. Le taux d'expression génique pour CCR2 et CREM est mesuré par RT-qPCR. Le protocole a ensuite été optimisé en testant 21 substances connues (10 sensibilisants et 11 non sensibilisants) avec 73 donneurs. Le set de gènes a été élargi à 13 gènes et 9 temps d'exposition testés. L'expression génique est déterminée en accroissement (« Fold Change » ou *ratio* des niveaux d'expression génique exposé à la substance sur son solvant contrôle correspondant) par rapport au contrôle négatif. Ces résultats sont prometteurs et ont démontré une corrélation linéaire avec les données du LLNA. La méthode prédit correctement certains pro-haptènes montrant certaines capacités métaboliques, mais pourrait ne pas être adéquate pour les cytotoxiques extrêmes (European Chemicals Agency, 2016).

❖ **SensiDerm**

Ce test développé par Proteomics a pour but de discriminer les substances sensibilisantes des non sensibilisantes à travers l'expression de biomarqueurs protéiques spécifiques des cellules dendritiques MUTZ-3 sur la base de biomarqueurs protéiques spécifiques. Le panel de biomarqueurs comprend 10 protéines qui ont démontré un profil d'expression différent dans les cellules MUTZ-3 en fonction du potentiel sensibilisant de la substance testée. Les cellules MUTZ-3 sont exposées à des concentrations non toxiques (viabilité > 80%) pendant 24h. Les protéines cellulaires sont ensuite extraites et analysées par spectrométrie de masse. Les résultats sont exprimés par un *ratio* de l'expression protéique entre les cellules exposées et les cellules témoins. Ce *ratio* est transformé en score *via* un modèle mathématique, et comparé à un seuil discriminant les sensibilisants des non sensibilisants (Thierse *et al.*, 2011).

3.4.4 La prolifération des Lymphocytes T

Les LT sont typiquement affectés par les complexes protéine-haptène présentés par les DC au niveau de leur CMH. La compréhension moléculaire de ce processus s'est améliorée au cours des dernières années (Martin *et al.*, 2010). Le peptide antigénique est présenté par le CMH et reconnu par l'intermédiaire des récepteurs des LT en tant qu'élément étranger. Le LT est alors activé pour former un LT mémoire, qui proliférera par la suite. Si ils sont réactivés lors de la présentation du même haptène par les DC de la peau, ces LT mémoire induiront une DCA (Vocanson *et al.*, 2009).

Une approche connexe repose sur l'hypothèse qu'il existe une corrélation entre la puissance des allergènes de contact et la fréquence des LT et le répertoire des récepteurs des LT (Kotturi *et al.*, 2008). Il est plausible que la puissance de sensibilisation puisse être corrélée avec la taille du contact entre l'allergène et l'effecteur spécifique et les pools de LT régulateurs et leur diversité, ce qui pourrait constituer la base d'une nouvelle génération d'essais de T-cell priming *in vitro*.

Etant donné que la dernière étape de la phase de sensibilisation consiste en l'activation des LT naïfs au niveau du ganglion lymphatique, un test *in vitro* basé sur les LT est nécessaire pour confirmer l'AOP ainsi que pour identifier les substances sensibilisantes, comme schématisé dans la Figure 38. Comme décrit précédemment, les lymphocytes T sont typiquement activés par les complexes protéine-haptène présentés par les DC *via* les molécules du CMH pour former un lymphocyte T mémoire. La compréhension moléculaire de ce processus s'est améliorée ces dernières années (Martin *et al.*, 2010). La plupart des protocoles reconnaissent l'importance du processus de présentation antigénique de cette étape. Ainsi les tests *in vitro* basés sur les cellules T sont généralement soit des cocultures de DC traitées par des allergènes et des LT modifiés par l'expression de biomarqueurs sélectionnés (par exemple l'IFN- γ), soit une mesure de la prolifération lymphocytaire. Une grande partie de ce travail a été récemment passée en revue par Martin *et al.* (2010).

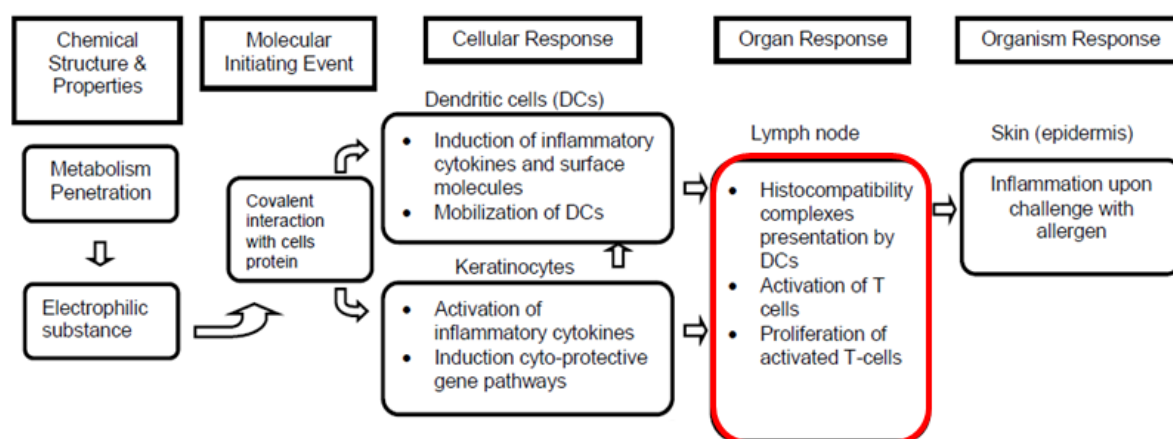


Figure 38 : Mesure de la prolifération lymphocytaire selon l'AOP (OCDE, 2012)

❖ hTCPA (human T Cell Priming Assay)

Ce test consiste à mesurer l'activation des LT humains mis en coculture avec des DC en présence de la substance chimique d'essai. La prolifération lymphocytaire et la production de cytokines (par exemple l'IFN- γ) rendent compte de l'activation lymphocytaire. Lorsqu'une substance chimique engendre l'activation des LT, elle est considérée comme sensibilisante. Reconnaissant l'importance du processus de présentation antigénique correspondant au « T-cell priming », des tests *in vitro* de T-cell priming ont été développés (Martin *et al.*, 2010).

Ce test, human T cell priming Assay (hTCPA) ou test d'immunisation primaire, consiste en une réaction mixte lymphocytaire autologue utilisant des DC (dérivées de monocytes) hapténisées, comme CPA, et les LT du sang périphérique humain, comme cellules répondeuses. La prolifération cellulaire et/ou la sécrétion de cytokines sont alors utilisées comme paramètres de lecture de l'immunisation et l'activation des précurseurs T spécifiques de l'haptène. Jusqu'à présent, alors que les allergènes forts/modérés apparaissaient capables d'induire une immunisation primaire, l'intensité des réponses observées était modeste et les résultats peu reproductibles. De plus, aucun test n'était efficace pour induire l'immunisation vis-à-vis d'haptènes faibles. En effet, il a été démontré, dans les modèles expérimentaux, que l'activation des LT spécifiques est restreinte par la présence de cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ (Tregs), et que la déplétion de ces cellules T régulatrices augmente de façon significative le nombre de LT CD8⁺ effecteurs, producteurs d'IFN- γ , qui sont activés dans les ganglions drainants le site de sensibilisation. Ainsi, il est apparu évident que l'activation *in vitro* des LT par les haptènes serait d'autant plus efficace si les Tregs étaient éliminés des cellules répondeuses. Plus récemment, une seconde sous-population de lymphocytes exprimant le marqueur CD56⁺, comprenant des lymphocytes de type NKT et également des cellules NK, limite également fortement l'activation *in vitro* de LT spécifiques de l'haptène, en tuant les CPA qui viennent d'être hapténisées. Une nouvelle fois, éliminer cette sous-population des cellules répondeuses permet d'accroître de façon significative l'activation des LT effecteurs. Les stratégies actuellement utilisées pour développer un test hTCPA de 2^{ème} génération capitalisent donc ces approches dans lesquelles les leucocytes sanguins de sujets sains sont déplétés en cellules Tregs ou cellules CD56⁺, avant d'être cocultivés avec des DC stimulées par les chimiques d'intérêt. L'approche la plus récente utilise, en outre, des cellules répondeuses naïves (CD45RA^{pos}). Les paramètres de lecture mesurés sont toujours la prolifération cellulaire T ainsi que la production de médiateurs de l'inflammation.

L'exploration de la réponse d'HSC chez la souris a permis d'apporter des informations cruciales pour l'amélioration de ces tests hTCPA de 1^{ère} génération.

Alors que les tests de 1^{ère} génération ne pouvaient détecter que des sensibilisants forts ou extrêmes, de récents développements utilisent du sang périphérique humain déplété en LT régulateurs qui empêchent normalement la phase de sensibilisation, augmentant ainsi la détection de la prolifération des LT (Vocanson *et al.*, 2008).

3.4.5 Résumé des méthodes alternatives actuellement validées ou en cours de validation

Parmi l'ensemble des méthodes évoquées précédemment, le tableau 10 présente les tests qui sont actuellement validés ou en cours de validation.

Événement clé de l'AOP mesuré	Test	Statut de validation, acceptation réglementaire	Méthodes de tests UE/Guideline OCDE	Résultat selon la méthode/guideline	Protocole DB-ALM EURL ECVAM
Événement clé 1 Liaison peptide/protéine	DPRA	Validée et acceptation réglementaire	B.59/TG 442C	SS ou NS avec des informations complémentaires	154
Événement clé 2 Activation du kératinocyte	KeratinoSens™	Validée et acceptation réglementaire	B.60/TG 442D	SS ou NS avec des informations complémentaires	155
	LuSens	En cours d'évaluation pour validation	N.D/N.D	SS ou NS avec des informations complémentaires	184
	SENS-IS	En cours d'évaluation pour validation	N.D/N.D	SS ou NS avec des informations complémentaires	N.D
Événement clé 3 Activation de la cellule dendritique	h-CLAT	Validée et acceptation réglementaire	N.D/TG 442E	SS ou NS avec des informations complémentaires	158
	U-SENS™	Validée et acceptation réglementaire	N.D/TG 442E	SS ou NS avec des informations complémentaires	183
	IL-8 Luc	Validée et acceptation réglementaire	N.D/TG 442E	SS ou NS avec des informations complémentaires	N.D
Événement clé 4 Réponse LT	N.D	N.D	N.D/ N.D	N.D	N.D

N.D : Non disponible ; SS : Sensibilisant cutané ; NS : Non sensibilisant ; TG : Test Guideline (ligne directrice du test)

Tableau 10 : Statut de validation et d'adoption des méthodes *in chemico/in vitro* pour la sensibilisation cutanée (ECHA r7a, 2016)

Les méthodes ont été validées indépendamment pour un champ défini. Cela signifie que chacune à ses propres limites et ne peut pas être utilisée comme unique méthode pour

évaluer la sensibilisation cutanée; cependant, dans de nombreux cas, les limitations peuvent être compensées lorsqu'elles sont combinées à des informations supplémentaires, par exemple en utilisant des informations provenant de substances similaires dans le cadre d'une approche fondée sur le poids de l'évidence (Weight of Evidence, WoE). Ces méthodes *in vitro* n'ont pas été validées pour prédire la puissance et ne peuvent donc pas être utilisées seules pour catégoriser et prédire la puissance. Cependant, elles peuvent fournir des informations quantitatives ou des informations sur la concentration qui peuvent être utiles pour évaluer le risque de sensibilisation chez l'homme. Il est à noter que certaines méthodes décrites dans un événement clé spécifique peuvent également couvrir des mécanismes relevant d'autres événements clés. De même, il n'existe actuellement aucune méthode d'essai *in vitro* validée ou adoptée pour traiter l'événement clé n°4, correspondant à l'activation des LT de l'AOP. Néanmoins, ceci est une étape clé dans la DCA reflétant la réponse immunitaire adaptative, de manière similaire au LLNA, même si le LLNA ne mesure pas les réponses spécifiques des LT mais seulement leurs proliférations cellulaires (Dietz *et al.*, 2013, 2010).

L'ensemble des différentes méthodes *in vitro* ont été présentées ici, en lien avec l'étape du phénomène de sensibilisation qu'elles étudient. Il n'existe pas encore de test *in vitro* qui puisse mimer les deux dernières étapes du phénomène d'induction de la sensibilisation cutanée à savoir la migration des cellules dendritiques et la prolifération des lymphocytes T. À l'avenir, des méthodes uniques intégrant différents événements clés au sein d'un même test pourront être disponibles (par exemple, le SENS-IS peut avoir le potentiel d'être une méthode unique, mais cela sera clarifié une fois que la validité scientifique de la méthode d'essai aura été établie).

Afin de potentialiser au mieux la combinaison de différents tests au sein d'une stratégie, il semble cohérent de choisir *a minima* un test mimant l'étape d'hapténation, puis un test étudiant l'inflammation épidermique, et enfin un test mesurant l'activation des cellules dendritiques.

III. Les nouvelles stratégies pour l'évaluation de la sensibilisation cutanée

1. Les différentes stratégies d'évaluation proposées

Le SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) ainsi que le Règlement REACH ont mentionné que les tests *in vitro* validés pour la sensibilisation cutanée ne doivent pas être utilisés seuls dans un contexte réglementaire pour l'évaluation du potentiel sensibilisant des molécules, mais peuvent être utilisés en batterie de tests *in vitro* selon une approche par le « Poids de l'Evidence » (European Commission, 2016; European Parliament and Council of the European Union, 2006). De même, l'actuel consensus au sein de la communauté scientifique est qu'une méthode alternative seule n'est actuellement pas suffisante pour remplacer les tests sur animaux et couvrir l'ensemble des points clés de la sensibilisation cutanée. L'utilisation d'une stratégie intégrative combinant plusieurs tests alternatifs ou Integrated Testing Strategy (ITS) est donc nécessaire. Cette stratégie consiste à combiner des tests représentatifs des différents événements clés de l'AOP de la sensibilisation cutanée (Urbisch *et al.*, 2015; van der Veen *et al.*, 2014). Avant de présenter les différentes stratégies, il convient de définir en quoi consiste une ITS et d'expliquer comme celle-ci s'intègre au sein d'une approche intégrée en matière d'essai et d'évaluation (IATA).

❖ **La stratégie de tests intégrés (ITS)**

Une stratégie de tests intégrés (ITS) est une méthode qui intègre les informations sur l'évaluation des dangers issues de plus d'une source et qui permet ainsi de faciliter la prise de décision. Elle doit être construite en tenant compte du principe des trois R (réduction, raffinement et remplacement). Cette stratégie d'évaluation itérative permet d'orienter l'évaluateur sur la nécessité de réaliser des tests supplémentaires et le cas échéant de le guider sur le choix des essais (INERIS, 2016).

Les ITS ont pour principal objectif de favoriser l'utilisation des données issues de méthodes alternatives *in vitro*, *in silico* ou *in chemico*, et ainsi réduire la nécessité de l'expérimentation animale. Ils décrivent des procédures opérationnelles qui guident une évaluation transparente et scientifiquement rationnelle des dangers des substances chimiques (INERIS, 2016).

Les principaux travaux sur les ITS ont été initiés par l'ECVAM et l'OCDE pour la corrosion et l'irritation oculaire puis dans le cadre du projet européen OSIRIS (2007-2011). Ce projet avait

pour but d'aider au développement des méthodes alternatives et notamment les ITS afin de répondre aux exigences et principes du règlement REACH. Les ITS ont donc par la suite été intégrées dans le règlement REACH et plus particulièrement décrites dans le guide « R7, Endpoint specific guidance » de l'Agence européenne des produits chimiques (European Chemicals Agency (ECHA)) (European Chemicals Agency, 2016).

❖ L'approche intégrée en matière d'essai et d'évaluation

L'approche intégrée en matière d'essai et d'évaluation ou Integrated Approaches on Testing and Assessment (IATA) est un ensemble de méthodes de collecte de données, de tests et d'évaluations qui intègrent des données issues de différents niveaux : *in vitro*, *in vivo*, *in chemico*, *in silico*, physico-chimiques,... Grâce aux IATA, les batteries prédéfinies de tests jusqu'alors utilisées pour évaluer la toxicité d'une substance pourraient être remplacées par une stratégie de tests ciblés adaptée au profil de toxicité et à l'utilisation prévue de chaque substance. Ces approches permettraient alors de réduire et/ou de remplacer l'utilisation d'animaux ainsi que de favoriser la compréhension des mécanismes d'actions (INERIS, 2016). Une stratégie IATA comporte plusieurs étapes. Dans un premier temps, les données disponibles sur la substance sont compilées. Si le WoE permet de conclure sur la toxicité de la substance, aucune donnée supplémentaire n'est alors requise. Dans le cas contraire, selon les lacunes, les méthodes d'essai les plus appropriées pour connaître le profil toxicologique précis de la substance sont déterminées en utilisant notamment les stratégies de tests intégrés (ITS). En fonction des données acquises, une décision réglementaire peut ensuite être prise en s'appuyant sur l'ensemble de ces informations (INERIS, 2016).

L'objectif d'une IATA est de renforcer l'évaluation du danger des substances chimiques grâce à la considération de l'ensemble des outils et informations disponibles tout en respectant les principes du règlement REACH (tel que le principe des 3R).

Une IATA intègre le mode d'action et la voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables (AOP). Les résultats sont groupés par événement clé (ou Key Event (KE)) susceptible de conduire à l'expression d'une toxicité. L'objectif est de couvrir un maximum de niveaux de l'organisation biologique de l'AOP (cible moléculaire, réponse cellulaire, atteinte des tissus/organes,...). Pour chacun des principaux événements qui par définition doivent être mesurables, des essais servent à les caractériser et à quantifier l'AOP.

Les IATA et les ITS sont des approches similaires. En effet, les IATA sont en réalité une évolution

méthodologique du concept des ITS, qui permet de mieux cadrer leur application grâce à l'établissement de méthodologies détaillées et de renforcer leur pertinence grâce notamment à l'intégration du concept d'AOP et des nouvelles évolutions concernant les méthodes *in silico*. Par ailleurs, la force probante des données est clairement discutée dans les méthodologies et un poids important lui est attribué par rapport aux ITS où la démarche consiste principalement à suivre une stratégie itérative d'essais *in vitro* jusqu'aux essais *in vivo*. Dans les IATA, l'ensemble des données est intégré dans une AOP et la force probante des données permet soit de conclure, soit d'identifier les lacunes et les essais supplémentaires nécessaires (INERIS, 2016).

L'ensemble de ces différents outils (AOP, ITS et IATA) concourent aux efforts réalisés aujourd'hui pour promouvoir une approche holistique de l'évaluation des dangers en mutualisant les informations disponibles dans les domaines de la toxicité, aussi bien pour accroître les connaissances sur une substance que pour limiter le nombre des essais.

Dans le cadre d'une évaluation des risques cumulés, ces outils devraient permettre de décrire finement et quantitativement les actions des substances individuelles ainsi que d'identifier et intégrer les interactions, compétitions ou synergies des substances entre elles. Ces évolutions sont attendues à plus long terme car elles nécessitent la génération et la mutualisation de données ainsi qu'un effort de modélisation importante pour permettre de telles prédictions (INERIS, 2016).

Ainsi, un certain nombre de paramètres sont à prendre en compte dans le développement et le choix d'une ITS. Dans un premier temps, les tests sélectionnés doivent démontrer individuellement leur reproductibilité, leur robustesse et leur pertinence dans leurs capacités à discriminer les molécules allergisantes de celles qui ne le sont pas. Et ce, tout en ayant le même degré de performance que les modèles animaux traditionnellement utilisés, voire avec de meilleures performances vis-à-vis de la prédictivité chez l'homme.

De plus, dans une perspective industrielle, ces tests doivent permettre un débit relativement important, être faciles à mettre en oeuvre et transférables. Pour finir, en lien avec les besoins des toxicologues dans l'évaluation du risque, l'approche alternative d'un test seul ou d'une combinaison de tests intégrés au sein d'une ITS doit permettre de déterminer de manière quantitative le potentiel allergisant de la molécule. Actuellement, il est admis qu'un seul test ne permet pas de remplir tous ces critères et donc qu'une batterie de tests doit être sélectionnée (Jowsey *et al.*, 2006; Natsch *et al.*, 2009).

❖ Performances individuelles des tests *in vitro*

La sélection d'une ITS se base en premier lieu sur les performances individuelles (sensibilité, spécificité et précision) des tests *in vitro* ainsi que leur état actuel de validation réglementaire. L'ensemble des résultats obtenus pour chacune des méthodes est présenté dans le tableau 11.

Événement clé de l'AOP (KE)	Méthodes	Comparaison	Nb chimiques	Précision (%)	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Référence bibliographique
KE1	DPRA	LLNA	n=180	80%	80%	77%	OCDE 442C, 2015
		LLNA	n=194	75%	76%	72%	Urbisch, 2015
		Homme	n=102	84%	84%	84%	Urbisch, 2015
KE2	KeratinoSens™	LLNA	n=201	77%	78%	76%	OCDE 442D, 2015
		LLNA	n=188	73%	77%	63%	Urbisch, 2015
		Homme	n=102	82%	82%	84%	Urbisch, 2015
	LuSens	LLNA	n=77	73%	76%	67%	Urbisch, 2015
		Homme	n=60	79%	78%	79%	Urbisch, 2015
	SENS-IS	LLNA	n=150	96,6%	97,7%	95,2%	Cottrez, 2016
		Homme	n=130	96%	95,8%	96,5%	Cottrez, 2016
	SenCeeTox	LLNA	n=97	84%	81%	92%	(McKim <i>et al.</i> , 2012, 2010)
KE3	h-CLAT	LLNA	n=142	85%	93%	66%	OCDE 442E, 2017
		LLNA	n=166	76%	81%	64%	Urbisch, 2015
		Homme	n=98	82%	89%	64%	Urbisch, 2015
	U-SENS™	LLNA	n=166	86%	91%	65%	OCDE 442E, 2017
		LLNA	n=150	73%	73%	74%	Urbisch, 2015
		Homme	n=85	78%	74%	88%	Urbisch, 2015
	IL-8 Luc	LLNA	n=143	86%	91%	65%	OCDE 442E, 2017
		LLNA	n=136 (hors domaine d'applicabilité)	89%	96%	53%	OCDE 442E, 2017
		Homme	n=90	80%	93%	39%	Urbisch, 2015
		Homme	n=84 (hors domaine d'applicabilité)	86%	93%	54%	Urbisch, 2015
		LLNA	n=122	79%	79%	90%	Kimura <i>et al.</i> , 2015
	GARD	LLNA	n=127	86%	92%	70%	Johansson <i>et al.</i> , 2017
	VITOSENS®	LLNA	n=21	89%	82%	97%	Hooyberghs <i>et al.</i> , 2008

Tableau 11 : Résultats de prédictivité obtenus pour les différentes méthodes *in vitro*

Les statistiques de prédictivité de Cooper ont été calculées comparativement aux résultats obtenus chez l'homme ou dans le LLNA (Cooper *et al.*, 1979), selon les formules suivantes :

$$\text{Sensibilité [\%]} = \left(\frac{VP}{VP + FN} \right) * 100$$

Spécificité [%] = $(VN / (VN + FP)) * 100$

Précision [%] = $((VP + VN) / (VP + FP + VN + FN)) * 100$

où VP : Vrai Positif, FP : Faux Positif, VN : Vrai Négatif et FN : Faux Négatif.

De même, le groupe de travail STTF de Cosmetics Europe a sélectionné 43 molécules considérées comme difficiles à tester incluant des colorants capillaires (souvent faux positifs), des surfactants (souvent faux négatifs), des fragrances, des extraits naturels, des actifs (souvent faux positifs) et des filtres UV. Ces molécules ont été testées sur 5 des 6 méthodes prioritaires (données non publiées). Le tableau 12 reprend l'ensemble des résultats obtenus pour chacune de ces méthodes.

Méthodes	Événement de l'AOP	Précision (%)	Faux négatifs (%)	Faux positifs (%)
DPRA	Moléculaire initiateur	48,5%	29,4%	75%
KeratinoSens™	Événement clé 2	52,4%	36%	64,7%
SENS-IS	Événement clé 2	74,4%	16%	38,9%
h-CLAT	Événement clé 3	62,8%	8%	77,8%
U-SENS™	Événement clé 3	65,1%	8%	77,2%

Tableau 12 : Tableau des résultats obtenus pour 43 molécules testées par Cosmetics Europe

Toutes les méthodes n'ont pas délivrées de données sur toutes les substances testées (h-CLAT, U-SENS™, SENS-IS : 43 molécules, KératinoSens™ : 42 molécules et DPRA : 33 substances).

Aucune des méthodes mentionnées ci-dessus ne couvre entièrement la complexité de la sensibilisation cutanée étant donné qu'elles sont recommandées comme des tests autonomes pour un KE de l'AOP (OECD, 2012). Pour cette raison, il est largement proposé que l'évaluation du danger et/ou du risque soit effectuée en utilisant une ITS (Ezendam *et al.*, 2016; Hartung *et al.*, 2013; Jaworska and Hoffmann, 2010; Rovida *et al.*, 2015). Cependant, la prédictivité globale des performances d'une ITS dépendra invariablement de la prédictivité individuelle des différents tests sélectionnés. En outre, étant basées sur un biomarqueur unique ou peu nombreux, les méthodes actuelles ne fournissent que des informations prédictives limitées, et parfois montrent des chevauchements en terme d'informations mécanistiques. Ainsi, lors de la conception d'une ITS, des tests à haute performance prédictive et au contenu informatif couvrant un ou plusieurs des KE de l'AOP (OECD, 2012) sont clairement à privilégier (Lindstedt and Borrebaeck, 2011). Au vu des résultats obtenus individuellement pour chacune des

méthodes, différentes stratégies ont été développées et proposées par les industriels. Il est aussi à noter que la plupart de ces stratégies reposent sur des méthodes déjà déployées au sein des entreprises concernées ainsi que sur les connaissances associées.

❖ **Exemples de stratégies de tests intégrés (ITS)**

Différentes approches ont été présentées dans la littérature scientifique sur la prédictivité des méthodes *in vitro* à la sensibilisation cutanée ainsi que des ITS pour la classification des sensibilisants ou pour l'estimation de leur puissance (faible, modérée, forte et extrême) (Jaworska *et al.*, 2013, 2015; Jowsey *et al.*, 2006; Natsch *et al.*, 2015; Nukada *et al.*, 2013; Urbisch *et al.*, 2015).

Par exemple Urbisch *et al.* (2015) ont comparé la capacité prédictive du LLNA à des stratégies de tests non animales (*in chemico/in vitro*) vis-à-vis de molécules allergisantes cutanés pour l'homme. Les auteurs ont montré que pour le test du LLNA comparé aux données humaines, la précision obtenue était de 82%, avec une sensibilité de 91% et une spécificité de 64%. Pour les méthodes d'essai *in vitro* combinées, la précision était de 90% avec une sensibilité et une spécificité de 90% (pour $n \pm 100$ substances). Bien que la nature des données ne soit que partiellement divulguée, ni évaluée indépendamment, les méthodes combinées présenteraient une meilleure capacité à prédire les données humaines que le LLNA dans l'identification des molécules allergisantes chez l'homme (catégorie 1 du GHS ou système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques du CLP). Cependant, les tests pris individuellement ne sont pas aussi sensibles que le LLNA (Urbisch *et al.*, 2015).

▪ *Combinaison de différents tests et choix du modèle de prédiction*

La stratégie proposée par Bauch *et al.* (2012) est basée sur 4 tests *in vitro* qui sont DPRA, LuSens, h-CLAT et U-SENS™. Celle-ci a été testée sur 54 substances. Si les deux tests basés sur la réactivité des protéines puis sur l'activation des KC *via* la voie ARE, soit le DPRA et le LuSens ou le KeratinoSens™, mènent à des résultats négatifs, alors la substance sera considérée comme non sensibilisante. A l'inverse, si la substance est prédite comme sensibilisante uniquement par le test U-SENS™, alors la substance sera considérée comme positive. Si les prédictions sont conflictuelles, ou bien si le test du h-CLAT est utilisé à la place du U-SENS™, une approche dite du «Poids de l'Evidence» (WoE) doit être utilisée. Les deux tests conduisant au même résultat, quels que soient ces deux tests seront pris en considération. L'arbre

décisionnel de cette ITS est représenté en figure 39.

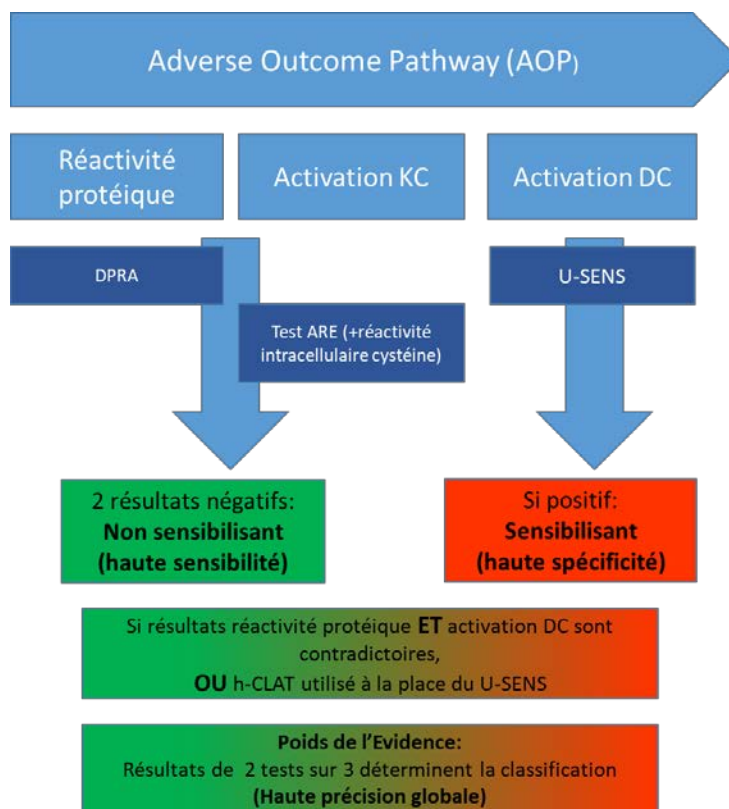


Figure 39 : Modèle de prédiction de Bauch *et al.* (2012)

En utilisant ce modèle, 44 des 53 substances de l'étude ont été correctement prédites par comparaison aux résultats du LLNA. Les prédictivités statistiques de ce modèle ont été calculées et sont les suivantes : sensibilité de 93% ou 81%, spécificité de 95% ou 88%, et une précision générale de 94% ou 83%, comparées aux données humaines et au LLNA respectivement. Les résultats obtenus sur 54 molécules comparées au LLNA et aux données humaines (Bauch *et al.*, 2012) sont représentés dans le Tableau 13.

Comparaison aux données humaines		Précision (%)
Standard <i>in vivo</i>	LLNA	89%
Méthodes individuelles	DPRA	87%
	LuSens	82%
	U-SENS	85%
	h-CLAT	78%
Combinaison (1 sur 2 est positif)	DPRA et LuSens	85%
	DPRA et U-SENS	81%
	DPRA et h-CLAT	83%
	LuSens et U-SENS	80%
	LuSens et h-CLAT	82%
Modèle de prédiction	DPRA, LuSens et U-SENS	94%

Tableau 13 : Résultats obtenus selon le modèle de prédiction de Bauch *et al.* (2012)

Selon les auteurs, la meilleure concordance de 94% par rapport au LLNA (89%) a été observée en associant les trois tests suivants : DPRA, LuSens et le U-SENS™. Ceci a amené à proposer une stratégie en deux temps. Dans un premier temps, la réalisation systématique du DPRA avec le LuSens. Si les deux résultats classent la substance de façon identique, aucune autre investigation n'est réalisée, mais en cas de résultats discordants, le test du h-CLAT ou du U-SENS est à réaliser. Dans ce dernier cas, le classement de la substance est obtenu selon le poids de l'évidence sur la base de 2 résultats concordants sur les 3 tests réalisés (Figure 39).

- *Les approches « 2 sur 3 »*

Parmi les différentes ITS qui ont été proposées par la communauté scientifique, l'approche « 2 sur 3 » est la plus simple qui prend en compte le principe du poids de l'évidence. La stratégie « 2 sur 3 » se décompose en 2 étapes. La première consiste à tester le produit chimique avec 2 méthodes. En cas de résultats concordants entre les 2 tests, il est possible de conclure sur le potentiel sensibilisant ou non du produit. En cas de résultats contradictoires entre les 2 tests, la matière première est testée avec une 3^{ème} méthode. Le principe du poids de l'évidence est ensuite appliqué pour émettre une conclusion finale. En effet, si 2 tests sur 3 sont positifs, la substance sera classée comme sensibilisante, et si 2 tests sur 3 sont négatifs, la substance sera classée comme non sensibilisante.

Une seconde étude appliquant la même stratégie que Bauch *et al.* (2012) à 145 substances chimiques a montré une bonne corrélation (81%) par rapport au LLNA (Natsch *et al.*, 2013). Les résultats obtenus sont assez similaires à ceux obtenus par Bauch *et al.* (2012) et sont présentés dans le tableau 14.

Méthodes		Précision sur 54 chimiques (Bauch <i>et al.</i> 2012) comparée aux données humaines	Précision sur 54 chimiques (Bauch <i>et al.</i> 2012) comparée aux données du LLNA	Précision sur 145 chimiques (Natsch, 2013) comparée aux données du LLNA
Méthodes individuelles	DPRA	87%	79%	80%
	Test utilisant un gène ARE : LuSens ou KeratinoSens™	82%	81%	77%
	Test U937/CD86 (U-SENS™)	85%	74%	71%
“2 sur 3”	DPRA, Test-ARE et U-SENS™	94%	83	81%

Tableau 14 : Modèle de prédiction de Natsch *et al.* (2013)

Urbish *et al.* (2015) ont aussi utilisé l'approche « 2 sur 3 » sur 213 composés. Pour cette étude,

les tests du DPRA, LuSens ou KeratinoSens™, h-CLAT ou U-SENS™ ont été combinés puis comparés aux données humaines et animales (LLNA). Les composés n'ayant pas été testés dans au *minimum* 3 tests sont retirés de l'ensemble des analyses. La combinaison du DPRA, du KeratinoSens™ ainsi que du h-CLAT présente les meilleurs résultats (Tableau 15).

Comparaison aux données humaines/LLNA	n	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Prédictivité positive (%)	Prédictivité négative (%)	Précision (%)
DPRA + KeratinoSens + h-CLAT	101/180	90/82	90/72	96/89	79/59	90/79
DPRA + KeratinoSens + U-SENS	95/171	84/79	100/77	100/90	70/59	88/78
DPRA + LuSens + h-CLAT	90/133	90/83	89/78	95/91	80/64	90/82
DPRA + LuSens + U-SENS	75/126	87/84	100/84	100/93	75/69	91/84

Tableau 15 : Modèle de prédiction de Urbisch (2015) basé sur l'analyse 2 sur 3

Ces différentes approches « 2 sur 3 » présentent l'avantage de la simplicité en terme de compréhension et de communication. Néanmoins, plusieurs paramètres sont à prendre en considération. En effet, compte tenu de la complexité de la réaction de sensibilisation cutanée et de la grande biodiversité chimique des substances ayant vocation à être évaluées en sensibilisation, et du faible nombre de molécules testées dans ces ITS, il semble légitime de s'interroger sur leurs robustesses prédictives réelles. De même, certains tests utilisés ne reflètent que certaines phases mécanistiques de la DCA, par exemple le DPRA et le KeratinoSens™ pourraient apporter une information finalement assez proche sur le potentiel d'hapténisation, affaiblissant la précision globale de la stratégie surtout pour les molécules classées dès le premier tour (cas où le DPRA et le KeratinoSens sont concordants). De plus, certains protocoles d'étude sont parfois encore notablement différents entre certaines études (cas du U-SENS ou MUSST/U937, dont le protocole n'est pas identique dans les travaux publiés par BASF, L'Oréal et Procter & Gamble). Au vu de ces différents éléments, il ne semble pas possible qu'une seule stratégie, même de par sa simplicité (« vote à la majorité » basé sur 3 tests *in vitro*), puisse devenir un standard réglementaire pour évaluer la complexité du phénomène de sensibilisation.

- *Les ITS pour prédire la puissance*

Natsch *et al.* (2009) ont été les premiers à proposer des combinaisons de tests pour prédire la puissance d'un sensibilisant cutané sur un ensemble de 116 substances (Natsch *et al.*, 2009). Le modèle incorpore quatre descripteurs représentant les différents KE de l'AOP en utilisant un système basé sur la méthode des scores (Jowsey *et al.*, 2006). Ils ont combiné la réactivité

peptidique en tant que substitut de la liaison protéique, l'induction de l'activité de la luciférase dépendante de l'élément ARE avec une prédiction utilisant un modèle *in silico* pour le potentiel de sensibilisation cutanée (TIMES-SS). La relation entre les scores obtenus et la puissance n'a pas été suffisante ($R^2 = 0,423$) pour en distinguer des classes de puissance. Toutefois, les molécules sensibilisantes extrêmes ont pu être facilement distinguées des molécules sensibilisantes faibles et des non sensibilisantes (NS) car 57 des 59 sensibilisants faibles/NS ont obtenu une valeur prédictive d'EC3 < 3. Cependant, en raison du chevauchement important des résultats obtenus entre les molécules sensibilisantes fortes, modérées et faibles, ce modèle publié n'est pas recommandé pour les distinguer selon les catégories 1A ($EC3 \leq 0,1$: extrême, $EC3 > 0,1- \leq 1$: fort) et les catégories 1B ($EC3 \geq 1- < 10$) du CLP.

D'autres approches (conduisant également à une surprédiction des modérés par rapport au LLNA) reposent sur des combinaisons d'informations comme le réseau de neurones artificiels ou Artificial Neuronal Networks (ANN) (Hirota *et al.*, 2015, 2013; Tsujita-Inoue *et al.*, 2014) (Figure 40), les arbres de décision, les modèles basés sur les scores (Nukada *et al.*, 2013; Takenouchi *et al.*, 2015), et les modèles de régression basés sur le domaine mécanistique (Natsch *et al.*, 2015). En accord avec la variabilité du LLNA, ces modèles intègrent des méthodes validées *in vitro* et des analogues combinés ou non avec des outils *in silico*. Ces différentes méthodes présentent des précisions globales dans la prédiction des catégories de puissance allant de 70% à 85% (European Chemicals Agency, 2016).

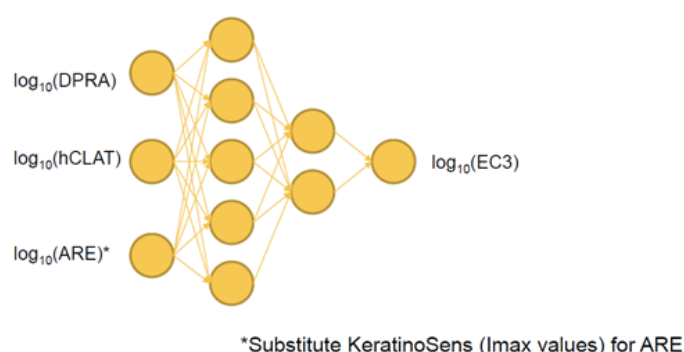


Figure 40 : Artificial neural network de Shiseido (Hirota, Fukui *et al.* 2015)

- *Bayesian network (BN)*

Le réseau bayésien (BN) est un modèle *in silico* à haute prédictivité proposé par Jaworska *et al.* (Jaworska *et al.*, 2013, 2011, 2015). Le modèle BN intègre plusieurs sources d'informations

et est capable de guider les tests qui doivent être conduits afin d'obtenir une meilleure prédictivité. La deuxième version du modèle (ITS-2) (Jaworska *et al.*, 2013) a été construit autour de 124 substances (appelés communément ensemble de formation) et testé sur 21 substances chimiques. Ce modèle a permis de prédire correctement 95% et 86% des substances selon les classes de puissance du LLNA. Les classes du LLNA ont été réduites à quatre, fusionnant les sensibilisants extrêmes et forts en sensibilisants forts. Le modèle combine différents tests *in silico* (TIMES-SS), *in vitro* (KeratinoSens™, U-SENS™, modèles de perméation cutanée), *in chemico* (DPRA), ainsi que les paramètres du coefficient de répartition octanol-eau (K_{ow}). Le modèle utilise tous les paramètres fournis pour en dériver une valeur de probabilité d'appartenance à chacun des groupes de puissance du LLNA (LLNA pEC3). Cependant, le modèle peut fonctionner malgré des données manquantes permettant d'estimer la certitude de la prédiction réalisée. Le modèle inclut un facteur de correction pour les accepteurs de Michael qui sont systématiquement surestimés.

Une troisième version améliorée du modèle (ITS-3) a été récemment publiée (Jaworska *et al.*, 2015). Le système a été construit dans le but d'améliorer la précision et la prédictivité par rapport au LLNA. Parmi les nouveaux éléments, les corrections de biodisponibilité *in vivo* et *in vitro* ainsi que la prise en compte des domaines d'applicabilité des méthodes individuelles. Les trois tests alternatifs validés, DPRA, KeratinoSens™ et h-CLAT sont intégrés dans cette ITS-3. Dans ce modèle, la prédiction de la puissance est fournie sous forme de probabilité de distribution en quatre classes de puissance (Figure 41). Cette probabilité de distribution est convertie en facteur de Bayes. La nouvelle base de données ITS-3 est issue de 207 substances ayant des données complètes en *in vivo* et *in vitro*. La précision pour prédire les résultats du LLNA sur un ensemble de molécules externes ($n = 60$) a été évaluée en trois niveaux et s'est révélée élevée (> 90%) selon l'ordre suivant : danger (deux classes) > classification de la puissance selon le GHS (trois classes) > puissance (quatre classes). La précision globale obtenue pour la classification selon quatre catégories (non sensibilisants, faibles, modérés ou forts) est de 80%, tandis que la précision des prédictions les plus fiables est de 98%.

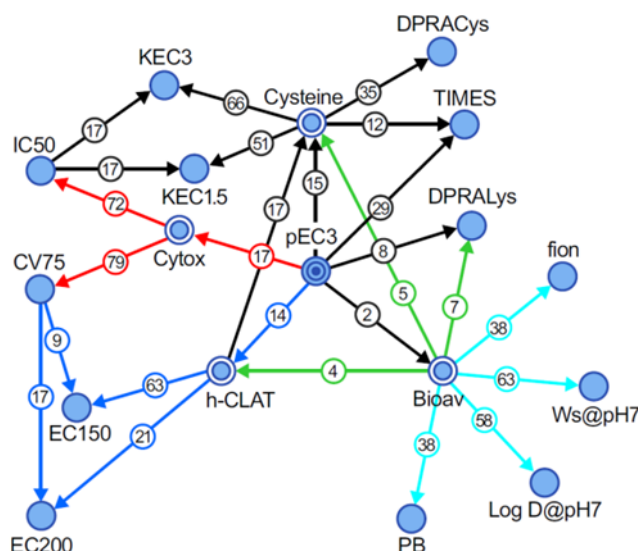


Figure 41 : Bayesian network ITS3 (Jaworska *et al.* 2015)

- *Les ITS basées sur les outils in silico*

Contrairement aux modèles *in vitro*, Dearden *et al.* (2015) ont développé un modèle de QSAR pour prédire les valeurs d'EC3 du LLNA à partir de descripteurs purement informatiques (CODESSA, MOE et logiciel winMolconn41). Ils ont divisé un set de 204 sensibilisants ayant un EC3 en LLNA en 10 domaines mécanistiques et dérivé un QSAR pour chaque domaine. Ils ont obtenu de bonnes prédictivités ($R^2 > 0,83$) pour 7 des 10 domaines et un Q^2 (équivalent du R^2) $> 0,79$ pour 6 des 10 domaines. Les domaines ayant les meilleures prédictions sont les suivants : potentiel d'oxydation ($R^2 = 0,91$), transfert d'acyle ($R^2 = 0,90$), accepteur de Michael ($R^2 = 0,83$), accepteur pro-Michael ($R^2 = 0,83$), SN2 ($R^2 = 0,82$) et base de Schiff + initiateurs de base pro-Schiff ($R^2 = 0,82$). Trop peu de substances contiennent des domaines SN1, pro-SN2, et SNAr pour développer des QSARs significatifs. Cette méthode ne classe pas les molécules en puissance, mais donne une corrélation avec l'EC3 du LLNA. Si celle-ci est élevée, une bonne performance est attendue pour ce test. Bien que ce modèle ne soit pas adéquat comme méthode de prédiction seule, il a cependant un intérêt à être utilisé dans une approche du poids de l'évidence, surtout compte tenu de l'obtention d'une valeur qui, de plus, est rapide et reproductible. Il peut également être utilisé comme un moyen de regrouper les substances chimiques pour effectuer du read-across.

- *Synthèse des différentes ITS actuellement proposées*

L'OCDE, conjointement avec l'ECVAM, a développé un document décrivant les bases pour concevoir une IATA basée sur les KE de l'AOP de la sensibilisation cutanée ainsi que des



exemples de modèles pour signaler une ITS. Les ITS actuellement proposées et suivies par les différents industriels sont regroupées dans l'un de ces annexes (OECD, 2016b). L'objectif de ce document est de promouvoir une description cohérente des ITS afin de faciliter leur évaluation et leur acceptation dans les pays membres de l'OCDE. Ce document donne les principes pour décrire et appliquer une ITS, ainsi que les différentes études de cas proposées par les industriels pour évaluer la sensibilisation cutanée. L'ensemble de ces études de cas est représenté dans le tableau 16.

Etude de cas		Objectif
1	An Adverse Outcome Pathway-based "2 out of 3" integrated testing strategy approach to skin hazard identification (BASF)	Hazard identification
2	Sequential Testing Strategy (STS) for hazard identification of skin sensitizers (RIVM)	Hazard identification
3	A non-testing Pipeline approach for skin sensitisation (G. Patlewicz)	Hazard identification
4	Stacking meta-model for skin sensitisation hazard identification (L'Oréal)	Hazard identification
5	Integrated decision strategy for skin sensitisation hazard (ICCVAM)	Hazard identification
6	Consensus of classification trees for skin sensitisation hazard prediction (EC-JRC)	Hazard identification
7	Sensitizer potency prediction based on Key event 1 + 2: Combination of kinetic peptide reactivity data and KeratinoSens® data (Givaudan)	Potency prediction
8	The artificial neural network model for predicting LLNA EC3 (Shiseido)	Potency prediction
9	Bayesian Network DIP (BN-ITS-3) for hazard and potency identification of skin sensitizers (P&G)	Potency prediction
10	Sequential testing strategy (STS) for sensitising potency classification based on in chemico and in vitro data (Kao Corporation)	Potency prediction
11	Integrated testing strategy (ITS) for sensitising potency classification based on <i>in silico</i> , <i>in chemico</i> , and <i>in vitro</i> data (Kao Corporation)	Potency prediction
12	DIP for skin allergy risk assessment (SARA) (Unilever)	Potency prediction

Tableau 16 : Les différentes ITS proposées (OECD, 2016b)

Les 6 premières méthodes proposent une évaluation du danger tandis que les 6 dernières une évaluation du risque.

Plus en détail, le tableau 17 présente les différents tests *in vitro* utilisés dans ces ITS ainsi que les autres informations utilisées comme les outils *in silico* ou les données de biodisponibilité.

	Etude de cas	Biodisponibilité	Propriétés physico-chimiques	<i>In silico</i>	Réactivité chimique KE1	KE2	KE3	KE4	Effets indésirables	Autres
1	ITS basée sur le poids de l'évidence (BASF)				TG 442C	TG 442D LuSens	h-CLAT m-MUSST			
2	STS (Stratégie séquentielle de tests) basée sur l'identification du danger (RIVM)			Divers	TG 442C	TG 442D HaCaT signature génique	h-CLAT			
3	IATA-SS (Dupont)		X	Divers	TG 442C Essai de déplétion du GSH	TG 442D	h-CLAT U937	TG 429	TG 406	ex : Irritation cut/oc, Ames
4	Stratégie de décision (L'Oréal)		X	Divers	TG 442C	TG 442D Test ARE-Nrf2	U-SENS™ Test PGE2			
5	Stratégie de décision intégrée pour le risque de sensibilisation cutanée (ICCVAM)		X	OCDE Toolbox		h-CLAT				
6	Modèle d'arbre décisionnel pour prédire le risque de sensibilisation cutanée (EC JRC)			TIMES SS Dragon						
7	Prédiction de la puissance KE 1+2 (Givaudan)		X	TIMES SS	Test Cor1C420	TG 442D				
8	Modèle artificiel neuronal pour prédire l'EC3 du LLNA (Artificial Neural Network, ANN) (Shiseido)		X		SH Test	Test AREc32	h-CLAT			
9	ITS/Stratégie de Décision (SD) pour le danger et la puissance (P&G)	pénétration (modèle PBPK)	X	TIMES SS	TG 442C	TG 442D	h-CLAT U937 test	TG 429		
10	Système hiérarchisé pour prédire le potentiel sensibilisant et la puissance (STS) (Kao Corporation)				TG 442C		h-CLAT			
11	Système de batterie de tests basé sur le score (ITS) (Kao Corporation)			DEREK Nexus	TG 442C		h-CLAT			
12	IATA pour l'évaluation de la sensibilisation (Unilever)	pénétration modifiée OCDE TG 428			OCDE modifié TG 428					

Tableau 17 : Résumé de l'ensemble des tests intégrés au sein des ITS proposées (OECD, 2016b)

Néanmoins, à partir des informations résumées dans le tableau 17, quelques observations générales peuvent être faites sur toutes ces ITS :

1- Toutes les ITS utilisent des données mécanistiques traitant d'un ou plusieurs KE de l'AOP de

la sensibilisation cutanée (OCDE 2012). En l'absence de méthode standardisée pour le KE4, aucune de ces ITS ne peut intégrer cette donnée. Toutefois, les différentes ITS montrent déjà un très haut niveau de précision pour une prédictivité binaire (par exemple sensibilisant/non sensibilisant) par rapport au LLNA,

2- Outre les méthodes validées et réglementairement adoptées au sein des ITS, d'autres informations pertinentes telles que les propriétés physico-chimiques et les prédictions *in silico* contribuent à l'évaluation et à la classification des dangers liés à la sensibilisation cutanée,

3- Les informations sur le KE1 (Événement moléculaire initiateur) sont utilisées dans toutes les ITS (dérivées des modèles *in silico* et/ou *in chemico*). Ces informations sur la réactivité peptidique ont prouvé, par des analyses sous-jacentes, avoir le plus haut pouvoir de discrimination entre les substances chimiques sensibilisantes et non sensibilisantes (par exemple, Asturiol *et al.*, 2016; Natsch *et al.*, 2015).

4- Toutes les ITS utilisent des tests cellulaires et/ou des descripteurs *in silico* qui prennent en compte le métabolisme de la peau et les processus d'auto-oxydation. Comme indiqué en détail à l'annexe I de la ligne directrice 256 de l'OCDE, le nombre de pré- et pro-haptènes classés par erreur comme non sensibilisants est généralement limité.

5- La majorité des ITS ont été développées et testées avec un nombre substantiel de produits chimiques (dans certains cas plus de 200) pour lesquels des données de sensibilisation cutanée *in vivo* sont disponibles. Il est donc probable que leurs domaines d'application couvrent de façon pertinente les principaux mécanismes de réaction de la sensibilisation cutanée.

6- La précision des différentes ITS spécifiquement conçues pour prédire des classifications binaires par rapport au LLNA est élevée et se situe entre 79 et 93% (sensibilité entre 79-98% et spécificité entre 72-94%).

7- Lorsqu'une évaluation de la capacité prédictive comparée aux données humaine est effectuée, les ITS ont tendance à prédire les réponses humaines plus précisément que le modèle animal (LLNA) (Asturiol *et al.*, 2016; Strickland *et al.*, 2017; Urbisch *et al.*, 2015; Zang *et al.*, 2017).

8- Six ITS sont conçues pour l'évaluation de la puissance de sensibilisation. Cependant, pour prendre en compte l'exactitude de la prédiction de la puissance, un aspect important à considérer est la variabilité des données de référence *in vivo*. En effet, des analyses récentes ont confirmé que ce phénomène est loin d'être négligeable (Dumont *et al.*, 2016; Hoffmann, 2015) et qu'il est difficile d'assigner à une molécule une classe de puissance avec une

confiance suffisante sur la base d'un seul résultat en LLNA.

À la lumière de ce qui précède, il est évident que certaines ITS développées dans le domaine de la sensibilisation cutanée ont des performances comparables à celles du LLNA pour l'identification du danger. De plus, certaines d'entre elles semblent être plus précises que le LLNA pour prédire le danger de sensibilisation cutanée chez l'homme. Cependant, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour parvenir à une définition plus détaillée de la puissance relative des sensibilisants à des fins d'évaluation du risque, même si ces ITS résumées dans le tableau 17 fournissent déjà des informations utiles pour la classification et l'étiquetage des substances.

2. Les difficultés et les limites des méthodes alternatives

Bien que des méthodes *in chemico* et *in vitro* substitutives à l'animal soient utilisées pour fournir des informations liées aux exigences du règlement REACH, il convient de noter qu'il n'y a pas d'approche actuelle validée pour évaluer la puissance menant à des sous-catégories selon le règlement CLP. Aucun test toxicologique *in vitro* n'est actuellement parfait et chaque méthode d'essai proposée doit être équilibrée entre la sensibilité (taux de vrais positifs) et la spécificité (taux de vrais négatifs) de l'effet prédictif sur la population humaine. Ces méthodes se sont révélées relativement performantes comparées au LLNA (précision d'environ 80%) et sont actuellement proposées pour être utilisées en combinaison avec d'autres informations pour évaluer le potentiel de sensibilisation cutanée des produits chimiques. Une des limites soulevée est qu'elles ne traitent que d'une partie des mécanismes biologiques complexes qui conduisent à l'acquisition de la DCA.

▪ *Quid d'une molécule non testée ?*

Dans le cas où aucune information n'est disponible pour une substance, il est recommandé de commencer l'évaluation en utilisant la boîte à outils QSAR de l'OCDE (OCDE Toolbox) ou tout autre outil *in silico*. La boîte à outils peut être utilisée à plusieurs fins. D'abord, elle facilite l'identification de la substance chimique et permet de savoir si des données *in vitro* et *in vivo* sont déjà disponibles pour la substance d'intérêt. Deuxièmement, elle identifie les structures d'alertes spécifiques à la sensibilisation comme la liaison aux protéines à l'aide de profileurs.

Troisièmement, elle peut être utilisée pour prédire et caractériser la transformation métabolique ou abiotique (par exemple l'auto-oxydation ou l'hydrolyse) des produits de la substance. Quatrièmement, elle facilite l'identification des analogues par des données expérimentales croisées. En outre, les données *in vivo* existantes pour la substance (et/ou ses analogues) peuvent fournir des informations sur la puissance de sensibilisation cutanée, par exemple *via* les valeurs d'EC3 obtenues à partir d'études en LLNA. Il est à noter que les prédictions peuvent aussi bien adresser les points finaux *in vivo* qu'*in vitro*, bien que pour l'instant il y ait peu de données *in vitro* incluses dans la boîte à outils (l'identification des analogues avec ces données peut être difficile).

Dans le cas où toutes les données existantes disponibles par l'utilisation de la boîte à outils QSAR de l'OCDE et/ou d'autres outils *in silico* ne permettent pas de conclure sur le danger de sensibilisation cutanée, y compris la puissance, il est alors nécessaire d'étudier un nombre suffisant d'événements clés tels que décrits dans l'AOP pour fournir des informations à partir de méthodes non animales. Le consensus actuel est de couvrir différents KE par des méthodes *in chemico/in vitro/in silico* afin d'améliorer la prédictivité finale. Par conséquent, en cas de non réalisation d'un ou deux KE, l'évaluateur devra justifier son approche. Sur la base des connaissances actuelles, les informations obtenues à partir des peptides pour mesurer la réactivité, qu'elles soient obtenues à partir de méthodes *in chemico* ou *in silico*, semblent avoir un fort pouvoir prédictif en donnant plus de poids à l'évaluation globale de la sensibilisation cutanée (Natsch *et al.*, 2013; Urbisch *et al.*, 2015).

- *Traitement des résultats négatifs*

Il a longtemps été reconnu que même les tests prédictifs *in vivo* en sensibilisation cutanée n'étaient pas parfaits, et ne livraient pas 100% de précision en terme de prédiction du danger chez l'homme (Basketter *et al.*, 2009; Basketter and Kimber, 2011). Néanmoins, une analyse de Kern *et al.* sur 127 molécules (Kern *et al.*, 2010) montre que le LLNA a identifié toutes les molécules avec succès sauf pour 2 molécules de la liste des pré- et pro-haptènes (soit une prédictivité d'environ 97%). Cette analyse a démontré qu'une grande proportion des pré- et pro-haptènes ont été correctement identifiés par les méthodes non animales. Par conséquent, il est admis que les données *in vitro* négatives soient acceptées à moins d'avoir un argumentaire scientifique convaincant sur la présence d'une substance qui est susceptible d'agir exclusivement comme un pro-haptène par activation métabolique. Des outils *in silico*

tels que TIMES-SS ou la boîte à outils de l'OCDE sont en mesure de fournir une telle information (Casati *et al.*, 2016). Etant donné que les méthodes *in chemico* et *in vitro* n'ont pas été développées en tant que méthodes autonomes, il est donc recommandé de combiner plusieurs tests lorsque des résultats négatifs sont obtenus afin de confirmer sa valeur prédictive négative.

- *Prédictivité variable selon les domaines mécanistiques*

Certains domaines mécanistiques sont plus faciles à prédire que d'autres. Par exemple, Natsch *et al.* (2015) ont trouvé une meilleure prédictivité pour les époxydes et les domaines à substitution nucléophile, avec un $R^2 > 0,80$. Les aldéhydes sont les plus difficiles à prédire, avec un $R^2 = 0,21$. Les paramètres de puissance de prédiction varient également selon les domaines mécanistiques des molécules. Ceci est une information précieuse pour la poursuite du développement des différents modèles : par exemple, les constantes de cinétique se sont avérées être importantes dans la prédiction du domaine SN2/SNAr ; de même, la valeur de l'EC3 du KeratinoSens™ est bien corrélée aux molécules accepteurs de Michael, ainsi que la cytotoxicité et la pression de vapeur pour les époxydes. Compte tenu du grand nombre de substances testées par Natsch *et al.* (2015), cette méthode pourrait être utilisée dans un approche du poids de l'évidence ou comme base pour le regroupement et le read-across pour des analogues structuraux (European Chemicals Agency, 2016).

Des informations importantes sur les domaines mécanistiques ont également été fournies par Urbisch *et al.* (2015). Ils ont observé que les tests basés sur l'élément de réponse ARE, comme le KeratinoSens™ et le LuSens ne sont pas efficaces pour prédire le potentiel de sensibilisation cutanée des agents acylants. De même, les bases de Schiff sont systématiquement mal classées dans les méthodes étudiées (DPRA, KeratinoSens™, LuSens, h-CLAT et U-SENS™). Cette information peut être d'une grande utilité pour l'ensemble de ces méthodes qui nécessiteront des tests supplémentaires liés à leurs limites d'applicabilité.

- *Capacité métabolique limitée ou champ d'application inadapté*

Le DPRA par exemple n'a pas de système métabolique et les méthodes *in vitro* validées en monocouches ne représentent pas pleinement la situation métabolique *in vivo* (Casati *et al.*, 2016). Ainsi, les résultats générés avec ces méthodes pour prédire la capacité des produits chimiques qui nécessitent une activation métabolique pour devenir des molécules actives

peuvent être erronés. Les méthodes d'essai *in chemico/in vitro* actuellement disponibles n'ont pas ou une capacité métabolique limitée (Fabian *et al.*, 2013). Par conséquent, les substances nécessitant une activation métabolique avant de devenir des molécules sensibilisantes peuvent ne pas être correctement identifiées par ces méthodes d'essai. De même, les substances nécessitant une transformation abiotique (par exemple, auto-oxydation ou hydrolyse) avant de devenir actives peuvent ne pas être détectées. Néanmoins, ce problème s'appliquait généralement avec les tests sur animaux. En outre, les modèles QSAR ne tiennent généralement pas compte du métabolisme ni de la transformation abiotique ou seulement par comparaison implicite à un modèle fixe d'ensemble de substances qui nécessitent ou non une activation métabolique (par read-across). Il est important de noter qu'il est de la responsabilité de l'évaluateur de s'assurer qu'une méthode d'essai convienne pour tester la substance afin d'obtenir les informations adéquates. Ainsi, avant de réaliser un test, l'évaluateur doit examiner s'il existe des limitations spécifiques à certaines substances selon le domaine d'applicabilité de l'essai (la faible solubilité ou le log Kow, la nature de la molécule ; par exemple le DPRA n'est pas applicable aux molécules UVCB). Il peut aussi y avoir certaines limites intrinsèques liées à l'essai, comme l'absence ou la capacité métabolique limitée, pour lesquelles les pro-haptènes peuvent ne pas être correctement détectés et donner des résultats faussement négatifs. De même, les substances exigeant une transformation abiotique, par exemple l'auto-oxydation, l'oxydation lente ou encore l'hydrolyse dans le cas des pré-haptènes, peuvent ne pas être correctement identifiées. Actuellement, une modification du DPRA est en cours de développement (le PPRA) pour une meilleure identification des pro-haptènes (Merckel *et al.*, 2013), mais le travail est encore en cours pour évaluer la valeur ajoutée de ce test. Une analyse concernant la capacité des méthodes de tests *in vitro* à détecter les pro- et les pré-haptènes a été réalisée à l'occasion d'une réunion EURL ECVAM tenue en 2015 et discuté avec un groupe d'experts (Casati *et al.*, 2016). Les experts ont noté que de nombreuses substances considérées comme des pro-haptènes étaient également des pré-haptènes, comme le géranjol par exemple. Il a également été noté que la majorité des haptènes non directs étaient des pré-haptènes qui étaient généralement identifiés en DPRA. Cependant, le problème identifié pour les oxydants lents est identique en utilisant des méthodes d'essai *in vivo*. Les substances qui sont exclusivement des pro-haptènes, qui n'étaient pas identifiées en DPRA, étaient généralement identifiées par l'un des tests cellulaires (le h-CLAT en détectant la majorité). Le résultat de cette analyse a permis de

mettre en évidence une prédictivité comparable du danger de sensibilisation cutanée à celle obtenue précédemment avec le test du LLNA. A la lumière de cette analyse, le groupe d'experts a conclu qu'à moins qu'il n'y ait un argument scientifique qu'une substance puisse être un pro-haptène activé métaboliquement (*via* les modèles *in silico*), les résultats négatifs obtenus dans les méthodes d'essai non animales peuvent être considérées comme acceptables (European Chemicals Agency, 2016).

- *Conclusion*

En raison de la complexité du critère de sensibilisation cutanée, une combinaison de tests alternatifs *in silico*, *in chemico* et *in vitro* dans une approche du poids de l'évidence doit être considérée pour augmenter la prédictivité finale de l'évaluation.

La prédiction de la puissance d'un sensibilisant cutané par des méthodes alternatives est actuellement un objectif encore en cours de développement, et les efforts pour développer des approches intégrant différentes ITS doivent être jugés dans le contexte de la variabilité du LLNA. Alors que des recommandations fermes pour des stratégies de tests intégrés ne peuvent être faites, cette revue des différentes ITS montre que certaines méthodes *in silico* et *in vitro* combinées sont toutefois prometteuses pour l'identification des catégories et même pour discriminer les substances en classes de puissance. Enfin, il convient de mentionner que les méthodes *in vitro*, utilisant des modèles d'épidermes 3D reconstruits, ont également l'avantage d'intégrer la notion de biodisponibilité et d'être pourvues d'une capacité métabolique plus proche de la peau humaine native (Hewitt *et al.*, 2013) et présentent donc un intérêt des plus prometteurs pour évaluer le potentiel de sensibilisation cutanée. L'ensemble des résultats rapportés ces dernières années pour plusieurs ITS combinant différentes méthodologies (Dearden *et al.*, 2015; Hirota *et al.*, 2015; Jaworska *et al.*, 2015; Natsch *et al.*, 2015; Takenouchi *et al.*, 2015) ainsi que pour certaines méthodes *in vitro* basées sur des gènes sont très encourageants pour l'évaluation du potentiel de sensibilisation cutanée (par exemple Cottrez *et al.*, 2016, 2015; Lambrechts *et al.*, 2010).

PRESENTATION DU TRAVAIL

Présentation du travail

Au sein des laboratoires Pierre Fabre, depuis l'entrée en vigueur le 11 Mars 2013 du nouveau Règlement cosmétique n°1223/2009 sur l'interdiction de l'expérimentation animale, les méthodes alternatives, substitutives aux essais de toxicité à doses répétées comme le Local Lymph Node Assay (LLNA), sont nécessaires afin de caractériser et d'évaluer le danger de sensibilisation cutanée des produits chimiques.

De façon concomitante, la voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables ou Adverse Outcome Pathway (AOP) a été décrite par l'OCDE (OECD, 2012). Celle-ci est composée de différents événements clés (KE) pour lesquels des méthodes alternatives sont associées.

Le premier objectif de ce travail a été d'identifier 3 méthodes alternatives qui couvrent les différentes étapes de l'AOP de la sensibilisation et d'étudier leurs performances individuelles pour 33 substances sélectionnées. Parmi les méthodes alternatives proposées, nous avons sélectionné le DPRA pour le KE1, le SENS-IS pour le KE2 et le h-CLAT pour le KE3. Nous avons ensuite défini notre stratégie d'évaluation en combinant les différents tests entre eux et en comparant les résultats obtenus au test de référence sur la souris, à savoir le LLNA.

Nous avons montré qu'il est préférable de suivre une séquence prédéfinie de 2 tests afin de conclure plus rapidement et en cas de résultats contradictoires, réaliser un 3^{ème} test pour conclure par le Poids de l'Evidence quant au danger de sensibilisation cutanée.

Parallèlement, les principales phases du processus biologique de sensibilisation cutanée font l'objet d'un consensus scientifique selon lequel il est recommandé d'associer à *minima* 3 tests couvrant les 3 premiers événements clés de la sensibilisation pour obtenir une information sur l'évaluation du danger. Ces tests simples comparativement à la complexité des mécanismes immunologiques mis en jeu dans l'allergie cutanée, ont montré leur efficacité pour la détection des molécules allergisantes. Cependant, choisir une telle stratégie et l'internaliser nécessite une mise en place qui peut-être complexe, coûteuse et longue. Par ailleurs, chaque test évalue un KE de l'AOP et donc un phénomène biologique en utilisant des modèles *in vitro* de lignées cellulaires différentes. Suite à cette constatation, la question posée a été la suivante : une même cellule peut-elle adresser l'ensemble des KE de l'AOP. Nous nous sommes donc intéressés à la possibilité de combiner différents KE menant au développement de la dermatite de contact allergique (DCA) au sein d'un même type cellulaire. Les cellules

dendritiques (DC) jouent un rôle clé lors de la phase de sensibilisation cutanée de la DCA. En effet, après activation par un antigène (Ag), la DC évolue d'un phénotype immature à un phénotype mature. Elle perd sa fonction d'internalisation pour devenir une cellule présentatrice d'Ag (CPA) professionnelle. Elle peut alors présenter aux lymphocytes T naifs le peptide hapténisé. Nous avons donc sélectionné un type cellulaire agissant comme une cellule dendritique, à savoir la THP-1. Cette lignée promonocytaire utilisée dans le test human Cell Line Activation Test (h-CLAT) a été validée par l'OCDE en 2015 pour détecter le potentiel allergisant des composés chimiques *via* la mesure de l'induction de deux marqueurs d'activation de la DC, CD86 et CD54. Nous avons étudié comme événements initiaux (KE1) le stress oxydant en mesurant les formes réactives à l'oxygène (FRO) et le glutathion (GSH) ainsi que la voie Nrf2-Keap1 (voie centrale de détoxification) et l'expression génique pour le KE2 et les modifications phénotypiques pour le KE3.

Nous avons montré que les molécules allergisantes fortes, comme le cinnamaldéhyde ou la methylisothiazolinone, induisent une production précoce des FRO associée à une réduction du GSH. Elles activent également la voie Nrf2-Keap1 et induisent l'expression des marqueurs de surface cellulaire CD54 et CD86, ainsi qu'une production de cytokines spécifiques telles que l'IL-8, IL-18,... Nous avons aussi montré que les DC stimulées préalablement par les produits chimiques sont capables d'induire une prolifération lymphocytaire. L'ensemble de ces résultats ont montré une bonne corrélation pour détecter les sensibilisants forts et les irritants. Cependant, les sensibilisants modérés et faibles, agissant comme des pro-haptènes semblent ne pas induire de façon équivalente tous les KE sélectionnés.

Pour conclure, ce travail a permis de proposer un test intégrant l'ensemble des mesures biologiques comme différents KE au sein d'un même type cellulaire.

RESULTATS

ARTICLE 1

Article 1

Comparison and validation of an *in vitro* skin sensitization strategy using a data set of 33 chemical references

Toxicology in Vitro 45 (2017) 374–385

Elodie Clouet, Saadia Kerdine-Römer, Pierre-Jacques Ferret

La dermatite de contact allergique (DCA) est une réaction inflammatoire aïgue qui se développe après une exposition répétée de la peau à une molécule allergisante. L'interdiction des expérimentations animales est appliquée au sein de l'Union européenne depuis Mars 2013, conduisant au développement de méthodes alternatives substitutives. Plusieurs méthodes *in vitro* ont été développées mais aucune n'est actuellement suffisante pour fournir une information quantitative comme obtenue par le précédent test de référence utilisée sur la souris, à savoir le Local Lymph Node Assay (LLNA).

Dans ce travail, nous avons mis au point une stratégie de tests intégrés ou Integrated Testing Strategy (ITS) pour évaluer la sensibilisation cutanée en sélectionnant trois méthodes *in vitro* qui couvrent les trois premières étapes de la voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables ou Adverse Outcome Pathway (AOP) définie par l'OCDE. Les tests sélectionnés sont le DPRA pour la mesure de la réactivité chimique correspondant au KE1 ; le SENS-IS pour la mesure de l'activation des KC au niveau du KE2 *via* l'activation des gènes induits dans les voies de signalisation biochimiques affectées par l'action définitive d'un électrophile comprenant la voie des kinases telles que Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) et la voie de réponse au stress oxydatif (Keap1-Nrf2) et le dernier test sélectionné correspond au test du h-CLAT pour la mesure du KE3 correspondant à l'activation de la DC. Le but de cette étude a été de comparer ces trois méthodes grâce à l'approche « 2 sur 3 » basée sur le poids de l'évidence (Weight of Evidence, WoE). Les résultats de 33 produits chimiques de référence ont été comparés aux données *in vivo* (en particulier humaines). Pour réaliser les statistiques de Cooper, les résultats ont été réduit à Oui/Non (« 1 » / « 0 ») selon les modèles de prédiction des tests individuels. En utilisant ces données, une comparaison directe entre les prédictivités des méthodes d'essai non-animales et humaine est possible. La précision des analyses individuelles par rapport aux données du LLNA est de 79 à 91% pour ces 33 produits chimiques. Nous avons ensuite effectué un système de d'attribution de numéros en

combinant deux méthodes *in vitro* parmi celles sélectionnées. Nous avons attribué la valeur finale de « 1 » lorsque le produit était classé sensibilisant pour les deux tests et « 0 » lorsque les deux résultats obtenus étaient négatifs. En cas de résultats contradictoires, correspondant à un résultat positif dans un test et négatif dans l'autre, nous avons attribué un score de « 0/1 ». Pour réaliser les statistiques de Cooper, nous les avons finalement considérées comme positives, afin de majorer le risque. Avec notre modèle de prédiction, DPRA, SENS-IS et h-CLAT, nous avons obtenu une meilleure précision à 94% que le LLNA (88%) comparée aux données humaines. Néanmoins, en combinant deux méthodes alternatives, nous n'avons pas obtenu de meilleurs résultats qu'avec le test de référence du LLNA. Cependant, la meilleure combinaison *in vitro* de méthodes semble être le DPRA et le SENS-IS par rapport aux deux autres, DPRA et h-CLAT, et h-CLAT et SENS-IS. Nous avons ensuite investigué notre modèle avec une approche « 2 sur 3 » afin de savoir si ces trois tests doivent être effectués en même temps ou séquentiellement. Nous avons montré que tester dans un premier temps le DPRA et SENS-IS a permis de conclure sur 29 des 33 produits chimiques, tandis que le DPRA et l'h-CLAT sur 25, et le SENS-IS et l'h-CLAT sur 23. Avec cette séquence prédéfinie, le DPRA et le SENS-IS en première intention, puis le test du h-CLAT en cas de résultats équivoques, nous concluons plus rapidement en effectuant moins de tests. Ainsi, nous avons montré qu'il est préférable de suivre une séquence préférentielle que de tester des produits chimiques simultanément avec ces trois méthodes.



Comparison and validation of an *in vitro* skin sensitization strategy using a data set of 33 chemical references



Elodie Clouet^{a,b,*}, Saadia Kerdine-Römer^b, Pierre-Jacques Ferret^a

^a Pierre Fabre Dermo-Cosmetics Research & Development, Toxicology Division, Safety Department, Toulouse, France

^b UMR996 - Inflammation, Chemokines and Immunopathology, INSERM, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France

ARTICLE INFO

Keywords:

ITS
Skin sensitization
DPRA
h-CLAT
SENS-IS
AOP

ABSTRACT

Allergic contact dermatitis (ACD) is an adverse health effect that develops following repeated exposure to skin sensitizing chemicals. An animal testing ban has been applied in EU, leading to development of reliably predictive non-animal methods. Several *in vitro* methods have been developed as alternatives but one single non-animal test method is not been sufficient to fully address since the LLNA test ban.

Here, we have selected an ITS (Integrated Testing Strategy) for skin sensitization which focuses on three *in vitro* methods that covered the first three steps of the AOP (DPRA, SENS-IS or h-CLAT). The aim of this study was to compare these three methods due to the WoE approach based on a 2-out-of-3-assessment. The results of 33 references were compared to *in vivo* data (especially human). We have shown that tested firstly DPRA and SENS-IS have permitted to conclude on 29 of 33 chemicals, whereas DPRA and h-CLAT on 25, and SENS-IS and h-CLAT on 23. With this sequence, DPRA and SENS-IS and then h-CLAT in case of equivocal results, we conclude more quickly by performing fewer tests. Thereby, we have shown that it is better to follow a preferential sequence than testing chemicals simultaneously with these three methods.

1. Introduction

The principle of the “Three Rs” (Russell and Burch, 1959) has been present in spirit in European Union (EU) legislation from as early as 1986, when the first EU law for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes was adopted. Russell and Burch proposed the principles of Replacement, Reduction and Refinement (the “Three Rs”) as key strategies of a systematic framework aimed to achieve the goal of humane experimental techniques. They saw replacement as the ultimate goal for laboratory animal based research, education and testing, with the other two, reduction and refinement, being more readily achievable in the short term. This concept, combined with societal change for 20 years, has led to a total animal testing ban in cosmetics which came into force with the

Cosmetic Regulation no. 1223/2009 on March 13th, 2016. Since 2004, EU law bans the sale of any cosmetic product in finished form tested on animals, as well as cosmetics containing ingredients subject to new animal testing since 2013.

Allergic Contact Dermatitis (ACD) represents a severe health problem with increasing worldwide prevalence, which is estimated at 15–20% in the world's population (Bruckner et al., 2000; Thyssen et al., 2007). ACD resulting from skin sensitization is provoked by repeated skin contact with low molecular weight chemicals (Kimber et al., 2011). Information on this toxicological endpoint is required in different legal frameworks, including the European Regulation of Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemical Substances (REACH; EC 1907/2006) and under the United Nations Globally Harmonized System for Classification, Labeling and Packaging (GHS/CLP). One of

Abbreviations: Ac, Acylating agents; ACD, Allergic Contact Dermatitis; AOP, Adverse Outcome Pathway; ARE, Antioxidant Response Element; DC, dendritic cell; DMSO, dimethyl sulfoxide; DNCB, dinitrochlorobenzene; DPRA, Direct Peptide Reactivity Assay; ECVAM, European Centre for the Validation of Alternative Methods; FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorting; FN, false negative; FP, false positive; GP, guinea pig; GPTS, guinea pig based tests; h-CLAT, human Cell Line Activation Test; HRIPT, Human Repeated Insult Patch Test; IATA, Integrated Approaches to Testing and Assessment; Ig, immunoglobulin; ITS, Integrated Testing Strategy; KE, Key Event; LLNA, local lymph node assay; MA, Michael acceptors; MFI, Mean Fluorescence Intensity; MIE, Molecular Initiating Event; MT1 and MT2, Metallothionein-1 and -2; MUSST, myeloid u937 skin sensitization test; OECD TG, Organisation Economic for Co-operation and Development Test Guidelines; PBS, phosphate-buffered saline; QRA, Quantitative Risk Assessment; QSAR, Quantitative structure-activity relationship; RFI, Relative Fluorescence Intensity; RhE, Reconstructed human Epidermis; ROS, Reactive Oxygen Species; RT-PCR, Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction; SB, Schiff base formers; SLS, sodium lauryl sulfate; SI, stimulation index; SN2, Substances reacting by nucleophilic substitutions of type 1 or 2; STS, Sequential Testing Strategy; TG, test guidelines; TMR, Test Methods Regulation; TN, true negative; TP, true positive; TNBS, 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid; WoE, Weight of Evidence

* Corresponding author at: Institut de Recherche Pierre Fabre, Recherche et Développement Pierre Fabre Dermo Cosmetique, 3 Avenue Hubert Curien, BP 13562, 31035 Toulouse Cedex, France.

E-mail address: elodie.clouet@pierre-fabre.com (E. Clouet).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.05.014>

Received 31 December 2016; Received in revised form 6 May 2017; Accepted 19 May 2017

Available online 21 May 2017

0887-2333/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

the objectives of the REACH Regulation was to promote non-animal test methods. To better understand the impact of chemicals, reliable hazard and exposure information must be provided to demonstrate their safety. The hazard data has been traditionally generated through animal testing but now there are presently a number of other ways: by comparing substances with similar ones; by grouping them together into logical categories; by performing specialised computer modelling; by using Weight of Evidence; or by using a validated alternative test. The REACH Regulation is clear that every effort must be made and alternative methods used wherever possible and testing on animals is truly the last resort. To conform this, a revision of Annex VII of REACH was published at the end of 2016 (European Parliament, 2016). This text allows, if adequate, the use of *in vitro/in silico* methods in place of the local lymph node assay (LLNA), a sensitization test on mice for classification and labeling. Furthermore, under the EU animal testing Directive (2010/63/EU) companies must not test on animals when an alternative method is accepted under the EU legislation (European Union, 2010). In that vein, a revision of the ECHA R7a guidance on skin sensitisation was published recently at the end of 2016 (European Chemicals Agency, 2016).

To complete, information on skin sensitization is required in the safety assessment of EU Cosmetics Regulation (EC 1223/2009). Within these various legislative frameworks, information is necessary on the skin sensitization hazard potential. Furthermore, quantitative information that allows hazard assessment is needed to meet the regulatory requirements to sub-categorize skin sensitizers according to their potency class. Until recently, these legislative frameworks had been relying on information from animal models. Models accepted by the different regulations are the guinea pig (GP) models described in OECD TG406 (OECD, 1992) including the guinea pig maximization test (GPMT) and Buehler test, and the LLNA described in OECD TG429 (OECD, 2010a) and non-radioactive variants of the LLNA in OECD TG442A and 442B (OECD, 2010b, 2010c). From an animal welfare perspective, the LLNA has been a first refinement and reduction method compared to the classical guinea pig methods. Another advantage of the LLNA was generating dose-response data on lymphocyte proliferation. These quantitative data were used to derive the EC3 value, which was the Effective Concentration that induces a threefold increase in local lymph node proliferative activity. The EC3 correlates relatively well with known human thresholds for contact allergy (Basketter et al., 2005; Griem et al., 2003; Schneider and Akkan, 2004). This value is used for sub-categorizing of skin sensitizers, e.g. in the GHS 1A (EC3 ≤ 2%; strong skin sensitizers) and 1B (EC3 > 2%; other skin sensitizers) and allowing Quantitative Risk Assessment (QRA). Clearly, since the animal testing ban, novel predictive test methods or strategies for skin sensitization need to provide information that allow both hazard identification and potency sub-categorization of skin sensitizers.

ACD is composed of two phases: the first called sensitization phase and the second one the elicitation phase. The chemical and biological pathways involved are relatively well characterized and have been simplified and structured into an Adverse Outcome Pathway (AOP). The KEs involved have now been formally described by the OECD (OECD, 2012). AOP represents existing knowledge concerning the causal linkages between initial molecular events and an adverse outcome at the individual and population levels. These events include skin bioavailability and metabolism, hapten formation (*i.e.*, the ability of a chemical to react with skin proteins), epidermal inflammation *via* keratinocyte and/or dendritic cell (DC) signalling, DC activation, maturation and migration, and T-lymphocyte (T-cell) proliferation; meaning that several KEs are required for acquisition of skin sensitization. Thus, many *in vitro* methods including haptenisation with *in chemico* assays (Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA), Peroxidase peptide reactivity assay (PPRA)), DC line activation (cell based assays (U-SENS™, mMUSST, h-CLAT)) and keratinocyte activation (KeratinoSens™ and SENS-IS) have been developed as alternative methods and are currently used in different stages of formal validation (Reisinger

et al., 2015). Among those methods developed or under development, three *in vitro* methods have been recently validated:

- 1) The test method OECD 442C adopted in 2015 - Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) is an *in chemico* test method which addresses peptide reactivity, postulated to be the Molecular Initiating Event (MIE) (corresponding to the first Key Event (KE1)) of the skin sensitization AOP (OECD, 2012). Reactivity is measured by quantifying depletion of synthetic peptides containing either cysteine or lysine.
- 2) The test method OECD 442D adopted in 2015- ARE-Nrf2 Luciferase Test Method (KeratinoSens™) is an *in vitro* test method which addresses keratinocyte induction of a cyto-protective gene pathway linked to skin sensitization, *i.e.* KE2 of the AOP (OECD, 2012). The test method uses luminescence detection to measure gene expression of the Antioxidant/electrophile Response Element (ARE)-dependent pathway.
- 3) The test method OECD 442E adopted in 2016 - human Cell Line Activation Test (h-CLAT) is an *in vitro* method which addresses activation of the dendritic cells (DCs), *i.e.* KE3 of the AOP (OECD, 2012). The assay quantitatively measures changes in the expression of cell surface markers (CD86 and CD54), associated with the activation of DCs, in a human monocytic leukemia cell line by flow cytometry analysis.

These tests cover specific KEs within the skin sensitization AOP, previously outlined (OECD, 2012).

Besides these, many other assays are in development and at different stages of the evaluation process (EURL-ECVAM, 2016). Out of these, two *in vitro* keratinocyte assays are in development: the LuSens assay (Bauch et al., 2012; Ramirez et al., 2016; Ramirez et al., 2014; Urbisch et al., 2015), a test method similar to KeratinoSens™ and the SENS-IS assay (Cottrez et al., 2016b; Cottrez et al., 2015), a test determining the sensitizing potential and potency of chemicals using a panel of genes. Moreover, data on over a hundred substances is available for the myeloid U937-based skin sensitization assays (U-SENS™, formerly known as MUSST, myeloid U937 skin sensitization test) (Ade et al., 2006; Alépée et al., 2015; Bauch et al., 2011; Piroird et al., 2015; Urbisch et al., 2015), which is similarly to the h-CLAT. The U-SENS™ test is currently being peer-reviewed by EURL-ECVAM and a proposal for the development of an OECD Test Guideline has been included in the OECD work program (EURL-ECVAM, 2016; Ezendam et al., 2016).

However, there is a current scientific consensus that one single non-animal test method will not be able to provide sufficient information to fully address this AOP and replace the use of animals, compared to LLNA (Adler et al., 2011). In many cases, the use of a battery of tests in combination and/or with other information in the context of integrated approaches such as Weight of Evidence (WoE) or testing and assessment strategies have to be considered (European Parliament, 2016; Patlewicz et al., 2014; Tollefsen et al., 2014). There are several testing strategies proposed that combine *in silico* (QSARs), *in chemico* (OECD TG 442C) and/or *in vitro* tests (*e.g.* OECD TG 442D and 442E) to distinguish skin sensitizers from non-sensitizers.

In addition, the new REACH consolidation as well as ECHA guidance R7a or OECD EU test guidelines updated agree that these methods can be used within a WoE assessment. Recently, the OECD has also developed two guidance documents on defined approaches to testing and assessment. The first is a general document that provides a set of principles and how to use them within an Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) (OECD, 2016a); the second document specifically focuses on case studies (OECD, 2016b).

Therefore, all of these tests (except for the SENS-IS) are already being successfully used in combination in a number of Integrated Testing Strategies (ITS). Some of them, which include, but are not limited to, the “2 out of 3” approach (Bauch et al., 2012; Natsch et al.,

2013; van der Veen et al., 2014a), an ITS based on Bayesian Networks (Jaworska et al., 2013) or an ITS which includes an assessment of potency (Nukada et al., 2013; Tsujita-Inoue et al., 2014). Some approaches are constructed on a mechanistic base using parts of the AOP, e.g. the “2 out of 3” ITS (Urbisch et al., 2015) or the Sequential Testing Sequence (STS) of the RIVM (van der Veen et al., 2014a, 2014b). Others apply statistical approaches to conduct their strategy (e.g. the integrated decision strategy of Strickland et al. (2016)) or use a combination of both (e.g. the Bayesian ITS of Jaworska et al. (2015)). The skin sensitization ITS proposed by BASF (Bauch et al., 2012) and later updated by Natsch et al. (2013) and Urbisch et al. (2015), is based on assays reflecting the first 3 KEs: KE1 with DPRA, KE2 with LuSens assay or the KeratinoSens™ and KE3 with the mMUSST or the h-CLAT. Their initial approach was developed using assays that reflect the first three KEs of the AOP. The preliminary prediction model was based on a dataset of 54 substances. Application of this prediction model resulted in an accuracy of 83–94%, a sensitivity of 81–93% and a specificity of 88–95% compared to LLNA or human data, respectively (Bauch et al., 2012). This ITS further evolved with a larger dataset of 145 substances (102 skin sensitizers and 43 non-sensitizers). The data interpretation procedure used was simplified compared to that used in the initial study of Bauch et al. (2012). Thus, an ITS combining data from the regulatory accepted test methods (DPRA, KeratinoSens™ and h-CLAT) resulted in the highest accuracy of 90%; sensitivity and specificity both were 90% as well, compared to human data. This predictivity was more accurate compared to predictions based on the LLNA for the same dataset, for which the accuracy, sensitivity and specificity were 82%, 91% and 64%, respectively (Urbisch et al., 2015). Many AOP-based testing strategies are focused mainly on MIE (KE1), KE2 and KE3, meaning that the AOP is not yet totally covered. Informations on these last events seem to be sufficient to predict skin sensitization with a high certainty. Furthermore, the “2 out of 3” approach shows that it is possible to identify skin sensitizers with a high accuracy based on only two KEs (Ezendam et al., 2016). But, the majority of predictive *in vitro* or *in chemico* assays cannot estimate potency on their own. A possible explanation may be that the dynamic range of *in vitro* and *in chemico* assays is too limited to detect the broad range of skin-sensitizing potencies (e.g. lack of bioactivation of prohaptens, water solubility of the test substances, ...).

In this study, we propose an in-house IATA selecting three *in vitro* tests that cover main KEs defined by the AOP (Fig. 1): DPRA (MIE), SENS-IS (KE2) and h-CLAT (KE3). According to the previous explanation, the originality of our ITS has been to integrate the SENS-IS which measures the gene expression of irritation and sensitization biomarkers at the KE2 level. The SENS-IS assay was submitted to ECVAM in September 2011 and was enrolled in the OECD guideline work in 2015. Despite the fact that this assay is not yet approved, it can provide an accurate prediction of potency categories (Cottrez et al., 2015). Moreover, the use of 3D model allows us to avoid any solubility limitation of the test item. In addition, several studies have shown that regulation of gene expression correlates with potency (McKim et al., 2012; van der Veen et al., 2013). Thus, the different read-out(s) issued from the SENS-IS assay seems to be more capable of distinguishing sensitizer, irritant or antioxidant and assigning potencies. Thereby, SENS-IS provide a possible way to encompass metabolism as well as bioavailability limitations of ingredients and come closer to potency assessment (Cottrez et al., 2015). Therefore, the aim of this study was to compare the available data, previously published (Cottrez et al., 2015; Urbisch et al., 2015) with the above mentioned *in vitro* methods (DPRA, SENS-IS and h-CLAT). All results obtained within this ITS was compared to LLNA and human data from literature. The predictivities of the individual methods as well as their combinations (2 or 3 methods) are evaluated. A pragmatic “WoE” approach is used: Any two of the three tests decide the overall result (any two assays must be positive to rate the substance as a skin sensitizer and any two assays must be negative to rate the substance as a nonsensitizer). The final aim of our

ITS is to give reliable information about the potential sensitization risk induced by a chemical.

2. Material and methods

2.1. Strategy for selecting tests

Each AOP starts with a Molecular Initiating Event (MIE), consisting in the first step that initiates the perturbation caused by a chemical, followed by several KEs at the cellular, organ or organism level, eventually resulting in the adverse outcome. For skin sensitization, the MIE is the covalent binding of a chemical or its metabolites to skin proteins, resulting in the formation of an immunogenic conjugate. This triggers two cellular events, KE2 and KE3. The electrophilic properties of skin sensitizers cause an activation of keratinocytes (KE2), resulting in the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines, and activation of antioxidant responses. These mediators are essential components for the generation of an adaptive immune response (Martin et al., 2011; van der Veen et al., 2011). The immunogenic conjugate is taken up by dermal DCs and/or Langerhans cells, resulting in activation and migration of these cells to the draining lymph nodes (KE3). The DC present epitopes of the conjugate to T cells, resulting in activation and proliferation of T cells (KE4), occurring in sensitization phase of the immune system. The AOP is a simplification of a complex biological process, which offers the opportunity to anchor existing test methods or *in silico* tools that measure the MIE or other KEs. This AOP can be used to mechanistically underpin the development of strategies for the testing and assessment of chemicals for a specific regulatory need (MacKay et al., 2013; Patlewicz et al., 2014). Considering this AOP, ITS used within the IATA consists of methods with a mechanistic relevance for the endpoint that must be assessed. Placed in the context, we have selected validated or under-validation *in vitro* methods that covered three main KEs.

The DPRA evaluates KE1 and the protein/peptide reactivity of a substance (covalent interaction with cellular proteins). The SENS-IS represents KE2 and addresses keratinocyte activation (through Pathways-associated gene expression). And the h-CLAT describes KE3 and DCs activation (expression of co-stimulatory and adhesion cell surface markers). When used together, they cover the first three of the four KEs of the sensitization process, thus being of mechanistic relevance and supporting the scientific rationale for using a combination of these methods in an AOP-based ITS.

2.2. Selection of chemicals

The main selection criterion for the substances was the availability of both human and LLNA reference data. Only molecules having results in each of 3 *in vitro* methods were retained: DPRA, h-CLAT and SENS-IS as well as LLNA and human data, taken from two publications (Cottrez et al., 2015; Urbisch et al., 2015) indicated in Table 1. These chemicals are used in cosmetics as well as fragrance or pharmaceutical use. Among the 33 selected, 23 (70%) are classified as sensitizers according to LLNA and 19 (58%) according to human data. In Table 1, all results are combined per test to each molecule, and compared to both human and LLNA data.

For each chemical and per test, we attributed a simple number: “0” for negative test results, “1” indicates positive test results for all different tests and “0/1” for equivocal results. However, for equivocal results, and during combination process, the worst-case will be retained (e.g. “1” for salicylic acid which is quoted in DPRA (“0/1”)).

2.3. Non-animal tests methods selected: *in vitro* skin sensitization studies according to AOP Skin Sensitization

2.3.1. Direct peptide reactivity assay (DPRA) for the Key Event 1

The Molecular Initiating Event leading to skin sensitization is

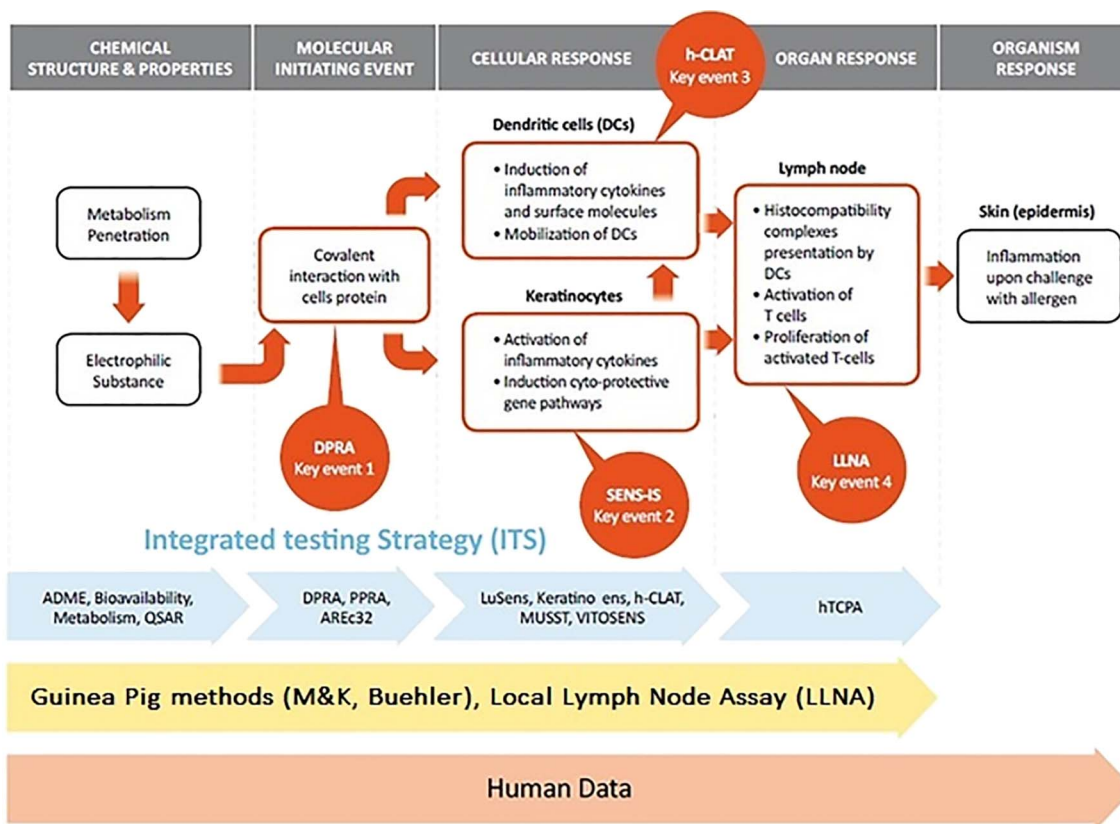


Fig. 1. Schematic representation of Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitization and necessity to follow an Integrated Testing Strategy (ITS) since the LLNA ban to cover the different key events.

This figure is inspired by the AOP for skin sensitization (OECD, 2012). It shows the *in vitro* methods selected in our prediction model to cover the different key events of the AOP (Adverse Outcome Pathway). All results obtained were compared to LLNA and human data.

Table 1

Chemical references selected including available data for *in vitro* methods as well as *in vivo* tests (LLNA and human data). The references have been classified according to their potency in LLNA.

Chemical name	CAS number	LLNA EC3 (%)	LLNA category / Potency	Proposed protein-binding mechanism	Human Data	LLNA	DPRA	SENS-IS	h-CLAT	
Oxazolone	15646-46-5	0,003	Extreme	MA / Ac	1	1	1	1	1	
Diphenylcyclopropanone	886-38-4	0,003	Extreme	Ac	1	1	1	1	1	
p-Benzoquinone	106-51-4	0,01	Extreme	MA	1	1	1	1	1	
1,4-Phenylenediamine	106-50-3	0,16	Strong	quinone precursor	1	1	1	1	1	
Phthalic anhydride	85-44-9	0,16	Strong	Ac	0	1	1	1	0	
Propyl gallate	121-79-9	0,32	Strong	quinone precursor	1	1	1	1	1	
2-Amino-phenol	95-55-6	0,4	Strong	quinone precursor	1	1	1	1	1	
Formaldehyde	50-00-0	0,7	Strong	SB	1	1	1	1	1	
Methyltribromo glutaronitrile	35691-65-7	0,9	Strong	S _N 2	1	1	1	1	1	
Glyoxal	107-22-2	1,4	Moderate	SB	1	1	1	1	1	
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	1,7	Moderate	S _N 2	1	1	1	1	1	
Isoeugenol	97-54-1	1,8	Moderate	quinone precursor	1	1	1	1	0	
1,2-Benzisothiazolin-3-one	2634-33-5	2,4	Moderate	S _N 2	1	1	1	1	1	
Cinnamic aldehyde	104-55-2	3,1	Moderate	MA	1	1	1	1	1	
Citral	5392-40-5	5	Moderate	MA	1	1	1	1	1	
Tetramethylthiuram disulfide	137-26-8	5,2	Moderate	S _N 2	1	1	1	1	1	
Diethyl maleate	141-05-9	5,8	Moderate	MA	1	1	1	1	1	
Alpha hexyl cinnamic aldehyde	101-86-0	11	Weak	MA	0	1	0	1	0	
Eugenol	97-53-0	13	Weak	quinone precursor	1	1	1	1	1	
Benzyl benzoate	120-51-4	17	Weak	S _N 2	0	1	0	1	0	
Hydroxycitronellal	107-75-5	23	Weak	SB	1	1	1	1	1	
Butyl glycidil ether	2426-08-6	31	Weak	S _N 2	1	1	1	1	0	
Salicylic acid	69-72-7	>50	None	no alert	0	0	0/1	0	1	
Benzalkonium chloride	8001-54-5	False positive	None	no alert	0	0	0	0	0	
Propyl paraben	94-13-3	>50	None	no alert	0	0	0	0	1	
Sodium laurylsulfate	151-21-3	False positive	None	no alert	0	0	0/1	0	0	
Octanoic acid/caprylic acid	124-07-2	>50	None	no alert	0	0	0	0	1	
1-Butanol	71-36-3	>50	None	no alert	0	0	0	0	0	
Hexyl salicylate	6259-76-3	>50	None	no alert	0	1	0	0	1	
Glycerol	56-81-5	>50	None	no alert	0	0	0	0	0	
Lactic acid	50-21-5	>50	None	no alert	0	0	0	0	0	
Propylene glycol	57-55-6	>50	None	no alert	0	0	0	0	0	
Diethyl phthalate	84-66-2	>50	None	no alert	0	0	0	0	1	
					Sensitizer (S)	19	23	22	22	22
					Not sensitizer (NS)	14	10	11	11	11

* For Salicylic acid and Sodium Lauryl Sulfate, the results were equivocal, so we considered them ultimately as positives.

postulated in the AOP to be covalent binding of electrophilic chemical species with selected nucleophilic molecular sites of action in skin proteins (Gerberick et al., 2008; Karlberg et al., 2008).

The correlation of skin reactivity and skin sensitization is well established (Gerberick et al., 2008; Jordan, 1983; Landsteiner and Jacobs, 1936; Rastogi et al., 1998). Gerberick et al. (Gerberick et al., 2009; Gerberick et al., 2004) have developed a Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for screening the skin sensitization potential of chemicals by measuring peptide depletion following incubation with allergens and non-allergens.

The DPRA was performed according to the OECD TG442C (OECD, 2015a) and describing into the publication of Urbisch et al. (2015). Peptide reactivity data were generated using a method to measure reactivity of a test chemical with model heptapeptides containing lysine (Ac-RFAAKAA-COOH) or cysteine (Ac-RFAACAA-COOH) (Gerberick et al., 2004). Peptide reactivity was reported as percent depletion based on the decrease in non-reacted peptide concentration in the sample relative to the average concentration measured in the control. Peptides were prepared and purified by the SynPep Corporation (Dublin, CA, USA) to > 90% purity as measured by HPLC, and molecular weight confirmation was determined by flow injection positive-ion electrospray mass spectrometry. Briefly, 400 μ L of a 1.25 mM peptide stock solution prepared in buffer and a 100 mM test chemical stock solution prepared in either acetonitrile or DMSO/acetonitrile were added to 100 mM ammonium acetate buffer (pH 10.2) for the lysine peptide or 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) for the cysteine peptide. The final reaction, containing 0.5 mM of the peptide and 5 or 25 mM of the test chemical, representing 1:10 and 1:50 M ratios, was mixed and incubated in the dark for 24 h at 25 °C. Control samples and standards used for defining the calibration curve for each analysis were prepared without test chemical for each peptide and ranged from 0.0156 to 1.0 mM. All samples were prepared in triplicate. Following incubation, the peptide was quantified by reverse-phase HPLC (Waters 2695 Alliance) on a Zorbax SB-C18 column (2.1 * 100 mm, 3.5 μ m) with UV detection at 220 nm (Waters 996 PDA detector) using an external standard linear calibration curve. The UV spectrum was collected from 210 to 400 nm to allow verification of the peptide peak identity. For salicylic acid and sodium lauryl sulfate, the results are equivocal, so we considered these results as positive.

2.3.2. Explorative sensitization prediction test (SENS-IS test) for the Key Event 2

Haptens can also react with cell surface proteins and activate response pathways in keratinocytes (Weltzien et al., 2009). Uptake of the hapten by keratinocytes activates multiple events, including the release of pro-inflammatory cytokines and the induction of cytoprotective cellular pathways. Keratinocyte exposure to sensitizers also results in induction of ARE/RhE-dependent pathways (Natsch and Emter, 2008). Expression of ARE/RhE-dependent genes and other cytoprotective genes (including CYP1A1, MT1 and MT2) in HaCaT cells are part of a proprietary *in vitro* battery approach to determine sensitization potency (McKim et al., 2010).

To address that complexity and this second key event described in the AOP, the SENS-IS model was developed by Immunosearch Company to assess the potential of the test products to specifically induce the expression of irritation and/or sensitization biomarkers in an *in vitro* 3D skin model. Immunosearch developed this assay after analyzing genes modulated during the sensitization process either on mice (LLNA) or human (blisters). The panel of sensitization biomarkers defined includes genes already identified as markers, such as the ARE family, and others not yet associated with the sensitization process (called SENS-IS gene subset).

The SENS-IS is based on the overexpression analysis of three sets of genes (62 genes) defined by Cottrez et al. (2015), one specifically reflecting the irritant potential (IRR genes) and the other two set of genes (ARE and SENS-IS genes) correlating with the sensitization

potential. ARE genes control the expression of proteins critical in the detoxification and elimination of Reactive Oxygen Species (ROS) and electrophiles (Nguyen et al., 2009). The SENS-IS assay was submitted to ECVAM in September 2011 and was enrolled in the OECD guideline work in 2015. SENS-IS expose 3D epidermal skin tissues addressing substance activation by keratinocytes as well as the cytotoxicity of a substance. This assay was primarily developed for simple ingredients and has been tested and validated with around 180 chemicals (100 from phase II, + 30 RIFM + 50 Phase III). Furthermore, its prediction model gives a quantitative response (potency) for ingredient that correlate to the LLNA. EpiSkin® tissues (L'Oréal, France) are exposed with the test substances using the protocol to determine *in vitro* skin irritation described in OECD TG439 (OECD, 2015b). Chemical references were used diluted in PBS, Olive oil or DMSO, at the concentrations of 50% to 0.1% depends on the LLNA category. 30 μ L (26.3 μ L/cm²) of each dilution was applied on the top of each reconstituted epidermis. The test product was gently spread on the epidermis surfaces to ensure it covers the entire surface. After 15 min exposure, the EpiSkin® were rinsed with PBS. Epidermis were then incubated at 37 °C for 6 h and then samples were harvested and frozen in liquid nitrogen before tissue lysing and RNA extraction. The complete epidermis was collected, placed in a RNazol® solution and the total RNA was isolated. After reverse transcription, quantitative gene expression was measured by RT-PCR with a SYBR green buffer using the LC480 Roche's apparatus and specific biomarkers primers defined for the SENS-IS test. Three negative controls (PBS, Olive oil and DMSO treated skins), a positive irritation control (5% SLS) and two positive sensitization controls (Hexylcinnamaldehyde (HCA) at 50% in Olive oil and TNBS at 1% in PBS) were performed.

A test substance is considered to be sensitizer if it increases the expression (compared to the solvent control) of at least 7 genes measured by qPCR in either the “SENS-IS” (7/21) or the “ARE” (7/17) gene sets. To take into account non-specific gene over-expression due to cell stress, the induction of > 15 genes (on 23) in the irritation gene set, classifies a result as inconclusive and the test substance is re-analyzed at a lower concentration. Similarly to the LLNA, potency is classified according to the concentration of test material needed to induce a positive response: positive at 0.1%: extreme; positive at 1%: strong; positive at 10%: moderate; positive at 50%: weak. SENS-IS is considered to mainly address KE2 from the AOP of skin sensitization, but may, as ARE-activated genes are included, also provide information on protein reactivity of a test chemical. Furthermore, up to today, product safety evaluation in the EU is predominantly based on data/information on their individual ingredients. However, for skin sensitization, mixture component effects have been demonstrated in numerous studies either by the presence of irritating chemicals or by the modification of dermal absorption. SENS-IS assay has evaluate the ability of mixture component effects on the potency of skin sensitization of chemicals and seems to be efficient to measure the component effects and assess mixtures or final products. Influence of formulations (oil-in-water, emulsion, cleansing water, oil, water-in-oil emulsion) and state of the skin (irritated or not) on the sensitizing potential of some components has been measured (Cottrez et al., 2016a). SENS-IS assay could be used in a near future to test complex mixtures and final products.

2.3.3. Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for the Key Event 3

As noted in the AOP during allergen contact with the skin, immature epidermal DCs (known as Langerhans cells and dermal DCs) serve as antigen-presenting cells (Kimber et al., 2011; Ryan et al., 2007). In this role, they recognize and internalize the hapten-protein complex formed during covalent binding. Subsequently, the DC loses its ability to seize new hapten-protein complex and gains the potential to display the allergen-MHC-complex to naive T-cells; this process is often referred to as DC maturation. The h-CLAT test is an *in vitro* method measuring by flow cytometry the expression of CD86 and CD54 protein markers on

the cell surface of the human monocytic leukemia cell line THP-1 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) used as a surrogate for human DC (Ashikaga et al., 2010; Ashikaga et al., 2006; Sakaguchi et al., 2010; Sakaguchi et al., 2009; Sakaguchi et al., 2006). The h-CLAT has been validated by ECVAM and OECD (Aeby et al., 2010; European Commission, 2015; OECD, 2016c).

For dose finding, cytotoxicity tests were conducted and the concentration resulting in 75% cell viability, termed CV75, was calculated based on the analysis of viable cells. THP-1 cells were treated with eight different concentrations, decided based on dose finding cytotoxicity test, for 24 h. After removing the test substance, the expression of CD86 and CD54 on the cell surface was measured by flow cytometry. The Relative Fluorescence Intensity (RFI) was used as an indicator of CD86 and CD54 expression. If the RFI of CD86 or CD54 was > 150% or 200% at any dose in at least two out of three experiments, the substance was judged as a sensitizer. Otherwise, it was considered a non-sensitizer (Ashikaga et al., 2006).

The Relative Fluorescence Intensity (RFI) is used as an indicator of CD86 and CD54 expression. RFI is calculated using the following formula:

$$\text{RFI} = \text{MFI of test item-treated cells} - \text{MFI of test item-treated isotope control cells}$$

$$\text{MFI of vehicle control cells} - \text{MFI of vehicle isotope control cells}$$

2.4. In vivo study and human data

The predictivities of the non-animal test methods listed previously were compared to LLNA and human data.

2.4.1. Guinea pig assays and local lymph node assay (LLNA)

In the regulatory context, the skin sensitization potential of a chemical has traditionally been evaluated using animal tests, in particular the guinea pig based tests (GPTs) including guinea pig maximization test (GPMT) and Buehler test described in OECD TG406 (OECD, 1992) or the mouse-based local lymph node assay (LLNA) described in OECD TG429 (OECD, 2010a) (or OECD TG442 A + B (OECD, 2010b, 2010c)). In the GPMT, guinea pigs are exposed to the test substance by intradermal injection and topical application by occlusion. Following a rest period of ten to fourteen days, the challenge dose is introduced dermally. The extent and degree of skin reactions to this challenge exposure are then compared with control animals. In the Buehler test, guinea pigs are repeatedly exposed to the test substance by topical application under occlusion. Following a rest period of twelve days, a dermal challenge treatment is performed under occlusive conditions. The LLNA is the gold standard regulatory toxicology test for skin sensitization along with GPMT. Compared with the GPMT, LLNA uses fewer animals, it is quantitative, and it gives a numerical prediction of potency. In the LLNA, the test substance is applied to the ears of mice for three days and later tritiated radioactive thymidine is introduced to measure cell proliferation in auricular lymph nodes. An increase in lymph node cell proliferation compared to control animals indicates sensitization.

In the main study, a minimum of four animals per dose group is recommended. Test substance treatment dose levels were based on the recommendations given by Kimber and Basketter (1992) and in the ICCVAM Panel Report (ICCVAM, 1999). Dose levels selected from the concentration series 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5%, etc. The maximum concentration tested should be the highest achievable level while avoiding excessive local irritation and overt systemic toxicity.

The LLNA experimental procedure is performed as follows:

In the main study, groups of 4 or 5 mice were treated by topical applications of 25 μL test or control solutions to the entire dorsal surface of each ear. The topical applications were performed once daily

over three consecutive days. In each study, a positive control was included. The negative control group was treated with the vehicle alone. On day 6, record the weight of each mouse and inject 250 μL of sterile phosphate-buffered saline (PBS) containing 20 μCi of (^3H)-methyl thymidine or 250 μL PBS containing 2 μCi of (^{125}I)-iododeoxyuridine (^{125}IU) and 10^{-5} M fluorodeoxyuridine into each mouse via the tail vein (Kimber, 1995; Loveless et al., 1996). Five hours later, each mouse is euthanized and the draining (“auricular”) lymph nodes of both ears are collected and placed in PBS (one container per mouse). Both bilateral draining lymph nodes must be collected in PBS and individually pooled for each animal. Following further processing steps, the incorporation of ^3H -methyl thymidine into the lymph nodes was measured in a scintillation counter and expressed as the number of disintegrations per minute (DPM). The proliferative response of lymph node cells was expressed as the number of radioactive disintegrations per minute per lymph node (i.e., DPM/lymph node). For each dose group, the stimulation index (SI) was calculated as the ratio of the arithmetic mean DPM/lymph node values (corrected for background) of the test and negative control groups. The EC3 value (theoretical concentration resulting in a SI value of 3) was determined by linear interpolation of points on the dose-response curve, immediately above and below the 3-fold threshold.

2.4.2. Human data/clinical sensitization exposure

Human data were available for all 33 substances selected; we retained only the column that shown the final classification of human data mainly issued of Urbisch et al. (2015) board (“1” indicates positive test results and “0” for negative test results).

2.5. Cooper statistics to compare in vitro assays as stand-alone or in combination

The Cooper statistics of predictivity were calculated for the single assays and their combinations as well as for the “2 out of 3” prediction model (Cooper et al., 1979). All parameters are based on a 2×2 contingency table counting the number of compounds that are “true positive” (TP), “false positive” (FP), “true negative” (TN) and “false negative” (FN):

$$\text{Sensitivity}[\%] = (\text{TP}/(\text{TP} + \text{FN})) \times 100 \text{ \& Specificity}[\%] = (\text{TN}/(\text{TN} + \text{FP})) \times 100$$

$$\text{Positive predictive value}[\%] = (\text{TP}/(\text{TP} + \text{FP})) \times 100$$

$$\text{Negative predictive value}[\%] = (\text{TN}/(\text{TN} + \text{FN})) \times 100$$

$$\text{Accuracy}[\%] = ((\text{TP} + \text{TN})/(\text{TP} + \text{FP} + \text{TN} + \text{FN})) \times 100$$

3. Results

3.1. Comparison of single assays compared to LLNA and human data

After attributing a positive (“1”) or negative (“0”) results to each chemical reference (Table 1) in each alternative method as well as LLNA and human data as described in Mat & Med, we compared results of single assays in terms of sensitivity, specificity and accuracy using Cooper statistics.

To determine the performance of the LLNA to predict skin sensitization hazard of this data set, LLNA data were directly compared to the available human data for all substances. A total of 4 (12%) of the substances (phthalic anhydride, alpha hexyl cinnamic aldehyde, benzyl benzoate and hexyl salicylate) were incorrectly identified as FP by the LLNA. In total, comparison to human data revealed a sensitivity of 100%, a specificity of 71% and an overall accuracy of 88% of the LLNA (Table 3).

For salicylic acid and sodium lauryl sulfate, the results were

Table 2
Number attribution system for combination of different *in vitro* methods and for our prediction model (DPRA, h-CLAT and SENS-IS).

Chemical name	LLNA EC3 (%)	LLNA category / potency	Use	Proposed protein-binding mechanism	Human Data	LLNA	DPRA	SENS-IS	h-CLAT	DPRA and hCLAT	DPRA and SENS-IS	h-CLAT and SENS-IS	DPRA, h-CLAT and SENS-IS
Oxazolone	0.003	Extreme	Other	MA/Ac	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Diphenylcyclopropenone	0.003	Extreme	pharmaceutical use	Ac	1	1	1	1	1	1	1	1	1
p-Benzoquinone	0.01	Extreme	pharmaceutical use	MA	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,4-Phenylenediamine	0.16	Strong	dye (production)	quinone precursor	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Phthalic anhydride	0.16	Strong	dye (production)	Ac	0	1	1	1	0	0/1	1	0/1	1
Propyl gallate	0.32	Strong	preservative/disinfectant	quinone precursor	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-Amino-phenol	0.4	Strong	cosmetics (other use)	quinone precursor	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Formaldehyde	0.7	Strong	preservative/disinfectant	SB	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Methyldibromo glutaronitrile	0.9	Strong	preservative/disinfectant	S _N -2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Glyoxal	1.4	Moderate	Other	SB	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-Mercaptobenzothiazole	1.7	Moderate	pesticide	S _N -2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Isocugenol	1.8	Moderate	fragrance	quinone precursor	1	1	1	1	0	0/1	1	0/1	1
1,2-Benzisothiazolin-3-one	2.4	Moderate	preservative/disinfectant	S _N -2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cinnamic aldehyde	3.1	Moderate	fragrance	MA	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Citral	5	Moderate	fragrance	MA	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tetramethylthiuram disulfide	5.2	Moderate	pesticide	S _N -2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Diethyl malate	5.8	Moderate	Other	MA	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Alpha hexyl cinnamic aldehyde	11	Weak	fragrance	MA	0	1	0	1	0	0	0/1	0/1	0
Eugenol	13	Weak	fragrance	quinone precursor	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Benzyl benzoate	17	Weak	preservative/disinfectant	S _N -2	0	1	0	1	0	0	0/1	0/1	0
Hydroxycitronellal	23	Weak	fragrance	SB	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Buyl glycidyl ether	31	Weak	Other	S _N -2	1	1	1	1	0	0/1	1	0/1	1
Salicylic acid	>50	None	preservative/disinfectant	no alert	0	0	0/1	0	1	1	0	0	0
Benzalkonium chloride	False positive	None	preservative/disinfectant	no alert	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Propyl paraben	>50	None	preservative/disinfectant	no alert	0	0	0	0	1	0/1	0	0/1	0
Sodium lauryl sulfate	False positive	None	surfactant	no alert	0	0	0/1	0	0	0/1	0/1	0	0
Octanoic acid/caprylic acid	>50	None	dye (production)	no alert	0	0	0	0	1	0/1	0	0/1	0
1-Butanol	>50	None	solvent	no alert	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hexyl salicylate	>50	None	fragrance	no alert	0	1	0	0	1	0/1	0	0/1	0
Glycerol	>50	None	cosmetics (other use)	no alert	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lactic acid	>50	None	preservative/disinfectant	no alert	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Propylene glycol	>50	None	solvent	no alert	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diethyl phthalate	>50	None	Other	no alert	0	0	0	0	1	0/1	0	0/1	0
Sensitizer (S)					19	23	22	22	22	26	24	27	21
Not-sensitizer (NS)					14	10	11	11	11	7	9	6	12

TP	True positive
FP	False positive
FN	False negative
TN	True negative

equivocal in DPRA, so we considered them finally as positive to get into the worst-case approach.

When calculating the Cooper statistics, the assessments were reduced to Yes/No (“1”/“0”) ratings according to the prediction models of the individual assays. Using the data, a direct comparison between the predictivities of the non-animal test methods and human is possible (Table 3). Accuracies of the single assays compared to LLNA data range from 79 to 91% for these 33 chemicals. Interestingly, when comparing the positive predictive values of almost all single non-animal test methods with human data, the percentages were generally higher than comparison with LLNA data (except for h-CLAT in that case).

3.2. Comparison of combination assays compared to LLNA and human data

We have performed an attribution number system combining two *in vitro* methods among those selected, as shown in Table 2. To attribute the final number, we have classified the chemicals as a sensitizer or “1” when for the both tests the score is 1, non-sensitizer or “0” when a score is 0 for both tests. For ambiguous result, positive in one test and negative in another one, we have classified as an equivocal result or “0/1”. To realize Cooper statistics, we considered them finally as positive to get into the worst-case. Using all the data from Table 2, a direct comparison between the predictivities of the non-animal test methods and human and LLNA data has been possible thanks to Cooper statistics (Table 3). Thus, in combining two alternatives methods, we didn't obtain better result than with LLNA. Nevertheless, the best two *in vitro* methods combination seems to be DPRA and SENS-IS compared to the two others, DPRA and h-CLAT, and h-CLAT and SENS-IS.

3.3. “2 out of 3” prediction model and order to carried out the testing sequence.

We realized the same process to combine our three selected *in vitro* methods (Table 2). The least complicated way to assess the skin sensitization hazard potential of a substance is to use the results of single assays which reflect key steps of the AOP within a “2 out of 3” prediction model. For the assays addressing the three KE described in the OECD AOP on skin sensitization mentioned above (OECD, 2012), a “2 out of 3” assessment was introduced for the first time by Bauch et al. (2012). In our study, this prediction model was applied using DPRA, SENS-IS and h-CLAT data. We realized the previous attribution number system combining these three *in vitro* methods, shown in Table 2. Any two congruent results of the three tests rule the overall assessment: If at least two of the three assays were positive, the substance was rated to be a skin sensitizer (“1”). If at least two of the three assays were negative, the substance was rated to be a non-sensitizer (“0”). The classification as a sensitizer or non-sensitizer is therefore based on a WoE pertaining to key events of the AOP. Cooper statistics for our final prediction model were determined in comparison to human data (and benchmarked to the previous gold standard test, the LLNA). Results for 33 substances, respectively, were obtained using this prediction model in Table 3.

Our prediction model, DPRA, SENS-IS and h-CLAT, provides some-

what higher accuracies compared to the predictivities of the single assays, whereby the accuracies compared to human or LLNA data were 94% or 88%, respectively. These results indicate that the investigated non-animal methods generally predict human data more accurately than LLNA data. To determine the performance of the LLNA to predict skin sensitization hazard of this data set, LLNA data were directly compared to the available human data. For comparison, our prediction model revealed a sensitivity of 100%, a specificity of 86% and an overall accuracy of 94% for the same set of substances suggesting predictions to be more relevant for humans. The analysis shows that combination of two *in vitro* methods is not enough to obtain better predictivity than LLNA (Fig. 2). Finally, the results indicate that the investigated non-animal methods generally predict human data more accurately than LLNA data.

After determine our prediction model in a “2 out of 3” strategy in order to predict better human sensitization than LLNA, we wondered whether these three tests should be performed at the same time or sequentially. According to the Fig. 2, three different “2 out of 3” strategy are conceivable. With the first strategy, DPRA and SENS-IS combined, we are able to classify 29 out of 33 chemicals and for 4 others, the h-CLAT test is added to draw a conclusion from the WoE. For the second strategy, combining DPRA and h-CLAT, we can classify 25 out of 33 chemicals and for 8 others, the SENS-IS test is added to draw conclusion from the WoE. Within the third strategy, SENS-IS and h-CLAT combined, we can classify for fewer chemicals, 23 out of 33, and for 10 others, the DPRA is added to draw a conclusion from the WoE. Finally, the first strategy permits us to classify a larger number of molecules, associating fewer tests than the two other strategies.

It is interesting to note that the number of tests performed is increased by +5% and +8% respectively with strategies 2 and 3 compared to the first. So, the strategy 1 appears to be the best one.

4. Discussion

4.1. Discordant results between LLNA and human data

The arbitrary assignment of “1” to equivocal results in LLNA and human data could be questionable because that triggers false results and particularly a final positive result. Regarding the difference between human data and LLNA results obtained, we can discuss as follows for the 4 molecules, phthalic anhydride, α -hexyl cinnamic aldehyde, benzyl benzoate and hexyl salicylate.

For example in Table 1, phthalic anhydride is positive in DPRA and SENS-IS (classified as a strong sensitizer). Moreover, phthalic anhydride is classified in the Annex VI of CLP as a sensitizer (H317) because positive in LLNA but it appears negative in humans (Urbisch et al., 2015). According to Urbisch et al. (2015), phthalic anhydride is known to be a respiratory sensitizer, but not a skin sensitizer (Dearman et al., 2013). Phthalic anhydride led to complete peptide depletion and adduct formation at Lys-residues of the peptide, due to its amine reactive function (Natsch et al., 2015). Phthalic anhydride appears negative in human population, but it is considered a sensitizer on specific workers exposed daily to this molecule. Their sensitivity was confirmed by

Table 3
Cooper statistics results for single assays as well as their combination compared to human data.

«Compared to human»			Positive predictive value	Negative predictive value	Sensitivity	Specificity	Accuracy
<i>In vitro</i> assays	Individual assays	DPRA	86	100	100	79	91
		h-CLAT	77	82	89	64	79
		SENS-IS	86	100	100	79	91
	Combinations	DPRA and h-CLAT	73	100	100	50	79
		DPRA and SENS-IS	79	100	100	64	85
		hCLAT and SENS-IS	70	100	100	43	76
	Prediction model	DPRA, h-CLAT and SENS-IS	90	100	100	86	94
	<i>In vivo</i> standard	LLNA	83	100	100	71	88

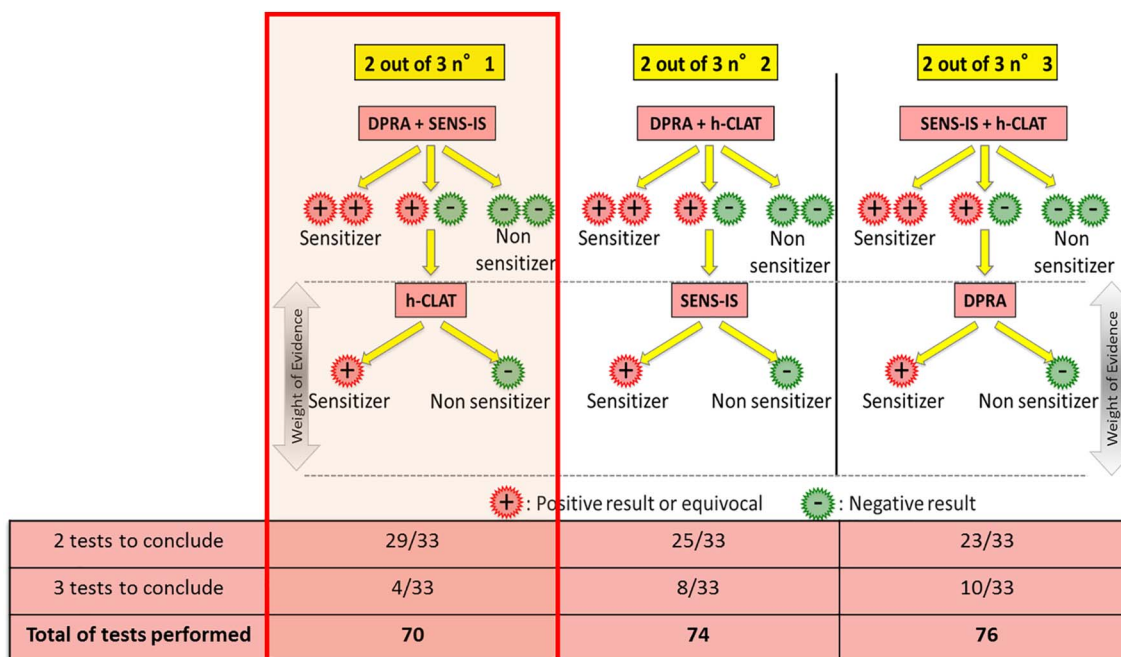


Fig. 2. Different «2 out of 3» strategies and preferential sequence selected.

direct bronchial tests, positive prick tests and positive RAST (Newcombe, 1992).

For α -hexyl cinnamic aldehyde, Urbisch et al. (2015) discuss the final inconclusive human data but we gave a final negative result in humans according to the RIFM database and Basketter et al. (2014). For benzyl benzoate, it is probably not or only a weak sensitizer in humans (Basketter et al., 2014) (class 5 of potency) with no evidence of induction in HRIPT at 59000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Finally, concerning the hexyl salicylate, we observed no induction in HRIPT at 35433 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and in HMT (Human Maximization Test) at 20654 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Therefore, the very low EC3 (0.18%) may be due to its irritating properties (possibly sensitizing impurities).

4.2. Misclassified substances and applicability domain in single assays

Concerning equivocal results obtained in stand-alone assays in Table 1, two molecules, salicylic acid and sodium lauryl sulfate, had inconclusive results.

Salicylic acid appears positive (96.5% Cysteine/78.9% Lysine) in DPRA of Natsch et al. (2013) and negative (91.3% Cys/99% Lys) in Bauch et al. (2012). Similarly, sodium lauryl sulfate (SLS) appears negative (100% Cys/100% Lys) in DPRA of Natsch et al. (2013) and positive (100% Cys/2.9% Lys) in Bauch et al. (2012).

According to Gerberick et al. (2007), salicylic acid co-eluted with lysine peptide, indicating that it could not be evaluated using DPRA. However, salicylic acid could be easily separated from NAL using ADRA (Amino acid Derivative Reactivity Assay), and its depletion could hence be determined (Fujita et al., 2014). Finally, in case of an inconclusive result, we assumed a worst-case scenario by assigning “1” for individual method, without taking into account the applicability domain or the physical-properties of the test item.

The discussion of false predictions provided by the single non-animal test methods would be beyond the scope of this study. Hence, the analysis was restricted to the detailed investigation of false positive and false negative predictions by the “2 out of 3” approach, when compared to LLNA and human data.

4.3. Integrated Testing Strategy results

The “sensitization testing strategy” is an approach, which incorporates the latest validated (or under validation) methods. The safety assessor evaluating or analyzing simple cosmetic ingredients can apply it. Before defining its ITS, it is important to have an understanding on each test selected and especially to know their respective applicability domain as well as the strategy to follow. Various strategies are presently proposed (van der Veen et al., 2014a). The outcome of the approach suggested here meets the requirements of the EU Cosmetics Regulation by providing a sensitization profile, which covers all available sensitization endpoints, required to make a safety decision. In addition, this approach, to an extent, overcomes the challenges of the animal testing ban. Finally, this approach was confirmed by previous *in vivo* tests and human data. In order to facilitate acceptance of *in vitro* sensitization methods by regulatory committees, results of the single test methods as well as simple “2 out of 3” ITS have been compiled and qualitatively compared to both animal and human data. The sensitizing potential of the chemical reference was investigated in three explorative *in vitro* tests, DPRA, SENS-IS and h-CLAT validated or under validation by OECD (OECD, 2016c; 2015a) or ECVAM (under submission and external validation study). These three methods covered three out of four KEs defined by AOP for skin sensitization (OECD, 2012). Unfortunately, despite a good correlation between the proposed ITS and the results obtained by LLNA and human data, it is presently not yet approved to draw conclusions on potency by using only *in vitro* methods (Bauch et al., 2011). Regarding the results obtained from this prediction model, we achieved a good correlation between our final prediction and human data for 31 chemicals, except for phthalic anhydride and salicylic acid. As explained above, phthalic anhydride is known to be a respiratory allergen and supposed to be a cutaneous sensitizer in some specific populations. Regarding salicylic acid, its inconclusive result comes from the co-elution obtained with the lysine peptide, whereas it is a non-sensitizer in humans. In h-CLAT, salicylic acid was false negative in all labs because it is not stable in water and falls out of the applicability domain. Due to the attribution of “1” in inconclusive results into the DPRA and the false positive result in h-CLAT, salicylic acid has been misclassified in our prediction model. However, despite the results, this attribution number system allows us to reach a better

positive predictive value of our model than the LLNA, and at the same time to be more conservative.

Moreover, the major limitation of the methods presented is that they no longer permit the use of Quantitative Risk Assessment (QRA) approaches, as was done previously with available LLNA EC3 values. The EC3 value allows the safety assessor to carry out risk quantification, which was essential for the safety evaluation and risk assessment. With the ban on animal testing, we must therefore devise a new strategy to manage the use of skin sensitizing chemicals as effective as the QRA approach to define several potency classes. Unfortunately, unlike the LLNA and associated QRA process, all *in vitro* models currently developed allow only the prediction of hazard without a clear notion of potency.

Concerning our strategy, it should be noticed that this approach seems interesting for simple molecules but difficult to implement for mixtures (e.g. perfumes, essential oils and plant extracts). Indeed, although this seems applicable with the SENS-IS (Cottrez et al., 2016a), this goes beyond the scope of applicability domain for DPRA and h-CLAT. Moreover, preliminary results (data not shown) indicate that this prediction model does not appear to be applicable to mixtures.

Finally, different strategies were proposed in the literature, such as other ITS using the “2 out of 3” prediction model (Urbisch et al., 2015). For example, Bauch et al. (2012) proposed a strategy using DPRA, LuSens and mMUSST. An overall accuracy of 83% and 94% compared to LLNA or human data, respectively, was achieved. Natsch et al. (2013) used the DPRA, Keratino-Sens™ and MUSST in their “2 out of 3” prediction model and reported a similar accuracy for 145 substances (81% compared to LLNA). In the model proposed by Urbisch et al. (2015), the results of the DPRA, KeratinoSens™ and h-CLAT were used for applying this prediction model. All three of these “2 out of 3” prediction models provide very similar accuracy levels as high as those of our prediction model. These “2 out of 3” prediction models revealed a higher accuracy rate when compared to human data for the same set of substances. This indicates that the “2 out of 3” predictions might be more relevant for humans than the LLNA predictions.

However, some specific substances like pre/pro-haptens or molecules with specific physical-properties (e.g. physical state, stability, interference with the detection system) may be misclassified in some *in vitro* models. The major interest of our proposed strategy consists in integrating a 3-D reconstructed epidermal model (SENS-IS) in which solubility problems or technical limitations can be avoided.

5. Conclusion

Our original goal was to develop an ITS based on three *in vitro* methods that cover the main key events of the AOP for skin sensitization. Our prediction model seems to have a high accuracy rate of hazard prediction for human data compared to LLNA.

The interest of this approach is that it integrates a reconstructed human skin model (SENS-IS) avoiding some specific limitations (solubility, substances with high cytotoxicity or some pro/pre haptens) which may be limited in others methods. Finally, it seems interesting to carry out this prediction model sequentially: firstly, DPRA and SENS-IS; and in case of an ambiguous result, a third test, the h-CLAT, must be realized in order to draw a conclusion due to the WoE. Our prediction model could be used as an ITS, allowing the safety assessor to meet the EU Cosmetics Regulation requirements and to overcome the challenges raised by the animal testing ban in terms of skin sensitization.

Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.05.014> associated with this article can be found, in online version.

References

- Ade, N., Martinuzzi-Teissier, S., Pallardy, M., Rousset, F., 2006. Activation of U937 cells by contact sensitizers: CD86 expression is independent of apoptosis. *J. Immunotoxicol.* 3, 189–197. <http://dx.doi.org/10.1080/15476910600978038>.
- Adler, S., Basketter, D., Creton, S., Pelkonen, O., Van Benthem, J., Zuang, V., Andersen, K.E., Angers-Loustau, A., Aptula, A., Bal-Price, A., Benfenati, E., Bernauer, U., Bessems, J., Bois, F.Y., Boobis, A., Brandon, E., Bremer, S., Broschard, T., Casati, S., Cioecka, S., Corvi, R., Cronin, M., Daston, G., Dekant, W., Felner, S., Grignard, E., Gundert-Remy, U., Heinonen, T., Kimber, I., Kleinjans, J., Komulainen, H., Kreiling, R., Kreyza, J., Leite, S.B., Loizou, G., Maxwell, G., Mazzatorta, P., Munn, S., Pfueller, S., Phrakonkham, P., Piersma, A., Poth, A., Prieto, P., Repetto, G., Rogiers, V., Schoeters, G., Schwarz, M., Serafimova, R., Tähti, H., Testai, E., Van Delft, J., Van Loveren, H., Vinken, M., Worth, A., Zaldivar, J.M., 2011. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Arch. Toxicol.* 85, 367–485. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-011-0693-2>.
- Aeby, P., Ashikaga, T., Bessou-Touya, S., Schepky, A., Gerberick, F., Kern, P., Marrec-Fairley, M., Maxwell, G., Ovigne, J.M., Sakaguchi, H., Reisinger, K., Tailhardat, M., Martinuzzi-Teissier, S., Winkler, P., 2010. Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa's research and method development program. *Toxicol. in Vitro* 24, 1465–1473. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2010.07.005>.
- Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J., 2015. Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol. in Vitro* 30, 373–382. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2015.09.028>.
- Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., Toyoda, H., 2006. Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: the human cell line activation test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. in Vitro* 20, 767–773. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2005.10.012>.
- Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N., Itagaki, H., 2010. 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* 38, 275–284.
- Basketter, D.A., Andersen, K.E., Liden, C., Van Loveren, H., Boman, A., Kimber, I., Alanko, K., Berggren, E., 2005. Evaluation of the skin sensitizing potency of chemicals by using the existing methods and considerations of relevance for elicitation. *Contact Dermatitis* 52, 39–43. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-1873.2005.00490.x>.
- Basketter, D.A., Alepee, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Gilmour, N., Goebel, C., Hibatallah, J., Hoffmann, S., Kern, P., Martinuzzi-Teissier, S., Maxwell, G., Reisinger, K., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., 2014. Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatol.* 25, 11–21. (contact, atopic, Occup. drug). <http://dx.doi.org/10.1097/DER.0000000000000003>.
- Bauch, C., Kolle, S.N., Fabian, E., Pachel, C., Ramirez, T., Wiench, B., Wruck, C.J., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R., 2011. Intralaboratory validation of four *in vitro* assays for the prediction of the skin sensitizing potential of chemicals. *Toxicol. in Vitro* 25, 1162–1168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.030>.
- Bauch, C., Kolle, S.N., Ramirez, T., Eltze, T., Fabian, E., Mehling, A., Teubner, W., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R., 2012. Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 489–504. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.05.013>.
- Bruckner, A.L., Weston, W.L., Morelli, J.G., 2000. Does sensitization to contact allergens begin in infancy? *Pediatrics* 105, e3.
- Cooper 2nd, J.A., Saracci, R., Cole, P., 1979. Describing the validity of carcinogen screening tests. *Br. J. Cancer* 39, 87–89.
- Cottrez, F., Boitel, E., Auriault, C., Aeby, P., Groux, H., 2015. Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model. Development of the SENS-IS assay. *Toxicol. in Vitro* 29, 787–802. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2015.02.012>.
- Cottrez, F., Boitel, E., Dalhuchyts, H., Bidan, C., Rattier, S., Ferret, P., Groux, H., 2016a. *In Vitro* Skin Sensitization Analysis of Mixtures: Results Using the SENS-IS Assay.
- Cottrez, F., Boitel, E., Ourlin, J.C., Peiffer, J.L., Fabre, I., Henaoui, I.S., Mari, B., Vallauri, A., Paquet, A., Barbry, P., Auriault, C., Aeby, P., Groux, H., 2016b. SENS-IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: reproducibility and predictivity results from an inter-laboratory study. *Toxicol. in Vitro* 32, 248–260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.01.007>.
- Dearman, R.J., Basketter, D.A., Kimber, I., 2013. Inter-relationships between different classes of chemical allergens. *J. Appl. Toxicol.* 33, 558–565. <http://dx.doi.org/10.1002/jat.1758>.
- EUR-ECVAM, 2016. EURL ECVAM status report on the development. In: Validation and Regulatory Acceptance of Alternative Methods and Approaches, <http://dx.doi.org/10.2788/86047>.
- European Chemicals Agency, 2016. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. In: Chapter R7a: Endpoint Specific Guidance. European Chemicals Agency. <http://dx.doi.org/10.2823/2611>.
- European Commission, 2015. EURL ECVAM Recommendation on the Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitisation Testing. <http://dx.doi.org/10.2788/29986>.
- European Parliament, 2016. Consolidated version of the REACH Regulation. Commission Regulation (EU) 2016/1688 of 20 September 2016 Amending Annex VII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Res.
- European Union, 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the

- Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Off. J. Eur. Union 33–79 (doi: 32010L0063).
- Ezendam, J., Braakhuis, H.M., Vandebriel, R.J., 2016. State of the art in non-animal approaches for skin sensitization testing: from individual test methods towards testing strategies. Arch. Toxicol. 90, 2861–2883. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-016-1842-4>.
- Fujita, M., Yamamoto, Y., Tahara, H., Kasahara, T., Jimbo, Y., Hioki, T., 2014. Development of a prediction method for skin sensitization using novel cysteine and lysine derivatives. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 70, 94–105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2014.06.001>.
- Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Bailey, R.E., Chaney, J.G., Morrall, S.W., Lepoittevin, J.-P., 2004. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicol. Sci. 81, 332–343. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfh213>.
- Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Foertsch, L.M., Price, B.B., Chaney, J.G., Lepoittevin, J.-P., 2007. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. Toxicol. Sci. 97, 417–427. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfm064>.
- Gerberick, F., Aleksic, M., Basketter, D., Casati, S., Karlberg, A.-T., Kern, P., Kimber, I., Lepoittevin, J.P., Natsch, A., Ovigne, J.M., Rovida, C., Sakaguchi, H., Schultz, T., 2008. Chemical reactivity measurement and the predictive identification of skin sensitizers. The report and recommendations of ECVAM Workshop 64. Altern. Lab. Anim 36, 215–242.
- Gerberick, G.F., Troutman, J.A., Foertsch, L.M., Vassallo, J.D., Quijano, M., Dobson, R.L.M., Goebel, C., Lepoittevin, J.-P., 2009. Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxidase oxidation system. Toxicol. Sci. 112, 164–174. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfp192>.
- Griem, P., Goebel, C., Scheffler, H., 2003. Proposal for a risk assessment methodology for skin sensitization based on sensitization potency data. Regul. Toxicol. Pharmacol. 38, 269–290.
- ICCVAM, 1999. The murine Local Lymph Node Assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis for potential of chemicals/compounds. In: The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494. (February).
- Jaworska, J., Dancik, Y., Kern, P., Gerberick, F., Natsch, A., 2013. Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J. Appl. Toxicol. <http://dx.doi.org/10.1002/jat.2869>.
- Jaworska, J.S., Natsch, A., Ryan, C., Strickland, J., Ashikaga, T., Miyazawa, M., 2015. Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative Weight of Evidence and adaptive testing strategy. Arch. Toxicol. 89, 2355–2383. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-015-1634-2>.
- Jordan, W.P., 1983. Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. J. Am. Acad. Dermatol. 8, 575. [http://dx.doi.org/10.1016/S0190-9622\(83\)80070-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0190-9622(83)80070-X).
- Karlberg, A.-T., Bergstrom, M.A., Borje, A., Luthman, K., Nilsson, J.L.G., 2008. Allergic contact dermatitis—formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers. Chem. Res. Toxicol. 21, 53–69. <http://dx.doi.org/10.1021/tx7002239>.
- Kimber, I., 1995. Contact and respiratory sensitization by chemical allergens: uneasy relationships. Am. J. Contact Dermat. 6, 34–39. [http://dx.doi.org/10.1016/1046-199X\(95\)90068-3](http://dx.doi.org/10.1016/1046-199X(95)90068-3).
- Kimber, I., Basketter, D.A., 1992. The murine local lymph node assay: a commentary on collaborative studies and new directions. Food Chem. Toxicol. 30, 165–169. [http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915\(92\)90153-C](http://dx.doi.org/10.1016/0278-6915(92)90153-C).
- Kimber, I., Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Dearman, R.J., 2011. Chemical allergy: translating biology into hazard characterization. Toxicol. Sci. 120 (Suppl), S238–S268. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfq346>.
- Landsteiner, K., Jacobs, J., 1936. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. II. J. Exp. Med. 64, 625–639.
- Loveless, S.E., Ladies, G.S., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Scholes, E.W., House, R.V., Hilton, J., Dearman, R.J., Kimber, I., 1996. Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. Toxicology 108, 141–152. [http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X\(95\)03279-0](http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X(95)03279-0).
- MacKay, C., Davies, M., Summerfield, V., Maxwell, G., 2013. From pathways to people: applying the adverse outcome pathway (AOP) for skin sensitization to risk assessment. ALTEX 30, 473–486.
- Martin, S.F., Esser, P.R., Weber, F.C., Jakob, T., Freudenberg, M.A., Schmidt, M., Goebeler, M., 2011. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. Allergy 66, 1152–1163. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02652.x>.
- McKim, J.M.J., Keller 3rd, D.J., Gorski, J.R., 2010. A new in vitro method for identifying chemical sensitizers combining peptide binding with ARE/EpRE-mediated gene expression in human skin cells. Cutan. Ocul. Toxicol. 29, 171–192. <http://dx.doi.org/10.3109/15569527.2010.483869>.
- McKim, J.M.J., Keller 3rd, D.J., Gorski, J.R., 2012. An in vitro method for detecting chemical sensitization using human reconstructed skin models and its applicability to cosmetic, pharmaceutical, and medical device safety testing. Cutan. Ocul. Toxicol. 31, 292–305. <http://dx.doi.org/10.3109/15569527.2012.667031>.
- Natsch, A., Emter, R., 2008. Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the in vitro testing of the sensitization potential of chemicals. Toxicol. Sci. 102, 110–119. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfm259>.
- Natsch, A., Ryan, C.A., Foertsch, L., Emter, R., Jaworska, J., Gerberick, F., Kern, P., 2013. A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. J. Appl. Toxicol. 33, 1337–1352. <http://dx.doi.org/10.1002/jat.2868>.
- Natsch, A., Emter, R., Gfeller, H., Haupt, T., Ellis, G., 2015. Predicting skin sensitizer potency based on in vitro data from KeratinoSens and kinetic peptide binding: global versus domain-based assessment. Toxicol. Sci. 143, 319–332. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfu229>.
- Newcombe, D.S., 1992. Clinical Immunotoxicology.
- Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C.B., 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. J. Biol. Chem. 284, 13291–13295. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R900011200>.
- Nukada, Y., Miyazawa, M., Kazutoshi, S., Sakaguchi, H., Nishiyama, N., 2013. Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicol. in Vitro 27, 609–618. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2012.11.006>.
- OECD, 1992. Test No. 406: Skin Sensitisation, Guideline for Testing of Chemicals. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070684-en>.
- OECD, 2010a. Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Guideline for Testing of Chemicals. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071100-en>.
- OECD, 2010b. Test No. 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA. OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264090972-en>.
- OECD, 2010c. Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA.
- OECD, 2012. The adverse outcome pathway for skin sensitization initiated by covalent binding for proteins. Part 1. In: Scientific Evidence OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment.
- OECD, 2015a. Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA).
- OECD, 2015b. Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264242845-en>.
- OECD, 2016a. Guidance document on the reporting of defined approaches to be used within integrated approaches to testing and assessment (IATA) for skin sensitization. In: ENV/JM/MONO(2016) 28. OECD Publishing, Paris.
- OECD, 2016b. Guidance document on the reporting of defined approaches and individual information sources to be used within integrated approaches to testing and assessment (IATA) for skin sensitization. In: ENV/JM/MONO(2016)29. OECD Publishing, Paris.
- OECD, 2016c. Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT). <http://dx.doi.org/10.1787/9789264264359-en>.
- Patlewicz, G., Kuseva, C., Kesova, A., Popova, I., Zhechev, T., Pavlov, T., Roberts, D.W., Mekeny, O., 2014. Towards AOP application—implementation of an integrated approach to testing and assessment (IATA) into a pipeline tool for skin sensitization. Regul. Toxicol. Pharmacol. 69, 529–545. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.06.001>.
- Piroid, C., Ovigne, J.-M., Rousset, F., Martinuzzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N., 2015. The myeloid U937 skin sensitization test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. Toxicol. in Vitro 29, 901–916. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2015.03.009>.
- Ramirez, T., Mehling, A., Kolle, S.N., Wruck, C.J., Teubner, W., Eltze, T., Aumann, A., Urbisch, D., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R., 2014. LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. Toxicol. in Vitro 28, 1482–1497. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.08.002>.
- Ramirez, T., Stein, N., Aumann, A., Remus, T., Edwards, A., Norman, K.G., Ryan, C., Bader, J.E., Fehr, M., Burleson, F., Foertsch, L., Wang, X., Gerberick, F., Beilstein, P., Hoffmann, S., Mehling, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R., 2016. Intra- and inter-laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: a reporter gene-cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers. Toxicol. in Vitro 32, 278–286. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.01.004>.
- Rastogi, S.C., Lepoittevin, J.P., Johansen, J.D., Frosch, P.J., Menne, T., Bruze, M., Dreier, B., Andersen, K.E., White, I.R., 1998. Fragrances and other materials in deodorants: search for potentially sensitizing molecules using combined GC-MS and structure activity relationship (SAR) analysis. Contact Dermatitis 39, 293–303.
- Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehn, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinuzzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., Van Vliet, E., Maxwell, G., 2015. Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. Toxicol. in Vitro 29, 259–272. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.10.018>.
- Russell, Burch, R.L., 1959. The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, London UK.
- Ryan, C. a, Kimber, I., Basketter, D. a, Pallardy, M., Gildea, L. a, Gerberick, G.F., 2007. Dendritic cells and skin sensitization: biological roles and uses in hazard identification. Toxicol. Appl. Pharmacol. 221, 384–394. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2007.03.006>.
- Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., Itagaki, H., Toyoda, H., Suzuki, H., 2006. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human cell line activation test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. Toxicol. in Vitro 20, 774–784. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2005.10.014>.
- Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Kosaka, N., Ito, Y., Yoneyama, K., Sono, S., Itagaki, H., Toyoda, H., Suzuki, H., 2009. The relationship between CD86/CD54 expression and THP-1 cell viability in an in vitro skin sensitization test - human cell line activation test (h-CLAT). Cell Biol. Toxicol. 25, 109–126. <http://dx.doi.org/10.1007/s10565-008-9059-9>.
- Sakaguchi, H., Ryan, C., Ovigne, J.-M., Schroeder, K.R., Ashikaga, T., 2010. Predicting skin sensitization potential and inter-laboratory reproducibility of a human cell line activation test (h-CLAT) in the European Cosmetics Association (COLIPA) ring trials.

- Toxicol. in Vitro 24, 1810–1820. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2010.05.012>.
- Schneider, K., Akkan, Z., 2004. Quantitative relationship between the local lymph node assay and human skin sensitization assays. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 39, 245–255. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2004.02.002>.
- Strickland, J., Zang, Q., Kleinstreuer, N., Paris, M., Lehmann, D.M., Choksi, N., Matheson, J., Jacobs, A., Lowit, A., Allen, D., Casey, W., 2016. Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J. Appl. Toxicol.* 36, 1150–1162. <http://dx.doi.org/10.1002/jat.3281>.
- Thyssen, J.P., Linneberg, A., Menné, T., Johansen, J.D., 2007. The epidemiology of contact allergy in the general population—prevalence and main findings. *Contact Dermatitis* 57, 287–299. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01220.x>.
- Tollefsen, K.E., Scholz, S., Cronin, M.T., Edwards, S.W., de Knecht, J., Crofton, K., Garcia-Reyero, N., Hartung, T., Worth, A., Patlewicz, G., 2014. Applying adverse outcome pathways (AOPs) to support integrated approaches to testing and assessment (IATA). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 70, 629–640. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.09.009>.
- Tsujita-Inoue, K., Hirota, M., Ashikaga, T., Atobe, T., Kouzuki, H., Aiba, S., 2014. Skin sensitization risk assessment model using artificial neural network analysis of data from multiple in vitro assays. *Toxicol. in Vitro* 28, 626–639. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.01.003>.
- Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kollé, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H., 2015. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337–351. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.12.008>.
- van der Veen, J., Vandebriel, R., van Loveren, H., Ezendam, J., 2011. Keratinocytes, Innate Immunity and Allergic Contact Dermatitis-Opportunities for the Development of In Vitro Assays to Predict the Sensitizing Potential of Chemicals. Ro YS, (Contact de. ed).
- van der Veen, J.W., Pronk, T.E., van Loveren, H., Ezendam, J., 2013. Applicability of a keratinocyte gene signature to predict skin sensitizing potential. *Toxicol. in Vitro* 27, 314–322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.023>.
- van der Veen, J.W., Rorije, E., Emter, R., Natsch, A., Van, L.H., Ezendam, J., 2014a. Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69, 371–379. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.04.018>.
- van der Veen, J.W., Soeteman-Hernandez, L.G., Ezendam, J., Stierum, R., Kuper, F.C., van Loveren, H., 2014b. Anchoring molecular mechanisms to the adverse outcome pathway for skin sensitization: analysis of existing data. *Crit. Rev. Toxicol.* 44, 590–599. <http://dx.doi.org/10.3109/10408444.2014.925425>.
- Weltzien, H.U., Corsini, E., Gibbs, S., Lindstedt, M., Borrebaeck, C., Budde, P., Schulz-Knappe, P., Thierse, H.-J., Martin, S.F., Roggen, E.L., 2009. Safe cosmetics without animal testing? Contributions of the EU Project Sens-it-iv. *J. Verbr. Lebensm.* 4, 41–48. <http://dx.doi.org/10.1007/s00003-009-0510-5>.

ARTICLE 2

Article 2

Second generation of skin sensitization AOP within a same cell line, THP-1

En préparation

Elodie Clouet, Chloé Raffalli, Rami Bechara, Marie-Hélène Damiens, Hervé Groux, Marc Pallardy, Pierre-Jacques Ferret, Saadia Kerdine-Römer

Dans le contexte du Règlement cosmétique n°1223/2009, le développement de tests alternatifs à l'expérimentation animale pour identifier et classer les substances chimiques selon leur potentiel allergisant est devenu un enjeu majeur pour les industriels. Un certain nombre de tests *in silico/in vitro* modélisant les événements précoces de la DCA ont été développés permettant l'évaluation du danger de sensibilisation. Selon un consensus, une seule méthode alternative non animale n'est pas suffisante pour couvrir l'ensemble des événements clés (KE) définis dans l'AOP de la sensibilisation cutanée (OECD, 2012).

Les DC sont des cellules présentatrices d'antigène jouant un rôle majeur dans la réponse immunitaire primaire pouvant être activées par des molécules allergisantes. Dans ce contexte, nous avons proposé de combiner différents tests considérés comme des KE au sein d'un même type cellulaire, à savoir la THP-1, lignée cellulaire présentant des caractéristiques communes aux DC. Nous avons étudié la production de formes réactives à l'oxygène (FRO) et la déplétion du glutathion (GSH), représentatifs du stress oxydant induit par les composés électrophiles comme KE1. Ce stress chimique ou oxydant est perçu par les DC comme un signal de danger, induisant alors leur maturation. Ces molécules allergisantes sont aussi capables d'activer la voie de détoxification Nrf2/Keap1. Nrf2 jouerait plusieurs rôles dans la sensibilisation cutanée. Tout d'abord, son activation résulte du stress oxydant induit par l'exposition au sensibilisant. A l'état basal et en absence de stress chimique ou oxydant, Nrf2 est couplé à son répresseur cytosolique Keap1 qui assure sa dégradation *via* le protéasome. En présence d'un stress, Nrf2 transloque dans le noyau et induit l'expression de gènes antioxydants et des enzymes de phase II. Nrf2 est donc impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire. En effet, il a été démontré que certains gènes sous le contrôle de Nrf2 ont des effets immunologiques. Par exemple, l'hème-monooxygénase 1 (*hmx1*), qui est surexprimé sous le contrôle de Nrf2, inhibe la maturation des DC, réduisant ainsi l'activation des LT. Cette voie est centrale pour la détection des composés électrophiles. Pour le KE2, nous avons donc choisi d'étudier

l'activation de la voie Nrf2/Keap1 ainsi que l'expression des gènes induits. De plus, les sensibilisants de contact, en tant que molécules réactives, ont la capacité d'induire un signal de danger déclenchant au sein de la peau une cascade d'événements conduisant à la maturation des DC, qui se traduit par une modulation phénotypique ainsi que la production d'un certain nombre de cytokines et chimiokines. Pour le KE3, nous avons donc étudié la modification du phénotype de la THP-1, caractérisé par l'expression des marqueurs de surface CD54 et CD86 comme défini dans le test validé du h-CLAT, et la production de médiateurs inflammatoires tels que les cytokines. Pour finir, nous avons étudié la capacité de la THP-1 activée à induire une prolifération des lymphocytes T comme dernier événement clé de cette AOP intégrée.

Cette AOP intégrée au sein de la THP-1 présente une excellente prédiction quant à l'identification des sensibilisants forts comme le cinnamaldehyde (CinA) et la méthylisothiazolinone (MIT). En effet, ces molécules sont capables d'induire une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) corrélée à une déplétion du GSH, tout en activant la voie Nrf2. Enfin, les sensibilisants forts sont capables d'activer la THP-1 et induire ainsi une prolifération lymphocytaire. Cependant, ce test intégré ne semble pas adapté pour les pro- et pré-haptènes en raison de la capacité métabolique limitée de la THP-1. De même, cette étude montre que tous les sensibilisants n'activent pas de façon équivalente les voies de signalisation intracellulaires conduisant à un stress oxydant, des modifications phénotypiques et à la maturation de la THP-1. Inversement, tous les sensibilisants semblent induire la prolifération des lymphocytes T, mais pas les irritants.

Par ce travail, nous proposons un unique test d'AOP intégrée au sein d'un même type cellulaire, couplé à tous les KE représentatifs de la sensibilisation cutanée. Ce modèle peut être proposé comme seul test pour identifier et classer les forts sensibilisants, les irritants et les non sensibilisants.

FULL ARTICLE – Research article

Second generation of skin sensitization AOP within a same cell line, THP-1

Elodie Clouet^{1,2}, Chloé Raffalli², Rami Bechara², Marie-Hélène Damiens², Hervé Groux³, Marc Pallardy², Pierre-Jacques Ferret¹, Saadia Kerdine-Römer²

¹ Safety Assessment Department, Pierre Fabre Dermo Cosmétique, Toulouse, France

² UMR996 - Inflammation, Chemokines and Immunopathology, INSERM, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France France

³ ImmunoSearch, Grasse, France

Keywords: Allergic contact dermatitis, Adverse Outcome Pathway (AOP), THP-1, dendritic cell, Nrf2

Contact:

Prof. Saadia Kerdine-Römer, INSERM UMR-996; Université Paris-Sud,
Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, F-92296 Châtenay-Malabry

Tel: 00 33 (0) 1 4683 5779, Fax: 00 33 (0) 1 4683 5496

E-mail address: saadia.kerdine-romer@u-psud.fr

Summary

In the context of the 2013 ban given by EU Cosmetics Regulation, the ability to identify and classify the skin sensitization potential of chemicals without animals is of high importance for the cosmetic industry. Different *in vitro* chemistry-based assays have been developed and allow the evaluation of sensitization hazard. According to a scientific consensus, one single non-animal test is not sufficient to cover the different key events (KE) defined by the Adverse Outcome Pathway (AOP) for skin sensitization.

Since dendritic cells (DC) play a key role in the skin sensitization phase leading to the development of Allergic Contact Dermatitis (ACD), we propose to combine different tests in same cell acting as a DC, the THP-1 cell, covering all KE defined by AOP.

To consider an integrated-AOP, we decided studying as initial events ROS production and GSH depletion as cellular oxidative stress for KE1, Nrf2 activation pathway and gene expressions for KE2, phenotype modifications as cell-surface markers and cytokines production for KE3, and T cell proliferation for KE4. All of those measurements were realized on THP-1 cell-line, after exposure to a variety of chemicals, including irritants, non-sensitizers and allergens (pro/prehaptens).

Results showed that strong sensitizers as CinA or MIT are correlated with an early ROS production and a reduction of intracellular glutathione. Those chemicals as well as antioxidants specifically activate the Nrf2-Keap1 pathway, measured by western blot and a Nrf2 DNA-binding ELISA. They also strongly induced phenotype maturation of THP-1 cell-line with CD54 and CD86 expression at cell-surface and specific cytokine production such as IL-8, IL-18. Strong sensitizers were able to induce the T cell proliferation while non-sensitizers and irritants did not.

In the present study, we have demonstrated that we can address the 3 main KE of skin sensitization AOP in a same cell line as well as addressing lymphocyte activation.

Abbreviations

7-AAD: 7-Aminoactinomycin D

ACD: Allergic Contact Dermatitis

AOP: Adverse Outcome Pathway

ARE: Antioxidant Response Element

CD54: Cluster of Differentiation 54

CD86: Cluster of Differentiation 86

cDNA: complementary Deoxyribonucleic Acid

CinA: Cinnamaldehyde

CS: Contact sensitizer

CT: Cycle Threshold

DC: Dendritic Cell

DCFH-DA: Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DNCB: Dinitrochlorobenzene

DPRA: Direct Peptide Reactivity Assay

DTT: Dithiothreitol

ECHA: European Chemicals Agency

ECVAM: European Centre for the Validation of Alternative Methods

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EU: European Union

FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting

Fb: FACS Buffer

FITC: Fluorescein isothiocyanate

GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry

GSH: Glutathione

GSSG: Glutathione disulfide

h-CLAT: human Cell Line Activation Test

HPLC: High Pressure Liquid Chromatography

HRIPT: Human Repeated Insult Patch Test

Ig: Immunoglobulin

ITS: Integrated Testing Strategy

KE: Key Event

Keap1: Kelch-like EC-associated protein 1

LLNA: Local Lymph Node Assay

mAb: Monoclonal Antibody

MFI: Mean Fluorescence Intensity

NaCl: Sodium Chloride

Nrf2: Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2

OECD TG: Organisation Economic for Co-operation and Development Test Guidelines

PBS: Phosphate-buffered saline

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride

REACH: Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals

RFI: Relative Fluorescence Intensity

RNA: Ribonucleic acid

ROS: Reactive oxygen species

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction

SLS: Sodium Lauryl Sulfate

SI: Stimulation Index

Introduction

Allergic contact dermatitis (ACD) resulting from the development of skin sensitization is a dermatological disease that occurs after a chemical contact with the skin (Kimber *et al.*, 2011). Skin sensitization is one of the key events to be addressed in the human hazard characterization and risk assessment of chemicals and cosmetic ingredients. Skin allergy is a two-step process: (1) skin sensitization is induced when dermal exposure occurs at sufficient levels to result in T cell activation and proliferation and (2) skin elicitation with subsequent dermal exposures. The adverse effect is triggered during elicitation by a response of the immune system, resulting in dermal symptoms of ACD, which includes erythema formation, itching and burning. Traditionally, the skin sensitization potential of substances has been addressed by using animal models. Originally, guinea pig models, such as the Buehler or the guinea maximization test, were used, which provided skin sensitization hazard information, but usually no potency information (Buehler, 1965; Magnusson and Kligman, 1969; OECD, 1992). The guinea pig models have largely been replaced with the murine Local Lymph Node Assay (LLNA) that was internationally accepted in 2002 (OECD, 2002). Guinea pig models measure the elicitation phase of the response by detecting erythema upon re-challenge to a test chemical. In contrast, the LLNA quantifies the induction phase of the response by measuring lymphocyte proliferation, which has been demonstrated to be a predictive biomarker of skin sensitization (Kimber *et al.*, 1994). The LLNA measures the dose-response, by virtue of evaluating multiple test concentrations from which an EC₃ (the test substance concentration inducing a three-fold proliferation compared to concurrent vehicle-treated controls) is derived as a measure of relative potency. The EC₃ is inversely proportional to the potency of a skin sensitizer (Basketter *et al.*, 2000; Gerberick *et al.*, 2007; Loveless *et al.*, 2010). An increasing political and ethical demand to replace animal experiments resulted in the regulatory requirement in Europe to assess the safety of cosmetic ingredients without testing on animals (European Commission, 2009). Moreover, a recent amendment of the industrial chemical regulation explicitly requests information from non-animal test methods and prescribes that animal testing only be conducted if the non-animal methods are not applicable or the obtained results are inadequate for classification and risk assessment purposes (European Parliament and Council of the European union, 2006). Alongside these political developments, the OECD has summarised the detailed understanding of the biological

mechanism of skin sensitization (Vandebriel and Loveren, 2010) by structuring the various biological steps in the process into an Adverse Outcome Pathway (AOP).

The four key events (KE) are covalent binding to skin proteins (KE1), keratinocyte responses (KE2), activation of dendritic cells (KE3) and T-cell proliferation (KE4) that lead to the adverse outcome of ACD have been described. Various non-animal test methods have been developed addressing one or more of the first three key events, but are at different stages of development. So far, five test methods have completed this process and have achieved this acceptance: (1) the direct peptide reactivity assay (DPRA), an *in chemico* test method that addresses KE1 by evaluating the reactivity of chemicals using model peptides containing cysteine or lysine residues (Gerberick *et al.*, 2007, 2004; OECD, 2015a), (2) the KeratinoSens™, an *in vitro* assay that is based on the activation of the Keap1-Nrf2-ARE pathway as the oxidative and electrophilic stress response and addresses KE2 in HaCaT-derived human keratinocytes (Emter *et al.*, 2010; OECD, 2015b), and (3) three *in vitro* assays that address mechanisms described under the activation of dendritic cells as the human cell line activation test (h-CLAT), an *in vitro* assay measuring biomarkers of dendritic cell activation in THP-1, a human promonocytic cell line or U937 cell line activation Test (U-SENS™) or Interleukin-8 Reporter Gene Assay (IL-8 Luc assay). Those 3 methods address KE3 (OECD, 2017, 2016a; Sakaguchi *et al.*, 2006).

One single non-animal test method is not sufficient to cover the AOP and to have 100% accuracy compared with the LLNA. Thus, several integrated testing strategies (ITS) that use multiple tests have been developed to evaluate the sensitizing potential of chemicals.

Under REACH of the EU regulations, three non-animal test methods such as the DPRA, KeratinoSens™, and the h-CLAT, can now be used to fulfill the regulatory information requirements for skin sensitization (European Chemicals Agency, 2016). Moreover, the guidance document published in 2016 by the OECD describes as case studies the defined approaches of several ITS for hazard identification and potency categorization (OECD, 2016b, 2016c).

However, there is no differential weighting of these individual test methods used and no predetermined sequential order of testing. Each of the three test methods qualitatively (i.e. not quantitatively) and conceptually addresses each KE of the AOP, rather than being their exact reproduction, and provides overlapping information in covering KEs.

In this context, ACD is a common skin disease known to be induced by contact sensitizers (CS) in which dendritic cells (DC) are involved, playing pivotal roles (Martin *et al.*, 2011). They initiate and orchestrate innate and adaptive immune responses. After contact with the skin, the chemical sensitizer activates skin DC, which migrate to draining lymph nodes and induce a specific T lymphocyte response (Banchereau and Steinman, 1998; Vocanson *et al.*, 2009).

The main objective of this work is to propose combining tests and endpoints within a same cell-line as an integrated-AOP. Knowing the fact that DC plays a key role in ACD, we have selected a dendritic cell type, THP-1, a human monocytic leukemia cell line that serves as a DC surrogate (Ashikaga *et al.*, 2010; Sakaguchi *et al.*, 2006). The reactivity of chemicals using reactive oxygen species (ROS) and glutathione (GSH) depletion measurement have been selected to evaluate the KE1, Nrf2-antioxidant response element (ARE) activation pathway and genes expression addressing KE2 as the oxidative and electrophilic stress response (Emter *et al.*, 2010), the up-regulation of surface markers CD86 and CD54 and identification of cytokines on THP-1 cells addressing KE3 and T-cell proliferation with human CD4⁺/THP-1 co-culture addressing KE4.

Materials and methods

Chemicals

9 different molecules were selected including controls as PBS and DMSO, non-sensitizers (BZK and t-BHQ), irritant (SDS, which is a false positive in LLNA), RESO and EUG as weak, FAR and GER as moderate, and two strong sensitizers, CinA and MIT. The sensitizing and non-sensitizing chemicals used in this study are shown in Table 1. They were all purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). The sensitizing compounds were selected based on human evidence and to reflect various potency classes.

Culture of THP-1 cell line

The human monocytic cell line THP-1 (ATCC-TIB-202; LGC, Molsheim, France) was grown in RPMI 1640 medium with 25 mM HEPES GlutaMAX (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Biowest, AbCys, Courtaboeuf, France), 1% sodium pyruvate (Gibco, Invitrogen), antibiotics [100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Gibco, Invitrogen)] and 0.05 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) at 37°C in humidified air containing 5% CO₂. Cells were maintained at a density between 2×10^5

and 1×10^6 cells/ml, and frozen stocks were regularly thawed and sub-cultured to avoid cultures with higher than 30 passages.

Chemical treatment

THP-1 cells were cultured for at least 12 h at 8×10^5 cells/ml in complete medium without 2-mercaptoethanol. On the next day, the cells were seeded in complete medium at 1×10^6 cells/ml and treated with chemicals (Table 1).

THP-1 were stimulated at subtoxic dose for 24 h, or depending on experiments or endpoints, in complete medium. t-BHQ, EUG, FAR, GER, CinA were diluted in DMSO to solubilize the water-insoluble chemicals and BZK, SDS, RESO, MIT in water. Final concentrations of solvent in culture media did not exceed 0.1%. Cell viability after treatment was never less than 75% as assessed by trypan blue exclusion or propidium iodide (PI).

Measurement of cell viability

THP-1 cells were seeded in 24-well plates (1×10^6 cells/ml, 1 ml/well) with various concentrations of each chemical for 24 h (Table 1). Cells were washed twice with PBS and harvested cells were incubated with annexin-V-PE and 7-aminoactinomycin D (7-AAD) according to the manufacturer's protocol (BD Biosciences). Cell viability was measured using the FL-3 wavelength on a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Data acquisition was performed using the CellQuest software (BD Biosciences). At least four independent experiments were performed for each chemical. The viability cell is mainly compared to resultat obtained on THP-1 according Urbisch publication (Urbisch *et al.*, 2015) or other cell viability data in literature.

Flow cytometric analysis of THP-1

After 24 h of incubation with chemicals at subtoxic concentration, THP-1 cells were harvested, washed once in cold phosphate-buffered saline (PBS) and 3×10^5 cells (per antibody) were incubated in PBS containing 0.05% bovine serum albumin (BSA) for 30 min at 4°C with the monoclonal antibodies PE-conjugated anti-CD86 (555658, BD) and allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD54 (559771, BD). Appropriate antibody isotypes (IgG1, BD) were used at the same concentrations as the controls. After incubation, cells were washed twice in PBS + 0.05% BSA and once in PBS. THP-1 cell phenotype modifications were detected using a FACS

Calibur flow cytometer. For each sample, 10000 cells were acquired from a gated homogenous cell population selected from a side versus forward-scatter dot plot and analyzed using the CellQuest software (Becton Dickinson). Results were expressed using relative fluorescence intensity (RFI) calculated with the following formula, where MFI is the mean fluorescence intensity: (MFI of chemical-treated cells labeled with antigen-specific antibody – MFI of chemical-treated isotype control cells)/(MFI of vehicle control cells labeled with antigen-specific antibody – MFI of vehicle isotype control cells).

Quantitative determination of GSH/GSSG

After treatment with chemicals at subtoxic concentration for 1 h, 1×10^6 cells were collected by pipetting and washed twice with cold PBS. 25 μ L of cells diluted in PBS were put in the 96-well plate, one set of cells for total glutathione measurement and one set for GSSG measurement. The GSH/GSSG-Glo™ Assay kit from Promega (Madison, USA) was used. The GSH/GSSG ratio was measured according to the protocol given by the manufacturer. To measure the total glutathione, a reducing agent converts all the glutathione, GSH and GSSG in a cell lysate to the reduced form, GSH. To only measure the oxidized form GSSG, a reagent is added that blocks all the GSH while leaving the GSSG intact. The cells were lysed with 25 μ L of Total Glutathione Lysis Reagent or Oxidized Glutathione Lysis Reagent depending on the configuration. The plate was shaken for 5 min. 50 μ L of Luciferin Generation Reagent was added to all wells, and assays were mixed and incubated for 30 min. 100 μ L of Luciferin Detection Reagent was added to all wells, assays were mixed and after 15 min of incubation, luminescence was measured with a Tristar LB 941 from Berthold (Germany). The levels of total GSH and GSSG were calculated after interpolation of glutathione concentrations from standard curves. The content of GSH was obtained by subtracting the amount of GSSG from total GSH content.

ROS detection

Intracellular reactive oxygen species were measured using the specific dye dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich), as described (El Ali *et al.*, 2017) by flow cytometry.

Briefly, THP-1 cells (2×10^6 cells/ml) were loaded for 30 min with DCFH-DA (2 μ M) in serum-free RPMI at 37 °C. Cells were washed and resuspended in PBS (1×10^6 cells/ml). Following

incubation at 37 °C with chemicals at subtoxic concentration (30 min, 1 h and 2h), fluorescence intensity of DCF was then measured in the FL1 channel. A total of 10000 living cells were analyzed. RFI was calculated by using the following formula: RFI (% of control) = (MFI of chemical-treated cells/MFI of vehicle control cells) x 100.

Immunoblotting

Western blot was performed as previously described (Migdal *et al.*, 2013). THP-1 cells (10^6 cells/ml, 2 ml/well) were exposed during 6 h to test compounds at subtoxic concentration. Cells were washed twice in cold PBS before lysis in 40 μ L of lysis buffer (20 mM Tris pH 7.4, 137 mM NaCl, 2mM EDTA pH 7.4, 2mM sodium pyrophosphate, 1% Triton, 10% glycerol, 1mM PMSF, 1mM Va_3VO_4 , 25 mM β -glycerophosphate, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin and 10 μ g/ml pepstatin) and left in ice for 20 min. Then, they were centrifuged at 15000 rpm for 20 min at 4°C, before the supernatants were collected. Total protein concentration was evaluated using bicinchoninic acid assay, and equal amounts of denatured proteins (30 μ g) were loaded on 12% polyacrylamide gels (TGX Stain-Free FastCast; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) for approximately 30 min at 300V in running buffer. Stain-free gels were activated by exposure to UV for 1 min. Proteins were transferred to PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) using the Bio-Rad Trans-Blot Turbo Transfer System for 7 min. Total proteins on membranes were detected using the Stain-free method (Gilda and Gomes, 2013). For the Nrf2/Keap1 analysis pathway, membranes were incubated with antibodies raised against Nrf2 (H-300; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Immunoreactive bands were detected by chemoluminescence (ECL solution, Amersham Biosciences). Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence using a ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). Bands were quantified using Image Lab software (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). Results were expressed as the fold induction that represented the ratio of Nrf2 to the total p38 MAPK (Cell Signaling Technology, Ozyme, St-Quentin en Yvelines, France) for treated cells compared with untreated control cells (at $t = 0$).

Measurement of Nrf2 Transcription factor (DNA binding)

DNA binding was analyzed using specific ELISA-based TransAM kits from Active Motif as described by Macoch *et al.* (2015) and Raffalli *et al.* (2017). After being treated, THP-1 cells were lysed in a hypotonic buffer constituted of Non-diet P40 (NP40), 20% glycerol, 20 mM

HEPES-KOH pH 7.9, 420 mM NaCl, 1 mM DTT, 1mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium pyrophosphate, 125 mM okadaic acid, 62.5 mM EDTA, 40 mM EGTA, 0.5 mM PMSF, 1 g/ml aprotinin, 1 g/ml pepstatin and 1 g/ml leupeptin. After being left in ice for 20 min, THP-1 cells were centrifuged 20 min at 4°C at 17600 x g. Total protein concentration was evaluated using bicinchoninic acid assay and 20 µg of protein were used for each molecule tested. Total protein cell extracts (20 mg) were incubated for 1 h in a 96-well plate to which oligonucleotides, containing consensus binding sites for Nrf2, had been immobilized. After washing, the plate was incubated for 1 h with the appropriate primary antibody (Ab), which specifically detected an epitope accessible only when Nrf2 is activated and bound to its cognate oligonucleotide. The plate was then washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary Ab (1:1000) for 1 h at room temperature. Colorimetric readout was quantified by spectrophotometry at 450 nm. Independent experiments were repeated at least three times.

Genes expression according to SENS-IS adapted

THP-1 cells (1×10^6 cells/ml, 2 ml/well) were exposed to test compounds at subtoxic dose for 6 h. This time point was determined in preliminary experiments and was found to be optimal to study expression of Nrf2 target genes (data not shown). Briefly, the cells were collected and centrifuged at 3500 rpm for 5 min. The RNA isolation process was adapted from Wakkach *et al.*, (2003). Briefly, the cells pellet were placed in a tube for snap freezing in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using Qiazol reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France) and RNeasy Mini Kit according to the manufacturer instructions (Qiagen, Courtaboeuf, France). Briefly, the sample was added to 1ml Qiazol reagent and homogenized using a TissueLyser II (Qiagen, Courtaboeuf, France), and 2 steel beads. After centrifugation, the supernatant was collected and 0.2 ml bromochloro propane (Sigma, France) was added and mixed vigorously. The homogenate was centrifuged at 12 000 g for 15 min at 4°C. The upper phase (aqueous phase) was added to 600 µl of 70% ethanol, and immediately mixed by pipetting. The mixture was transferred to a RNeasy spin column placed in a 2 ml collection tube and followed by total RNA extraction according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis for SENS-IS adapted

The RT-PCR analysis procedure was adapted from Wakkach *et al.*, 2003. Briefly, total RNA reverse transcription was performed with 1 µg total RNA in 20 µl final volume using Random Primers (Invitrogen, France) and SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, France), according to the manufacturer's instructions. Quantitative RT-PCR was performed using SYBR Green real time PCR Master Mix (ROCHE, France) with 0.4 µM of each oligonucleotide primer in a total volume 25 µl. The reaction was performed in an LC480 System (ROCHE, France). The amplification program consisted of one cycle at 95°C with a 1 min hold, followed by 40 cycles at 95°C with a 15 s hold, then at an annealing temperature of 60°C with a 15 s hold and, finally, at 72°C with a 40 s hold.

The relative amount of each transcript was normalized to the amount of the mean expression levels of 3 housekeeping genes transcripts (Glucuronidase β, β2 microglobuline, and «non-POU domain containing, octamer-binding»: NONO) in the same cDNA.

Prediction model evaluation for SENS-IS adapted

Gene expression level measurement was performed through an absolute quantification analysis using the second derivative maximum method algorithm developed by ROCHE. To evaluate the level of tissue destruction by the chemical at a given concentration, the Cycle Threshold (CT) value of the HSPAA1 gene was measured. The maximal acceptable limit for this CT value was 110% of the corresponding vehicle control value. Expression of various genes was measured by real-time PCR according to Cottrez *et al.* (2015). Results were expressed as fold induction compared with control samples (corresponding vehicle-treated cells) and previously corrected by the expression of the reference genes.

According to the SENS-IS prediction model (Cottrez *et al.*, 2015), a test substance is considered a sensitizer if it induces the over expression (fold value >1.25) (compared to their respective vehicle, PBS or DMSO) of at least 7 genes among two groups of respectively 21 and 17 genes named «SENS-IS» and «REDOX». Both groups of genes are involved in skin sensitization but are related to different pathways: the «REDOX» group gathers genes involved in the oxidative stress responses, whereas the «SENS-IS» group gathers genes biomarkers of skin sensitization but not involved in the oxidative stress response.

Cytokine Array

Cytokine secretion was assessed using the Proteome Profiler Array: Human Cytokine Array Panel A, ARY005B (R & D Systems, Minneapolis MN, USA) as described by the manufacturer's instructions. The kit consists of a nitrocellulose membrane containing 36 different anti-cytokine/chemokine antibodies spotted in duplicate. The 36 cytokines/chemokines included complement component 5a (C5a), CD40 ligand, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), GRO α , I-309, soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1), gamma interferon (IFN- γ), IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-16, IL-17, IL-17E, IL-23, IL-27, IL-32 α , IFN- γ -induced protein 10 (IP-10), I-TAC, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), migration inhibition factor (MIF), macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , serpin E1, RANTES, SDF-1, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and sTREM-1. Briefly, membranes were incubated with blocking buffer at room temperature for 1 h. After THP-1 (1×10^6 cells/ml) being treated at subtoxic concentration of tested compounds during 24 h. Cell supernatants (0.5 ml) were collected and mixed with a biotinylated detection antibody cocktail at room temperature for 1 h, and then each was incubated with a membrane overnight at 4°C. The arrays were then washed three times for 10 min and subsequently incubated with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin for 30 min at room temperature. The arrays were exposed to peroxidase substrate (ECL solution; Amersham Biosciences). Cytokine array were detected by chemiluminescence using a ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France).

Cytokines quantification in THP-1 supernatants

CXCL8/IL-8, IL-16, Total IL-18, CCL5/RANTES, CCL-4/MIP-1 β and Serpin E1/PAI-1 levels in the culture supernatants were measured using human CXCL8/IL-8, IL-16, Total IL-18, CCL5/RANTES, CCL-4/MIP-1 β and Serpin E1/PAI-1 DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits, respectively (R&D Systems, Abingdon, United Kingdom) according to the manufacturer's guidelines. THP-1 cells were seeded in 24-well plates (1×10^6 cells/ml, 1 ml/well) with test compounds at subtoxic dose for 24 h. ELISA assays were performed on culture supernatants according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN). The lower limit of detection was approximately 30 pg/ml for CXCL8, 15 pg/ml for human IL-16, 10 pg/ml for IL-18, 15 pg/ml for CCL4/MIP-1 β , 15 pg/ml for

CCL5/RANTES, and 0.313 ng/ml for Serpin E1/PAI-1. Colorimetric readout was quantified by spectrophotometry at 450 and 550 nm.

Co-culture CD4⁺ and THP-1

The capacity of THP-1 to activate CD4⁺ T cells was evaluated by the use of allogeneic T CD4⁺ lymphocytes labeled with 0.5 μ M carboxy fluorescein succinimidyl ester (CFSE), according to the manufacturer's instructions, as described by de Bourayne *et al.*, (2017). CD4⁺ T cells were isolated from PBMCs by positive selection with the MACS CD4 isolation kit II (Miltenyi Biotec). These T cells were confirmed to have purity greater than 95%, based on CD4 (555349; BD Biosciences) expression evaluated by flow cytometry.

THP-1 were stimulated with chemicals and positive controls such as NiSO₄ (500 μ M) and LPS (100 ng/mL) for 24 hours, in complete medium. Treated THP-1 were washed and then cultured with allogeneic total CD4⁺ T cells at 1:10 DC/THP-1 *ratio* for 5 d in complete RPMI 1640. On day 5, CD4⁺ T-cell proliferation was analyzed by flow cytometry and expressed as the percentage of CFSE low cells. Cell division was next determined by analyzing CFSE dilution with a FACSCalibur flow cytometer and CellQuest software (BD Biosciences).

Results

Cytotoxicity Measurement

For each chemical, several concentrations were first tested on THP-1 cells to assess viability after 24 h of treatment using 7-AAD staining (data not shown). According to these results, one concentration for each chemical was selected for further experiments. This concentration was the maximal concentration inducing no more than 30% cytotoxicity (Table 2).

Taking into account the fact that most of the time, allergens lead to an oxidative stress, we decided to investigate the ROS production as well as GSH depletion following exposure to the selected chemicals.

ROS production

ROS production was measured at 30 min, 1 h and 2 h by flow cytometry. RESO and MIT induced a significant production of ROS after 30 min and 1 h, compared to levels induced by BZK, a

negative control as well as vehicle control (Fig. 1A). Interestingly, SDS did not induce ROS production. Concerning chemicals solubilized in DMSO, we observed a significant ROS production after 30 min and 1 h exposure of CinA (Fig. 1C).

Glutathione Depletion

The glutathione depletion corresponds to the decrease of the intracellular GSH content. As illustrated, we observed a significant decrease in GSH/GSSG *ratio* after 1 h exposure of MIT, RESO and BZK (Fig. 1B) and a lower decrease for CinA (Fig. 1D). Taking into the fact that BZK belongs to ammonium quaternium family, we can suspect a different mode of action, leading to the GSH decrease.

In response to an oxidative stress to the cells, the Nrf2/Keap1 pathway is activated in order to induce the synthesis of antioxidant enzymes (Dickinson *et al.*, 2004). At basal state, Nrf2 is linked to its repressor Keap1 which inhibits its activity. Under an oxidative stress, Keap1 is released and the phosphorylated Nrf2 can translocate into nucleus and can activate ARE (Antioxidant Responsive Element) sequence.

Nrf2 protein accumulation

To investigate the activation of Nrf2 pathway after chemicals exposure, the accumulation of the Nrf2 protein was measured by western blot. THP-1 cells were stimulated for 6 h with tested molecules, and Nrf2 proteins were expressed as the *ratio* of Nrf2 proteins to the loading control. Our results showed that in response to strong sensitizers Nrf2 is accumulated. The level of Nrf2 was significantly higher in strong sensitizers (CinA and MIT) as well as t-BHQ which is usually used as a positive control for Nrf2 pathway (Fig. 2A).

A representative western blot with high accumulation of Nrf2 for t-BHQ, CinA and MIT is illustrated.

DNA-binding ELISA for activated Nrf2 transcription factor

In order to activate the transcription of target genes, accumulated Nrf2 need to translocate to the nucleus and bind to ARE consensus sequence. Therefore, Nrf2 DNA binding activity was measured 6 h post stimulation.

Nrf2 accumulation previously observed is correlated to the corresponding ARE binding sequences. We showed that strong sensitizers (CinA and MIT) induced a significant increase of Nrf2 DNA binding while irritant SDS did not. The fold induction induced by both CinA and MIT was comparable to tBHQ, our positive control (Fig. 2B).

Genes expression for SENS-IS adapted

Among this set of different genes, we have specifically selected 12 genes IRR, 6 genes for SENS-IS and 9 genes for ARE that are modulated after stimulation by our chemicals as shown in Table 3. The results were expressed as fold induction compared with control samples (corresponding vehicle-treated cells) and previously corrected by the expression of the reference genes. We observed that genes are modulated differently and not identically for all molecules. However, it can be noted that some genes are particularly induced by strong sensitizers as *il-8*, *il-1a*, *dup1*, *cxcl1*, *cxcl14* and strongly induced for ARE genes as *nqo1*, *akr1b10*, *hmox1* (Table 3). In Table 4, we have shown the summary results and the number of genes induced according to the SENS-IS adapted. We have a positive result in IRR group if ≥ 12 genes are induced and SENS-IS and ARE groups if ≥ 7 genes are overexpressed.

Phenotypic maturation of THP-1 as well as cytokine production are biomarkers of DC maturation after allergens exposure. For this purpose, we decided to investigate the expression of two specific cell surface markers CD54/CD86, according to the validated h-CLAT protocol. In a second step, we investigated the response modulated by inflammatory cytokines.

CD54/CD86

The phenotype of THP-1 cells was analyzed after 24 h of treatment with chemicals. We measured 2 activation markers: CD86 and CD54. These modifications were expressed as RFI values. Vehicle-treated THP-1 cells had an immature phenotype as they expressed low levels of CD86 and CD54. According to the h-CLAT protocol, expression of CD86 and CD54 on the cell surface was measured by flow cytometry. The Relative Fluorescence Intensity (RFI) was used as an indicator of CD54 and CD86 expression. If the RFI of CD86 or CD54 was greater than 150% or 200%, the substance was classed as a sensitizer. RESO, EUG, CinA and MIT induced a significant expression of CD54. Concerning CD86, the expression was significant with EUG, GER, CinA and MIT. We have a good correlation for all of our molecules except for FAR which is positive only with CD54 in the literature (Fig. 3).

Cytokines expression

We have studied the modulation of THP-1 by measuring the cytokines expression. We have used a proteome profiler that is a membrane-based antibody array to have an overview of 36 human cytokines and chemokines. 3 illustrative membranes are shown (Fig. 4). Depending on

the nature of the molecule, cytokines and/or chemokines were differently expressed in THP-1 after 24 h exposure. This first approach allows us to select candidates that have been quantified by ELISA. Among these 36 cytokines, IL-8, -16 and -18 and CCL-4 and -5 and Serpin-E1 were retained.

Cytokines quantification

We investigated the effects of the chemicals on production of CCL4/MIP-1 β by THP-1 cells after 24 h. The sensitizing chemicals, in general, enhanced production of CCL4/MIP-1 β with statistically significant increases at some concentrations for moderate and strong sensitizers as FAR, GER, CinA and MIT. Compared with CCL4/MIP-1 β levels in the vehicle control cells, the highest MIP-1 β production was obtained from THP-1 cells treated with GER and MIT (Fig. 5A). Concerning CCL5/RANTES, we observed a significant production after antioxidant t-BHQ and strong sensitizers, CinA and MIT, exposures (Fig. 5B).

For IL-8, we didn't measure production for the vehicle control DMSO (below the detection limit of 30 pg/ml). Nevertheless, we observed a significant production of IL-8 for strong sensitizer as MIT and no significant production after irritant treatment (Fig. 5C).

For IL-16, we observed a significant production for strong sensitizer MIT compared to vehicle control PBS, as well as EUG, FAR, GER and CinA compared to vehicle control DMSO (Fig. 5D).

For IL-18, we have observed a significant production only for MIT exposure after 24 h (Fig. 5E). Concerning Serpin E1, we did not observe production for all chemical treatment except for MIT (data not shown).

T-cell proliferation

These results show that both T cell activation and proliferation to sensitizers is readily detectable at days 5–7 after CD4⁺/THP-1 coculture. We have measured LT proliferation alone as a negative control. We have used LPS and nickel as positive controls. We observed an increase proliferation for strong sensitizers and moderate compared to their vehicle control and no significant treatment after irritant treatment as shown in Fig. 6A and B.

Statistics

All results are recorded as means \pm standard errors of the means (SEM) unless otherwise stated. Statistical testing was performed using Prism 5.02 software (GraphPad Software Inc.). Unpaired t test, Mann-Whitney test, or 2-way ANOVA with Bonferroni post hoc analysis were

used to analyze differences between groups, as appropriate. Significance was defined as *p* values of <0.05.

Discussion

To consider an integrated-AOP, we proposed to study initial events as ROS production and GSH depletion (cellular oxidative stress) for KE1, Nrf2 activation pathway and gene expressions for KE2, phenotype modifications as surface markers and cytokines production for KE3, and T cell proliferation for KE4, according to AOP for skin sensitization (OECD, 2012). To be in accordance with the 3R concept, we tested these molecules on the THP-1 cell line, which is the model currently used in the h-CLAT *in vitro* test (Nukada *et al.*, 2012).

Measurement of ROS production and GSH depletion as KE1

The hypothesis that contact sensitizers (CS) can be perceived as a danger signal by DC has proposed based on signalling pathways (MAPK, NFκB) identified upon CS treatments and known to be triggered by danger signals such as toll-like receptor agonists (Ade *et al.*, 2007; Boislève *et al.*, 2004). Such chemicals can also alter the redox glutathione (GSH/ GSSG) balance in human DC derived from monocytes (MoDC) (Mizuashi *et al.*, 2005). DNCB and other CS like dinitrofluorobenzene (DNFB), trinitrochlorobenzene (TNCB) can lead to the production of reactive species (RS) in BMDC (Esser *et al.*, 2012) or MoDC (Byamba *et al.*, 2010).

ROS production

Full activation of DC is essential for the establishment of sensitization to haptens. Electrophilic and oxidative stress may be involved in this process (Ade *et al.*, 2009; Mizuashi *et al.*, 2005). Indeed, reactive oxygen species (ROS) was found to be produced after treatment with contact sensitizers such as 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) in cells like DC (Byamba *et al.*, 2010; Migdal *et al.*, 2010). In this study, we hypothesized that chemicals induce an oxidative stress leading to DC activation. Therefore, we studied ROS production and GSH/GSSG *ratio* in THP-1 cells described as a surrogate of DC for KE1.

In a mouse model of contact hypersensitivity (CHS), ROS are rapidly produced in the skin following CS treatment and play a role in the oxidative and enzymatic degradation of the extracellular matrix component hyaluronic acid (HA) (Esser *et al.*, 2012).

Nrf2 is known to regulate cytoprotective responses caused by reactive species and electrophiles, we addressed the role of ROS production as a sign of chemical reactivity. The increase in ROS production following CS exposure was significantly higher upon MIT or CinA treatments compared to controls. It is well known that only a small amount of intracellular GSH is sufficient to rescue cell viability under oxidative stress and that GSH is essential for cell survival upon oxidative stress (Hatem *et al.*, 2014).

GSH Depletion

A key antioxidant molecule in the regulation of the redox state, which also plays a role in cytoprotection, is glutathione (GSH). GSH is the most abundant intracellular low molecular weight thiol, and plays a major role in detoxification processes that maintain cellular redox homeostasis. Its protective action is based on oxidation of the thiol group of its cysteine residue, resulting in the formation of oxidized glutathione (GSSG); this in turn is catalytically reversed to GSH by GSH reductase (Franco and Cidlowski, 2012). GSH depletion is an early hallmark in the progression of cell death in response to different apoptotic *stimuli* (Franco and Cidlowski, 2006). GSH is one of the key antioxidant molecules responsible for maintenance of DC intracellular redox homeostasis. Cellular GSH levels are mainly determined by Nrf2 activity in regulating genes involved in GSH biosynthesis such as the glutamate-cysteine ligase catalytic (GCLC) subunit (MacLeod *et al.*, 2009). GSH acts in conjunction with GSH peroxidases and glutathione S-transferases to detoxify ROS (Requejo *et al.*, 2010). The ROS production induced by strong sensitizers as MIT and CinA lead to a reduction of GSH.

Nrf2 pathway and genes expression as KE2

Chemical reactivity is necessary for a chemical to be a sensitizer, allowing both covalent binding to proteins and maturation of dendritic cells (DCs) by mimicking “danger signals”. Although chemical sensitizers are extremely diverse in weight and structure, most of them share electrophilic properties and possess intrinsic reactivity toward various amino acids containing nucleophilic heteroatoms (i.e., cysteine, lysine, histidine, arginine, or methionine). The main pathway responsible for cell defense against oxidative stress and maintaining the cellular redox balance at physiological levels is the nuclear factor-erythroid 2-related-factor 2 (Nrf2) pathway (Aw Yeang *et al.*, 2012; Stepkowski and Kruszewski, 2011). Electrophilic and oxidative stresses can be detected by the Keap1-Nrf2 cellular sensor pathway, implicated in

the antioxidant response of the cell (Baird and Dinkova-Kostova, 2011). Under normal conditions, the Kelchlike ECH-associated protein 1 (Keap1) sequesters the transcriptional regulator Nrf2 in the cytoplasm, provoking its proteasomal degradation (Kobayashi *et al.*, 2004).

In the presence of oxidative and/or electrophilic stress, Keap1 releases Nrf2, which migrates to the nucleus, and binds to the antioxidant-responsive element (ARE) sequence forming heterodimers with small Maf proteins, inducing gene transcription (Kensler *et al.*, 2007). These dimers induce the transcription of genes with an antioxidant response element (ARE) in their promoters (Holland and Fishbein, 2010) and coding for proteins mostly involved in detoxification, such as heme oxygenase-1 (HO-1) or NADPH-quinone oxidoreductase 1 (Nqo1). Keap1 is a thiol rich protein having three cysteines known to play a role in Nrf2 activation (Yamamoto *et al.*, 2008). We reported that contact sensitizers induced Nrf2 protein accumulation in the THP-1 cell line and in human DC (CD34-DC). Nrf2 protein accumulation was inhibited in cells pretreated with the antioxidant N-acetylcysteine (Ade *et al.*, 2009). Thus, Keap1-Nrf2 is described as one of the cellular sensor mechanisms that recognize intrinsic chemical reactivity of molecules rather than diverse structures, and a number of reports suggest that chemical sensitizers may activate the Nrf2 pathway (Natsch, 2009; Natsch and Emter, 2016). Indeed, mostly all chemical sensitizers, with the exception of lysine-reactive haptens, have been found positive in a cell based-ARE assay (Emter *et al.*, 2010; Natsch and Emter, 2008). In this context, we hypothesized that the electrophilic properties of chemical sensitizers toward endogenous proteins may be part of the danger signals perceived by THP-1 as DC surrogate exposed to these chemicals, leading to the activation of the Nrf2-ARE regulatory pathway. We previously reported that Nrf2 was induced in the presence of CS (Migdal *et al.*, 2013) but not in the presence of irritants in human DC (Ade *et al.*, 2009). In our study, both strong sensitizers, CinA and MIT, led to the accumulation of Nrf2 and slight accumulation for RESO that acts as a weak sensitizer. However, pre/pro haptens as EUG, FAR and GER didn't induced the Nrf2 pathway activation meaning that these molecules act in a different way for Nrf2 activation or that they are not activated in these study conditions.

Genes expression

The hypothesis that chemical sensitizers can be perceived as a danger signal by DCs has been also proposed based on signalling pathways identified upon chemical sensitizer treatment and

known to be triggered by danger signals such as toll-like receptor agonists (Ade *et al.*, 2009). HMOX1 and NQO1 genes are upregulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line. In the nucleus, Nrf2 binds to the consensus sequence ARE allowing the transcription of many target genes [heme oxygenase-1 (*hmox1* or *ho-1*), NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (*nqo1*), glutathione- S-transferase (*gst*)] (Ryan *et al.*, 2004; Watai *et al.*, 2007) showed an upregulation of Nrf2-inducible genes in microarray studies using peripheral blood-derived DC treated with dinitrobenzenesulfonic acid for 24 h. All these results have led to the KeratinoSens assay development based on Nrf2 transcriptional activity for *in vitro* detection of chemical sensitizers (Emter *et al.*, 2010). In the same vein, we have been interested in studying the gene signature in THP-1 after sensitizers exposure. To address the KE2, we realised the SENS-IS adapted on the same set of genes. The results seem to well correlated with strong sensitizers. Similarly, we observed that particular genes could be used as markers for strong sensitizers as *hmox1*, *nqo1* or *cxcl14*.

Modulation of THP-1 phenotype as KE3

Several *in vitro* studies reported that human DCs were able to acquire a mature phenotype in response to chemical sensitizer exposure, characterized by the upregulation of (1) MHC-II molecules, costimulatory molecules, chemokine receptors and (2) the synthesis of cytokines (Aiba *et al.*, 1997). For these reasons, we decided to investigate cell surface markers CD54/CD86 and cytokines production as KE2.

CD54/CD86

A large structural variety of sensitizers is considered to react with nucleophilic sites of proteins, based on their intrinsic electrophilic nature. In addition, binding to cysteine or lysine residues within critical proteins, which trigger subsequent MAPK signaling pathway modulation, is also addressed as a key factor in up-regulating dendritic cell (DC) activation markers as covered by the h-CLAT (Guedes *et al.*, 2017; Megherbi *et al.*, 2009). The initiating event in these cell-based as KeratinoSens and h-CLAT assays appears to rely on the reactivity of a chemical (Otsubo *et al.*, 2017).

DC maturation is characterized by expression of major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules, such as CD40, CD54, CD83, and CD86. In the h-CLAT method, the modulation of the CD86 and CD54 cell surface markers are measured by flow cytometry in

THP-1 cells and used to discriminate sensitizer and non-sensitizer chemicals (OECD TG 442E, 2016). Also, it has been shown that ROS production plays a role in the upregulation of surface molecules such as CD86, CD40, and HLA-DR known to be important for DC function in response to DNCB (Byamba *et al.*, 2010; Mizuashi *et al.*, 2005) In this study, we did not follow h-CLAT guidelines (OECD, 2016a). Despite this fact, we obtained the same results as describe in the literature except for FAR which is positive only with CD54.

Cytokines expression and quantification

Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules (Hulette *et al.*, 2002; Reuter *et al.*, 2011). After a membrane cytokine array, we have selected key cytokines and quantified by ELISA. Among these 36 cytokines, IL-8, -16 and -18 and CCL-4 and -5 and Serpin-E1 were retained.

IL-8 is a potent chemotactic peptide for neutrophils, T lymphocytes, basophils (Leonard *et al.*, 1990), as well as natural killer cells (Sebok *et al.*, 1993). IL-8 has been tested under various conditions as a marker for sensitization (Ouwehand *et al.*, 2010; Python *et al.*, 2009, 2007). IL-18 (IFN- γ inducing factor) has been demonstrated to favor Th-1 type immune response by enhancing the secretion of pro-inflammatory mediators such as TNF- α , IL-8 and IFN- γ , and to play a key proximal role in the induction of ACD (Cumberbatch *et al.*, 2001). IL-16 acts as an immunomodulatory cytokine that contributes to the regulatory process of T cell recruitment and activation at sites of inflammation (Cruikshank *et al.*, 1987). Interestingly, a promoter polymorphism in the IL-16 gene is suspected to be associated with the susceptibility to ACD (Reich *et al.*, 2003). CCL5/RANTES plays a role in initiating migration of irritant-exposed human Langerhans cells (LCs) out of the epidermis. Furthermore, migration to the dermis occurs under the influence of CCL2 (MCP-1) and CCL5 (RANTES), which are secreted by fibroblasts (Ouwehand *et al.*, 2010). CCL4/MIP-1 β is a powerful monocyte chemoattractant that activate cells by increasing intracellular [Ca²⁺] and releasing arachidonic acid. MIP-1 β is chemotactic for a wide variety of inflammatory cells, including T lymphocytes, NK cells, monocytes and macrophages (Loetscher *et al.*, 1994; Taub *et al.*, 1995; Ugucioni *et al.*, 1995). It was shown to be involved in T lymphocyte trafficking into lymph nodes (Tedla *et al.*, 1998).

We have shown that IL-18 could be used a cytokine marker for strong sensitizer as MIT whereas IL-16 is produced by the THP-1 after irritant and sensitizers exposure. Despite the results obtained that are not exploitable in terms of statistics (no IL-8 detected after THP-1

treated by DMSO vehicle), IL-8 appears to be a good marker for differentiating sensitizers from irritants.

Proliferation of T-cell as KE4

DCs when they are activated migrate to the draining lymph nodes where they present haptenized peptides to naïve T cells. These T lymphocytes will then become activated in order to induce a specific response to the haptenized peptide (Martin, 2014; Vocanson *et al.*, 2009). Furthermore, T cells proliferate and migrate from the lymph nodes to the blood where they recirculate between the lymphoid organs and the skin. Following our hypothesis that sensitizers may affect the sensitization phase by modifying the cellular microenvironment with ROS production, oxidative stress and/or TP-1 phenotype, we addressed the effect of THP-1 exposed to various chemicals on CD4⁺ lymphocyte proliferation. In our work, we investigated an original coculture of THP-1 previously stimulated by our chemicals during 24 h and purified allogeneic total CD4⁺ T cells during 5 days. These results show that both T cell activation and proliferation to sensitizers is readily detectable. We observed an increase proliferation for strong sensitizers and moderate compared to their vehicle control and no significant treatment after irritant treatment. However, this T-cell proliferation does not appear as a dose-response related to the potency of the sensitizer, as well as response is inherent to the donor.

Conclusion

A key step in the skin sensitization process is the formation of a covalent adduct between the chemical sensitizer and endogenous proteins in the skin. The intrinsic protein reactivity of chemical sensitizers (or after their oxidation/metabolism) is generally assumed to be a shared property and could be the common characteristic detected by DCs rather than their structure or size. Moreover, it is now well accepted that, according to the danger model of Matzinger (1998) and in the context of contact sensitization (Kimber and Dearman, 2002), DCs need to receive danger signals from their environment to be fully activated and to migrate to lymph nodes. Experimental evidences suggested that chemical sensitizers themselves could provide a danger signal, allowing the maturation of DCs (Ade *et al.*, 2007; Boislève *et al.*, 2004; Casati *et al.*, 2005). In the same way, Nrf2 is one of the key players in contact allergy, integrating

chemical sensitizer's protein reactivity and translating this signal into a biological response in DCs (Kim *et al.*, 2009) and that it is also activated by chemical sensitizers in DCs (Ade *et al.*, 2009). A good target for contact allergens is the cytosolic protein Keap1, allowing accumulation of Nrf2 and its activation.

Taking into account these different parameters and the key role of DC in ACD, our study aims to propose a strategy to categorize allergens by combining multiple activation pathways within a same cell-line. For this specific purpose, we have selected THP-1 cell as DC surrogate and furthermore, this cell line is regulatory validated with the h-CLAT test. This strategy is presented in Figure 7. Likewise, THP-1 cells is known to be activated by a larger panel of chemical sensitizers and even by all pre-/prohaptens, confirming that this cell line is a useful tool for *in vitro* sensitization screening (Nukada *et al.*, 2011).

In summary, this integrated-AOP seems to present a good prediction for strong sensitizers as CinA and MIT according to the Table 4. These results are mostly correlated with a production of ROS and reduction of glutathione meaning that modifications of the danger signal affects the sensitization outcome but depends on the type of allergens. Chemicals with cysteine/lysine (CIN) and high cysteine (mainly MIT) reactivity were true activators of the Nrf2 pathway in our model, whereas other chemicals such as the lysine-reactive as RESO showed an Nrf2-independent activation. For pre- and pro-haptens as EUG, FAR and GER, we can suspected less metabolic capacity of THP-1 cells or another activation pathway than Nrf2.

This study shows that all sensitizers are not equal in intracellular signalization for inducing an expression of oxidative stress, cell-surface markers, DC maturation. Conversely, all sensitizers appear to induce T-cell proliferation while not for irritants.

We provide that DC like as THP-1 testing coupled to different endpoints similar to KEs as described in the AOP of skin sensitization could be used as a single test to identify and classify skin sensitizing chemicals, summarized in Figure 8.

References

- Ade, N., Antonios, D., Kerdine-Romer, S., Boisleve, F., Rousset, F., Pallardy, M., 2007. NF-kappaB plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO(4) but not by DNCB. *Toxicol. Sci.* 99, 488–501. doi:10.1093/toxsci/kfm178
- Ade, N., Leon, F., Pallardy, M., Peiffer, J.-L., Kerdine-Romer, S., Tissier, M.-H., Bonnet, P.-A., Fabre, I., Ourlin, J.-C., 2009. HMOX1 and NQO1 genes are upregulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: role of the Keap1/Nrf2 pathway. *Toxicol. Sci.* 107, 451–460. doi:10.1093/toxsci/kfn243
- Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., Tagami, H., 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.* 27, 3031–3038. doi:10.1002/eji.1830271141
- Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Kosaka, N., Ishikawa, M., Nukada, Y., Miyazawa, M., Ito, Y., Nishiyama, N., Itagaki, H., 2010. 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.* 38, 275–284.
- Aw Yeang, H.X., Hamdam, J.M., Al-Huseini, L.M.A., Sethu, S., Djouhri, L., Walsh, J., Kitteringham, N., Park, B.K., Goldring, C.E., Sathish, J.G., 2012. Loss of transcription factor nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) leads to dysregulation of immune functions, redox homeostasis, and intracellular signaling in dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 287, 10556–10564. doi:10.1074/jbc.M111.322420
- Baird, L., Dinkova-Kostova, A., 2011. The cytoprotective role of the Keap1–Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol.* 85, 241–272. doi:10.1007/s00204-011-0674-5
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252. doi:10.1038/32588
- Basketter, D.A., Blaikie, L., Dearman, R.J., Kimber, I., Ryan, C.A., Gerberick, G.F., Harvey, P., Evans, P., White, I.R., Rycroft, R.J.G., 2000. Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42, 344–348. doi:10.1034/j.1600-0536.2000.042006344.x
- Boislève, F., Kerdine-Römer, S., Rougier-Larzat, N., Pallardy, M., 2004. Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: Role of TNF- α and MAPK. *J. Invest. Dermatol.* 123, 494–502. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23229.x
- Buehler, E. V, 1965. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig . *Arch. Dermatol.* 91, 171–177.
- Byamba, D., Kim, T.G., Kim, D.H., Je, J.H., Lee, M.-G., 2010. The Roles of Reactive Oxygen Species Produced by Contact Allergens and Irritants in Monocyte-derived Dendritic Cells. *Ann. Dermatol.* 22, 269–278. doi:10.5021/ad.2010.22.3.269
- Casati, S., Aeby, P., Basketter, D.A., Cavani, A., Gennari, A., Gerberick, G.F., Griem, P., Hartung, T., Kimber, I., Lepoittevin, J.-P., Meade, B.J., Pallardy, M., Rougier, N., Rousset, F., Rubinstenn, G., Sallusto, F., Verheyen, G.R., Zuang, V., 2005. Dendritic cells as a tool for the predictive identification of skin sensitisation hazard. *Altern. Lab. Anim.* 33, 47–62.

Cottrez, F., Boitel, E., Auriault, C., Aeby, P., Groux, H., 2015. Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model. Development of the SENS-IS assay. *Toxicol. Vitro.* 29, 787–802. doi:10.1016/j.tiv.2015.02.012

Cruikshank, W.W., Berman, J.S., Theodore, A.C., Bernardo, J., Center, D.M., 1987. Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* 138, 3817–3823.

Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Antonopoulos, C., Groves, R.W., Kimber, I., 2001. Interleukin (IL)-18 induces Langerhans cell migration by a tumour necrosis factor-alpha- and IL-1beta-dependent mechanism. *Immunology* 102, 323–330.

de Bourayne, M., Gallais, Y., El Ali, Z., Rousseau, P., Damiens, M.-H., Cochet, C., Filhol, O., Chollet-Martin, S., Pallardy, M., Kerdine-Romer, S., 2017. Protein kinase CK2 controls T-cell polarization through dendritic cell activation in response to contact sensitizers. *J. Leukoc. Biol.* 101, 703–715. doi:10.1189/jlb.3A0715-320RR

Dickinson, D.A., Levonen, A.-L., Moellering, D.R., Arnold, E.K., Zhang, H., Darley-Usmar, V.M., Forman, H.J., 2004. Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1152–1159. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.011

El Ali, Z., Delomenie, C., Botton, J., Pallardy, M., Kerdine-Romer, S., 2017. Dendritic cells' death induced by contact sensitizers is controlled by Nrf2 and depends on glutathione levels. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 322, 41–50. doi:10.1016/j.taap.2017.02.014

Emter, R., Ellis, G., Natsch, A., 2010. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245, 281–90. doi:10.1016/j.taap.2010.03.009

Esser, P.R., Woffle, U., Durr, C., von Loewenich, F.D., Schempp, C.M., Freudenberg, M.A., Jakob, T., Martin, S.F., 2012. Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation. *PLoS One* 7, e41340. doi:10.1371/journal.pone.0041340

European Chemicals Agency, 2016. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R7a: Endpoint specific guidance., European Chemicals Agency. doi:10.2823/2611

European Commission, 2009. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetics products, Official Journal of the European Union.

European Parliament, Council of the European union, 2006. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/4. doi:http://eur-lex.europa.eu/pri/en/oj/dat/2003/l_285/l_28520031101en00330037.pdf

Franco, R., Cidlowski, J.A., 2012. Glutathione efflux and cell death. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 1694–1713. doi:10.1089/ars.2012.4553

Franco, R., Cidlowski, J.A., 2006. SLCO/OATP-like transport of glutathione in FasL-induced apoptosis: glutathione efflux is coupled to an organic anion exchange and is necessary for the progression of the execution phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 281, 29542–29557. doi:10.1074/jbc.M602500200

Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Bailey, R.E., Chaney, J.G., Morrall, S.W., Lepoittevin, J.-P., 2004.

Development of a Peptide Reactivity Assay for Screening Contact Allergens. *Toxicol. Sci.* 81, 332–343. doi:10.1093/toxsci/kfh213

Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Foertsch, L.M., Price, B.B., Chaney, J.G., Lepoittevin, J.-P., 2007. Quantification of Chemical Peptide Reactivity for Screening Contact Allergens: A Classification Tree Model Approach. *Toxicol. Sci.* 97, 417–427. doi:10.1093/toxsci/kfm064

Gilda, J.E., Gomes, A. V., 2013. Stain-free total protein staining is a superior loading control to b-actin for western blots. *Anal. Biochem.* 440, 186–188. doi:10.1016/j.ab.2013.05.027

Guedes, S., Neves, B., Vitorino, R., Domingues, R., Cruz, M.T., Domingues, P., 2017. Contact dermatitis: in pursuit of sensitizer's molecular targets through proteomics. *Arch. Toxicol.* 91, 811–825. doi:10.1007/s00204-016-1714-y

Hatem, E., Berthonaud, V., Dardalhon, M., Lagniel, G., Baudouin-Cornu, P., Huang, M.-E., Labarre, J., Chdin, S., 2014. Glutathione is essential to preserve nuclear function and cell survival under oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 75 Suppl 1, S25-6. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.746

Holland, R., Fishbein, J.C., 2010. Chemistry of the Cysteine Sensors in Kelch-Like ECH-Associated Protein 1. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1749–1761. doi:10.1089/ars.2010.3273

Hulette, B.A., Ryan, C.A., Gerberick, G.F., 2002. Elucidating changes in surface marker expression of dendritic cells following chemical allergen treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 226–233.

Kensler, T.W., Wakabayashi, N., Biswal, S., 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 89–116. doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046

Kim, S.T., Takeuchi, K., Sun, Z.-Y.J., Touma, M., Castro, C.E., Fahmy, A., Lang, M.J., Wagner, G., Reinherz, E.L., 2009. The alphabeta T cell receptor is an anisotropic mechanosensor. *J. Biol. Chem.* 284, 31028–31037. doi:10.1074/jbc.M109.052712

Kimber, I., Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Dearman, R.J., 2011. Chemical allergy: translating biology into hazard characterization. *Toxicol. Sci.* 120 Suppl, S238-68. doi:10.1093/toxsci/kfq346

Kimber, I., Dearman, R.J., 2002. Allergic contact dermatitis: the cellular effectors. *Contact Dermatitis* 46, 1–5. doi:10.1034/j.1600-0536.2002.460101.x

Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W., Basketter, D.A., 1994. The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicology* 93, 13–31. doi:10.1016/0300-483X(94)90193-7

Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., Yamamoto, M., 2004. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7130–7139. doi:10.1128/MCB.24.16.7130-7139.2004

Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Moser, B., 1994. Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 8, 1055–1060.

Loveless, S.E., Api, A.-M., Crevel, R.W.R., Debruyne, E., Gamer, A., Jowsey, I.R., Kern, P., Kimber, I., Lea,

L., Lloyd, P., Mehmood, Z., Steiling, W., Veenstra, G., Woolhiser, M., Hennes, C., 2010. Potency values from the local lymph node assay: application to classification, labelling and risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 56, 54–66. doi:10.1016/j.yrtph.2009.08.016

MacLeod, A.K., McMahon, M., Plummer, S.M., Higgins, L.G., Penning, T.M., Igarashi, K., Hayes, J.D., 2009. Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: demonstration that the KEAP1-NRF2 pathway, and not the BACH1-NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds. *Carcinogenesis* 30, 1571–1580. doi:10.1093/carcin/bgp176

Macoch, M., Morzadec, C., Génard, R., Pallardy, M., Kerdine-Römer, S., Fardel, O., Vernhet, L., 2015. Nrf2-dependent repression of interleukin-12 expression in human dendritic cells exposed to inorganic arsenic. *Free Radic. Biol. Med.* 88, 381–390. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.003

Magnusson, B., Kligman, A.M., 1969. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol.* 52, 268–276.

Martin, S.F., 2014. T Lymphocytes as Tools in Diagnostics and Immunotoxicology, T lymphocytes as tools in diagnostic and immunotoxicology. doi:10.1007/978-3-0348-0726-5

Martin, S.F., Esser, P.R., Weber, F.C., Jakob, T., Freudenberg, M.A., Schmidt, M., Goebeler, M., 2011. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy* 66, 1152–1163. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02652.x

Matzinger, P., 1998. An innate sense of danger. *Semin. Immunol.* 10, 399–415. doi:10.1006/smim.1998.0143

Megherbi, R., Kiorpelidou, E., Foster, B., Rowe, C., Naisbitt, D.J., Goldring, C.E., Park, B.K., 2009. Role of protein haptentation in triggering maturation events in the dendritic cell surrogate cell line THP-1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 120–132. doi:10.1016/j.taap.2009.05.001

Migdal, C., Botton, J., El Ali, Z., Azoury, M.-E., Guldemann, J., Gimenez-Arnau, E., Lepoittevin, J.-P., Kerdine-Romer, S., Pallardy, M., 2013. Reactivity of chemical sensitizers toward amino acids in cellulose plays a role in the activation of the Nrf2-ARE pathway in human monocyte dendritic cells and the THP-1 cell line. *Toxicol. Sci.* 133, 259–274. doi:10.1093/toxsci/kft075

Migdal, C., Tailhardat, M., Courtellemont, P., Haftek, M., Serres, M., 2010. Responsiveness of human monocyte-derived dendritic cells to thimerosal and mercury derivatives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 246, 66–73. doi:10.1016/j.taap.2010.04.007

Mizuashi, M., Ohtani, T., Nakagawa, S., Aiba, S., 2005. Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 124, 579–586. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23624.x

Natsch, A., 2009. The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers-Functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers. *Toxicol. Sci.* 113, 284–292. doi:10.1093/toxsci/kfp228

Natsch, A., Emter, R., 2016. Nrf2 activation as a key event triggered by skin sensitizers: The development of the stable KeratinoSens reporter gene assay. *Altern. Lab. Anim.* 44, 443–451.

Natsch, A., Emter, R., 2008. Skin Sensitizers Induce Antioxidant Response Element Dependent Genes:

Application to the In Vitro Testing of the Sensitization Potential of Chemicals. *Toxicol. Sci.* 102, 110–119. doi:10.1093/toxsci/kfm259

Nukada, Y., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Hirota, M., Sakaguchi, H., Sasa, H., Nishiyama, N., 2012. Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150–60. doi:10.1016/j.tiv.2012.07.001

Nukada, Y., Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Mugita, N., Hirota, M., Miyazawa, M., Ito, Y., Sasa, H., Nishiyama, N., 2011. Predictive performance for human skin sensitizing potential of the human cell line activation test (h-CLAT). *Contact Dermatitis* 65, 343–353. doi:10.1111/j.1600-0536.2011.01952.x

OECD, 2017. Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation.

OECD, 2016a. Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT). doi:http://dx.doi.org/10.1787/9789264264359-en

OECD, 2016b. Guidance document on the reporting of defined approaches to be used within integrated approaches to testing and assessment. ENV/JM/MONO(2016)28. OECD Publishing, Paris.

OECD, 2016c. Guidance document on the reporting of defined approaches and individual information sources to be used within integrated approaches to testing and assessment (IATA) for skin sensitization. ENV/JM/MONO(2016)29. OECD Publishing, Paris.

OECD, 2015a. Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA).

OECD, 2015b. Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation. *OECD Environ. Heal. Saf. Publ.* 1–20. doi:10.1787/9789264229822-en

OECD, 2012. The adverse outcome pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding for proteins. Part 1. Scientific evidence OECD environment, health and safety publications series on testing and assessment.

OECD, 2002. Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay 1–7.

OECD, 1992. Test No. 406: Skin Sensitisation, Guideline for testing of chemicals. doi:10.1787/9789264070684-en

Otsubo, Y., Nishijo, T., Miyazawa, M., Saito, K., Mizumachi, H., Sakaguchi, H., 2017. Binary test battery with KeratinoSens™ and h-CLAT as part of a bottom-up approach for skin sensitization hazard prediction. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 88, 118–124. doi:https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.06.002

Ouwehand, K., Spiekstra, S.W., Reinders, J., Scheper, R.J., de Gruijl, T.D., Gibbs, S., 2010. Comparison of a novel CXCL12/CCL5 dependent migration assay with CXCL8 secretion and CD86 expression for distinguishing sensitizers from non-sensitizers using MUTZ-3 Langerhans cells. *Toxicol. In Vitro* 24, 578–585. doi:10.1016/j.tiv.2009.10.014

Python, F., Goebel, C., Aeby, P., 2009. Comparative DNA microarray analysis of human monocyte derived dendritic cells and MUTZ-3 cells exposed to the moderate skin sensitizer cinnamaldehyde. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 239, 273–283. doi:10.1016/j.taap.2009.06.003

Python, F., Goebel, C., Aeby, P., 2007. Assessment of the U937 cell line for the detection of contact

allergens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220, 113–124. doi:10.1016/j.taap.2006.12.026

Raffalli, C., Clouet, E., Kuresepi, S., Damiens, M.-H., Lepoittevin, J.-P., Pallardy, M., Ferret, P.-J., Giménez-Arnau, E., Kerdine-Römer, S., 2017. Fragrance Allergens Linalool and Limonene Allylic Hydroperoxides in Skin Allergy: Mechanisms of Action Focusing on Transcription Factor Nrf2. *Toxicol. Sci.* 1–10. doi:10.1093/toxsci/kfx207

Reich, K., Westphal, G., König, I.R., Mossner, R., Krüger, U., Ziegler, A., Neumann, C., Schnuch, A., 2003. Association of allergic contact dermatitis with a promoter polymorphism in the IL16 gene. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112, 1191–1194. doi:10.1016/j.jaci.2003.09.012

Requejo, R., Hurd, T.R., Costa, N.J., Murphy, M.P., 2010. Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage. *FEBS J.* 277, 1465–1480. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07576.x

Reuter, H., Spieker, J., Gerlach, S., Engels, U., Pape, W., Kolbe, L., Schmucker, R., Wenck, H., Diembeck, W., Wittern, K.P., Reisinger, K., Schepky, A.G., 2011. In vitro detection of contact allergens: Development of an optimized protocol using human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *Toxicol. Vitro.* 25, 315–323. doi:10.1016/j.tiv.2010.09.016

Ryan, C.A., Gildea, L.A., Hulette, B.C., Dearman, R.J., Kimber, I., Gerberick, G.F., 2004. Gene expression changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301–316. doi:10.1016/j.toxlet.2004.02.002

Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., Itagaki, H., Toyoda, H., Suzuki, H., 2006. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol. In Vitro* 20, 774–84. doi:10.1016/j.tiv.2005.10.014

Sebok, K., Woodside, D., al-Aoukaty, A., Ho, A.D., Gluck, S., Maghazachi, A.A., 1993. IL-8 induces the locomotion of human IL-2-activated natural killer cells. Involvement of a guanine nucleotide binding (Go) protein. *J. Immunol.* 150, 1524 LP-1534.

Stepkowski, T.M., Kruszewski, M.K., 2011. Molecular cross-talk between the NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 1186–1195. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.033

Taub, D.D., Proost, P., Murphy, W.J., Anver, M., Longo, D.L., van Damme, J., Oppenheim, J.J., 1995. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 95, 1370–1376. doi:10.1172/JCI117788

Tedla, N., Wang, H.W., McNeil, H.P., Di Girolamo, N., Hampartzoumian, T., Wakefield, D., Lloyd, A., 1998. Regulation of T lymphocyte trafficking into lymph nodes during an immune response by the chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1 alpha and MIP-1 beta. *J. Immunol.* 161, 5663–5672.

Uguccioni, M., D'Apuzzo, M., Loetscher, M., Dewald, B., Baggiolini, M., 1995. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 25, 64–68. doi:10.1002/eji.1830250113

Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H., 2015. Assessing

skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337–351. doi:10.1016/j.yrtph.2014.12.008

Vandebriel, R.J., Loveren, H. Van, 2010. Non-animal sensitization testing: State-of-the-art. *Crit. Rev. Toxicol.* 40, 389–404. doi:10.3109/10408440903524262

Vocanson, M., Hennino, A., Rozières, A., Poyet, G., Nicolas, J.F., 2009. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 64, 1699–1714. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02082.x

Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breittmayer, J.-P., Cottrez, F., Groux, H., 2003. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18, 605–617.

Watai, Y., Kobayashi, A., Nagase, H., Mizukami, M., McEvoy, J., Singer, J.D., Itoh, K., Yamamoto, M., 2007. Subcellular localization and cytoplasmic complex status of endogenous Keap1. *Genes Cells* 12, 1163–1178. doi:10.1111/j.1365-2443.2007.01118.x

Yamamoto, T., Suzuki, T., Kobayashi, A., Wakabayashi, J., Maher, J., Motohashi, H., Yamamoto, M., 2008. Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2758–2770. doi:10.1128/MCB.01704-07

Legends

Figure 1: ROS production and GSH depletion

(A) (B) Results shown for chemicals solubilized in PBS

(C) (D) Results shown for chemicals solubilized in DMSO

For ROS production (A, C), THP-1 (1×10^6 cells/ml) suspended in PBS are pretreated with chemicals at subtoxic concentration (30 min, 1 h and 2h), fluorescence intensity was measured by flow cytometry.

2-way ANOVA with Bonferroni post hoc analysis. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n = 4$, Results displayed as average $n = 4$ with SEM.

For GSH depletion (B, D), THP-1 (0.5×10^6) were stimulated at subtoxic dose for 1 h and analyzed by luminescence. Results were expressed as fold induction compared with untreated cells. Data were expressed as the mean of GSH/GSSG ratio \pm SEM.

8 independent experiments were performed in triplicate (except for Eug, Far, Ger: 5 independent experiments in triplicate).

*** $p < 0.001$ versus control cells, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, Mann-Whitney U tests

Figure 2: Nrf2 activation pathway

(A) Nrf2 protein accumulation

THP-1 (3×10^6) were stimulated at subtoxic dose for 6 h. Results (fold induction) were expressed as the *ratio* of Nrf2 proteins to the loading control and were compared with the vehicle control (PBS or DMSO). Data were expressed as mean \pm SEM. 4 independent experiments were performed in duplicate.

$n=4$, * $p < 0.05$, Mann-Whitney U tests.

Representative western blot.

(B) DNA-binding ELISA for activated Nrf2 transcription factor

THP-1 (5×10^6) were stimulated at subtoxic dose for 6 h and analyzed by spectrophotometry (450 nm). Results were expressed as fold induction compared with control samples (corresponding vehicle-treated cells, PBS or DMSO). Data were expressed as mean \pm SEM. 3 independent experiments were performed in duplicate.

$n=3$, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, Mann-Whitney U tests.

Figure 3: CD54/CD86 measurement

CD86 and CD54 were measured on THP-1 cells (1×10^6) after 24 h of treatment at subtoxic dose by flow cytometry.

Data were expressed using RFI \pm SEM as described above. 7 independent experiments were performed.

* $p < 0.05$ versus control cells, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,005$, Mann-Whitney U tests.

Figure 4: Cytokines expression

THP-1 cells (1×10^6) were treated with test chemicals at subtoxic dose for 24 h (stimulation of 1×10^6). Recover the supernatant and follow Proteome Profiler protocol (Human cytokine Array) from R&D Systems: membrane-based antibody array for the parallel determination of the relative levels of selected human cytokines and chemokines (36 per membrane)

Figure 5: Cytokines quantification

THP-1 (1×10^6) were stimulated at subtoxic dose for 24 h and analyzed by spectrophotometry. Results were expressed as concentration compared to standard curve using computer software generating a four parameter logistic (4-PL) according to R&D systems' instructions. Data were expressed as the mean of concentration \pm SEM. 6 independent experiments were performed in duplicate. *** $p < 0.001$ versus control cells, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, Mann-Whitney U tests.

Figure 6: T-cell proliferation

(A) Representative results shown for chemicals solubilized in PBS.

(B) Representative results shown for chemicals solubilized in DMSO

THP-1 were stimulated with chemicals, NiSO₄ (500 mM) and LPS (100 ng/mL) for 24 h and then cocultured (10^5 cells/ml) during 5 days with purified allogeneic total CD4⁺ T cells (10^6 cells/ml, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) were labeled with 0.5 mM CFSE.

Figure 7: Strategy followed

Figure 8: Focus on KEs within the AOP-integrated cell

Tables

Table 1: Chemicals selected

Table 2: Concentration of molecules used for the experiments

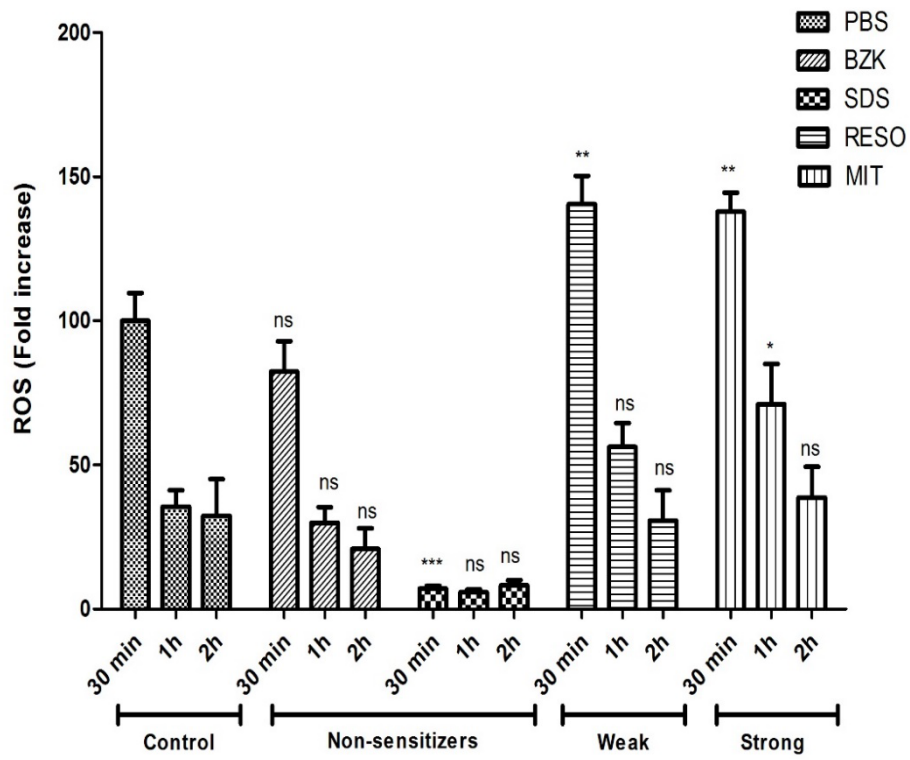
THP-1 cells were exposed to different concentrations of chemicals for 24 h. Cell viability was determined and the concentrations inducing 30% of mortality were chosen.

Table 3: Fold increase of genes induced compared to vehicle (PBS or DMSO)

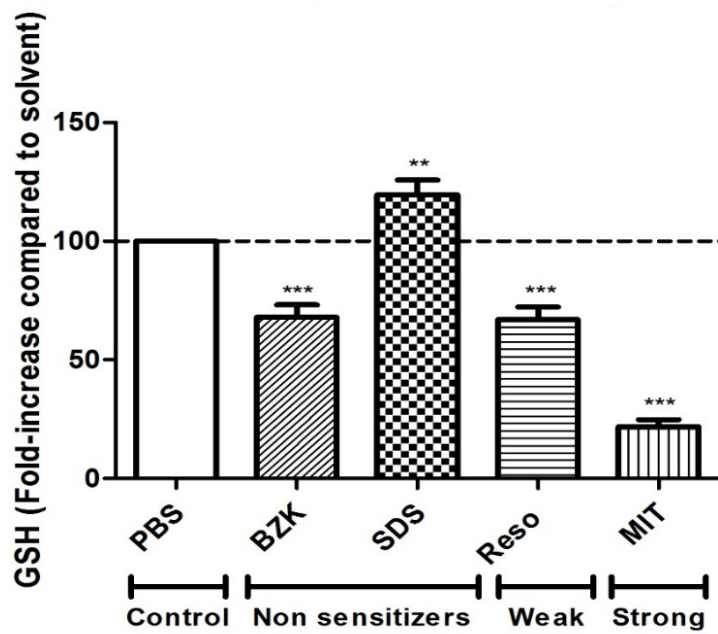
Table 4: Summary results and number of genes induced in the SENS-IS adapted.

Positive classification in the SENS-IS adapted: $IRR \geq 12$; $SENS-IS \geq 7$; $ARE \geq 7$

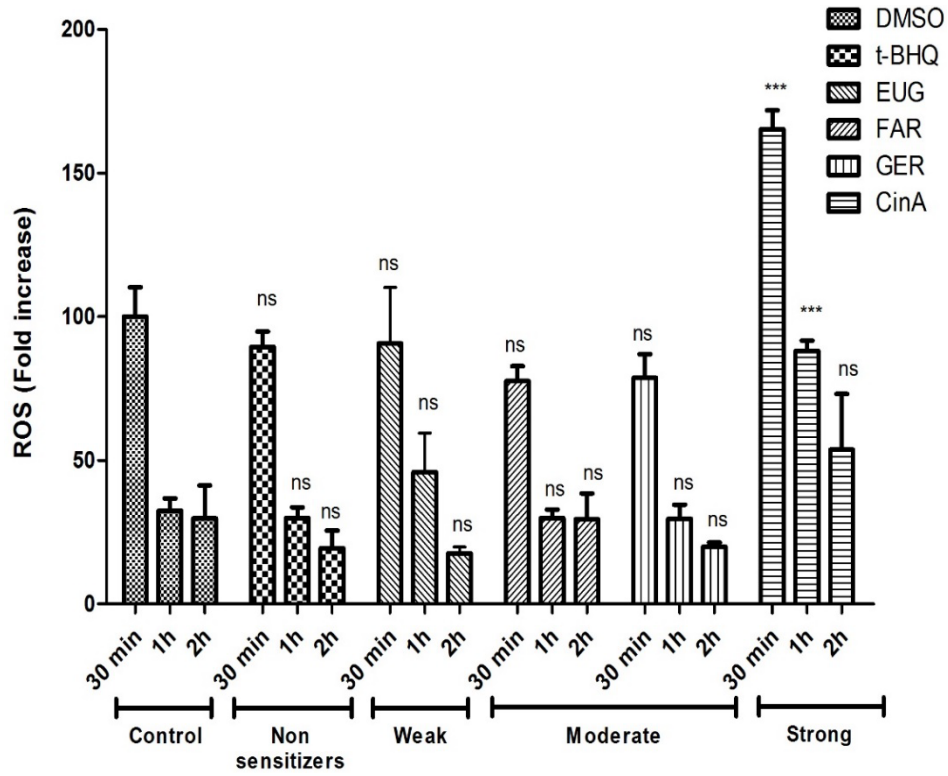
A.



B.



C.



D.

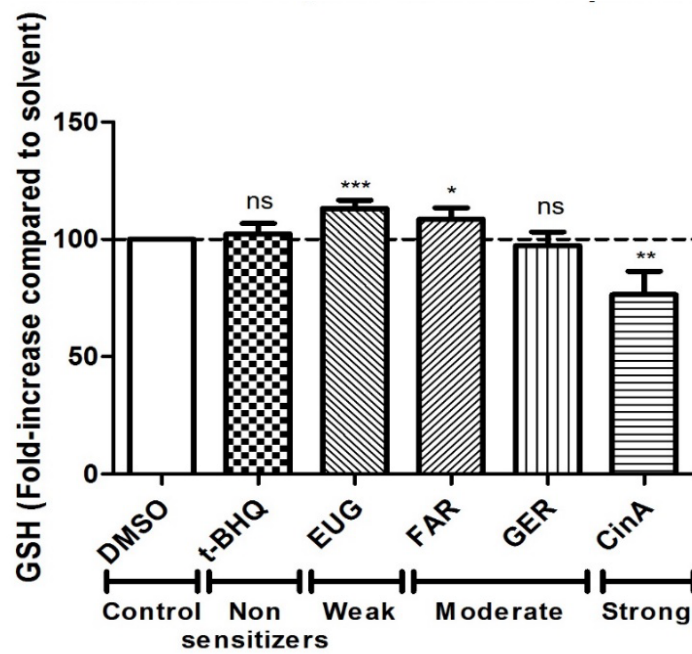
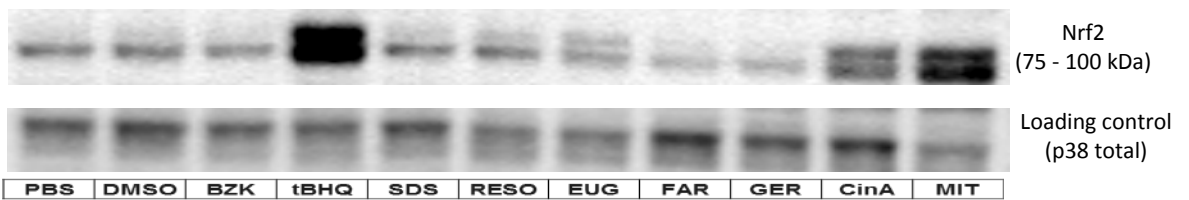
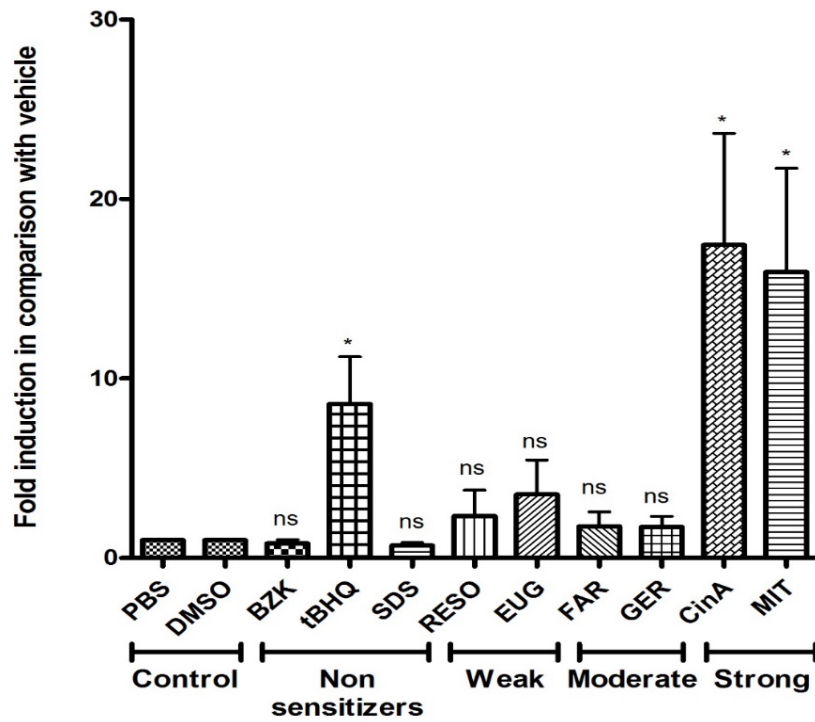


Figure 1

A.



B.

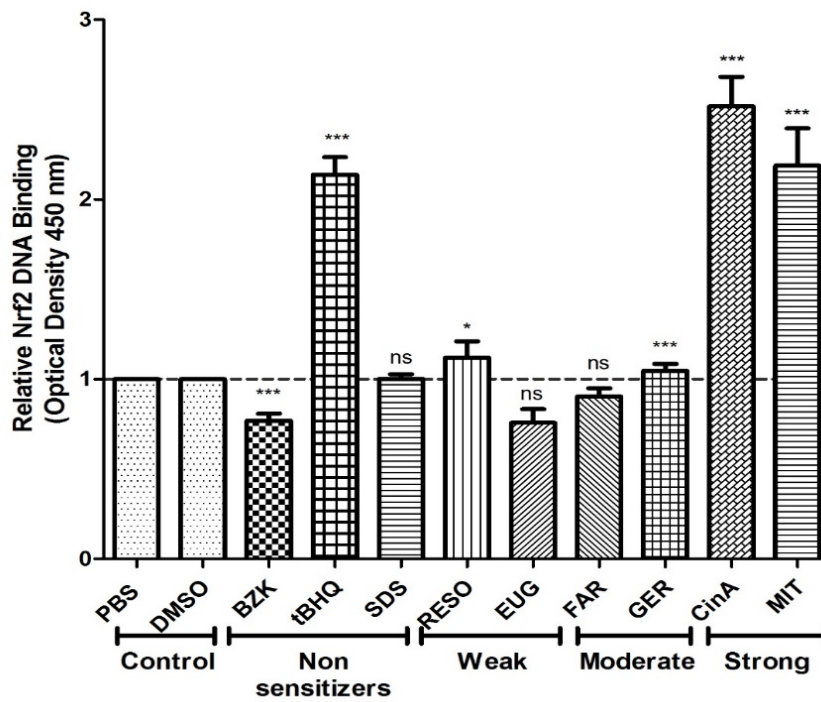


Figure 2

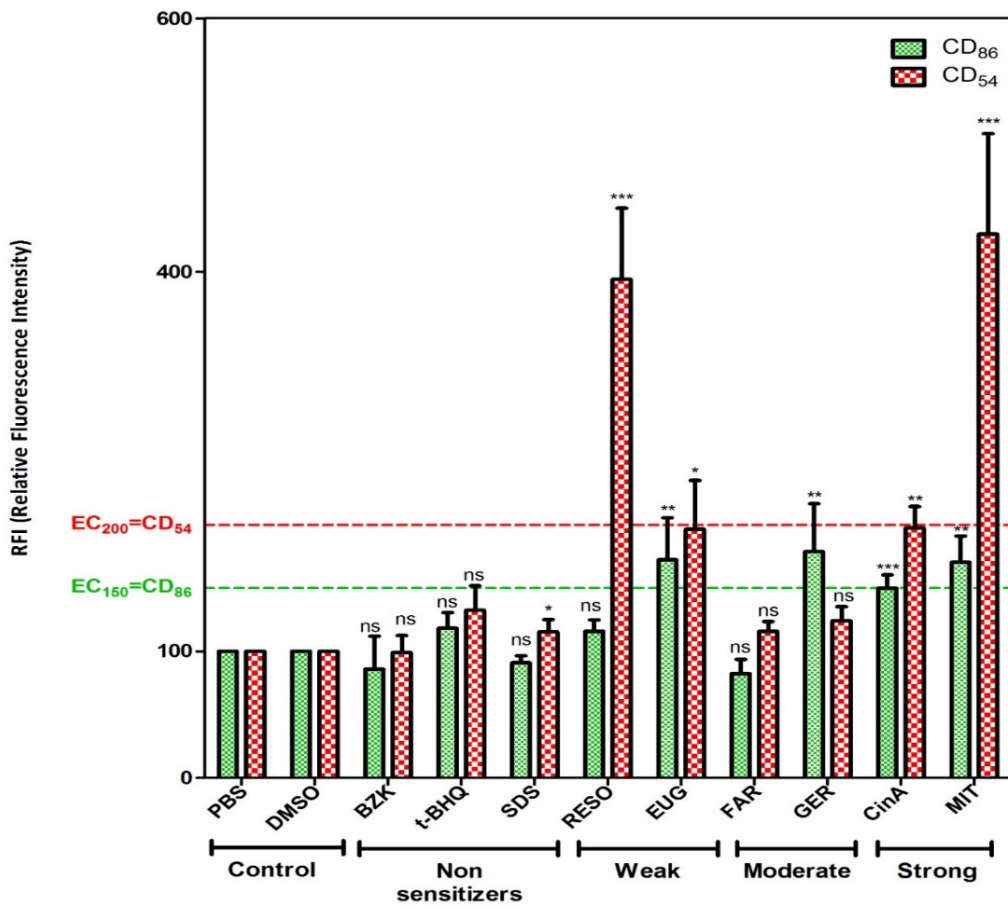


Figure 3

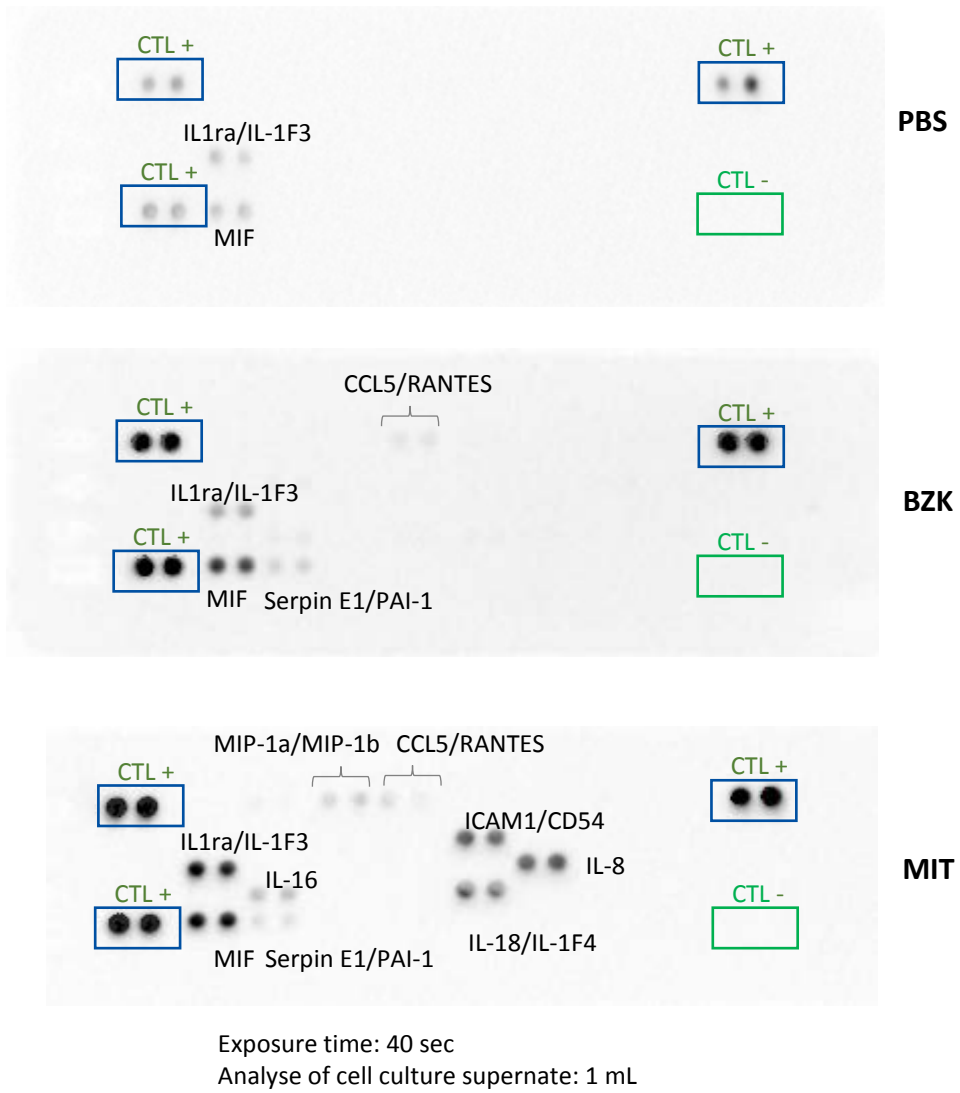
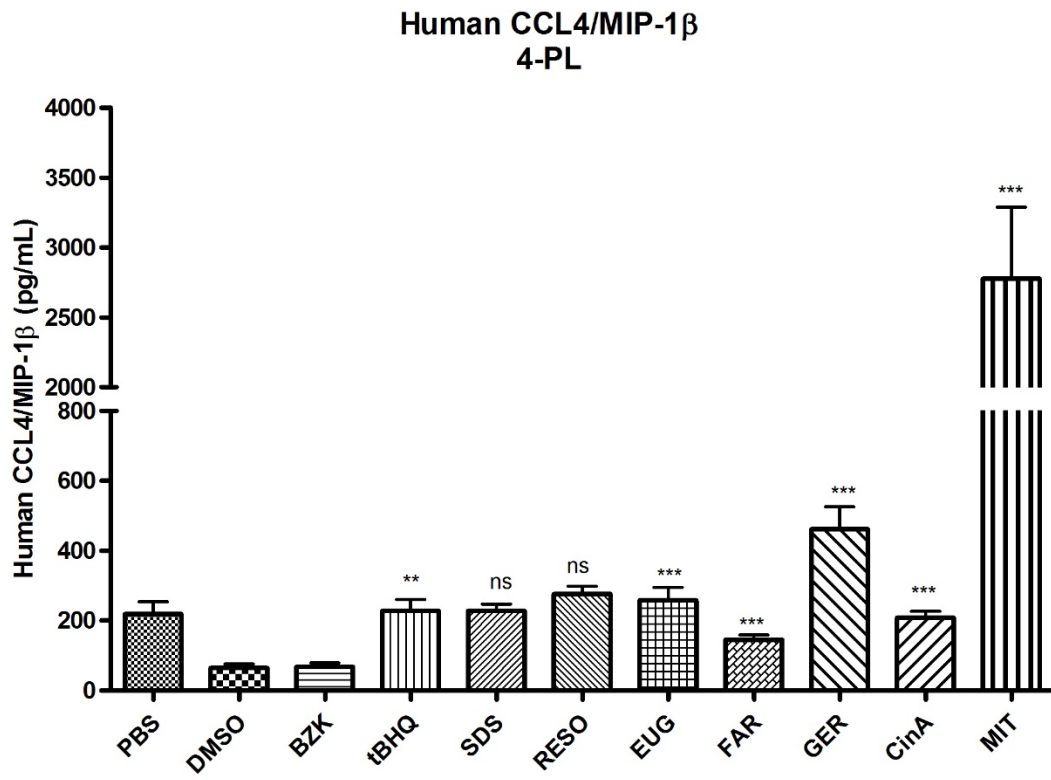
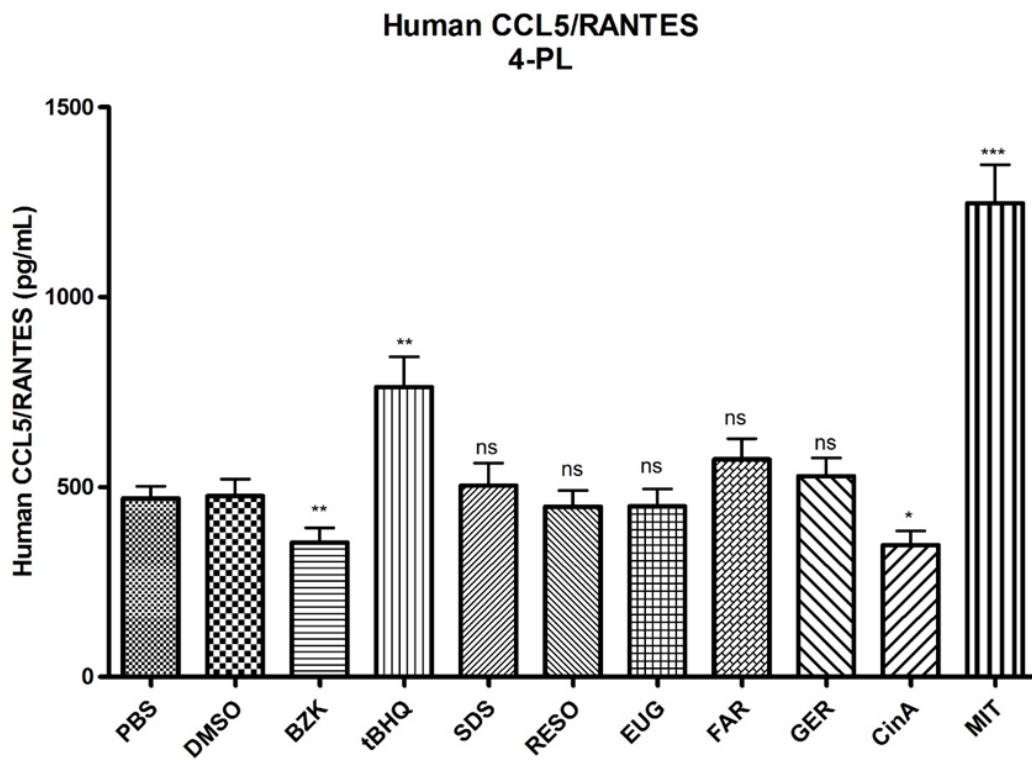


Figure 4

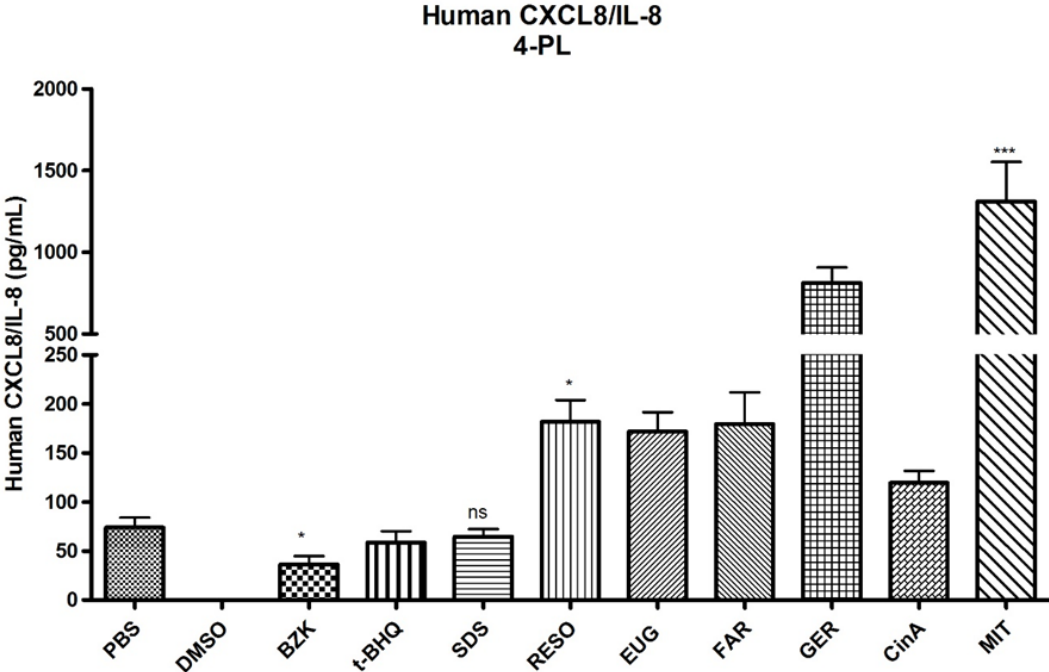
A.



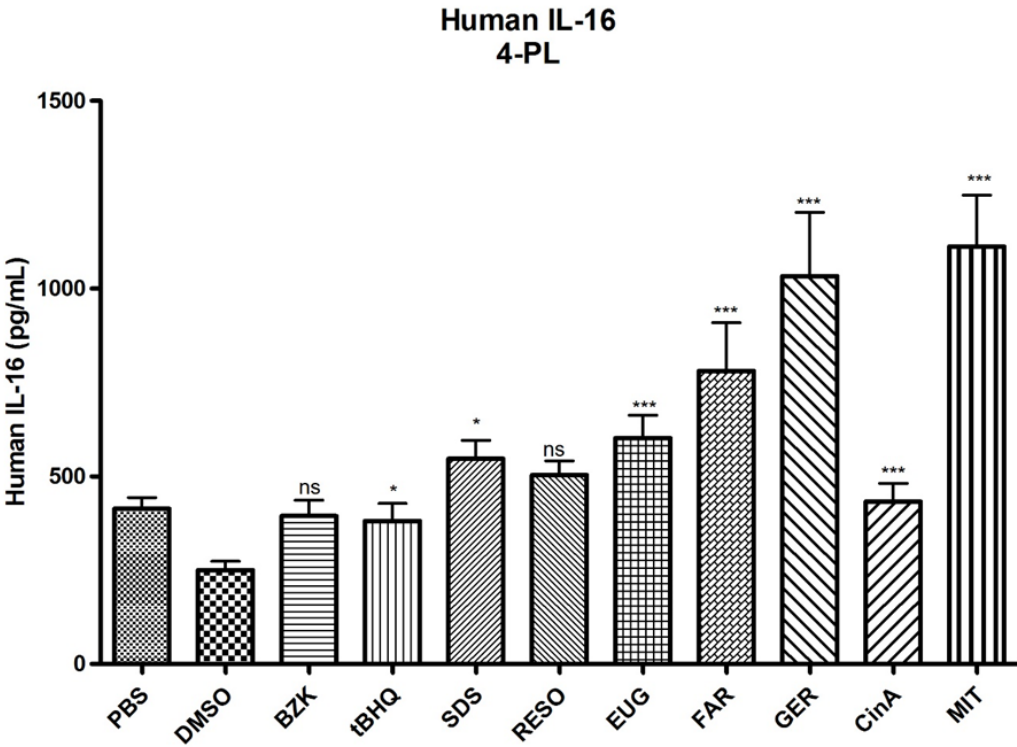
B.



C.



D.



E.

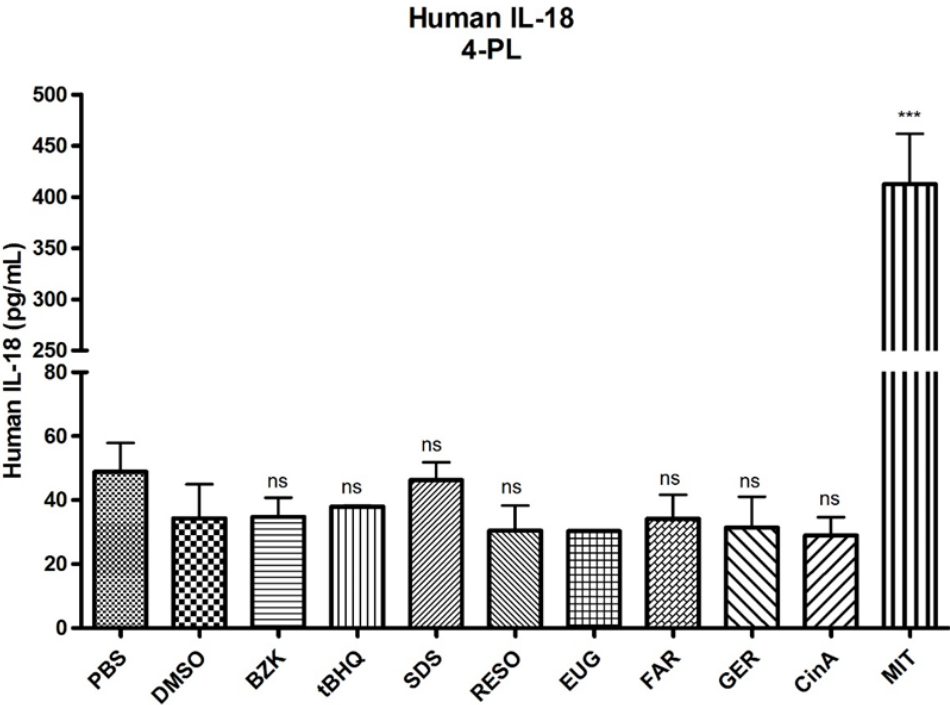
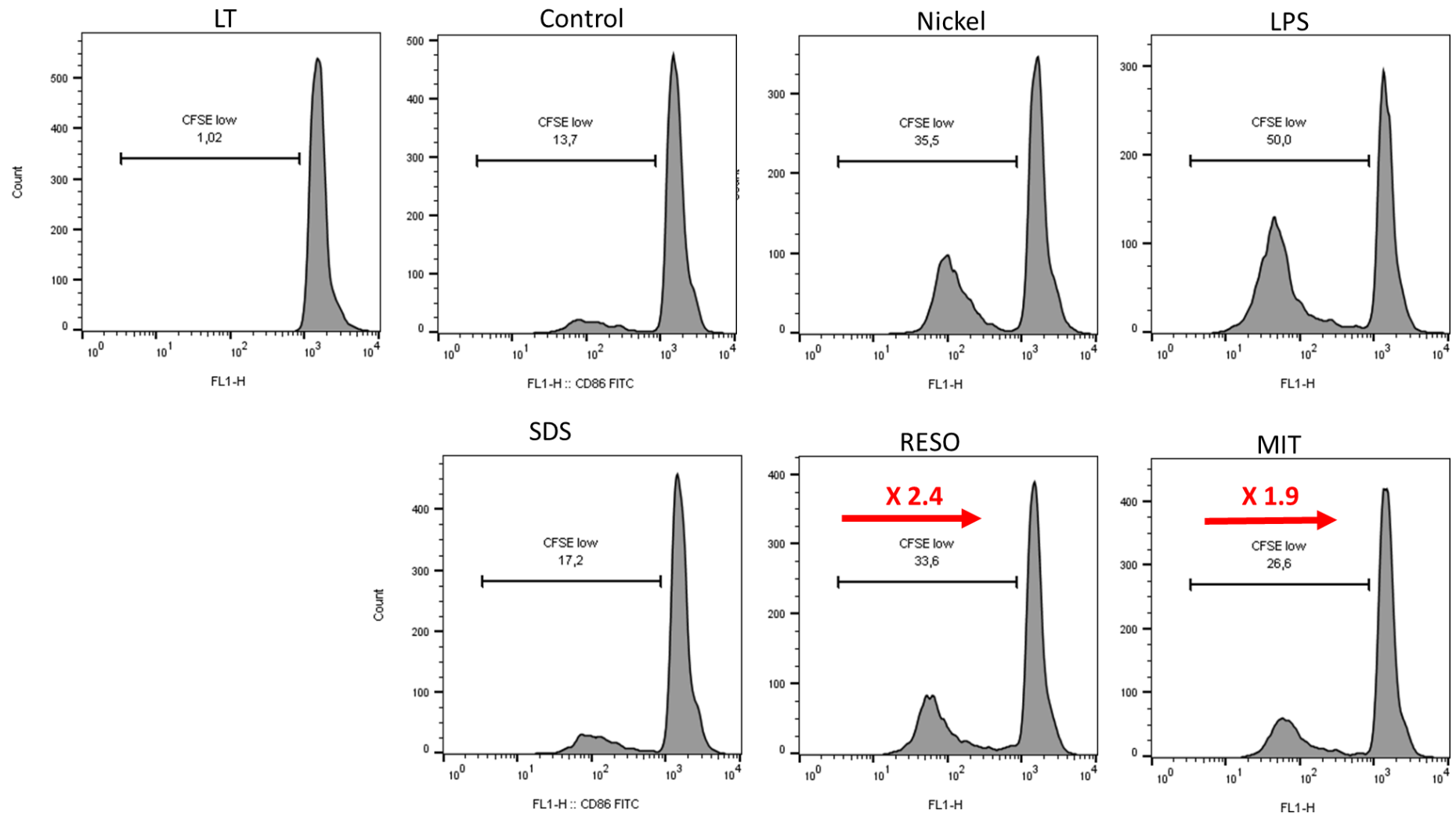


Figure 5

A.



B.

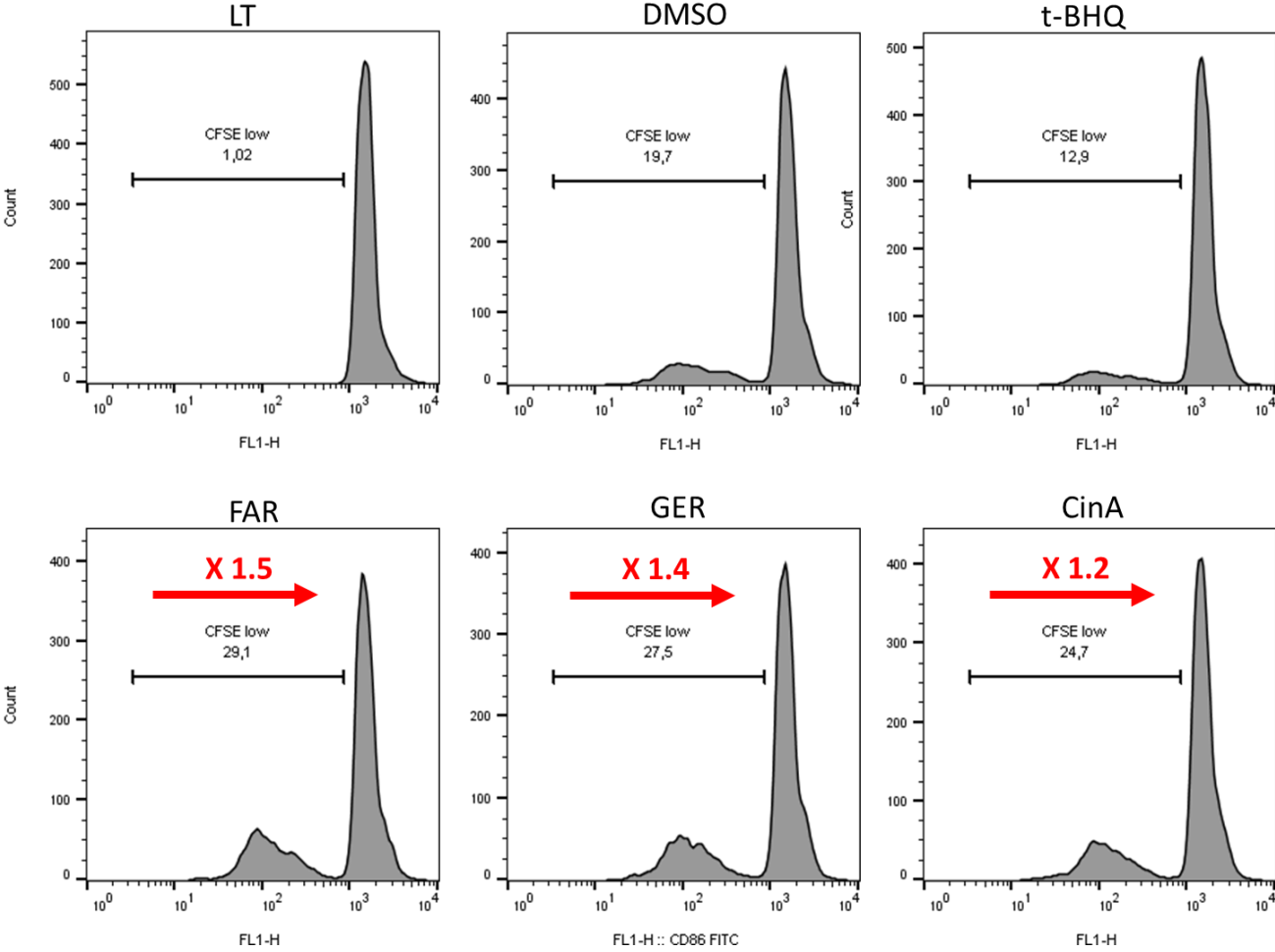


Figure 6

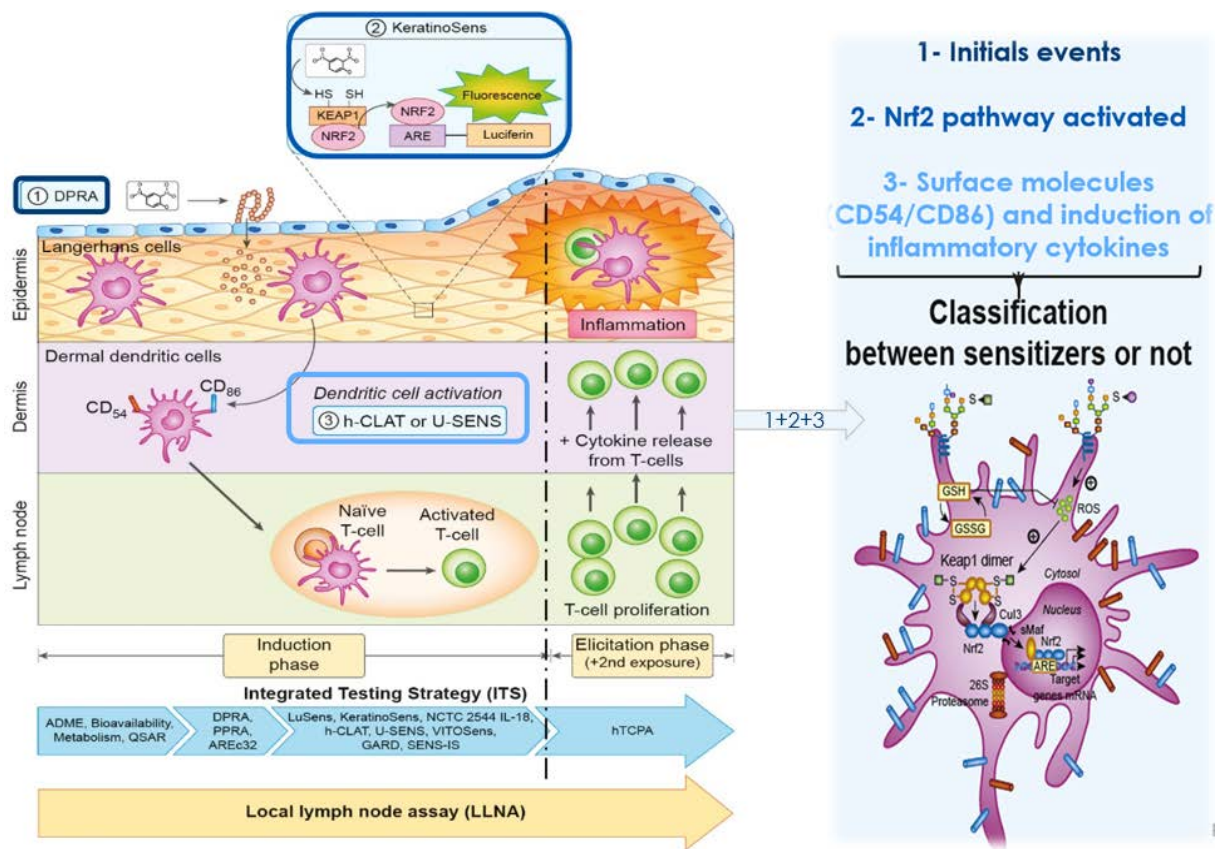


Figure 7

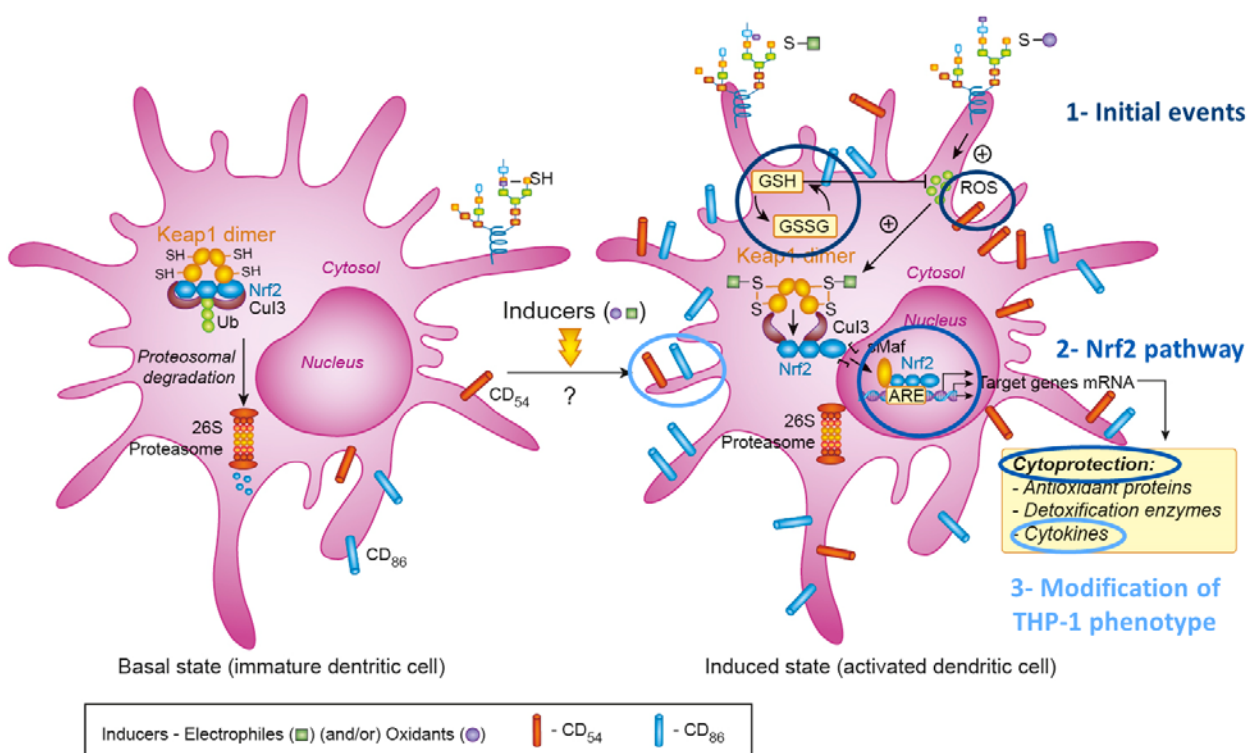


Figure 8

			Alert for AD								Potency category (Basketter 2014)	Human data (Bauch 2012; Basketter 2014)
Use - Category	Substance class	MW [g/mol]	log Kow	Proposed protein-binding mechanism	Pre- /Prohaptent	EC ₃ (LLNA) (%)	LLNA Classification					
NON SENSITIZERS	PBS	Phosphate buffered saline						No				
	DMSO	Dimethyl sulfoxide					No					
	BZK	Benzalkonium chloride	preservative/ disinfectant	quaternary ammonium compound	319.6	5.42	no alert	-	NC	No	5	0
	t-BHQ	tert-Butylhydroquinone	preservative/antioxydant	aromatic alcohol	166.22		NA	-		NT		
IRR	SDS	Sodium lauryl sulfate	Surfactant	Organic acid	288.4	2.42	no alert	-	14	Weak (False positive)	6	0
WEAK	RESO	Resorcinol	preservative/ disinfectant	aromatic alcohol	110.1	1.03	quinone precursor / radicalic substitution	pre/pro-MA	5.92	Weak	4	1
	EUG	Eugenol	fragrance	(aromatic) alcohol, ether	164.2	2.73	quinone precursor	pre/pro-MA	12.9	Weak	3	1
MODERATE	FAR	Farnesol	fragrance	α,β-unsaturated alcohol	222.4	5.77	MA	pro/pre	4.1	MOD	3	1
	GER	Geraniol	fragrance	α,β-unsaturated alcohol	154.3	3.47	MA	pro/pre	57 / 25.8 / 20.4 / 11.8 / 5.6	MOD	4	1
STRONG	CinA	Cinnamic aldehyde	fragrance	α,β-unsaturated aldehyde	132.2	1.82	MA	-	3.1	STRONG	2	1
	MIT	Methylisothiazolinone	preservative/ disinfectant	thiazol(ine)	115.1	0.83	SN2 / MA	-	a) 0.4; b) 1.9	STRONG	1	1

Table 1

Chemical references	Solvent	Cytotoxicity >30%	Concentration range tested	Selected concentrations
DMSO	PBS	Untested	Untested	0.10 %
BZK	PBS	3 µg/ml (Urbisch, 2015)	1.5, 3, 6, 10 µg/ml	3 µg/mL
t-BHQ	DMSO	>100 µM (no cytotoxic, Zhang, 2017 ; Li, 2005)	30, 100, 150 µM	30 µM
SDS	PBS	208.04 µM (Urbisch, 2015) 121.4 µM (Python, 2007)	50, 100, 150 µM	150 µM
RESO	PBS	5571.30 µM (Urbisch, 2015)	0.5, 1, 5, 10, 15 mM	7 mM
EUG	DMSO	872.11 µM (Urbisch, 2015)	0.5, 1, 1.5, 2 mM	1500 µM
FAR	DMSO	190.22 µM (Urbisch, 2015)	0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5 mM	500 µM
GER	DMSO	902.43 µM (Urbisch, 2015)	0.5, 1, 1.5, 2 mM	1000 µM
CinA	DMSO	211.86 µM (Urbisch, 2015) 100 µM (Migdal, 2013)	Not tested	100 µM
MIT	PBS	1.7 mM for MCI/MI mix (Sakagushi, 2010)	0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8 mM	0.15 mM

Table 2

THP-1	Gene title	Main function	PBS	DMSO	BZK / DMSO	t-BHQ / DMSO	SDS / PBS	Reso / PBS	EUG / DMSO	FAR / DMSO	GER / DMSO	CinA / DMSO	MIT / PBS
IL8	Interleukin 8	Inflammation	1	1	89	4	2	26	6	2	1	104	81
IL1A	Interleukin 1 alpha	Inflammation	1	1	1	3	1	2	5	2	1	36	9
TNFA	Tumor necrosis factor alpha induced	Inflammation	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	5
CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	Inflammation	1	1	6	1	2	1	4	1	1	3	13
PTGS2	Prostaglandin endoperoxide synthase 2	Inflammation	1	1	6	1	2	5	3	1	1	4	7
MMP10	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	Tissue repair	1	1	12	0	15	5	1	0	1	1	825
DUSP1	Dual specificity phosphatase 1	Inflammation	1	1	12	2	2	7	5	1	1	25	15
IL24	Interleukin 24	Inflammation	1	1	815	1	2	1	1	1	1	1	33
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	Inflammation	1	1	3	1	1	11	2	2	1	2	16
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	Inflammation	1	1	0	2	1	1	1	1	1	2	3
MMP3	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	Tissue repair	1	1	1	1	2	8	1	2	2	13	2
MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92 kDa gelatinase, 92 kDa type IV collagenase)	Tissue repair	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Total IRR					947	18	31	70	31	16	14	194	1010
CXCR1	Chemokine (C-X-C) receptor 1	Inflammation	1	1	5	1	1	3	0	1	1	3	1
IL1R2	Interleukin 1 receptor, type II	Inflammation	1	1	1	0	3	2	2	2	3	1	1
FABP4	Fatty acid binding protein 4, adipocyte	Inflammation/redox/detox	1	1	1	1	6	1	1	3	2	2	9
CXCL14	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14	Inflammation	1	1	0	1	1	1	1	1	1	2	6
SERPINB3	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	Inflammation	1	1	1	1	47	7	11	72	17	11	564
IL18	Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	Inflammation	1	1	2	1	1	2	1	1	1	2	1
Total SENSIS					10	6	59	15	16	80	25	20	582
GCLC	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	Redox/detox	1	1	2	2	1	2	2	1	1	4	3
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	Redox/detox	1	1	1	4	1	2	1	1	1	5	4
AKR1B10	Aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)	Redox/detox	1	1	3	3	9	2	3	0	0	100	27
AKR1C1	Aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	Redox/detox	1	1	0	2	1	3	1	2	2	1	0
CYP1A1	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	Redox/detox	1	1	2	1	3	13	1	2	1	3	3
TXNRD1	Thioredoxin reductase 1	Redox/detox	1	1	1	3	1	2	1	1	1	10	6
HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1	Redox/detox	1	1	2	14	2	3	45	3	2	2015	214
SLC7A11	Solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, gamma-system) member 11	Redox/detox	1	1	6	6	3	3	8	2	1	32	13
GCLM	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	Redox/detox	1	1	1	5	1	2	2	1	1	19	8
TOTAL ARE					17	40	21	32	64	14	11	2189	278

Table 3

		Key 1		Key 2			Key 3								
		Chemical reactivity		Proteins activity	DNA-binding ELISA	Genes expression on THP-1 (SENS-IS)			Surface markers		Modulation by inflammatory cytokines	Cytokines quantification			
		ROS	GSH depletion	Western blot	Nrf2 TransAM	IRR	SENS-IS	ARE	CD ₅₄	CD ₈₆	Cytokine array	CCL4	IL-8	IL-16	IL-18
NON SENSITIZERS	PBS					7	1	2			IL1-ra MIF				
	DMSO					6	2	2			IL1-ra MIF IL-16-/+ CCL5/RANTES				
	BZK					14	4	7			IL-16++ CCL5/RANTES				
	t-BHQ					11	1	11			IL-16++ CCL5/RANTES+				
IRR	SDS					13	7	5			IL-16++ CCL5/RANTES				
WEAK	RESO					16	4	12			IL-8+ IL-16+ CCL5/RANTES+				
	EUG					12	2	10			IL-8 IL-16-/+ CCL5/RANTES				
MODERATE	FAR					9	8	7			IL-8+ IL-16++ IL-18 CCL5/RANTES+				
	GER					7	4	4			IL-8++ IL-16++ CCL5/RANTES+				
STRONG	CinA					18	6	13			IL-16 IL-8+ IL-18+				
	MIT					17	7	11			IL-16+ IL-8 +++ IL-18++				

Table 4

DISCUSSION

Discussion

Avec l'interdiction de l'expérimentation animale instaurée définitivement depuis 2013 par le nouveau règlement cosmétique (CE) n°1223/2009, le développement de méthodes substitutives est devenu une alternative nécessaire pour évaluer la sécurité des ingrédients. Pour l'évaluation de la sensibilisation cutanée, plusieurs méthodes alternatives ont été développées. Cependant, une méthode alternative seule n'est pas suffisante pour remplacer le LLNA et couvrir l'ensemble des points clés de la sensibilisation cutanée. Des stratégies de tests intégrés (ITS, « Integrated Testing Strategy »), combinant plusieurs tests alternatifs, sont proposées mais aucune validée unanimement par la communauté scientifique ainsi qu'au niveau réglementaire pour évaluer le danger et/ou le risque de sensibilisation cutanée. Au sein de ce travail de Thèse initié chez Pierre Fabre, l'ITS de type « 2 sur 3 » a été choisie.

Une comparaison de plusieurs méthodes alternatives, couvrant les 3 premiers événements clés de la sensibilisation cutanée, a été effectuée selon plusieurs critères. Nous avons tout d'abord étudié les critères objectifs constitués de la précision, la sensibilité, la spécificité ainsi que de la reproductibilité inter- et intra-laboratoires de chacune des méthodes sélectionnées. Ces données rendent compte de l'efficacité des méthodes sur des ensembles de molécules de référence. Ensuite, les critères subjectifs composés du temps de réalisation des tests ainsi que de leurs coûts respectifs ont été pris en compte. L'ensemble de ces critères a permis de sélectionner des méthodes validées ou qui le seront prochainement, tout en conservant le meilleur rapport coût-efficacité pour chacun des tests.

Le tableau 18 regroupe l'ensemble des critères objectifs et subjectifs pour chacune des méthodes qui ont été comparés pour sélectionner la stratégie de tests intégrés la plus adaptée. Pour le KE1 de la sensibilisation cutanée, le DPRA a été choisi, car comparé au PPRA, ce test montre plus d'efficacité en raison du plus grand nombre de molécules testées. De plus, ce test a été validé réglementairement par l'OCDE en février 2015 (OCDE, 2015). Pour le KE2, nous avons choisi le SENS-IS. Bien qu'il ne soit pas encore validé au niveau réglementaire (validation en cours par l'OCDE), ce test présente de meilleures performances ($\geq 96\%$ en précision) que le KeratinoSens ou le LuSens. Pour le KE3, le h-CLAT a été retenu car ce test est disponible depuis 2014 et sa validation réglementaire a été officialisée en Juillet 2016 (OCDE, 2016), ce qui n'était pas le cas de l'U-SENS lors du choix de cette ITS (validation à l'ECVAM). Ces deux tests présentent des résultats équivalents en termes de reproductibilité inter- et

intra-laboratoires et de précision. Cependant, le U-SENS a l'avantage d'avoir une meilleure spécificité tandis que le h-CLAT présente une meilleure sensibilité.

AOP		1		2			3	
Méthodes		DPRA	PPRA	KeratinoSens	LuSens	SENS-IS	h-CLAT	U-SENS
Critères objectifs	Précision	80%	83%	77%	73%	96,9%	85%	86%
	Sensibilité	80%	93%	78%	76%	97,7%	93%	91%
	Spécificité	77%	64%	76%	67%	95,2%	66%	65%
	Repro inter-labo	80%		85%	100%	92-97,8%	80%	84%
	Repro intra-labo	85%		85%	100%	93,9%	80%	90%
	Références	OCDE 442C	Troutman, 2011	OCDE 442D	Draft OCDE 442D+ ECVAM recommandations	Cottrez, 2016	OCDE 442E	OCDE 442E
Critères subjectifs	Coût	1-3	3	3	-	4	4	2-3
	Temps test	7 j	-	4-6 semaines	-	2 semaines à 2 mois	5 semaines	-

Cotation de prix utilisée (€)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	1000-2000	2000-3000	3000-4000	4000-5000	5000-6000	6000-7000	7000-8000	8000-9000	9000-10000

Tableau 18 : Ensemble des critères retenus pour la comparaison des méthodes

Notre stratégie de tests intégrés retenue a été la suivante : le DPRA, le SENS-IS et le h-CLAT représentatifs des trois premiers KE de l'AOP. Il est à noter que cette stratégie adoptée peut être amenée à évoluer selon le développement et la validation de méthodes alternatives complémentaires plus sensibles. En effet, nous intégrerons prochainement dans cette ITS un outil *in silico* de QSAR, le programme Derek, développé pour identifier les structures d'alerte sur les composés chimiques susceptibles de conduire à un phénomène de sensibilisation. Cette nouvelle ITS se rapprochera de celles actuellement proposées dans la littérature comme précédemment décrites (Natsch *et al.*, 2015; OECD, 2016b, 2016c).

Pour finir, même si une stratégie d'évaluation est susceptible d'être validée dans les prochaines années, celles actuellement proposées à ce jour sont incapables de fournir une information sur la puissance d'un allergène. Tant que l'information sur la puissance ne sera pas fiable, il sera impossible de réaliser une évaluation quantitative du risque ou Quantitative risk Assessment (QRA). Cette valeur indispensable, obtenue en général à partir de l'EC3 du

LLNA, permet au toxicologue de mesurer le risque de sensibilisation lié à une substance et donc de définir un seuil de concentration à ne pas dépasser dans le produit fini. A titre informatif, avec le LLNA nous obtenions, au bout de 3 mois maximum de test, un EC3 nous permettant de faire du QRA pour un coût d'environ 6 000 euros par substance testée. A *contrario*, notre ITS actuelle nous permet d'obtenir uniquement une information sur le danger de la substance, pour une durée cumulée de 6 mois de tests et un coût final d'environ 12 000 euros par molécule testée. Ainsi, l'une des limites à notre ITS sélectionnée est l'absence de cette donnée nécessaire pour le toxicologue. Actuellement, toute substance classée comme sensibilisante dans notre ITS, dont la puissance est indéterminée, doit donc être éliminée de tout futur développement cosmétique.

Cependant, l'originalité de notre ITS est l'intégration du SENS-IS comme méthode spécifique du KE2 de l'AOP. Nous avons sélectionné le SENS-IS car ce test utilise un modèle 3D de peau reconstruite nous permettant de nous affranchir d'éventuel problème de solubilité tout en utilisant le modèle actuel le plus proche de la peau humaine (Hewitt *et al.*, 2013). De plus, en utilisant un système de test tel que le modèle 3D de peau, le SENS-IS permet de couvrir indirectement des étapes antérieures telles que la pénétration et le métabolisme cutané, la mesure indirecte de la réactivité chimique de l'électrophile et l'activation des KC *via* l'expression de gènes spécifiquement sélectionnés.

Cette ITS est adaptée pour les molécules simples cependant elle n'est pas applicable pour les molécules complexes comme les extraits végétaux, les mélanges et les parfums. En effet, depuis quatre ans au sein de la division Dermo-Cosmétique des Laboratoires Pierre Fabre, nous avons testé un ensemble de molécules complexes comprenant des extraits végétaux, des actifs, des parfums, connus pour être difficiles voir impossibles à tester en DPRA et h-CLAT. Toutefois, le SENS-IS est le seul test montrant des résultats corrects pour ces molécules complexes et notamment les parfums. Le SENS-IS a démontré sa faisabilité sur 22 parfums (Del Bufalo *et al.*, 2014). Aucune interférence liée à leur volatilité respective n'a été obtenue. La précision globale sur l'évaluation de la puissance est de 68% comparée aux données *in vivo* obtenues en LLNA. Cette étude montre que le SENS-IS pourra à moyen terme être utilisé comme un outil *in vitro* pour effectuer une analyse d'évaluation du risque pour les mélanges contenant des parfums.

Malgré cela, il est aussi important de garder à l'esprit que pour tout développement d'un cosmétique, l'ensemble de ses ingrédients doit être évalué individuellement dans un premier

temps, puis ensuite la formule. Il faudrait donc que cette ITS soit aussi adaptée pour tester le produit fini, ce qui n'est actuellement pas le cas. Concernant le produit fini, le seul test réalisé est le HRIPT ou Test Clinique Final de Sécurité (TCFS) sur l'homme. Il est aussi intéressant de se poser la question de la nécessité et de l'éthique d'un tel test qui peut potentiellement sensibiliser des volontaires. Cependant, il demeure le seul requis réglementaire (demandé par certaines autorités hors UE) pour évaluer le potentiel allergisant d'un produit fini avant sa mise sur le marché.

Ainsi, à terme, les tests *in vitro* de modèles 3D de peau reconstruite semblent les seules alternatives pour tester le produit fini. Cependant, si le produit fini est identifié comme étant allergisant, il sera difficile d'investiguer l'origine comme par exemple les effets synergiques ou antagonistes des substances, de même que l'influence de la galénique.

En effet, nous nous sommes intéressés à l'influence de la galénique dans le test du SENS-IS (Cottrez *et al.*, 2016a). Nous avons sélectionné 3 molécules allergisantes (Cinnamaldehyde, Isoeugenol, Hydroxycitronellal) et 2 mélanges de parfums. Ces substances ont été testées à 5 concentrations différentes (10%, 5%, 2%, 1%, 0.1%) dans 5 formulations cosmétiques correspondant à de l'huile, une émulsion eau-huile, une eau nettoyante, une huile dans l'eau et une microémulsion. Par cette étude, nous avons montré que le potentiel de sensibilisation d'une substance dans le test du SENS-IS dépend du type de formulation (Tableau 19).

Microémulsion	↓↓↓↓ Potentiel de sensibilisation des composés
Emulsion huile dans l'eau	↓↓ Potentiel de sensibilisation des composés
Huile	Neutre
Emulsion eau dans l'huile	↑↑ Potentiel de sensibilisation des composés
Eau nettoyante	↑↑↑↑ Potentiel de sensibilisation des composés

Tableau 19 : Influence de la formulation sur le potentiel sensibilisant

Les résultats obtenus corroborent les récentes publications sur les incertitudes liées au LLNA quant au choix des véhicules utilisés pour tester les substances. En effet, l'un des défis pour les approches alternatives pour prédire un résultat final apical est l'incertitude associée à la variabilité inhérente de la donnée de référence issue de l'animal. Dans le cas de la sensibilisation cutanée, la variabilité du LLNA définit une limite pour la prédictivité des

méthodes alternatives, en particulier pour prédire les classes de puissance qui peuvent être significativement affectées par les effets des solvants (Basketter *et al.*, 2001). Récemment cela a été confirmé par Hoffmann (Hoffmann, 2015) qui a analysé la variabilité potentielle liée au véhicule à l'égard du système de classification en cinq catégories utilisées dans le LLNA. De même, une analyse rétrospective de l'ICCVAM, (2011) a comparé les données du LLNA aux données humaines et a montré que dans un certain nombre de cas, la moitié des molécules allergisantes fortes était sous-classée selon la valeur seuil correspondant aux critères du CLP et qu'environ 60% des non allergisants était sur-classée. Une autre étude sur la variabilité du LLNA (Dumont *et al.*, 2016) selon les combinaisons substance-solvant a été réalisée. Les résultats ont montré que la variabilité inhérente du LLNA est moins significative pour les molécules de catégorie 1A, ($EC3 \leq 0.1$: extrême, $EC3 > 0.1- \leq 1$: fort) mais très significative pour les molécules de catégorie 1B ($EC3 \geq 1- < 10$: modérée) et les molécules non sensibilisantes du CLP.

Parallèlement, d'autres informations sont nécessaires à prendre en compte dans l'évaluation d'un potentiel sensibilisant et à intégrer dans les batteries de tests actuelles comme la pénétration cutanée et la nécessité ou non d'une activation abiotique ou enzymatique. Certaines limites liées aux méthodes *in vitro* sont aussi à améliorer et à prendre en compte comme la biodisponibilité (extrapolation de la concentration *in vitro* à une dose vivante), les domaines d'applicabilité (solubilité, métabolisme, biochimie, allergènes respiratoires, mélanges, produits biologiques) et la prédictivité de la puissance.

De même, l'identification des mécanismes influençant la vigueur des réponses des lymphocytes T pouvant expliquer la variabilité dans l'expression de la DCA au contact de sensibilisants faibles, modérés, forts et extrêmes est un défi encore à résoudre.

De nouvelles méthodes alternatives sont aussi en développement correspondant à des combinaisons de méthodes déjà existantes. Ces nouvelles méthodes permettront d'avoir 2 ou 3 méthodes en un seul test, comme par exemple la combinaison du SENS-IS et du test NCTC 2544 IL-18. Enfin, le hTCPA, toujours en phase de développement, est l'unique test permettant d'étudier la prolifération lymphocytaire, soit le dernier KE de la sensibilisation cutanée, et de ce fait suscite beaucoup d'intérêt.

L'AOP de la sensibilisation cutanée intègre différents KE représentés par des tests *in vitro* utilisant des modèles cellulaires différents. Chaque information obtenue est donc dépendante

de la lignée cellulaire en question. Cependant, certains événements tels que la production de signaux de danger, de ROS et la déplétion du GSH sont indépendants du type cellulaire. Par ailleurs, la DC est une cellule de l'immunité innée jouant un rôle majeur dans l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative : elle a la capacité de reconnaître et d'endocyter un Ag, migrer jusqu'aux ganglions drainants afin de le présenter aux LT et générer une réponse immunitaire spécifique de cet Ag (Banchereau and Steinman, 1998). La DC ne peut être activée par un Ag qu'en présence de signaux de danger, produits lors de dommages tissulaires, d'une réaction inflammatoire, d'un stress ou bien d'une mort cellulaire (Cumberbatch *et al.*, 2001a; Cumberbatch *et al.*, 2001b; Vabulas *et al.*, 2002; Antonopoulos *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2010). Tous ces signaux de dangers participent à la maturation complète de la DC (Gallucci and Matzinger, 2001). Celle-ci est caractérisée par une augmentation des molécules de co-stimulation (CD86, CD80 et CD40) en présence des haptènes tels que le DNCB (Mizuashi *et al.*, 2005; Byamba *et al.*, 2010). Les haptènes, molécules réactives intrinsèquement ou *via* la métabolisation ou l'oxydation, sont capables d'induire un stress chimique. Parmi les voies de détoxification en réponse aux xénobiotiques, la voie Nrf2/Keap1 est une voie centrale pour la détection de composés électrophiles tant endogènes qu'exogènes par la cellule (Itoh *et al.*, 2004; Kensler *et al.*, 2007).

Considérant l'ensemble de ces éléments ainsi que le rôle clé de la DC, nous avons adressé l'ensemble des événements clés de l'AOP dans une cellule proche de la DC, à savoir la THP-1. Par ce modèle cellulaire d'AOP intégrée, nous avons montré que les sensibilisants forts sont identifiés par une production de ROS corrélée à une déplétion du GSH, une activation de la voie Nrf2 ainsi qu'une modification des marqueurs phénotypiques et une production de cytokines. De même, nous avons montré que la THP-1 activée par des sensibilisants forts et modérés, est capable d'induire une prolifération des lymphocytes T. Cependant, certains sensibilisants faibles ou modérés, connus pour être des pré- ou pro-haptènes ne sont pas identifiés dans cette AOP intégrée. En effet, on peut suspecter soit une activité métabolique faible de la lignée cellulaire THP-1 soit une oxydation très lente de ces composés, tel que le géranol (Esser and Martin, 2017), qui en font des molécules non réactives. En outre, il est intéressant de noter que les irritants n'induisent pas la production de ROS, ni la déplétion du GSH ainsi que la voie Nrf2. De même, les THP-1 activées par des irritants ne modulent pas la prolifération des T. Ainsi, notre modèle d'AOP intégrée au sein d'un même type cellulaire semble montrer une haute prédictivité pour identifier les sensibilisants forts des irritants et

non sensibilisants. Néanmoins, la validation de cet essai intégré nécessiterait de tester un panel de molécules plus important (> 30 molécules dans un premier temps). Cependant, nous espérons proposer ce modèle de tests intégrés comme un unique test alternatif à l'AOP de la sensibilisation cutanée.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Conclusions & Perspectives

La sensibilisation cutanée est une réaction du système immunitaire qui résulte d'une succession d'événements physico-chimiques, chimiques et biologiques qui conduisent à l'activation des lymphocytes T spécifiques de l'allergène, suite à la pénétration cutanée d'un haptène (phase d'induction). Après cette première phase d'activation, le sujet développe lors du deuxième contact avec l'allergène une DCA qui se caractérise par une réaction inflammatoire aiguë (phase de déclenchement).

L'évaluation du potentiel sensibilisant se faisait par le passé majoritairement grâce aux tests *in vivo*, principalement le LLNA (Local Lymph Node Assay) réalisé chez la souris, et qui a succédé au GPMT (Guinea Pig Maximisation Test) réalisé chez le cobaye. Or, le Nouveau Règlement Cosmétique CE n°1223/2009 a interdit l'expérimentation animale ainsi que la commercialisation de produits cosmétiques contenant des ingrédients testés sur les animaux au sein de l'Union Européenne. Cette interdiction est entrée en vigueur en mars 2013.

De nombreux tests *in vitro* ont donc été développés pour répondre aux événements clés décrits dans l'AOP de la sensibilisation cutanée, avec leurs avantages et limites respectives. Plusieurs tests sont actuellement validés par l'OCDE comme le DPRA, le h-CLAT, le U-SENS et le KeratinoSens. D'autres sont en cours de validation comme le SENS-IS par exemple. Mais pour l'ensemble de ces tests, de nombreux faux positifs et/ou faux négatifs diminuent la précision globale du test. D'autres tests, à des stades moins avancés, sont toujours en cours de développement comme l'hTCPA. L'intérêt actuel est de combiner ces tests entre eux, avec *a minima* un test recouvrant un KE de l'AOP de la sensibilisation, et idéalement d'étudier en parallèle différents paramètres comme le passage cutané ou le métabolisme.

Enfin, les études *in silico* permettent de prédire la relation quantitative structure/activité (QSAR). Ce procédé met en évidence la corrélation entre la structure d'une molécule et son activité, aussi bien biologique que chimique. Les résultats de ces études sont regroupés dans une seule et même base de données qui permet de caractériser et de prédire la réactivité de molécules issues de familles chimiques identiques par le read-across. En associant les résultats prédictifs des tests *in vitro* avec ceux des méthodes *in silico*, il devient possible de conclure sur le caractère sensibilisant d'un produit en prenant en considération tous les aspects biologiques et chimiques de la DCA. L'ensemble de ces méthodes, ainsi que les différentes ITS

proposées, permettent ainsi de s'affranchir de toute forme d'expérimentation animale, tout en obtenant une précision de plus de 80%, en comparaison aux données humaines et animales. Plusieurs approches sur la façon de combiner et d'interpréter des données provenant de méthodes alternatives non animales ont été rapportées dans la littérature scientifique, et des évaluations indépendantes sont en cours de discussion. L'utilisation des prédictivités positives obtenues à partir de tests *in vitro/in chemico* tend à être meilleure que dans le cas où des prédictions négatives ou contradictoires sont obtenues. Cependant, en raison des limites spécifiques de chacune des méthodes d'essai *in chemico/in vitro*, dans le cas où une prédiction négative est obtenue, il est important de justifier comment celle-ci peut être exclue (via des outils *in silico*). Un ensemble d'informations complémentaires doit être intégré au sein des ITS tel que la présence d'un pro-haptène nécessitant une métabolisation, en utilisant des modèles de prédiction *in silico* ou d'autres types d'essai. De façon similaire, si la substance est un pré-haptène nécessitant une transformation abiotique pour exercer son potentiel de sensibilisation cutanée (European Chemicals Agency, 2016). Au terme de l'ITS choisie, les données obtenues, la justification du choix des méthodes d'essai, l'analyse de la cohérence des données, la conclusion sur l'identification des dangers et la classification selon le règlement CLP doivent être rapportées clairement et de manière transparente dans l'évaluation globale de la sensibilisation cutanée liée à une substance.

De plus, diverses informations seront prochainement à prendre en compte au vu des améliorations individuelles des méthodes *in vitro*, comme le raffinement des modèles peptidiques utilisés pour les tests de liaison ; la standardisation de la solubilisation et de la métabolisation des produits chimiques dans les milieux de culture des tests cellulaires ainsi que leurs données de biodisponibilité dans les modèles 3D d'épidermes reconstruits. L'ensemble de ces informations serviront en outre pour optimiser les modèles informatiques *in silico*. Ainsi, il sera éventuellement possible à moyen terme, grâce à l'impression 3D par exemple, de tester des ingrédients puis des produits finis sur des modèles 3D d'épidermes reconstruits qui intégreront des DC ou des LC. De même, on peut imaginer une puce mimant les différents organes impliqués dans la DCA comme le stratum cornéum, les dLN, le thymus dont l'ensemble serait irrigué par un système sanguin et lymphatique simulés (Figure 42). En parallèle, explorer comment la nature et le degré de la modification des protéines, des signaux de danger produits par les KC, de la migration des DC, des signaux produits par les DC et des réponses T impactent le niveau de sensibilisation des individus, permettront d'apporter

des informations cruciales pour mieux définir le pouvoir sensibilisant des produits chimiques. A l'avenir, il sera important d'établir dans quelle mesure le type d'exposition, unique ou répétée, influe sur ces différents paramètres et peut être transcrit dans ces protocoles *in vitro*. Des progrès majeurs sont donc à attendre au cours des prochaines années afin de mieux caractériser le pouvoir sensibilisant des produits chimiques qui, combinés à une meilleure maîtrise de l'exposition humaine à ces molécules, permettront le développement de stratégie d'évaluation et de gestion du risque plus adéquates et donc de prévenir le développement de la DCA.

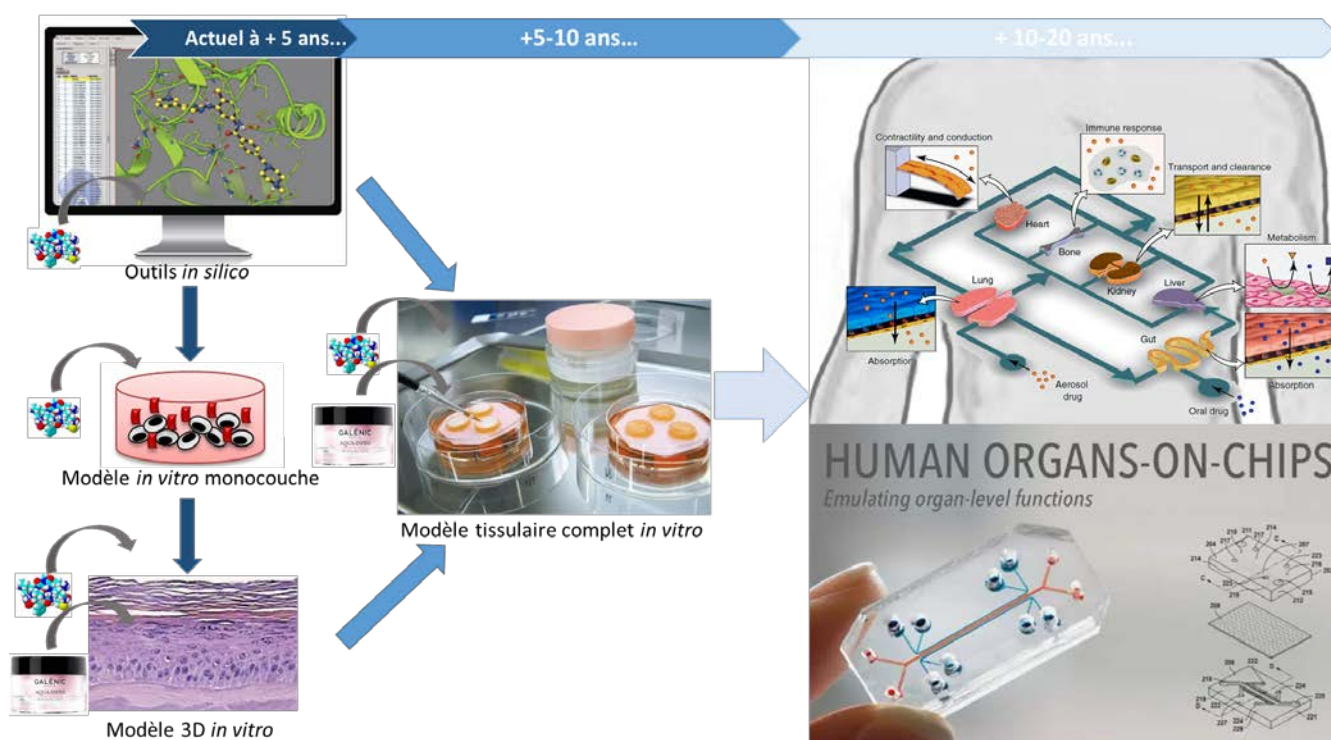


Figure 42 : Perspectives pour l'évaluation de la sensibilisation cutanée pour un ingrédient et le produit fini

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

A.

- Ade, N., Martinozzi-Teissier, S., Pallardy, M., Rousset, F., 2006. Activation of U937 cells by contact sensitizers: CD86 expression is independent of apoptosis. *J. Immunotoxicol.* 3, 189–197. doi:10.1080/15476910600978038
- Aeby, P., Ashikaga, T., Bessou-Touya, S., Schepky, A., Gerberick, F., Kern, P., Marrec-Fairley, M., Maxwell, G., Ovigne, J.-M., Sakaguchi, H., Reisinger, K., Tailhardat, M., Martinozzi-Teissier, S., Winkler, P., 2010. Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa's research and method development program. *Toxicol. In Vitro* 24, 1465–73. doi:10.1016/j.tiv.2010.07.005
- Ahlfors, S.R., Sterner, O., Hansson, C., 2003. Reactivity of contact allergenic haptens to amino acid residues in a model carrier peptide, and characterization of formed peptide-hapten adducts. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 16, 59–68. doi:10.1159/000068288
- Ahlström, M.G., Thyssen, J.P., Menné, T., Johansen, J.D., 2017. Prevalence of nickel allergy in Europe following the EU Nickel Directive – a review. *Contact Dermatitis* 77, 193–200. doi:10.1111/cod.12846
- Aiba, S., 2005. How are epidermal langerhans cells activated in the initiation phase of allergic contact dermatitis? *Aatex* 11, 10.
- Akdis, M., Palomares, O., van de Veen, W., van Splunter, M., Akdis, C.A., 2012. TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 1431–1438. doi:10.1016/j.jaci.2012.05.003
- Akiba, H., Kehren, J., Ducluzeau, M.-T., Krasteva, M., Horand, F., Kaiserlian, D., Kaneko, F., Nicolas, J.-F., 2002. Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8+ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *J. Immunol.* 168, 3079–3087.
- Albanesi, C., Cavani, A., Girolomoni, G., 1999. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *J. Immunol.* 162, 494–502.
- Albanesi, C., Scarponi, C., Cavani, A., Federici, M., Nasorri, F., Girolomoni, G., 2000. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 115, 81–87. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00041.x
- Albanesi, C., Scarponi, C., Giustizieri, M.L., Girolomoni, G., 2005. Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy* 4, 329–334.
- Aleksic, M., Pease, C.K., Basketter, D.A., Panico, M., Morris, H.R., Dell, A., 2008. Mass spectrometric identification of covalent adducts of the skin allergen 2,4-dinitro-1-chlorobenzene and model skin proteins. *Toxicol. Vitr.* 22, 1169–1176. doi:10.1016/j.tiv.2008.03.006
- Aleksic, M., Thain, E., Roger, D., Saib, O., Davies, M., Li, J., Aptula, A., Zazzeroni, R., 2009. Reactivity profiling: Covalent modification of single nucleophile peptides for skin sensitization risk assessment. *Toxicol. Sci.* 108, 401–411. doi:10.1093/toxsci/kfp030
- Anderson, S.E., Siegel, P.D., Meade, B.J., 2011. The LLNA: A Brief Review of Recent Advances and Limitations. *J. Allergy* 2011, 424203. doi:10.1155/2011/424203
- Andreas, N., Caroline, B., Leslie, F., Frank, G., Kimberly, N., Allison, H., Heather, I., Robert, L., Stefan, O., Hendrik, R., Andreas, S., Roger, E., 2011. The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the

- KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: Results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. Vitr.* 25, 733–744. doi:10.1016/j.tiv.2010.12.014
- Ankley, G.T., Bennett, R.S., Erickson, R.J., Hoff, D.J., Hornung, M.W., Johnson, R.D., Mount, D.R., Nichols, J.W., Russom, C.L., Schmieder, P.K., Serrano, J.A., Tietge, J.E., Villeneuve, D.L., 2010. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 730–741. doi:10.1002/etc.34
- Anses, 2016. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux usages de la méthylisothiazolinone (MIT) dans les produits à usage courant et aux risques associés de sensibilisations cutanée et respir.
- ANSM, 2008. Test clinique final de sécurité d'un produit cosmétique en vue de confirmer son absence de potentiel sensibilisant cutané retardé : Recommandations.
- Api, A.M., Parakhia, R., O'Brien, D., Basketter, D.A., 2017. Fragrances Categorized According to Their Relative Human Skin Sensitization Potency. *Dermatitis* 1. doi:10.1097/DER.0000000000000304
- Aptula, A.O., Roberts, D.W., Pease, C.K., 2007. Haptens, prohaptens and prehaptens, or electrophiles and proelectrophiles. *Contact Dermatitis* 56, 54–56. doi:10.1111/j.1600-0536.2007.00944.x
- Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., Toyoda, H., 2006. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767–73. doi:10.1016/j.tiv.2005.10.012
- Asturiol, D., Casati, S., Worth, A., 2016. Consensus of classification trees for skin sensitisation hazard prediction. *Toxicol. In Vitro* 36, 197–209. doi:10.1016/j.tiv.2016.07.014
- B.**
- Bal, W., Lukszo, J., Jezowska-Bojczuk, M., Kasprzak, K.S., 1995. Interactions of nickel(II) with histones. Stability and solution structure of complexes with CH₃CO-Cys-Ala-Ile-His-NH₂, a putative metal binding sequence of histone H3. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 683–692.
- Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.-C., Certa, H., Eigler, D., Emter, R., Faulhammer, F., Garcia, C., Graham, C., Haux, C., Kolle, S.N., Kreiling, R., Natsch, A., Mehling, A., 2011. Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and in vitro methods in a weight-of-evidence approach. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 60, 389–400. doi:10.1016/j.yrtph.2011.05.007
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252. doi:10.1038/32588
- Bangert, C., Brunner, P.M., Stingl, G., 2011. Immune functions of the skin. *Clin. Dermatol.* 29, 360–376. doi:10.1016/j.clindermatol.2011.01.006
- Baron, J.M., Holler, D., Schiffer, R., Frankenberg, S., Neis, M., Merk, H.F., Jugert, F.K., 2001. Expression of Multiple Cytochrome P450 Enzymes and Multidrug Resistance-Associated Transport Proteins in Human Skin Keratinocytes 116, 541–548.
- Basketter, D., Gerberick, G., Kimber, I., 2001. Skin sensitisation, vehicle effects and the local lymph node assay. *Food Chem. Toxicol.* 39, 621–627. doi:10.1016/S0278-6915(00)00169-1
- Basketter, D., Lea, L., Cooper, K., Stocks, J., Dickens, A., Pate, I., Dearman, R., Kimber, I., 1999. Threshold for classification as a skin sensitizer in the local lymph node assay: a statistical evaluation. *Food Chem. Toxicol.*

- 37, 1167–1174. doi:10.1016/S0278-6915(99)00112-X
- Basketter, D.A., 2009. The human repeated insult patch test in the 21st century: a commentary. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 28, 49–53. doi:10.1080/15569520902938032
- Basketter, D.A., Alepee, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Gilmour, N., Goebel, C., Hibatallah, J., Hoffmann, S., Kern, P., Martinozzi-Teissier, S., Maxwell, G., Reisinger, K., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., 2014. Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermat. contact, atopic, Occup. drug* 25, 11–21. doi:10.1097/DER.0000000000000003
- Basketter, D.A., Evans, P., Fielder, R.J., Gerberick, G.F., Dearman, R.J., Kimber, I., 2002. Local lymph node assay — validation, conduct and use in practice. *Food Chem. Toxicol.* 40, 593–598. doi:https://doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00130-2
- Basketter, D.A., Kimber, I., 2011. Skin irritation, false positives and the local lymph node assay: a guideline issue? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 61, 137–140. doi:10.1016/j.yrtph.2011.07.004
- Basketter, D.A., Lea, L.J., Dickens, A., Briggs, D., Pate, I., Dearman, R.J., Kimber, I., 1999. A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. *J. Appl. Toxicol.* 19, 261–266.
- Basketter, D.A., McFadden, J.F., Gerberick, F., Cockshott, A., Kimber, I., 2009. Nothing is perfect, not even the local lymph node assay: a commentary and the implications for REACH. *Contact Dermatitis* 60, 65–69. doi:10.1111/j.1600-0536.2008.01444.x
- Bauch, C., Kolle, S.N., Ramirez, T., Eltze, T., Fabian, E., Mehling, A., Teubner, W., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R., 2012. Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 489–504. doi:10.1016/j.yrtph.2012.05.013
- Bobr, A., Olvera-Gomez, I., Igyarto, B.Z., Haley, K.M., Hogquist, K.A., Kaplan, D.H., 2010. Acute ablation of Langerhans cells enhances skin immune responses. *J. Immunol.* 185, 4724–4728. doi:10.4049/jimmunol.1001802
- Böhme, A., Thaens, D., Paschke, A., Schüürmann, G., 2009. Kinetic Glutathione Chemoassay To Quantify Thiol Reactivity of Organic Electrophiles - Application to Kinetic Glutathione Chemoassay To Quantify Thiol Reactivity of Organic Electrophiles. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 742–750. doi:10.1021/tx800492x
- Bond, E., Adams, W.C., Smed-Sorensen, A., Sandgren, K.J., Perbeck, L., Hofmann, A., Andersson, J., Lore, K., 2009. Techniques for time-efficient isolation of human skin dendritic cell subsets and assessment of their antigen uptake capacity. *J. Immunol. Methods* 348, 42–56. doi:10.1016/j.jim.2009.06.012
- Bos, J.D., Meinardi, M.M.H.M., 2000. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.* 9, 1–5. doi:10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x
- Bouaziz, J.-D., Yanaba, K., Tedder, T.F., 2008. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol. Rev.* 224, 201–214. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00661.x
- Bowerman, N.A., Falta, M.T., Mack, D.G., Wehrmann, F., Crawford, F., Mroz, M.M., Maier, L.A., Kappler, J.W., Fontenot, A.P., 2014. Identification of multiple public TCR repertoires in chronic beryllium disease. *J. Immunol.* 192, 4571–4580. doi:10.4049/jimmunol.1400007
- Breatnach, S.M., 1988. The Langerhans cell. *Br. J. Dermatol.* 119, 463–469. doi:10.1111/j.1365-2133.1988.tb03249.x
- Buehler, E. V, 1965. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arch. Dermatol.* 91, 171–177.
- Byamba, D., Kim, T.G., Kim, D.H., Je, J.H., Lee, M.-G., 2010. The Roles of Reactive Oxygen Species Produced by Contact Allergens and Irritants in Monocyte-derived Dendritic Cells. *Ann. Dermatol.* 22, 269–278.

doi:10.5021/ad.2010.22.3.269

C.

- Calderon, M.A., Demoly, P., Gerth van Wijk, R., Bousquet, J., Sheikh, A., Frew, A., Scadding, G., Bachert, C., Malling, H.J., Valenta, R., Bilo, B., Nieto, A., Akdis, C., Just, J., Vidal, C., Varga, E.M., Alvarez-Cuesta, E., Bohle, B., Bufe, A., Canonica, W.G., Cardona, V., Dahl, R., Didier, A., Durham, S.R., Eng, P., Fernandez-Rivas, M., Jacobsen, L., Jutel, M., Kleine-Tebbe, J., Klimek, L., Lötvall, J., Moreno, C., Mosges, R., Muraro, A., Niggemann, B., Pajno, G., Passalacqua, G., Pfaar, O., Rak, S., Senna, G., Senti, G., Valovirta, E., van Hage, M., Virchow, J.C., Wahn, U., Papadopoulos, N., 2012. EAACI: A European Declaration on Immunotherapy. Designing the future of allergen specific immunotherapy. *Clin. Transl. Allergy* 2, 20. doi:10.1186/2045-7022-2-20
- Campos, R.A., Szczepanik, M., Lisbonne, M., Itakura, A., Leite-de-Moraes, M., Askenase, P.W., 2006. Invariant NKT cells rapidly activated via immunization with diverse contact antigens collaborate in vitro with B-1 cells to initiate contact sensitivity. *J. Immunol.* 177, 3686–3694.
- Cantrell, D., 1996. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 259–274. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.259
- Casati, S., Aeby, P., Basketter, D.A., Cavani, A., Gennari, A., Gerberick, G.F., Griem, P., Hartung, T., Kimber, I., Lepoittevin, J.-P., Meade, B.J., Pallardy, M., Rougier, N., Rousset, F., Rubinstenn, G., Sallusto, F., Verheyen, G.R., Zuang, V., 2005a. Dendritic cells as a tool for the predictive identification of skin sensitisation hazard. *Altern. Lab. Anim.* 33, 47–62.
- Casati, S., Aeby, P., Basketter, D.A., Cavani, A., Gennari, A., Gerberick, G.F., Griem, P., Hartung, T., Kimber, I., Lepoittevin, J.-P., Meade, B.J., Pallardy, M., Rougier, N., Rousset, F., Rubinstenn, G., Sallusto, F., Verheyen, G.R., Zuang, V., 2005b. Dendritic cells as a tool for the predictive identification of skin sensitisation hazard. *Altern. Lab. Anim.* 33, 47–62.
- Casati, S., Aschberger, K., Asturiol, D., Basketter, D., Dimitrov, S., Dumont, C., Karlberg, A.-T., Lepoittevin, J.-P., Patlewicz, G., Roberts, D.W., Worth, A., 2016. Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting. *Eur J Appl Toxicol* 27, 1–30. doi:10.2788/01803
- Cavani, A., Nasorri, F., Ottaviani, C., Sebastiani, S., De Pita, O., Girolomoni, G., 2003. Human CD25+ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals. *J. Immunol.* 171, 5760–5768.
- Chipinda, I., Hettick, J.M., Siegel, P.D., 2011. Haptenation: Chemical Reactivity and Protein Binding. *J. Allergy Clin Immunol* 127, 1–11. doi:10.1155/2011/839682
- Clark, R.A., Kupper, T.S., 2007. IL-15 and dermal fibroblasts induce proliferation of natural regulatory T cells isolated from human skin. *Blood* 109, 194–202. doi:10.1182/blood-2006-02-002873
- Clausen, B.E., Stoitzner, P., 2015. Functional specialization of skin dendritic cell subsets in regulating T cell responses. *Front. Immunol.* 6, 1–19. doi:10.3389/fimmu.2015.00534
- Cluzel-Tailhardat, M., Bonnet-Duquennoy, M., de Queral, D.P., Vocanson, M., Kurfurst, R., Courtellemont, P., Le Varlet, B., Nicolas, J.-F., 2007. Chemicals with weak skin sensitizing properties can be identified using low-density microarrays on immature dendritic cells. *Toxicol. Lett.* 174, 98–109. doi:10.1016/j.toxlet.2007.08.015
- Code de la santé publique, 2014. Article L5131-1.
- Coleman, K.P., McNamara, L.R., Grailer, T.P., Willoughby, J.A., Keller, D.J., Patel, P., Thomas, S., Dilworth, C., 2015. Evaluation of an In Vitro Human Dermal Sensitization Test for Use with Medical Device Extracts. *Appl. Vitro Toxicol* 1, 1–11.

- Toxicol. 1, 118–130. doi:10.1089/aivt.2015.0007
- Cooper, J.A. 2nd, Saracci, R., Cole, P., 1979. Describing the validity of carcinogen screening tests. *Br. J. Cancer* 39, 87–89.
- Corsini, E., Mitjans, M., Galbiati, V., Lucchi, L., Galli, C.L., Marinovich, M., 2009. Use of IL-18 production in a human keratinocyte cell line to discriminate contact sensitizers from irritants and low molecular weight respiratory allergens. *Toxicol. Vitro*. 23, 789–796. doi:10.1016/j.tiv.2009.04.005
- Cottrez, F., Boitel, E., Auriault, C., Aeby, P., Groux, H., 2015. Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model. Development of the SENS-IS assay. *Toxicol. Vitro*. 29, 787–802. doi:10.1016/j.tiv.2015.02.012
- Cottrez, F., Boitel, E., Dalhuchyts, H., Bidan, C., Rattier, S., Ferret, P., Groux, H., 2016a. In vitro skin sensitization analysis of mixtures : results using the SENS-IS assay. *Estiv Congr.*
- Cottrez, F., Boitel, E., Ourlin, J.C., Peiffer, J.L., Fabre, I., Henaoui, I.S., Mari, B., Vallauri, A., Paquet, A., Barbry, P., Auriault, C., Aeby, P., Groux, H., 2016b. SENS-IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: Reproducibility and predictivity results from an inter-laboratory study. *Toxicol. Vitro*. 32, 248–260. doi:10.1016/j.tiv.2016.01.007
- Crépy, M.N., 2010. Dermatoses professionnelles allergiques aux métaux Première partie : allergie de contact au nickel. *Doc. pour le Médecin du Trav.* 91–104.
- Crivellato, E., Vacca, A., Ribatti, D., 2004. Setting the stage: An anatomist's view of the immune system. *Trends Immunol.* 25, 210–217. doi:10.1016/j.it.2004.02.008
- Croft, M., Carter, L., Swain, S.L., Dutton, R.W., 1994. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J. Exp. Med.* 180, 1715–1728.
- Crotzer, V.L., Blum, J.S., 2010. Autophagy and adaptive immunity. *Immunology* 131, 9–17. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03321.x
- Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Griffiths, C.E., Kimber, I., 2003. Epidermal Langerhans cell migration and sensitisation to chemical allergens. *Apmis* 111, 797–804. doi:10.1034/j.1600-0463.2003.11107811.x
- Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Kimber, I., 1997. Interleukin 1 beta and the stimulation of Langerhans cell migration: comparisons with tumour necrosis factor alpha. *Arch. Dermatol. Res.* 289, 277–284.
- Czernielewski, J.M., Demarchez, M., 1987. Further evidence for the self-reproducing capacity of Langerhans cells in human skin. *J Invest Dermatol* 88, 17–20. doi:10.1111/1523-1747.ep12464659

D.

- De Jong, W.H., Van Och, F.M.M., Den Hartog Jager, C.F., Spiekstra, S.W., Slob, W., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H., 2002. Ranking of allergenic potency of rubber chemicals in a modified local lymph node assay. *Toxicol. Sci.* 66, 226–232.
- Dearden, J.C., Hewitt, M., Roberts, D.W., Enoch, S.J., Rowe, P.H., Przybylak, K.R., Vaughan-Williams, G.D., Smith, M.L., Pillai, G.G., Katritzky, A.R., 2015. Mechanism-Based QSAR Modeling of Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 1975–1986. doi:10.1021/acs.chemrestox.5b00197
- Dearman, R.J., Hilton, J., Basketter, D.A., Kimber, I., 1999. Cytokine endpoints for the local lymph node assay: consideration of interferon- γ and interleukin 12. *J. Appl. Toxicol.* 19, 149–135. doi:10.1002/(SICI)1099-

1263(199905/06)19:3<149::AID-JAT557>3.0.CO;2-L

- Debeuckelaere, C., Moussallieh, F.-M., Elbayed, K., Namer, I.-J., Berl, V., Gimenez-Arnau, E., Lepoittevin, J.-P., 2016. In situ chemical behaviour of methylisothiazolinone (MI) and methylchloroisothiazolinone (MCI) in reconstructed human epidermis: a new approach to the cross-reactivity issue. *Contact Dermatitis* 74, 159–167. doi:10.1111/cod.12524
- Del Bufalo, A., Tourneix, F., Martinozzi-Teissier, S., Cottrez, F., Groux, H., Cotovio, J., 2014. Evaluation of SENS-IS, an Episkin based model for identifying chemical sensitizers of fragrance ingredients 63.
- Diepgen, T.L., Coenraads, P.J., 1999. The epidemiology of occupational contact dermatitis. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 72, 496–506.
- Diepgen, T.L., Fartasch, M., Ring, J., Scheewe, S., Staab, D., Szczechanski, R., Werfel, T., Wahn, U., Gieler, U., 2003. [Education programs on atopic eczema. Design and first results of the German Randomized Intervention Multicenter Study]. *Hautarzt*. 54, 946–951. doi:10.1007/s00105-003-0613-3
- Dietz, L., Esser, P.R., Schmucker, S.S., Goette, I., Richter, A., Schnolzer, M., Martin, S.F., Thierse, H.-J., 2010. Tracking human contact allergens: from mass spectrometric identification of peptide-bound reactive small chemicals to chemical-specific naive human T-cell priming. *Toxicol. Sci.* 117, 336–347. doi:10.1093/toxsci/kfq209
- Dietz, L., Kinzebach, S., Ohnesorge, S., Franke, B., Goette, I., Koenig-Gressel, D., Thierse, H.-J., 2013. Proteomic allergen-peptide/protein interaction assay for the identification of human skin sensitizers. *Toxicol. In Vitro* 27, 1157–1162. doi:10.1016/j.tiv.2012.08.013
- Dieu, M.C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J.M., Oldham, E., Aït-Yahia, S., Brière, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., Caux, C., 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* 188, 373–386. doi:10.1084/jem.188.2.373
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kensler, T.W., 2005. The Role of Keap1 in Cellular Protective Responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1779–1791. doi:10.1021/tx050217c
- Dinkova-Kostova, A.T., Kostov, R. V., Canning, P., 2017. Keap1, the cysteine-based mammalian intracellular sensor for electrophiles and oxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 617, 84–93. doi:10.1016/j.abb.2016.08.005
- Divkovic, M., Pease, C.K., Gerberick, G.F., Basketter, D.A., 2005. Hapten-protein binding: From theory to practical application in the in vitro prediction of skin sensitization. *Contact Dermatitis* 53, 189–200. doi:10.1111/j.0105-1873.2005.00683.x
- dos Santos, G.G., Reinders, J., Ouwehand, K., Rustemeyer, T., Scheper, R.J., Gibbs, S., 2009. Progress on the development of human in vitro dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236, 372–382. doi:10.1016/j.taap.2009.02.004
- Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O., 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82, 377 LP-390.
- Dreno, B., 2009. Anatomy and physiology of skin and cutaneous annexes. *Ann. Dermatol. Venereol.* 136 Suppl, S247-51. doi:10.1016/S0151-9638(09)72527-X
- Dubuisson, C., La Vieille, S., Martin, A., 2002. Allergies Alimentaires: Etat des lieux et propositions d'orientations.
- Dumont, C., Barroso, J., Matys, I., Worth, A., Casati, S., 2016. Analysis of the Local Lymph Node Assay (LLNA) variability for assessing the prediction of skin sensitisation potential and potency of chemicals with non-animal approaches. *Toxicol. In Vitro* 34, 220–228. doi:10.1016/j.tiv.2016.04.008

E.

- Eilstein, J., Gimenez-Arnau, E., Duche, D., Rousset, F., Lepoittevin, J.-P., 2007. Mechanistic studies on the lysine-induced N-formylation of 2,5-dimethyl-p-benzoquinonediimine. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1155–1161. doi:10.1021/tx700040s
- Eilstein, J., Giménez-Arnau, E., Duché, D., Rousset, F., Lepoittevin, J.-P., 2006. Synthesis and Reactivity Toward Nucleophilic Amino Acids of 2,5-[13C]-Dimethyl-p-benzoquinonediimine. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 1248–1256. doi:10.1021/tx0601408
- Emter, R., Ellis, G., Natsch, A., 2010. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245, 281–90. doi:10.1016/j.taap.2010.03.009
- Engebretsen, K.A., Thyssen, J.P., 2016. Skin Barrier Function and Allergens. *Curr. Probl. Dermatol.* 49, 90–102. doi:10.1159/000441548
- Engeman, T.M., Gorbachev, A. V, Gladue, R.P., Heeger, P.S., Fairchild, R.L., 2000. Inhibition of Functional T Cell Priming and Contact Hypersensitivity Responses by Treatment with Anti-Secondary Lymphoid Chemokine Antibody During Hapten Sensitization. *J. Immunol.* 164, 5207 LP-5214.
- Enk, A.H., Katz, S.I., 1992. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 1398–402.
- Eschrich, D., Engels, U., Scheel, J., Schroeder, K., 2007. Monocyte derived dendritic cells as a tool to predict skin sensitization Limitations and opportunities. *Aatex* 86, 411–413.
- Esser, P.R., Martin, S.F., 2017. Pathomechanisms of Contact Sensitization. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 17, 83. doi:10.1007/s11882-017-0752-8
- EURL-ECVAM, 2016. EURL ECVAM Status Report on the Development , Validation and Regulatory Acceptance of Alternative Methods and Approaches. doi:10.2788/86047
- EURL ECVAM, 2017. The European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing [WWW Document]. URL <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam> (accessed 11.2.17).
- European Chemicals Agency, 2016. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R7a: Endpoint specific guidance., European Chemicals Agency. doi:10.2823/2611
- European Commission, 1976. Council Directive 76/768/EC. *Off. J. Eur. Communities* 1976, L 262/169-L 262/200.
- European Commission, 2004. Timetables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive 1–8.
- European Commission, 2009a. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetics products, *Official Journal of the European Union*.
- European Commission, 2009b. Rapport de la commission au parlement européen et au conseil. Rapport sur la mise au point, la validation et l'acceptation légale de méthodes pouvant être substituées à l'expérimentation animale dans le domaine des cosmétiques.
- European Commission, 2013. Communication From the Commission To the European Parliament and the Council on the animal testing ban and marketing ban. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 1689–1699. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- European Commission, 2016. the ScCs Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients. *ScCs* 1564, 151. doi:10.2772/47128
- European Parliament, 2016. Consolidated version of the REACH Regulation. *Commission Regulation (EU)*

2016/1688 of 20 September 2016 Amending Annex VII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Res.

European Parliament, Council of the European union, 2006. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/4. doi:http://eur-lex.europa.eu/pri/en/oj/dat/2003/l_285/l_28520031101en00330037.pdf

European Parliament, Council of the European union, 2008. Regulation (Ec) 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No. Off. J. Eur. Union L 353/1, 1355.

Ezendam, J., Braakhuis, H.M., Vandebriel, R.J., 2016. State of the art in non-animal approaches for skin sensitization testing: from individual test methods towards testing strategies. *Arch. Toxicol.* 90, 2861–2883. doi:10.1007/s00204-016-1842-4

F.

Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R., 2013. Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch. Toxicol.* 87, 1683–1696. doi:10.1007/s00204-013-1090-9

Fitzpatrick, J.M., Roberts, D.W., Patlewicz, G., 2017. What determines skin sensitization potency: Myths, maybes and realities. The 500 molecular weight cut-off: An updated analysis. *J. Appl. Toxicol.* 37, 105–116. doi:10.1002/jat.3348

Forster, R., Braun, A., Worbs, T., 2012. Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics. *Trends Immunol.* 33, 271–280. doi:10.1016/j.it.2012.02.007

Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., Lipp, M., 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23–33.

Freudenberg, M.A., Esser, P.R., Jakob, T., Galanos, C., Martin, S.F., 2009. Innate and adaptive immune responses in contact dermatitis: analogy with infections. *G. Ital. Dermatol. Venereol.* 144, 173–185.

Fukunaga, A., Khaskhely, N.M., Ma, Y., Sreevidya, C.S., Taguchi, K., Nishigori, C., Ullrich, S.E., 2010. Langerhans cells serve as immunoregulatory cells by activating NKT cells. *J. Immunol.* 185, 4633–4640. doi:10.4049/jimmunol.1000246

G.

Galbiati, V., Mitjans, M., Lucchi, L., Viviani, B., Galli, C.L., Marinovich, M., Corsini, E., 2011. Further development of the NCTC 2544 IL-18 assay to identify in vitro contact allergens. *Toxicol. Vitr.* 25, 724–732. doi:10.1016/j.tiv.2010.12.011

Gallucci, S., Matzinger, P., 2001. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 114–119. doi:10.1016/S0952-7915(00)00191-6

Gamerding, K., Moulon, C., Karp, D.R., van Bergen, J., Koning, F., Wild, D., Pflugfelder, U., Weltzien, H.U., 2003. A New Type of Metal Recognition by Human T Cells: Contact Residues for Peptide-independent Bridging of T Cell Receptor and Major Histocompatibility Complex by Nickel. *J. Exp. Med.* 197, 1345–1353.

doi:10.1084/jem.20030121

- Garcia, C., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.-C., Certa, H., Eigler, D., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R., Mehling, A., 2010. Comparative testing for the identification of skin-sensitizing potentials of nonionic sugar lipid surfactants. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 58, 301–307. doi:10.1016/j.yrtph.2010.06.016
- Gascoigne, N.R.J., Zal, T., 2004. Molecular interactions at the T cell-antigen-presenting cell interface. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 114–119. doi:10.1016/j.coi.2003.11.008
- Gaspari, A.A., 1997. The role of keratinocytes in the pathophysiology of contact dermatitis. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 17, 377–405. doi:https://doi.org/10.1016/S0889-8561(05)70316-7
- Gerberick, F., Aleksic, M., Basketter, D., Casati, S., Karlberg, A.-T., Kern, P., Kimber, I., Lepoittevin, J.P., Natsch, A., Ovigne, J.M., Rovida, C., Sakaguchi, H., Schultz, T., 2008. Chemical reactivity measurement and the predictive identification of skin sensitizers. The report and recommendations of ECVAM Workshop 64. *Altern. Lab. Anim.* 36, 215–242.
- Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Schlatter, H., Dearman, R.J., Kimber, I., Patlewicz, G.Y., Basketter, D.A., 2005. Compilation of historical local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods. *Dermat. contact, atopic, Occup. drug* 16, 157–202.
- Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kimber, I., Dearman, R.J., Lea, L.J., Basketter, D.A., 2000. Local lymph node assay: validation assessment for regulatory purposes. *Am. J. Contact Dermat.* 11, 3–18. doi:10.1053/ajcd.2000.0003
- Gerberick, G.F., Troutman, J.A., Foertsch, L.M., Vassallo, J.D., Quijano, M., Dobson, R.L.M., Goebel, C., Lepoittevin, J.-P., 2009. Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxidase oxidation system. *Toxicol. Sci.* 112, 164–174. doi:10.1093/toxsci/kfp192
- Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Bailey, R.E., Chaney, J.G., Morrall, S.W., Lepoittevin, J.-P., 2004. Development of a Peptide Reactivity Assay for Screening Contact Allergens. *Toxicol. Sci.* 81, 332–343. doi:10.1093/toxsci/kfh213
- Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Foertsch, L.M., Price, B.B., Chaney, J.G., Lepoittevin, J.-P., 2007. Quantification of Chemical Peptide Reactivity for Screening Contact Allergens: A Classification Tree Model Approach. *Toxicol. Sci.* 97, 417–427. doi:10.1093/toxsci/kfm064
- Gildea, L. a, Ryan, C. a, Foertsch, L.M., Kennedy, J.M., Dearman, R.J., Kimber, I., Gerberick, G.F., 2006. Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1813–22. doi:10.1038/sj.jid.5700319
- Gorbachev, A. V, Dilulio, N.A., Fairchild, R.L., 2001. IL-12 augments CD8+ T cell development for contact hypersensitivity responses and circumvents anti-CD154 antibody-mediated inhibition. *J. Immunol.* 167, 156–162.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 2005. The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 515–548. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611
- Guironnet, G., Dalbiez-Gauthier, C., Rousset, F., Schmitt, D., Peguet-Navarro, J., 2000. In vitro human T cell sensitization to haptens by monocyte-derived dendritic cells. *Toxicol. In Vitro* 14, 517–522.
- H.**
- Habif, T.P., Campbell, J.I.J., Chapman, M.S., Dinulos, J.G.H., Zug, K.A., Co, J.S., Lorette, G., 2012. *Maladies cutanées : diagnostic et traitement.* Elsevier Health Sciences France.

- Haig, D.M., Hopkins, J., Miller, H.R., 1999. Local immune responses in afferent and efferent lymph. *Immunology* 96, 155–63. doi:10.1046/j.1365-2567.1999.00681.x
- Hartung, T., Luechtefeld, T., Maertens, A., Kleensang, A., 2013. Integrated testing strategies for safety assessments. *ALTEX* 30, 3–18.
- He, D., Wu, L., Kim, H.K., Li, H., Elmets, C.A., Xu, H., 2006. CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J. Immunol.* 177, 6852–6858.
- He, D., Wu, L., Kim, H.K., Li, H., Elmets, C.A., Xu, H., 2009. IL-17 and IFN- γ mediate the elicitation of contact hypersensitivity responses by different mechanisms and both are required for optimal responses(). *J. Immunol.* 183, 1463–1470. doi:10.4049/jimmunol.0804108
- Hewitt, N.J., Edwards, R.J., Fritsche, E., Goebel, C., Aeby, P., Scheel, J., Reisinger, K., Ouedraogo, G., Duche, D., Eilstein, J., Latil, A., Kenny, J., Moore, C., Kuehnl, J., Barroso, J., Fautz, R., Pfuhrer, S., 2013. Use of human in vitro skin models for accurate and ethical risk assessment: metabolic considerations. *Toxicol. Sci.* 133, 209–217. doi:10.1093/toxsci/kft080
- Hirota, M., Fukui, S., Okamoto, K., Kurotani, S., Imai, N., Fujishiro, M., Kyotani, D., Kato, Y., Kasahara, T., Fujita, M., Toyoda, A., Sekiya, D., Watanabe, S., Seto, H., Takenouchi, O., Ashikaga, T., Miyazawa, M., 2015. Evaluation of combinations of in vitro sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J. Appl. Toxicol.* 35, 1333–1347. doi:10.1002/jat.3105
- Hirota, M., Kouzuki, H., Ashikaga, T., Sono, S., Tsujita, K., Sasa, H., Aiba, S., 2013. Artificial neural network analysis of data from multiple in vitro assays for prediction of skin sensitization potency of chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, 1233–46. doi:10.1016/j.tiv.2013.02.013
- Hoath, S.B., Leahy, D.G., 2003. The Organization of Human Epidermis: Functional Epidermal Units and Phi Proportionality. *J. Invest. Dermatol.* 121, 1440–1446. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12606.x
- Hoffmann, S., 2015. LLNA variability: An essential ingredient for a comprehensive assessment of non-animal skin sensitization test methods and strategies. *ALTEX* 32, 379–383. doi:http://dx.doi.org/10.14573/altex.1505051
- Honda, T., Egawa, G., Grabbe, S., Kabashima, K., 2013. Update of Immune Events in the Murine Contact Hypersensitivity Model: Toward the Understanding of Allergic Contact Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 133, 303–315. doi:10.1038/jid.2012.284
- Hooyberghs, J., Schoeters, E., Lambrechts, N., Nelissen, I., Witters, H., Schoeters, G., Van Den Heuvel, R., 2008. A cell-based in vitro alternative to identify skin sensitizers by gene expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 231, 103–111. doi:https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.03.014
- I.**
- ICCVAM, 2011. Test Method Evaluation Report: Usefulness and Limitations of the Murine Local Lymph Node Assay for Potency Categorization of Chemicals Causing Allergic Contact Dermatitis in Humans.
- Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Nakamura, A., 1993. A sensitive mouse lymph node assay with two application phases for detection of contact allergens. *Arch. Toxicol.* 67, 629–636.
- INERIS, 2013. Les méthodes alternatives en matière d'expérimentation animale, *Annales des Mines - Responsabilité et environnement.* doi:10.3917/re.071.0019
- INERIS, 2016. Note « Méthodes et outils émergents d'évaluation des dangers ».

Itano, A.A., Jenkins, M.K., 2003. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat. Immunol.* 4, 733–739. doi:10.1038/ni957

Itoh, K., Mimura, J., Yamamoto, M., 2010. Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1665–1678. doi:10.1089/ars.2010.3222

J.

Jakob, T., Ring, J., Udey, M.C., 2001. Multistep navigation of Langerhans/dendritic cells in and out of the skin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, 688–696. doi:10.1067/mai.2001.118797

Jaworska, J., Dancik, Y., Kern, P., Gerberick, F., Natsch, A., 2013. Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J. Appl. Toxicol.* doi:10.1002/jat.2869

Jaworska, J., Harol, A., Kern, P.S., Gerberick, G.F., 2011. Integrating non-animal test information into an adaptive testing strategy - skin sensitization proof of concept case. *ALTEX* 28, 211–225.

Jaworska, J., Hoffmann, S., 2010. Integrated Testing Strategy (ITS) - Opportunities to better use existing data and guide future testing in toxicology. *ALTEX* 27, 231–242.

Jaworska, J.S., Natsch, A., Ryan, C., Strickland, J., Ashikaga, T., Miyazawa, M., 2015. Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch. Toxicol.* 89, 2355–2383. doi:10.1007/s00204-015-1634-2

Jensen, C.S., Lisby, S., Baadsgaard, O., Vølund, A., Menné, T., 2002. Decrease in nickel sensitization in a Danish schoolgirl population with ears pierced after implementation of a nickel-exposure regulation. *Br. J. Dermatol.* 146, 636–642. doi:10.1046/j.1365-2133.2002.04666.x

Jiang, A., Bloom, O., Ono, S., Cui, W., Unternaehrer, J., Jiang, S., Whitney, J.A., Connolly, J., Banchereau, J., Mellman, I., 2007. Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity* 27, 610–624. doi:10.1016/j.immuni.2007.08.015

Jiang, W., Swiggard, W.J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R.M., Nussenzweig, M.C., 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375, 151–155. doi:10.1038/375151a0

Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., Amigorena, S., 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 557–569. doi:10.1038/nri3254

Johansson, H., Gradin, R., Forreryd, A., Agemark, M., Zeller, K., Johansson, A., Larne, O., Vliet, E. Van, Borrebaeck, C., Lindstedt, M., 2017. Evaluation of the GARD assay in a blind Cosmetics Europe study. *ALTEX* 1–10. doi:10.14573/altex.1701121

Johansson, H., Lindstedt, M., 2014. Prediction of Skin Sensitizers using Alternative Methods to Animal Experimentation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 115, 110–117. doi:10.1111/bcpt.12199

Johansson, H., Lindstedt, M., Albrekt, A.-S., Borrebaeck, C.A.K., 2011. A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests. *BMC Genomics* 12, 399. doi:10.1186/1471-2164-12-399

Johansson, H., Rydnert, F., Kühnl, J., Schepky, A., Borrebaeck, C., Lindstedt, M., 2014. Genomic Allergen Rapid Detection In-House Validation—A Proof of Concept. *Toxicol. Sci.* 139, 362–370.

Johansson, S.G.O., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P.S., Lanier, B.Q., Lockey, R.F., Motala, C., Ortega Martell, J.A.,

Platts-Mills, T.A.E., Ring, J., Thien, F., Van Cauwenberge, P., Williams, H.C., 2004. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 832–836. doi:10.1016/j.jaci.2003.12.591

Jowsey, I.R., Basketter, D.A., Westmoreland, C., Kimber, I., 2006. A future approach to measuring relative skin sensitising potency: a proposal. *J. Appl. Toxicol.* 26, 341–350. doi:10.1002/jat.1146

K.

Kaech, S.M., Cui, W., 2012. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 749–761. doi:10.1038/nri3307

Kamath, A.T., Henri, S., Battye, F., Tough, D.F., Shortman, K., 2002. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 100, 1734–1741.

Kaplan, D.H., Igyarto, B.Z., Gaspari, A.A., 2012. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 114–124. doi:10.1038/nri3150

Kapsenberg, M.L., 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 984–993. doi:10.1038/nri1246

Karlberg, A.-T., Bergstrom, M.A., Borje, A., Luthman, K., Nilsson, J.L.G., 2008. Allergic contact dermatitis--formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 53–69. doi:10.1021/tx7002239

Karlberg, A.T., Börje, A., Duus Johansen, J., Lidén, C., Rastogi, S., Roberts, D., Uter, W., White, I.R., 2013. Activation of non-sensitizing or low-sensitizing fragrance substances into potent sensitizers - Prehaptens and prohaptens. *Contact Dermatitis* 69, 323–334. doi:10.1111/cod.12127

Karlberg, A.T., Shao, L.P., Nilsson, U., Gafvert, E., Nilsson, J.L., 1994. Hydroperoxides in oxidized d-limonene identified as potent contact allergens. *Arch. Dermatol. Res.* 286, 97–103.

Kato, H., Okamoto, M., Yamashita, K., Nakamura, Y., Fukumori, Y., Nakai, K., Kaneko, H., 2003. Peptide-binding assessment using mass spectrometry as a new screening method for skin sensitization. *J. Toxicol. Sci.* 28, 19–24.

Kay, A., 2000. Overview of “Allergy and allergic diseases: with a view to the future”-of-Allergy-and-allergic-diseases. *Br. Med. Bull. Br. Counc.* 56, 843–864.

Kehren, J., Desvignes, C., Krasteva, M., Ducluzeau, M.T., Assossou, O., Horand, F., Hahne, M., Kagi, D., Kaiserlian, D., Nicolas, J.F., 1999. Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 189, 779–786.

Kendall, R.T., Feghali-Bostwick, C.A., 2014. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front. Pharmacol.* 5, 123. doi:10.3389/fphar.2014.00123

Kensler, T.W., Wakabayashi, N., Biswal, S., 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 89–116. doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046

Kerfoot, S.M., Szczepanik, M., Tung, J.W., Askenase, P.W., 2008. Identification of initiator B cells, a novel subset of activation-induced deaminase-dependent B-1-like cells that mediate initiation of contact sensitivity. *J. Immunol.* 181, 1717–1727.

Kern, P.S., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kimber, I., Aptula, A., Basketter, D.A., 2010. Local lymph node data for the

- evaluation of skin sensitization alternatives: a second compilation. *Dermat. contact, atopic, Occup. drug* 21, 8–32.
- Kim, E.-H., Surh, Y.-J., 2006. 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1516–1528. doi:10.1016/j.bcp.2006.07.030
- Kim, J.H., Hu, Y., Yongqing, T., Kim, J., Hughes, V.A., Le Nours, J., Marquez, E.A., Purcell, A.W., Wan, Q., Sugita, M., Rossjohn, J., Winau, F., 2016. CD1a on Langerhans cells controls inflammatory skin disease. *Nat. Immunol.* 17, 1159–1166. doi:10.1038/ni.3523
- Kimber, I., Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Dearman, R.J., 2011. Chemical allergy: translating biology into hazard characterization. *Toxicol. Sci.* 120 Suppl, S238–68. doi:10.1093/toxsci/kfq346
- Kimber, I., Basketter, D. a., Gerberick, G.F., Dearman, R.J., 2002. Allergic contact dermatitis. *Int. Immunopharmacol.* 2, 201–211.
- Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Scholes, E.W., Ladics, G.S., Loveless, S.E., House, R. V., Guy, A., 1995. An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. *Toxicology* 103, 63–73. doi:10.1016/0300-483X(95)03114-U
- Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Aiba, S., 2015. Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization. *Toxicol. Vitro.* 29, 1816–1830. doi:https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.07.006
- Kish, D.D., Gorbachev, A. V, Fairchild, R.L., 2005. CD8+ T cells produce IL-2, which is required for CD(4+)CD25+ T cell regulation of effector CD8+ T cell development for contact hypersensitivity responses. *J. Leukoc. Biol.* 78, 725–735. doi:10.1189/jlb.0205069
- Kish, D.D., Li, X., Fairchild, R.L., 2009. CD8 T cells producing IL-17 and IFN-gamma initiate the innate immune response required for responses to antigen skin challenge. *J. Immunol.* 182, 5949–5959. doi:10.4049/jimmunol.0802830
- Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhé, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C.H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D., Saeland, S., Davoust, J., Malissen, B., 2005. Dynamics and Function of Langerhans Cells In Vivo: Dermal Dendritic Cells Colonize Lymph Node Areas Distinct from Slower Migrating Langerhans Cells. *Immunity* 22, 643–654. doi:https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.04.004
- Kligman, A.M., 1966. The Identification of Contact Allergens by Human Assay: III. The Maximization Test: A Procedure for Screening and Rating Contact Sensitizers*. *J. Invest. Dermatol.* 47, 393–409. doi:https://doi.org/10.1038/jid.1966.160
- Kligman, A.M., Epstein, W., 1975. Updating the maximization test for identifying contact allergens. *Contact Dermatitis* 1, 231–239. doi:10.1111/j.1600-0536.1975.tb05389.x
- Kobayashi, Y., Matsumoto, M., Kotani, M., Makino, T., 1999. Possible involvement of matrix metalloproteinase-9 in Langerhans cell migration and maturation. *J. Immunol.* 163, 5989–5993.
- Kohl, L., Blondeel, A., Song, M., 2002. Retrospective Analysis of 819 Patch-Tested Patients 334–337.
- Kohler, J., Hartmann, U., Grimm, R., Pflugfelder, U., Weltzien, H.U., 1997. Carrier-independent hapten recognition and promiscuous MHC restriction by CD4 T cells induced by trinitrophenylated peptides. *J. Immunol.* 158, 591–597.
- Komura, J., Oguchi, M., Aoshima, T., Ofuji, S., 1980. Ultrastructural studies of allergic contact dermatitis in man. Infiltrating cells at the earliest phase of spongiotic bulla formation. *Arch. Dermatol. Res.* 267, 283–290.
- Kondo, S., Kooshesh, F., Wang, B., Fujisawa, H., Sauder, D.N., 1996. Contribution of the CD28 molecule to allergic

- and irritant-induced skin reactions in CD28 $-/-$ mice. *J. Immunol.* 157, 4822–4829.
- Kotturi, M.F., Scott, I., Wolfe, T., Peters, B., Sidney, J., Cheroutre, H., von Herrath, M.G., Buchmeier, M.J., Grey, H., Sette, A., 2008. Naive Precursor Frequencies and MHC Binding Rather Than the Degree of Epitope Diversity Shape CD8 $+$ T Cell Immunodominance. *J. Immunol.* 181, 2124–2133. doi:10.4049/jimmunol.181.3.2124
- Krasteva, M., Kehren, J., Ducluzeau, M.T., Sayag, M., Cacciapuoti, M., Akiba, H., Descotes, J., Nicolas, J.F., 1999. Contact dermatitis I. Pathophysiology of contact sensitivity. *Eur. J. Dermatol.* 9, 65–77.
- Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, D., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C., Wendel, A., 2008. 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 Chem. Toxicol.* 46, 1896–1904. doi:10.1016/j.fct.2008.01.019
- Kripke, M.L., Munn, C.G., Jeevan, A., Tang, J.M., Bucana, C., 1990. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J. Immunol.* 145, 2833 LP-2838.
- Kubo, A., Nagao, K., Yokouchi, M., Sasaki, H., Amagai, M., 2009. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J. Exp. Med.* 206, 2937–2946. doi:10.1084/jem.20091527
- Kuo, C.T., Leiden, J.M., 1999. Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 149–187. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.149
- L.**
- Lachapelle, J.M., Ale, S.I., Freeman, S., Frosch, P.J., Goh, C.L., Hannuksela, M., Hayakawa, R., Maibach, H.I., Wahlberg, J.E., 1997. Proposal for a revised international standard series of patch tests. *Contact Dermatitis* 36, 121–123.
- Lai, Y., Gallo, R., 2009. AMPed Up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 30, 131–141. doi:10.1016/j.it.2008.12.003.
- Lalko, J.F., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Troutman, J.A., Api, A.M., Kimber, I., 2013. Reactivity of chemical respiratory allergens in the Peroxidase Peptide Reactivity Assay. *Toxicol. In Vitro* 27, 651–61. doi:10.1016/j.tiv.2012.10.016
- Lambrechts, N., Vanheel, H., Nelissen, I., Witters, H., Van Den Heuvel, R., Van Tendeloo, V., Schoeters, G., Hooyberghs, J., 2010. Assessment of chemical skin-sensitizing potency by an in vitro assay based on human dendritic cells. *Toxicol. Sci.* 116, 122–129. doi:10.1093/toxsci/kfq108
- Lambrechts, N., Verstraelen, S., Lodewyckx, H., Felicio, A., Hooyberghs, J., Witters, H., Van Tendeloo, V., Van Cauwenberge, P., Nelissen, I., Van Den Heuvel, R., Schoeters, G., 2009. THP-1 monocytes but not macrophages as a potential alternative for CD34 $+$ dendritic cells to identify chemical skin sensitizers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236, 221–230. doi:10.1016/j.taap.2009.01.026
- Landsteiner, K., Jacobs, J., 1935. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *J. Exp. Med.* 61, 643–656.
- Lebre, M.C., van der Aar, A.M.G., van Baarsen, L., van Capel, T.M.M., Schuitemaker, J.H.N., Kapsenberg, M.L., de Jong, E.C., 2007. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J. Invest. Dermatol.* 127, 331–341. doi:10.1038/sj.jid.5700530
- Lepoittevin, J.P., 2006. Metabolism versus chemical transformation or pro- versus prehapens? *Contact*

- Dermatitis 54, 73–74. doi:10.1111/j.0105-1873.2006.00795.x
- Lepoittevin, J.P., Cribier, B., 1998. [Physiopathology of contact eczema]. *Ann. Dermatol. Venereol.* 125, 775–782.
- Lindberg, M., Edman, B., Fischer, T., Stenberg, B., 2007. Time trends in Swedish patch test data from 1992 to 2000. A multi-centre study based on age- and sex-adjusted results of the Swedish standard series. *Contact Dermatitis* 56, 205–210. doi:10.1111/j.1600-0536.2006.01063.x
- Lindstedt, M., Borrebaeck, C., 2011. Pattern rules: biomarker signatures for sensitization as an alternative to animal testing. *Biomark. Med.* 5, 809–811. doi:10.2217/bmm.11.82
- Liston, A., Gray, D.H.D., 2014. Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 154–165. doi:10.1038/nri3605
- Loveless, S.E., Ladies, G.S., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Scholes, E.W., House, R. V., Hilton, J., Dearman, R.J., Kimber, I., 1996. Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. *Toxicology* 108, 141–152. doi:10.1016/0300-483X(95)03279-0
- Lu, L., Vollmer, J., Moulon, C., Weltzien, H.U., Marrack, P., Kappler, J., 2003. Components of the ligand for a Ni⁺⁺ reactive human T cell clone. *J. Exp. Med.* 197, 567–574.
- Lunder, T., Kansky, a, 2000. Increase in contact allergy to fragrances: patch-test results 1989-1998. *Contact Dermatitis* 43, 107–9. doi:10.1034/j.1600-0536.2000.043002107.x

M.

- Ma, Q., 2014. Merkel Cells Are a Touchy Subject. *Cell* 157, 531–533. doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.010
- Macatonia, S.E., Edwards, a J., Knight, S.C., 1986. Dendritic cells and the initiation of contact sensitivity to fluorescein isothiocyanate. *Immunology* 59, 509–14.
- Macatonia, S.E., Knight, S.C., Edwards, A.J., Griffiths, S., Fryer, P., 1987. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J. Exp. Med.* 166, 1654–1667.
- Magnusson, B., Kligman, A.M., 1969. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol.* 52, 268–276.
- Martin, S., Ortmann, B., Pflugfelder, U., Birsner, U., Weltzien, H.U., 1992. Role of hapten-anchoring peptides in defining hapten-epitopes for MHC-restricted cytotoxic T cells. Cross-reactive TNP-determinants on different peptides. *J. Immunol.* 149, 2569 LP-2575.
- Martin, S.F., 2015. New concepts in cutaneous allergy. *Contact Dermatitis* 72, 2–10. doi:10.1111/cod.12311
- Martin, S.F., Dudda, J.C., Bachtanian, E., Lembo, A., Liller, S., Dürr, C., Heimesaat, M.M., Bereswill, S., Fejer, G., Vassileva, R., Jakob, T., Freudenberg, N., Termeer, C.C., Johner, C., Galanos, C., Freudenberg, M. a, 2008. Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 205, 2151–2162. doi:10.1084/jem.20070509
- Martin, S.F., Esser, P.R., Schmucker, S., Dietz, L., Naisbitt, D.J., Park, B.K., Vocanson, M., Nicolas, J.F., Keller, M., Pichler, W.J., Peiser, M., Luch, A., Wanner, R., Maggi, E., Cavani, A., Rustemeyer, T., Richter, A., Thierse, H.J., Sallusto, F., 2010. T-cell recognition of chemicals, protein allergens and drugs: Towards the development of in vitro assays. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 4171–4184. doi:10.1007/s00018-010-0495-3

- Martin, S.F., Esser, P.R., Weber, F.C., Jakob, T., Freudenberg, M.A., Schmidt, M., Goebeler, M., 2011. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy* 66, 1152–1163. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02652.x
- Martin, S.F., Merfort, I., Thierse, H.-J., 2006. Interactions of chemicals and metal ions with proteins and role for immune responses. *Mini Rev. Med. Chem.* 6, 247–255.
- Martinon, F., 2010. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur. J. Immunol.* 40, 616–619. doi:10.1002/eji.200940168
- Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K., Ichijo, H., 2005. ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat. Immunol.* 6, 587–592. doi:10.1038/ni1200
- Matura, M., Goossens, A., Bordalo, O., Garcia-Bravo, B., Magnusson, K., Wrangsjö, K., Karlberg, A.-T., 2002. Oxidized citrus oil (R-limonene): A frequent skin sensitizer in Europe. *J. Am. Acad. Dermatol.* 47, 709–714. doi:https://doi.org/10.1067/mjd.2002.124817
- McKim, J.M.J., Keller, D.J. 3rd, Gorski, J.R., 2010. A new in vitro method for identifying chemical sensitizers combining peptide binding with ARE/EpRE-mediated gene expression in human skin cells. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 29, 171–192. doi:10.3109/15569527.2010.483869
- McKim, J.M.J., Keller, D.J. 3rd, Gorski, J.R., 2012. An in vitro method for detecting chemical sensitization using human reconstructed skin models and its applicability to cosmetic, pharmaceutical, and medical device safety testing. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 31, 292–305. doi:10.3109/15569527.2012.667031
- McLafferty, E., Hendry, C., Alistair, F., 2012. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nurs. Stand.* 27, 35–42.
- McMahon, T., 2011. Evaluation of the Murine Local Lymph Node Assay (LLNA) for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Hazard Potential of Pesticide Formulations, in: Evaluation of the Murine Local Lymph Node Assay (LLNA) for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Hazard Potential of Pesticide Formulations.
- Merad, M., Ginhoux, F., Collin, M., 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 935–947. doi:10.1038/nri2455
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., Mortha, A., 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 563–604. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950
- Merckel, F., Giménez-Arnau, E., Gerberick, G.F., Lepoittevin, J.-P., 2013. In chemico evaluation of prohaptens skin sensitizers: behavior of 2-methoxy-4-(¹³C)methylphenol in the peroxidase peptide reactivity assay (PPRA) as an alternative to animal testing. *Toxicol. Lett.* 218, 266–72. doi:10.1016/j.toxlet.2013.02.008
- Migdal, C., Tailhardat, M., Courtellemont, P., Haftek, M., Serres, M., 2010. Responsiveness of human monocyte-derived dendritic cells to thimerosal and mercury derivatives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 246, 66–73. doi:10.1016/j.taap.2010.04.007
- Milpied-Homsy, B., Collet, E., Vigan, M., 2009. Allergic dermatitis. *Ann. Dermatol. Venereol.* 136, 573.
- Miyazawa, M., Ito, Y., Kosaka, N., Nukada, Y., Sakaguchi, H., Suzuki, H., Nishiyama, N., 2008a. Role of TNF-alpha and extracellular ATP in THP-1 cell activation following allergen exposure. *J. Toxicol. Sci.* 33, 71–83.
- Miyazawa, M., Ito, Y., Kosaka, N., Nukada, Y., Sakaguchi, H., Suzuki, H., Nishiyama, N., 2008b. Role of MAPK signaling pathway in the activation of dendritic type cell line, THP-1, induced by DNCB and NiSO₄. *J. Toxicol. Sci.* 33, 51–59. doi:10.2131/jts.33.51

- Mizuashi, M., Ohtani, T., Nakagawa, S., Aiba, S., 2005. Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 124, 579–586. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23624.x
- Moniaga, C.S., Egawa, G., Kawasaki, H., Hara-Chikuma, M., Honda, T., Tanizaki, H., Nakajima, S., Otsuka, A., Matsuoka, H., Kubo, A., Sakabe, J., Tokura, Y., Miyachi, Y., Amagai, M., Kabashima, K., 2010. Flaky tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state and by topical application with Dermatophagoides pteronyssinus extract. *Am. J. Pathol.* 176, 2385–2393. doi:10.2353/ajpath.2010.090957
- Monzon, M.E., Fregien, N., Schmid, N., Falcon, N.S., Campos, M., Casalino-Matsuda, S.M., Forteza, R.M., 2010. Reactive oxygen species and hyaluronidase 2 regulate airway epithelial hyaluronan fragmentation. *J. Biol. Chem.* 285, 26126–26134. doi:10.1074/jbc.M110.135194
- Moss, E., Debeuckelaere, C., Berl, V., Elbayed, K., Moussallieh, F.M., Namer, I.J., Lepoittevin, J.P., 2016. In Situ Metabolism of Cinnamyl Alcohol in Reconstructed Human Epidermis: New Insights into the Activation of This Fragrance Skin Sensitizer. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 1172–1178. doi:10.1021/acs.chemrestox.6b00148
- Mowad, C.M., Anderson, B., Scheinman, P., Pootongkam, S., Nedorost, S., Brod, B., 2016. Allergic contact dermatitis: Patient diagnosis and evaluation. *J. Am. Acad. Dermatol.* 74, 1029–1040. doi:https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.02.1139
- Muto, J., Morioka, Y., Yamasaki, K., Kim, M., Garcia, A., Carlin, A.F., Varki, A., Gallo, R.L., 2014. Hyaluronan digestion controls DC migration from the skin. *J. Clin. Invest.* 124, 1309–1319. doi:10.1172/JCI67947

N.

- Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., Sekikawa, K., Asano, M., Iwakura, Y., 2002. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17, 375–387.
- Natsch, A., 2009. The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers-Functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers. *Toxicol. Sci.* 113, 284–292. doi:10.1093/toxsci/kfp228
- Natsch, A., Emter, R., 2008. Skin Sensitizers Induce Antioxidant Response Element Dependent Genes: Application to the In Vitro Testing of the Sensitization Potential of Chemicals. *Toxicol. Sci.* 102, 110–119. doi:10.1093/toxsci/kfm259
- Natsch, A., Emter, R., Ellis, G., 2009. Filling the concept with data: integrating data from different in vitro and in silico assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol. Sci.* 107, 106–21. doi:10.1093/toxsci/kfn204
- Natsch, A., Emter, R., Gfeller, H., Haupt, T., Ellis, G., 2015. Predicting skin sensitizer potency based on in vitro data from KeratinoSens and kinetic peptide binding: global versus domain-based assessment. *Toxicol. Sci.* 143, 319–332. doi:10.1093/toxsci/kfu229
- Natsch, A., Gfeller, H., 2008. LC-MS-based characterization of the peptide reactivity of chemicals to improve the in vitro prediction of the skin sensitization potential. *Toxicol. Sci.* 106, 464–478. doi:10.1093/toxsci/kfn194
- Natsch, A., Ryan, C.A., Foertsch, L., Emter, R., Jaworska, J., Gerberick, F., Kern, P., 2013. A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *J. Appl. Toxicol.* 33, 1337–1352. doi:10.1002/jat.2868
- Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z., Nickoloff, B.J., 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 679–691. doi:10.1038/nri2622

- Nguyen, S.H., Dang, T.P., MacPherson, C., Maibach, H., Maibach, H.I., 2008. Prevalence of patch test results from 1970 to 2002 in a multi-centre population in North America (NACDG). *Contact Dermatitis* 58, 101–106. doi:10.1111/j.1600-0536.2007.01281.x
- Nicholson, P., Llewellyn, D., English, J., 2010. Evidence-based guidelines for the prevention, identification and management of occupational contact dermatitis and urticaria*. *Contact Dermatitis* 177–186.
- Nicolas, J.-F., 2015. Hypersensibilité aux médicaments. *Rev. Prat.* 65, 967–989.
- Nosbaum, A., Nicolas, J.F., Vocanson, M., Rozieres, A., Berard, F., 2010. Dermatite de contact allergique et irritative. *Physiopathologie et diagnostic immunologique. Arch. des Mal. Prof. l'Environnement* 71, 394–397. doi:10.1016/j.admp.2010.03.059
- Nosbaum, A., Rozieres, A., Hennino, A., Nicolas, J.-F., Vocanson, M., 2009. Allergic and irritant contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 19, 325–332.
- Novak, N., Baurecht, H., Schafer, T., Rodriguez, E., Wagenpfeil, S., Klopp, N., Heinrich, J., Behrendt, H., Ring, J., Wichmann, E., Illig, T., Weidinger, S., 2008. Loss-of-function mutations in the filaggrin gene and allergic contact sensitization to nickel. *J. Invest. Dermatol.* 128, 1430–1435. doi:10.1038/sj.jid.5701190
- Nukada, Y., Miyazawa, M., Kazutoshi, S., Sakaguchi, H., Nishiyama, N., 2013. Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, 609–18. doi:10.1016/j.tiv.2012.11.006

O.

- OECD, 1992. Test No. 406: Skin Sensitisation, Guideline for testing of chemicals. doi:10.1787/9789264070684-en
- OECD, 2002. Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay 1–7.
- OECD, 2010a. Test No. 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA. Paris.
- OECD, 2010b. Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA.
- OECD, 2010c. Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Guideline for testing of chemicals. doi:http://dx.doi.org/10.1787/9789264071100-en
- OECD, 2012. The adverse outcome pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding for proteins. Part 1. Scientific evidence OECD environment, health and safety publications series on testing and assessment.
- OECD, 2015a. Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA).
- OECD, 2015b. Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation. OECD Environ. Heal. Saf. Publ. 1–20. doi:10.1787/9789264229822-en
- OECD, 2016a. Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT). doi:http://dx.doi.org/10.1787/9789264264359-en
- OECD, 2016b. Guidance document on the reporting of defined approaches and individual information sources to be used within integrated approaches to testing and assessment (IATA) for skin sensitization. ENV/JM/MONO(2016)29. OECD Publishing, Paris.
- OECD, 2016c. Guidance document on the reporting of defined approaches to be used within integrated approaches to testing and assessment. ENV/JM/MONO(2016)28. OECD Publishing, Paris.

OECD, 2017a. DRAFT KEY EVENT BASED TEST GUIDELINES 442D In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the AOP Key Event on : Keratinocyte activation.

OECD, 2017b. Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation.

Off J Eur Union, 1994. European Parliament and Council Directive 94/27/EC.

Ouwehand, K., Santegoets, S.J.A.M., Bruynzeel, D.P., Scheper, R.J., de Gruijl, T.D., Gibbs, S., 2008. CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis. *Eur. J. Immunol.* 38, 3050–3059. doi:10.1002/eji.200838384

P.

Pasparakis, M., Haase, I., Nestle, F.O., 2014. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 289–301. doi:10.1038/nri3646

Patlewicz, G., Ball, N., Boogaard, P.J., Becker, R.A., Hubesch, B., 2015. Building scientific confidence in the development and evaluation of read-across. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 72, 117–133. doi:10.1016/j.yrtph.2015.03.015

Pawankar, R., Canonica, G., Holgate, S., Lockey, R., Blaiss, M., 2011. WAO White Book on Allergy.

Peiser, M., Tralau, T., Heidler, J., Api, A.M., Arts, J.H.E., Basketter, D.A., English, J., Diepgen, T.L., Fuhlbrigge, R.C., Gaspari, A.A., Johansen, J.D., Karlberg, A.T., Kimber, I., Lepoittevin, J.P., Liebsch, M., Maibach, H.I., Martin, S.F., Merk, H.F., Platzek, T., Rustemeyer, T., Schnuch, A., Vandebriel, R.J., White, I.R., Luch, A., 2012. Allergic contact dermatitis: Epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 763–781. doi:10.1007/s00018-011-0846-8

Petry, T., Bosch, A., Coste, X., Dupuis, V., Eigler, D., Germain, P., 2012. An assessment of the skin sensitisation hazard of a group of polyfunctional silicones using a weight of evidence approach. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 64, 305–14. doi:10.1016/j.yrtph.2012.08.021

Pichler, W.J., Beeler, A., Keller, M., Lerch, M., Posadas, S., Schmid, D., Spanou, Z., Zawodniak, A., Gerber, B., 2006. Pharmacological interaction of drugs with immune receptors: the p-i concept. *Allergol. Int.* 55, 17–25. doi:10.2332/allergolint.55.17

Pickard, C., Smith, A.M., Cooper, H., Strickland, I., Jackson, J., Healy, E., Friedmann, P.S., 2007. Investigation of Mechanisms Underlying the T-Cell Response to the Hapten 2,4-Dinitrochlorobenzene. *J. Invest. Dermatol.* 127, 630–637. doi:https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700581

Piroid, C., Ovigne, J.-M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N., 2015. The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. Vitro.* 29, 901–916. doi:10.1016/j.tiv.2015.03.009

Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J.-M., 2008. The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* 17, 1063–1072.

Proksch, E., Fölster-Holst, R., Jensen, J.M., 2006. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J. Dermatol. Sci.* 43, 159–169. doi:10.1016/j.jdermsci.2006.06.003

Python, F., Goebel, C., Aeby, P., 2007. Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220, 113–124. doi:10.1016/j.taap.2006.12.026

Python, F., Goebel, C., Aeby, P., 2009. Comparative DNA microarray analysis of human monocyte derived dendritic cells and MUTZ-3 cells exposed to the moderate skin sensitizer cinnamaldehyde. *Toxicol. Appl.*

Pharmacol. 239, 273–283. doi:10.1016/j.taap.2009.06.003

R.

- Raffalli, C., Clouet, E., Kuresepi, S., Damiens, M.-H., Lepoittevin, J.-P., Pallardy, M., Ferret, P.-J., Giménez-Arnau, E., Kerdine-Römer, S., 2017. Fragrance Allergens Linalool and Limonene Allylic Hydroperoxides in Skin Allergy: Mechanisms of Action Focusing on Transcription Factor Nrf2. *Toxicol. Sci.* 1–10. doi:10.1093/toxsci/kfx207
- Raghavan, B., Martin, S.F., Esser, P.R., Goebeler, M., Schmidt, M., 2012. Metal allergens nickel and cobalt facilitate TLR4 homodimerization independently of MD2. *EMBO Rep.* 13, 1109–1115. doi:10.1038/embor.2012.155
- Ramirez, T., Mehling, A., Kolle, S.N., Wruck, C.J., Teubner, W., Eltze, T., Aumann, A., Urbisch, D., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R., 2014. LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. *Toxicol. In Vitro* 28, 1482–97. doi:10.1016/j.tiv.2014.08.002
- Ratzinger, G., Stoitzner, P., Ebner, S., Lutz, M.B., Layton, G.T., Rainer, C., Senior, R.M., Shipley, J.M., Fritsch, P., Schuler, G., Romani, N., 2002. Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *J. Immunol.* 168, 4361–4371.
- Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., Van Vliet, E., Maxwell, G., 2015. Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. Vitro* 29, 259–272. doi:10.1016/j.tiv.2014.10.018
- Reuter, H., Spieker, J., Gerlach, S., Engels, U., Pape, W., Kolbe, L., Schmucker, R., Wenck, H., Diembeck, W., Wittern, K.P., Reisinger, K., Schepky, A.G., 2011. In vitro detection of contact allergens: Development of an optimized protocol using human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *Toxicol. Vitro* 25, 315–323. doi:10.1016/j.tiv.2010.09.016
- Richters, C.D., Hoekstra, M.J., van Baare, J., Du Pont, J.S., Hoefsmit, E.C., Kamperdijk, E.W., 1994. Isolation and characterization of migratory human skin dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 98, 330–6.
- Riemann, H., Loser, K., Beissert, S., Fujita, M., Schwarz, A., Schwarz, T., Grabbe, S., 2005. IL-12 breaks dinitrothiocyanobenzene (DNTB)-mediated tolerance and converts the tolerogen DNTB into an immunogen. *J. Immunol.* 175, 5866–5874.
- Ring, S., Karakhanova, S., Johnson, T., Enk, A.H., Mahnke, K., 2010. Gap junctions between regulatory T cells and dendritic cells prevent sensitization of CD8(+) T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 237. doi:10.1016/j.jaci.2009.10.025
- Ring, S., Schafer, S.C., Mahnke, K., Lehr, H.-A., Enk, A.H., 2006. CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *Eur. J. Immunol.* 36, 2981–2992. doi:10.1002/eji.200636207
- Roberts, D.W., 2015. Estimating skin sensitization potency from a single dose LLNA. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 437–443. doi:10.1016/j.yrtph.2015.01.009
- Roberts, D.W., Aptula, A.O., Patlewicz, G., Pease, C., 2008. Chemical reactivity indices and mechanism-based read-across for non-animal based assessment of skin sensitisation potential. *J. Appl. Toxicol.* 28, 443–454. doi:10.1002/jat.1293

- Roberts, D.W., Mekenyan, O.G., Dimitrov, S.D., Dimitrova, G.D., 2013. What determines skin sensitization potency-myths, maybes and realities. Part 1. The 500 molecular weight cut-off. *Contact Dermatitis* 68, 32–41. doi:10.1111/j.1600-0536.2012.02160.x
- Roberts, D.W., Natsch, A., 2009. High Throughput Kinetic Profiling Approach for Covalent Binding to Peptides: Application to Skin Sensitization Potency of Michael Acceptor Electrophiles. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 592–603. doi:10.1021/tx800431x
- Romagnoli, P., Labhardt, a M., Sinigaglia, F., 1991. Selective interaction of Ni with an MHC-bound peptide. *EMBO J.* 10, 1303–1306.
- Romani, N., Holzmann, S., Tripp, C.H., Koch, F., Stoitzner, P., 2003. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *Apmis* 111, 725–740. doi:DOI 10.1034/j.1600-0463.2003.11107805.x
- Rovida, C., Alépée, N., Api, A.M., Basketter, D.A., Bois, F.Y., Caloni, F., Corsini, E., Daneshian, M., Eskes, C., Ezendam, J., Fuchs, H., Hayden, P., Hegele-Hartung, C., Hoffmann, S., Hubesch, B., Jacobs, M.N., Jaworska, J., Kleensang, A., Kleinstreuer, N., Lalko, J., Landsiedel, R., Lebreux, F., Luechtefeld, T., Locatelli, M., Mehling, A., Natsch, A., Pitchford, J.W., Prater, D., Prieto, P., Schepky, A., Schüürmann, G., Smirnova, L., Toole, C., Van Vliet, E., Weisensee, D., Hartung, T., 2015. Integrated testing strategies (ITS) for safety assessment, in: *Altex*. doi:10.14573/altex.1411011
- Ruckert, R., Brandt, K., Hofmann, U., Bulfone-Paus, S., Paus, R., 2002. IL-2-IgG2b fusion protein suppresses murine contact hypersensitivity in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 119, 370–376. doi:10.1046/j.1523-1747.2002.01849.x
- Rustemeyer, T., De Ligter, S., Von Blomberg, B.M.E., Frosch, P.J., Scheper, R.J., 1999. Human T lymphocyte priming in vitro by haptenated autologous dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 117, 209–216. doi:10.1046/j.1365-2249.1999.00958.x
- Ryan, C.A., Gerberick, G.F., Gildea, L.A., Hulette, B.C., Betts, C.J., Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Kimber, I., 2005. Interactions of contact allergens with dendritic cells: opportunities and challenges for the development of novel approaches to hazard assessment. *Toxicol. Sci.* 88, 4–11. doi:10.1093/toxsci/kfi245
- Ryan, C.A., Gildea, L.A., Hulette, B.C., Dearman, R.J., Kimber, I., Gerberick, G.F., 2004. Gene expression changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301–316. doi:10.1016/j.toxlet.2004.02.002

S.

- Saei, A., Hadjati, J., 2013. Tolerogenic dendritic cells: key regulators of peripheral tolerance in health and disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 161, 293–303. doi:10.1159/000350328
- Saint-Mezard, P., Rosieres, A., Krasteva, M., Berard, F., Dubois, B., Kaiserlian, D., Nicolas, J.-F., 2004. Allergic contact dermatitis. *Eur. J. Dermatol.* 14, 284–295.
- Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., Itagaki, H., Toyoda, H., Suzuki, H., 2006. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol. In Vitro* 20, 774–84. doi:10.1016/j.tiv.2005.10.014
- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., Nomura, T., 2006. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 212, 8–27. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x
- Sawada, Y., Honda, T., Hanakawa, S., Nakamizo, S., Murata, T., Ueharaguchi-Tanada, Y., Ono, S., Amano, W.,

- Nakajima, S., Egawa, G., Tanizaki, H., Otsuka, A., Kitoh, A., Dainichi, T., Ogawa, N., Kobayashi, Y., Yokomizo, T., Arita, M., Nakamura, M., Miyachi, Y., Kabashima, K., 2015. Resolvin E1 inhibits dendritic cell migration in the skin and attenuates contact hypersensitivity responses. *J. Exp. Med.* 212, 1921–1930. doi:10.1084/jem.20150381
- SCCS, 2015. Scientific Committee on Consumer Safety Opinion on Methylisothiazolinone (MI) (P94) Submission III (Sensitisation only). Eur. Commission, Opin. Methylisothiazolinone (P94) Submission III (Sensitisation only). doi:10.2772/7297
- Schlede, E., Aberer, W., Fuchs, T., Gerner, I., Lessmann, H., Maurer, T., Rossbacher, R., Stropp, G., Wagner, E., Kayser, D., 2003. Chemical substances and contact allergy—244 substances ranked according to allergenic potency. *Toxicology* 193, 219–259.
- Schmidt, M., Goebeler, M., 2015. Immunology of metal allergies. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 13, 653–660. doi:10.1111/ddg.12673
- Schnuch, A., Uter, W., 2003. Decrease in nickel allergy in Germany and regulatory interventions. *Contact Dermatitis* 49, 107–108. doi:10.1111/j.0105-1873.2003.0128f.x
- Schnuch, A., Westphal, G.A., Müller, M.M., Schulz, T.G., Geier, J., Brasch, J., Merk, H.F., Kawakubo, Y., Richter, G., Koch, P., Fuchs, T., Gutgesell, T., Reich, K., Gebhardt, M., Becker, D., Grabbe, J., Szliska, C., Aberer, W., Hallier, E., 1998. Genotype and phenotype of N-acetyltransferase 2 (NAT2) polymorphism in patients with contact allergy. *Contact Dermatitis* 38, 209–211. doi:10.1111/j.1600-0536.1998.tb05709.x
- Schoeters, E., Verheyen, G.R., Nelissen, I., Van Rompay, A.R., Hooyberghs, J., Van Den Heuvel, R.L., Witters, H., Schoeters, G.E.R., Van Tendeloo, V.F.I., Berneman, Z.N., 2007. Microarray analyses in dendritic cells reveal potential biomarkers for chemical-induced skin sensitization. *Mol. Immunol.* 44, 3222–3233. doi:10.1016/j.molimm.2007.01.031
- Schwarzenberger, K., Udey, M.C., 1996. Contact Allergens and Epidermal Proinflammatory Cytokines Modulate Langerhans Cell E-cadherin Expression in Situ. *J. Invest. Dermatol.* 106, 553–558. doi:10.1111/1523-1747.ep12344019
- Scientific committee on consumer products, 2005. Classification and categorization of skin sensitizers and grading of test reactions, SCCP/0919/05.
- Seneschal, J., Clark, R.A., Gehad, A., Baecher-Allan, C.M., Kupper, T.S., 2012. Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. *Immunity* 36, 873–884. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.018
- Seré, K., Baek, J.-H., Ober-Blöbaum, J., Müller-Newen, G., Tacke, F., Yokota, Y., Zenke, M., Hieronymus, T., 2012. Two Distinct Types of Langerhans Cells Populate the Skin during Steady State and Inflammation. *Immunity* 37, 905–916. doi:https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.07.019
- Sieben, S., Baron, J.M., Blomeke, B., Merk, H.F., 1999. Multiple cytochrome P450-isoenzymes mRNA are expressed in dendritic cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118, 358–361. doi:24135
- Sligh, J.E.J., Ballantyne, C.M., Rich, S.S., Hawkins, H.K., Smith, C.W., Bradley, A., Beudet, A.L., 1993. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8529–8533.
- States., U., States., A. of F. and D.O. of the U., 1959. Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs, and cosmetics.
- Stingl, G., Katz, S.I., Clement, L., Green, I., Shevach, E.M., 1978. Immunologic Functions of Ia-Bearing Epidermal Langerhans Cells. *J. Immunol.* 121, 2005 LP-2013.

Strickland, J., Zang, Q., Paris, M., Lehmann, D.M., Allen, D., Choksi, N., Matheson, J., Jacobs, A., Casey, W., Kleinstreuer, N., 2017. Multivariate models for prediction of human skin sensitization hazard. *J. Appl. Toxicol.* 37, 347–360. doi:10.1002/jat.3366

T.

Takahashi, T., Kimura, Y., Saito, R., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Yamasaki, K., Aiba, S., 2011. An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol. Sci.* 124, 359–369. doi:10.1093/toxsci/kfr237

Takenouchi, O., Fukui, S., Okamoto, K., Kurotani, S., Imai, N., Fujishiro, M., Kyotani, D., Kato, Y., Kasahara, T., Fujita, M., Toyoda, A., Sekiya, D., Watanabe, S., Seto, H., Hirota, M., Ashikaga, T., Miyazawa, M., 2015. Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J. Appl. Toxicol.* 35, 1318–1332. doi:10.1002/jat.3127

Tang, A., Amagai, M., Granger, L.G., Stanley, J.R., Uddy, M.C., 1993. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361, 82–85.

Templeton, D.M., 2004. Mechanisms of immunosensitization to metals (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* doi:10.1351/pac200476061255

Thierse, H.-J., Gamberdinger, K., Junkes, C., Guerreiro, N., Weltzien, H.U., 2005. T cell receptor (TCR) interaction with haptens: metal ions as non-classical haptens. *Toxicology* 209, 101–107. doi:10.1016/j.tox.2004.12.015

Thierse, Budde, Dietz, Ohnesorge, Eikelmeier, Conde, 2011. Proteomic identification of allergen-regulated proteins and allergen-protein interaction networks in assisting biomarker and assay development. *Prog. Towar. Nov. Test. Strateg. Vitro. Assess. Allergens.*

Thyssen, J.P., Linneberg, A., Menné, T., Johansen, J.D., 2007. The epidemiology of contact allergy in the general population—prevalence and main findings. *Contact Dermatitis* 57, 287–99. doi:10.1111/j.1600-0536.2007.01220.x

Tomura, M., Honda, T., Tanizaki, H., Otsuka, A., Egawa, G., Tokura, Y., Waldmann, H., Hori, S., Cyster, J.G., Watanabe, T., Miyachi, Y., Kanagawa, O., Kabashima, K., 2010. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 883–893. doi:10.1172/JCI40926

Tortora, G., Derrickson, B., 2014. Principles of anatomy & physiology. 14th ed. John Wiley & Sons, pp.523-571., John Wiley. ed.

Tracey, B.M., Shuker, D.E.G., 1997. Characterization of Azo Coupling Adducts of Benzenediazonium Ions with Aromatic Amino Acids in Peptides and Proteins. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1378–1386. doi:10.1021/tx970117+

Trompezinski, S., Migdal, C., Tailhardat, M., Le Varlet, B., Courtellemont, P., Haftek, M., Serres, M., 2008. Characterization of early events involved in human dendritic cell maturation induced by sensitizers: Cross talk between MAPK signalling pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 230, 397–406. doi:10.1016/j.taap.2008.03.012

Tsujita-Inoue, K., Hirota, M., Ashikaga, T., Atobe, T., Kouzuki, H., Aiba, S., 2014. Skin sensitization risk assessment model using artificial neural network analysis of data from multiple in vitro assays. *Toxicol. In Vitro* 28, 626–39. doi:10.1016/j.tiv.2014.01.003

U.

Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H., 2015. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337–351. doi:10.1016/j.yrtph.2014.12.008

Usatine, R.P., Riojas, M., 2010. Diagnosis and management of contact dermatitis. *Am. Fam. Physician* 82, 249–255.

V.

Vabulas, R.M., Ahmad-Nejad, P., Ghose, S., Kirschning, C.J., Issels, R.D., Wagner, H., 2002. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 15107–15112. doi:10.1074/jbc.M111204200

Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., Caux, C., Lebecque, S., Saeland, S., 2000. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12, 71–81.

van der Veen, J., Vandebriel, R., van Loveren, H., Ezendam, J., 2011. Keratinocytes, innate immunity and allergic contact dermatitis- opportunities for the development of in vitro assays to predict the sensitizing potential of chemicals. In: Ro YS (ed) ., *Contact de. ed.*

van der Veen, J.W., Pronk, T.E., van Loveren, H., Ezendam, J., 2013. Applicability of a keratinocyte gene signature to predict skin sensitizing potential. *Toxicol. In Vitro* 27, 314–322. doi:10.1016/j.tiv.2012.08.023

van der Veen, J.W., Rorije, E., Emter, R., Natsch, A., Van, L.H., Ezendam, J., 2014. Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69, 371–9. doi:10.1016/j.yrtph.2014.04.018

van Och, F.M., Slob, W., de Jong, W.H., Vandebriel, R.J., van Loveren, H., 2000. A quantitative method for assessing the sensitizing potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of the uncertainty margins. *Toxicology* 146, 49–59.

Van Och, F.M.M., Van Loveren, H., Van Wolfswinkel, J.C., Machielsen, A.J.C., Vandebriel, R.J., 2005. Assessment of potency of allergenic activity of low molecular weight compounds based on IL-1 α and IL-18 production by a murine and human keratinocyte cell line. *Toxicology* 210, 95–109. doi:10.1016/j.tox.2005.01.004

Vandebriel, R.J., Loveren, H. Van, 2010. Non-animal sensitization testing: State-of-the-art. *Crit. Rev. Toxicol.* 40, 389–404. doi:10.3109/10408440903524262

Vandebriel, R.J., Pennings, J.L.A., Baken, K.A., Pronk, T.E., Boorsma, A., Gottschalk, R., Van Loveren, H., 2010. Keratinocyte gene expression profiles discriminate sensitizing and irritating compounds. *Toxicol. Sci.* 117, 81–89. doi:10.1093/toxsci/kfq182

Vocanson, M., Cluzel-Tailhardat, M., Poyet, G., Valeyrie, M., Chavagnac, C., Levarlet, B., Courtellemont, P., Rozières, A., Hennino, A., Nicolas, J.-F., 2008. Depletion of human peripheral blood lymphocytes in CD25+ cells allows for the sensitive in vitro screening of contact allergens. *J. Invest. Dermatol.* 128, 2119–22. doi:10.1038/jid.2008.15

Vocanson, M., Hennino, A., Rozières, A., Poyet, G., Nicolas, J.F., 2009. Effector and regulatory mechanisms in

allergic contact dermatitis. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 64, 1699–1714. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02082.x

Vocanson, M., Rozieres, A., Hennino, A., Poyet, G., Gaillard, V., Renaudineau, S., Achachi, A., Benetiere, J., Kaiserlian, D., Dubois, B., Nicolas, J.-F., 2010. Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 280–9, 289–7. doi:10.1016/j.jaci.2010.05.022

Vogt, A., Combadiere, B., Hadam, S., Stieler, K.M., Lademann, J., Schaefer, H., Autran, B., Sterry, W., Blume-Peytavi, U., 2006. 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1316–1322. doi:10.1038/sj.jid.5700226

W.

Wakabayashi, T., Hu, D.-L., Tagawa, Y.-I., Sekikawa, K., Iwakura, Y., Hanada, K., Nakane, A., 2005. IFN-gamma and TNF-alpha are involved in urushiol-induced contact hypersensitivity in mice. *Immunol. Cell Biol.* 83, 18–24. doi:10.1111/j.1440-1711.2005.01310.x

Wang, B., Esche, C., Mamelak, A., Freed, I., Watanabe, H., Sauder, D.N., 2003. Cytokine knockouts in contact hypersensitivity research. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 381–389.

Wang, L., Bursch, L.S., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Jameson, S.C., Hogquist, K.A., 2008. Langerin expressing cells promote skin immune responses under defined conditions. *J. Immunol.* 180, 4722–4727.

Wang, X.J., Hayes, J.D., Wolf, C.R., 2006. Generation of a stable antioxidant response element-driven reporter gene cell line and its use to show redox-dependent activation of Nrf2 by cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* 66, 10983–10994. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2298

Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S., Colonna, M., 2012. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* 13, 753–760. doi:10.1038/ni.2360

Warbrick, E. V., Dearman, R.J., Basketter, D.A., Kimber, I., 1999. Analysis of interleukin 12 protein production and mRNA expression in mice exposed topically to chemical allergens. *Toxicology* 132, 57–66.

Watanabe, H., Gaide, O., Petrilli, V., Martinon, F., Contassot, E., Roques, S., Kummer, J.A., Tschopp, J., French, L.E., 2007. Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 127, 1956–1963. doi:10.1038/sj.jid.5700819

Watanabe, R., Fujimoto, M., Ishiura, N., Kuwano, Y., Nakashima, H., Yazawa, N., Okochi, H., Sato, S., Tedder, T.F., Tamaki, K., 2007. CD19 expression in B cells is important for suppression of contact hypersensitivity. *Am. J. Pathol.* 171, 560–570. doi:10.2353/ajpath.2007.061279

Weber, M., Hauschild, R., Schwarz, J., Moussion, C., de Vries, I., Legler, D.F., Luther, S.A., Bollenbach, T., Sixt, M., 2013. Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients. *Science* 339, 328–332. doi:10.1126/science.1228456

Weinlich, G., Heine, M., Stossel, H., Zanella, M., Stoitzner, P., Ortner, U., Smolle, J., Koch, F., Sepp, N.T., Schuler, G., Romani, N., 1998. Entry into afferent lymphatics and maturation in situ of migrating murine cutaneous dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 110, 441–448. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00161.x

Weltzien, H.U., Corsini, E., Gibbs, S., Lindstedt, M., Borrebaeck, C., Budde, P., Schulz-Knappe, P., Thierse, H.-J., Martin, S.F., Roggen, E.L., 2009. Safe cosmetics without animal testing? Contributions of the EU Project Sens-it-iv. *J. für Verbraucherschutz und Leb.* 4, 41–48. doi:10.1007/s00003-009-0510-5

Williams, I.R., Kupper, T.S., 1996. Immunity at the surface: Homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci.* 58, 1485–1507. doi:[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(96\)00042-2](https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00042-2)

Wilson, N.S., Villadangos, J.A., 2004. Lymphoid organ dendritic cells: Beyond the Langerhans cells paradigm. *Immunol. Cell Biol.* 82, 91–98. doi:[10.1111/j.1440-1711.2004.01216.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2004.01216.x)

Wong, C.L., Ghassabian, S., Smith, M.T., Lam, A.-L., 2015. In vitro methods for hazard assessment of industrial chemicals – opportunities and challenges. *Front. Pharmacol.* 6, 1–13. doi:[10.3389/fphar.2015.00094](https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00094)

X.

Xu, H., Dilulio, N.A., Fairchild, R.L., 1996. T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (II) 4/II-10-producing (Th2) negative regulator. *J. Exp. Med.* 183, 1001–1012.

Xu, H., Heeger, P.S., Fairchild, R.L., 1997. Distinct roles for B7-1 and B7-2 determinants during priming of effector CD8+ Tc1 and regulatory CD4+ Th2 cells for contact hypersensitivity. *J. Immunol.* 159, 4217–4226.

Y.

Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Haas, K.M., Poe, J.C., Fujimoto, M., Tedder, T.F., 2008. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 28, 639–650. doi:[10.1016/j.immuni.2008.03.017](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.017)

Yoshida, Y., Sakaguchi, H., Ito, Y., Okuda, M., Suzuki, H., 2003. Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naive THP-1 cell line. *Toxicol. Vitr.* 17, 221–228. doi:[10.1016/S0887-2333\(03\)00006-7](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00006-7)

Z.

Zang, Q., Paris, M., Lehmann, D.M., Bell, S., Kleinstreuer, N., Allen, D., Matheson, J., Jacobs, A., Casey, W., Strickland, J., 2017. Prediction of skin sensitization potency using machine learning approaches. *J. Appl. Toxicol.* 37, 792–805. doi:[10.1002/jat.3424](https://doi.org/10.1002/jat.3424)

Zhao, Y., Balato, A., Fischelevich, R., Chapoval, A., Mann, D.L., Gaspari, A.A., 2009. Th17/Tc17 infiltration and associated cytokine gene expression in elicitation phase of allergic contact dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 161, 1301–1306. doi:[10.1111/j.1365-2133.2009.09400.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09400.x)

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Communications scientifiques

Communications orales

- 1st EPISKIN INTERNATIONAL SEMINAR on Safety and Efficacy applications of 3D human tissue models as alternative methods to Animal Testing, Lyon, France, 22-23 Juin 2017.
« SENS-IS: New in vitro assay for Skin sensitization on EpiSkin »
- 27th ERGECD (European Research Group on Experimental Contact Dermatitis), Kemptthal, Switzerland, 17-19 Mai 2017.
« Modulation of Redox Balance (Glutathione and Reactive Oxygen Species) and activation of Nrf2-Keap-1 pathway in the THP-1 cells: not all sensitizers are equal »
- IDEA Day, Maison de l'Aquitaine, Paris, 13 Décembre 2016 [article dans Expressions cosmétiques, n°43, Janv-Fev 2017].
« Cas pratique : Comparaison et validation d'une stratégie d'évaluation *in vitro* de la sensibilisation cutanée utilisant une base de données de 33 molécules »
- 8th meeting of the Immunotoxicology and Chemical Allergy Specialty Section (ITCASS)-EUROTOX, Faculté de pharmacie Paris Sud, Châtenay-Malabry, France, 17 November 2016.
« Comparison and validation of an *in vitro* skin sensitization strategy using a data set of 33 chemical references »
- 19th International Congress of European Society of Toxicology In Vitro (ESTIV), Juan-les-Pins, France, 14-17 October 2016
« Comparison and validation of an *in vitro* skin sensitization strategy using a data set of 33 chemical references »

Posters

- **International**

- Elodie Clouet, Chloé Raffalli, Marie-Hélène Damiens, Marc Pallardy, Pierre-Jacques Ferret, Saadia Kerdine-Römer.
« Second generation of skin sensitization AOP within a same cell line: Dream or Reality? »
Eurotox, International Congress, 53th annual meeting, 10-13 September 2017, Bratislava, Slovaquie.
- Elodie Clouet, Gregoire Guillain, Saadia Kerdine-Römer, Pierre-Jacques Ferret.
« Comparison and validation of an *in vitro* skin sensitization strategy using a data set of 33 chemical references »
Eurotox, International Congress, 52th annual meeting, 4-7 September 2016, Seville, Espagne.
- Elodie Clouet, Chloé Raffalli, Marc Pallardy, Pierre-Jacques Ferret, Saadia Kerdine-Römer.

« Modulation of Redox Balance (Glutathione and Reactive Oxygen Species) and activation of Nrf2-Keap1 pathway in the THP-1 cells: not all sensitizers are equal »
Eurotox, International Congress, 52th annual meeting, 4-7 September 2016, Seville, Espagne.

- **National**

- Elodie Clouet, Chloé Raffalli, Marie-Hélène Damiens, Marc Pallardy, Pierre-Jacques Ferret, Saadia Kerdine-Römer.
Second generation of skin sensitization AOP within a same cell line: dream or reality?
Congrès de Société Française de Toxicologie (SFT), 23 & 24 novembre 2017, Paris.
- Elodie Clouet, Chloé Raffalli, Marc Pallardy, Pierre-Jacques Ferret, Saadia Kerdine-Römer.
« Modulation of Redox Balance (Glutathione and Reactive Species) and activation of Nrf2-Keap1 pathway in the THP-1 cells: not all sensitizers are equal »
ESTIV, 14-17 Octobre 2016, Juan-les-Pins, France.
- Elodie Clouet, Chloé Raffalli, Marc Pallardy, Pierre-Jacques Ferret, Saadia Kerdine-Römer.
« Modulation of Redox Balance (Glutathione and Reactive Oxygen Species) and activation of Nrf2-Keap-1 pathway in the THP-1 cells: not all sensitizers are equal »
XVI^{ème} Journée de l'Ecole doctorale, Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué, Châtenay-Malabry, 17 juin 2016
- Elodie Clouet, Pierre-Jacques Ferret.
« A skin sensitization risk assessment of raw material derived from *Avena sativa* (oat) leaf/stem extract using in vitro validated methods (confirmed by animals and human data)»
Congrès de la Société Française de Toxicologie (SFT), 25 & 26 novembre 2015, Paris.

Publications

Comparison and validation of an in vitro skin sensitization strategy using a data set of 33 chemical references. E. Clouet *et al.* Toxicology in Vitro 45 (2017) 374–385.

Fragility of epidermis in newborns, children and adolescents. Blume-Peytavi *et al.* Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. Volume 30, Issue Supplement S4, pages 3–56, May 2016.

Groupe de travail

Cosmetics Europe Skin Tolerance Task Force (STTF) - Bruxelles

ANNEXES

Annexes

Article 3

Fragility of epidermis in newborns, children and adolescents. Blume-Peytavi *et al.* Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. Volume 30, Issue Supplement S4, pages 3–56, May 2016.

Article 4

Cosmetics Europe's skin sensitisation database of non-animal test methods and human and LLNA reference data. Hoffmann *et al.*. Critical Reviews in Toxicology, 2018.

DOI: 10.1080/10408444.2018.1429386

Article 5

Assessment of Non-Animal Defined Approaches for Predicting Skin Sensitization. Kleinstreuer *et al.* Critical Reviews in Toxicology, 2018.

DOI: 10.1080/10408444.2018.1429385

ARTICLE 3

REVIEW ARTICLE

Fragility of epidermis in newborns, children and adolescents

U. Blume-Peytavi,¹ J. Tan,² D. Tennstedt,³ F. Boralevi,⁴ G. Fabbrocini,⁵ A. Torrelo,⁶ R. Soares-Oliveira,⁷ M. Haftek,⁸ A.B. Rossi,⁹ M.D. Thouvenin,⁹ J. Mangold,⁹ M.F. Galliano,¹⁰ H. Hernandez-Pigeon,¹⁰ M.F. Aries,¹⁰ C. Rouvrais,¹⁰ S. Bessou-Touya,¹⁰ H. Duplan,¹⁰ N. Castex-Rizzi,¹⁰ V. Mengeaud,¹⁰ P.J. Ferret,¹¹ E. Clouet,¹¹ M. Saint Aroman¹²

¹Department of Dermatology and Allergy, Clinical Research Center for Hair and Skin Science, Charité-Universitätsmedizin, Berlin, Germany

²Department of Medicine, Faculty of Medicine, Schulich School of Medicine and Dentistry, Western University, Windsor campus, Windsor, ON, Canada

³Department of Dermatology, Saint-Luc University Clinics, Brussels, Belgium

⁴Pediatric Dermatology, Pellegrin Hospital, Bordeaux, France

⁵Department of Dermatology, University Hospital of Naples, Naples, Italy

⁶Pediatric Dermatology, Hospital del Niño Jesús, Madrid, Spain

⁷Department of Dermatology, Lisbon, Portugal

⁸University Lyon 1, Lyon, France

⁹Pierre Fabre Dermo-Cosmétique Research & Development, Clinical Division, Toulouse, France

¹⁰Pierre Fabre Dermo-Cosmétique Research and Development Center, Pharmacology Division, Toulouse, France

¹¹Pierre Fabre Dermo-Cosmétique Research & Development, Toxicology Division, Vigoulet-Auzil, France

¹²Pierre-Fabre Dermo-Cosmétique, Lavalur, France

*Correspondence: M. Saint Aroman. E-mail: marketa.saint.aroman@pierre-fabre.com

Abstract

Within their first days of life, newborns' skin undergoes various adaptation processes needed to accommodate the transition from the wet uterine environment to the dry atmosphere. The skin of newborns and infants is considered as a *physiological fragile skin*, a skin with lower resistance to aggressions. Fragile skin is divided into four categories up to its origin: physiological fragile skin (age, location), pathological fragile skin (acute and chronic), circumstantial fragile skin (due to environmental extrinsic factors or intrinsic factors such as stress) and iatrogenic fragile skin.

Extensive research of the past 10 years have proven evidence that at birth albeit showing a nearly perfect appearance, newborn skin is structurally and functionally immature compared to adult skin undergoing a physiological maturation process after birth at least throughout the first year of life. This article is an overview of all known data about fragility of epidermis in 'fragile populations': newborns, children and adolescents. It includes the recent pathological, pathophysiological and clinical data about fragility of epidermis in various dermatological diseases, such as atopic dermatitis, acne, rosacea, contact dermatitis, irritative dermatitis and focus on UV protection.

Received: 25 November 2015; revised: 10 February 2016; Accepted: 17 February 2016

Disclosures/conflicts of interest

All authors are employees of either Pierre Fabre Dermo-Cosmétique or Laboratoires Dermatologiques A-Derma.

The article *Fragility of Epidermis in Newborns, Children and Adolescents* was written by authors in aim to give the same oral lectures during 3rd International Skin Meeting, organized by A-DERMA Dermatological Laboratories on April 12th, 2016 in France.

SUMMARY
1. Fragile Skin Definition
I. From Pathology to Clinical Classification
II. Models of Fragile Skin
2. Fragile Skin Classification
2A. Physiological Fragile Skin
I. Skin and Skin barrier in Newborns and Infants
2B. Pathological Fragile Skin
I. Atopic Dermatitis
II. Acne
III. Rosacea
IV. Hand eczema and Irritant Contact Dermatitis
2C. Circumstantial (Environmental) Fragile Skin
I. Fragile Skin model exposed to ultraviolet irradiation (UV)
2D. Iatrogenic Fragile Skin
I. Skin Surgery
3. Fragile Skin Treatment Approach : the place of Rhealba® Oat in Management of Fragile Skin
3A. Rhealba® Oat Plantlets extract Tolerability: Skin sensitization risk assessment
3B. Rhealba® Oat in Pathological Fragile Skin
I. Atopic Dermatitis
i. In vitro model
ii. Clinical cases
II. Acne
3C. Rhealba® Oat in Circumstantial (Environmental) Fragile Skin
I. Ultraviolet irradiation (UV)
3D. Rhealba® Oat Efficacy: Focus on anti-inflammatory properties
4. Bibliographic References

Fragile Skin Definition

M. Haftek

University Lyon 1, EA4169, “Fundamental, clinical and therapeutic aspects of the skin barrier function”, Lyon, France

From pathology to clinical classification of fragile skin

A recent surge in recognition of ‘fragile’ skin’ in patients presenting no evident pathology¹ should not overshadow the fact that skin fragility does exist in the repertoire of dermatological diseases, and most frequently, generates serious therapeutic problems.²

Proneness to physical disruption may be inborn or acquired and the *locus minoris resistentiae* may be situated at every level of the skin structure, starting from the dermis and ending at the *stratum corneum* (Table 1). The causative problem is most frequently dependent on a defective structural protein or a faulty mechanism leading to its abnormal expression or function, e.g. malfunctioning enzymatic pathway.

Dermatoses resulting from dermal fragility may be traced back to the abnormal expression of various collagen types, elastic fibres, extracellular matrix proteoglycans and/or their regulatory

factors, e.g. the seven types of Ehlers–Danlos syndrome^{3,4} or dystrophic and acquired forms of epidermolysis bullosa targeting collagen VII.^{5,6} Hormonal imbalance (e.g. in Cushing disease, postmenopausal syndrome or locally, during long-term glucocorticoid therapy) may lead to the appearance of skin tears and premature skin ageing,^{7,8} whereas other forms of skin fragility may be due to dietary or metabolic causes (e.g. scurvy, in case of insufficiency in ascorbic acid, the vitamin necessary for action of hydroxylases during collagen biosynthesis).⁹

On the epidermal side of the dermal–epidermal junction, structural dissociation may be induced by minor traumas in case of failure of various junctional proteins. Lack of laminin 332, of collagen XVII (BPAG2) or of integrin β 4 in hemidesmosomes is the cause of junctional epidermolysis bullosa, where the split occurs in the *lamina lucida*.^{5,10} Epidermal fragility resulting from defective attachment of keratins to hemidesmosomes or desmosomes is provoked by defects involving small linker proteins, like plakins (including plectin, BPAG1/dystonin, desmoplakin, envoplakin), plakophilins, and the mechanisms of their peripheral stabilization by the cytoskeleton.^{11–13} Also, various defects of keratin expression provoke clumping of keratinocyte cytoskeleton and decrease epidermal resilience leading to epidermolysis bullosa simplex (keratins 5/14)^{5,14} or epidermolytic hyperkeratosis (keratins 1/2/10).¹⁵ When transmembrane elements of cell–cell junctions are the disease target, like desmogleins 3 and 1 as well as desmocollin 1 in autoimmune pemphigus, or claudin 1 mutation in Ichthyosis Hypotrichosis Sclerosing Cholangitis syndrome (IHSC or NISCH), the tissue function is deeply modified, with clinical signs of acantholysis or compensatory hyperkeratosis.^{16,17} Desmosomal adhesion is also compromised in cases of disturbed calcium trafficking, leading to more or less pronounced acantholysis, as documented in familial pemphigus of Hailey–Hailey and Darier disease (mutations in genes responsible for expression of cellular calcium pumps SERCA2/ATP2A2 and ATP2C1 respectively).¹⁸

At the advanced stages of keratinocyte differentiation and during formation of *stratum corneum*, biochemical processes leading to the constitution of cornified envelopes and to elaboration of the ‘natural moisturizing factor’ become equally responsible for the functional efficacy of epidermal permeability barrier. Their altered composition, due to abnormal expression of structural proteins or enzymes involved in molecular assembly or processing, provokes various dysfunctions, e.g. loricrin keratoderma¹⁹ or peeling skin syndrome related to mutations in transglutaminase 5 gene.²⁰ Peeling off of the horny layer does also occur in case of the absence of valid corneodesmosin, protein normally incorporated into the extracellular portions of corneodesmosomes and promoting mechanical resistance of these junctions.^{21,22} As desmosomal processing leading to *stratum corneum* desquamation depends on the interplay of catabolic enzymes and their natural inhibitors present in the intercellular spaces, every insufficiency of the latter results in premature elimination of the

Table 1 Examples of skin pathologies resulting in 'fragility' states

INBORN affections (responsible gene)	Structural or regulatory elements concerned	ACQUIRED affections
Peeling Skin Disease (<i>CDSN</i>)	SC, corneodesmosomes	
Loricrin Keratoderma (<i>LOR</i>)	SC, cornified envelopes	
X-linked ichthyosis (<i>STS</i>)	SC, lipids	Essential Fatty Acid deficiency
Ichthyosis vulgaris (<i>FLG</i>) Netherton syndrome (<i>SPINK5</i>)	SC/SG, Natural Moisturizing Factor; Serine proteases/inhibitors	Atopic Dermatitis
Lamellar ichthyosis (<i>TG1</i>)	SC/SG, cornified envelopes	
Exfoliative ichthyosis (<i>CSTA</i>)	SC/SG, desmosomes; Desmocollin 1	Subcorneal IgA pemphigus
Striated palmoplantar keratoderma (<i>DSG1</i>)	SG/SS, desmosomes; Desmogleins 1 & 3	Pemphigus foliaceus & vulgaris
Ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome (<i>PKP1</i>)	SG/SS, desmosomes; Plakophilin 1; Desmoglein 1	Staphylococcal Scalded Skin Syndrome
Epidermolytic keratoderma (<i>KRT1, KRT2, KRT10</i>)	SG/SS, keratins 1, 2 & 10	
Familial pemphigus (<i>ATP2C1</i>); Darier disease (<i>ATP2A2</i>)	SS keratinocytes	Toxic Epidermal Necrolysis; Pellagra/Vit.B3 deficiency
Epidermolysis bullosa (EB) simplex (<i>KRT5, KRT14, PLEC, DST</i>)	SB; keratins 5 & 14, plectin; dystonin/BPAG1	Bullous pemphigoid
Junctional EB (<i>LAMA3, LAMB3, LAMC2, COL17A1, ITGB4</i>)	SB keratinocytes/BMZ; hemidesmosomes, laminin 332, collagen XVII/BPAG2, integrin $\beta 4$	Porphyria Cutanea Tarda; Bullous pemphigoid
Dystrophic EB (<i>COL7A1</i>)	BMZ; anchoring fibrils, collagen VII	EB acquisita
Ehler-Danlos syndromes (<i>COL5A1, COL5A2, COL1A1</i> ...)	Dermis; various collagens; extracellular matrix proteoglycans; hydroxylases	Scurvy/Vit.C deficiency
Cutis laxa, various forms (<i>ELN, FBLN5</i> ...)	Dermis; elastin, fibulin; Lysyl oxidase, cathepsin G	Cutis laxa acquisita

Deficiency of any of the constitutive elements of skin structure or of the regulatory mechanisms involved in skin function may potentially result in skin fragility.

SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SS, stratum spinosum; SB, stratum basale; BMZ, basement membrane zone.

junctions, exfoliation, impaired permeability barrier, and thus induced skin inflammatory reaction. Such is the case in exfoliative ichthyosis related to gene mutation encoding cystatin A²³ and in Netherton syndrome due to the absence of LEKTI.²⁴ Metabolic and dietary causes of epidermal fragility include, besides others, porphyrin accumulation in *porphyria cutanea tarda*,²⁵ insufficiency in Vit. B3/niacine (pellagra), in zinc,²⁶ and in essential fatty acids.²⁷ The resulting changes have most frequently aspects of dermatitis, often combined with sensitivity to sunlight. Finally, acquired skin fragility may also have toxic (iatrogenic) and infectious causes. Massive keratinocyte apoptosis in toxic epidermal necrolysis may be induced by pharmacological molecules and is mediated by activated T lymphocytes,²⁸ whereas staphylococcal proteolytic toxins attacking desmoglein 1 are responsible for widespread acantholysis in SSSS.²⁹

In fact, from the dermatological point of view, every dermatosis may be regarded, more or less, as a state of skin 'fragility'. A striking example is provided by atopic dermatitis. Even though this increasingly frequent skin affection has an undeniably important immunological component,^{30,31} its pathophysiological origins can be traced to the impaired function of the epithelial barrier. Filaggrin gene mutation and the resulting absence of the protein and its functionally important degradation products in the *stratum corneum*, has been demonstrated as one of the causes of atopic dermatitis in a substantial fraction of patients.³² The permeable epidermal barrier, which lets through foreign

environmental antigens, reveals clinically as undeniably fragilized skin, prone to erythematous reactions.

Thus, 'fragile skin' should be considered as a very wide spectrum of skin conditions ranging from life-threatening diseases to subjectively perceived states of skin reactivity to environmental insults.

The development of cellular, tissue and clinical models to mimic fragile skin and an exploratory clinical evaluation of preparations to protect and repair fragile skin

C. Rouvrais^{*1}, M.F. Galliano^{*1}, H el ene Hernandez-Pigeon^{*1}, C. Carrasco¹, C. Coutanceau², B. Guiraud¹, H. Duplan¹, N. Castex-Rizzi¹, V. Mengeaud¹, S. Bessou-Touya¹, *CR, MFG and HHP contributed equally to this work.

¹Pierre Fabre Dermo-Cosm etique Research & Development, Clinical Division, Toulouse, France

²Medical Department Pierre Fabre Research and Laboratoires Dermatologiques A-Derma Lavour France

Background: Specific or discriminating *in vitro* models of fragile skin are lacking.

Objectives: This study describes the development of cellular and tissue models mimicking fragile skin using a new experimental double stress-based approach (sodium dodecyl sulphate [SDS]

and dehydration), clinical assays to determine fragile skin objectively, and an evaluation of the effects of active ingredients and cosmetic products on fragile skin.

Materials and methods: The protective/repair capability of Rhealba® Oat plantlets (ROP) extract was evaluated in *in vitro* models. Cellular/tissue assessments included structural damage and cytotoxicity, protein immunostaining, and cytokine analysis. *In vivo* skin barrier response to stress (an occlusive patch containing 0.25% SDS applied to the forearm anterior surface for 24 h) was measured by trans-epidermal water loss. An exploratory clinical study assessed the capability of ROP-based product to protect/repair fragile skin.

Results: In *in vitro* weakened cells, ROP extract prevented epidermal barrier alteration and protected cells from inflammation. ROP-based product (one application after SDS stress) significantly reduced skin barrier reactivity to normal skin levels in individuals with fragile skin.

Conclusion: These fragile skin models should enable initial evaluation of the capability of active ingredients to protect/restore skin barrier function, and aid in developing cosmetic creams for fragile skin.

Introduction

The main function of the skin is to establish a multifunctional barrier between the body and its external environment.³³ Skin barrier function is ensured to a large extent by the epidermis, the outermost layer of the skin, which serves as a first line of structural and functional defence against dehydration, chemical substances, physical aggression and microorganisms.^{34,35}

The physical and mechanical barrier function of the epidermis is controlled by the stratum corneum and various junctions which assist cell adhesion (via corneodesmosomes) and communication,^{36–38} and it has been hypothesized that tight junction proteins (e.g. claudin, occludin) perform tight junction structure-dependent and structure-independent functions and that the specific function of a tight junction protein may depend on the epidermal layer where it is expressed.³⁹ The role of the chemical, biochemical and immunological barrier is mainly attributed to the immune system, notably via the recruitment or production of pro-inflammatory cytokines (e.g. interleukin [IL]-1 and IL-8).^{35,40} The barrier function is largely dependent on the horny layer and its moisture levels through natural moisturizing factors.³⁷ However, the water barrier is not absolute due to trans-epidermal water loss (TEWL). The evaluation of TEWL is one of the methods used to assess the quality of the skin's barrier function,⁴¹ and TEWL increases in the presence of certain pathologies.

Disruption of the skin barrier function leads to a cascade of biological reactions in order to restore barrier homeostasis. This restoration involves cornification, intercorneocyte lipid secretion and innate defence stimulation.⁴² However, some individuals have a weakened skin barrier; in these individuals, their skin is intolerant and overreacts to different external stimuli.⁴³ Thus,

the physiological basis of fragile skin is centred on the epidermal structure and barrier function. Atopic dermatitis represents a pathophysiological case of stratum corneum perturbation associated with fragile skin.⁴⁴ Fragile skin can, therefore, be defined as having a lower resistance to environmental aggression and, as such, it requires specific treatment in order to reinforce its natural protective properties.

Fragile skin can be classified as constitutional (e.g. baby skin, elderly skin and fragile zones such as the face and eyelids); pathological (e.g. acne, atopic dermatitis, rosacea); environmental [e.g. skin aggressed by climatic stress (heat, cold), chemicals (surfactants such as sodium dodecyl sulphate, SDS), mechanical (e.g. rubbing)]; iatrogenic (e.g. medicinal treatment, aesthetic procedures).^{45,46} Although epidemiologic data regarding the prevalence of fragile skin are limited, a recent analysis of individuals from five diverse geographic regions demonstrated that fragile skin is perceived to occur in a substantial proportion (up to 53%) of individuals from any given country, particularly in the age range of 15–34 years, regardless of skin type.¹

To the best of our knowledge, there is currently no specific or discriminating *in vitro* model of fragile skin. The objectives of this study were to develop and characterize model systems for mimicking fragile skin at the cellular [normal human keratinocytes (NHKs)], tissue [reconstructed human epidermis (RHE)] and clinical levels, and to conduct an exploratory study in individuals to assess the capability of Rhealba® Oat plantlet (ROP) extracts to repair fragile skin in these models.

Materials and methods

Cell and tissue culture

Cell cultures were produced using NHKs from skin explants (abdominoplasty or breast reduction, obtained with patient consent). NHKs were grown in sterile conditions in Keratinocyte-Serum Free Medium (1X) [+L-Glutamine (K-SFM) (Gibco® - Life Technologies™) supplemented with 25 ng/mL Bovine Pituitary Extract (BPE) and 0.2 µg/mL recombinant human Epidermal Growth Factor (EGF) (Gibco® - Life Technologies™). The medium was supplemented with an antibiotic Primocin™ (1/1000) (InvivoGen). Cells were grown in an incubator at 37 °C in a water-saturated atmosphere and 5% CO₂.

For all experiments, NHKs were cultured in K-SFM without supplements (BPE, EGF and primocin).

The RHE tissue model was undertaken using methods reported previously by Poumay & Coquette.⁴⁷ Briefly, samples of human adult mammary tissue were collected as medical waste after obtaining informed consent. Keratinocytes were isolated by the trypsin technique and proliferating primary cultures initiated in KGM-2 (Clonetics) medium. For tissue reconstruction, the cells were then plated onto the microporous membrane of polycarbonate culture inserts (0.63 cm², Millipore) in EpiLife medium (Life Technologies). After 24 h of incubation at 37 °C,

cells were exposed to the air–liquid interface and further cultivated for 13 days in EpiLife medium supplemented with 1.5 mM calcium, 50 µg/mL vitamin C and 10 ng/mL KGF in an incubator at 37 °C and 5% CO₂.

Thereafter, RHE were transferred to 12-well plates containing Dulbecco's Modified Eagle's and maintained at 37 °C and 5% CO₂.

***In vitro* models mimicking fragile skin**

NHKs were exposed to SDS 10 µg/mL for 1 h and then incubated for an additional 24 h. The second dehydration stress was then performed by disposing the cells without medium inside a climatic chamber (Vötsch - Industrietechnik) with 15% relative humidity at 37 °C for 20 min. RHE was challenged by 0.1% SDS solution applied on the surface and then incubated for 18 h before exposure to 15% relative humidity at 37 °C for 1 h in a climatic chamber. Schematic designs of the experimental protocols are presented in Fig. 1.

Antibodies

For cell immunolabelling experiments, anti-claudin 1 (Invitrogen™) and anti-filaggrin (Abcam) antibodies were used at 1/50; phalloidin Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes - Life Technologies) was also used at 1/50. Secondary antibodies were used at 1/2000: Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) and Alexa Fluor® 488 F(ab')₂ anti-mouse IgG (H+L) (Molecular Probes - Life Technologies).

For RHE immunolabelling experiments, polyclonal rabbit antibody to claudin 1 (RP153-05 Diagnostic Biosystems) was used at 1/500 for immunohistochemistry and at 1/1000 for immunofluorescence. Polyclonal rabbit antibody to filaggrin (ab81468, Abcam) was used at 1/200, and Alexa Fluor® 594 goat anti-rabbit IgG (H+L) was used at 1/500 as a secondary antibody.

Cell immunofluorescence

For immunofluorescence, cells were fixed after the second stress with acetone at –20 °C for 10 min. Cells were then permeabilized with Triton® X-100 (Sigma-Aldrich) at 0.1% for 15 min and blocked with 3% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) in phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min. Primary and secondary antibodies were incubated for 1 h at room temperature. Coverslips containing the fixed immunolabelled cells were mounted with Prolong Gold AntiFade Reagent + DAPI (Molecular Probes - Invitrogen) and analysed with a fluorescent microscope (Nikon Eclipse 50i).

RHE histological analysis, immunofluorescence, and immunohistochemistry

Tissue sections (5 µm) were cut using a cryostat (Leica CM 3050s, Nanterre, France) and stained with hematoxylin/eosin using the DAKO Shandon Varistein 24-4 automatic slide stainer (DAKO, Trappes, France).

For immunofluorescence labelling, cryosections (8 µm) were fixed by methanol at –20 °C for 10 min and then blocked in blocking buffer (TBS buffer supplemented with heated-goat serum 10% and Tween-20 0.05%) for 1 h at room temperature. Primary antibodies diluted in blocking buffer were incubated overnight at 4 °C. After several washes in TBS buffer, secondary antibody was added for 1 hour at room temperature. Mounting was performed with Prolong Gold AntiFade Reagent + DAPI (Molecular Probes - Invitrogen) and the tissue sections were observed under a confocal microscope (Leica SP8) or a fluorescent microscope (Nikon Eclipse 50i).

For immunohistochemistry labelling, a standard protocol using the LSAB+System-Phosphatase Alcaline FUCHIN (Dako) was applied.

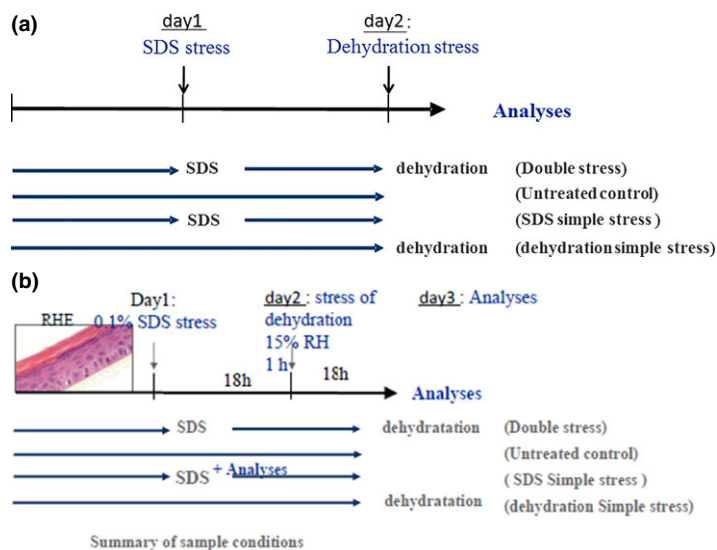


Figure 1 Schematic representation of the experimental protocol for applying two consecutive stresses on normal keratinocytes (a) or reconstructed human epidermis RHE (b).

ELISA Assays

Secretion of the pro-inflammatory cytokine IL1 α was monitored by ELISA (DuoSet kit DY200, R&D Systems) according to the manufacturer's protocol. Secretion of IL-8 was monitored using the HTRF kit 62IL8PEB (Cisbio Bioassays) according to the manufacturer's instructions.

Evaluation of Rhealba[®] Oat plantlets extract

ROP extract⁴⁸ was added onto the medium of barrier-weakened NHK cells or RHE before exposure to the second stress of dehydration. In addition, a simple formulation containing jellified-water, preservative and ROP (3% or 5%) was applied onto the surface of RHE before dehydration. A formulation without ROP was applied as placebo control.

Development of a clinical test to determine fragile skin

Based on the outcomes from the development of the cellular and tissue models mimicking fragile skin, we developed a test to determine fragile skin in healthy volunteers.

- > Skin barrier response to stress (application of an occlusive patch containing 0.25% SDS [60 μ L] on the anterior surface of the forearm for 24 h) was evaluated by measuring TEWL (using AquaFlux[®]; Biox Systems Ltd, London, UK). AquaFlux[®] measures the evaporation gradient between the skin surface and the cooling plate that closes off the chamber, and can be used to quantify skin barrier impairment. Greater skin impairment or damage results in higher TEWL values. For healthy skin (of the forearm) TEWL = 10–15 g/m²/h. In the general population, stress produced by 0.25% SDS under an occlusive patch for 24 h, increases TEWL by a factor of 1.3 (30%) compared with control,⁴⁹ according to the following TEWL ratio:

$$\frac{\text{TEWL (SDS zone)} - \text{TEWL (control zone)}}{\text{TEWL (control zone)}}$$

Since fragile skin is hyper-reactive to environmental stresses, it has a higher post-stress TEWL ratio than in the average population, that is, a ratio >1.3 (24 h after removal of the SDS patch).

Females, aged 18–50 years, with phototype I, II, III or IV, were eligible for inclusion if they were not already participating in a clinical research protocol, signed a participation consent form. Individuals with sun erythema, or those who had applied keratolytic or exfoliating products on the forearms in the preceding 4 or 2 weeks, respectively, preceding inclusion, were excluded from the study. Individuals with atopic dermatitis, psoriasis or eczema on the upper limbs, active skin lesions on the forearms, or nevi, ephelids or pigmented marks, scars or other lesions or dermatological affections that may have interfered with the examination of the zones where the patches were to be applied, were also excluded. Other exclusion criteria included

systemic corticosteroid therapy administered currently or for > 7 consecutive days in the 2 weeks preceding inclusion, current local corticosteroid therapy or discontinued in the 7 days preceding inclusion, current dermatological treatment on the forearms or discontinued in the 7 days preceding inclusion.

Prior to application of the 0.25% SDS patch (Day 0), demographic data, concomitant medications and associated pathologies were recorded. Test measurement zones were marked on the subject's forearm. Baseline TEWL measurements were performed and the SDS patch was applied. After 24 h (Day 1), the SDS patch was removed; TEWL was measured on Day 2 (24 h after SDS patch removal). Negative control and neutral control zones contained no SDS and no patch respectively.

Exploratory clinical study

An exploratory randomized, single-center, comparative clinical study was undertaken to assess the capability of a skin repair preparation (Rhealba[®] Oat plantlets (ROP)-based product, Laboratoires Dermatologiques A-Derma, France) to repair fragile skin in volunteers, after application of 0.25% SDS patches for 24 h. The overall methods and inclusion/exclusion criteria were identical to those described above for the development of a test to determine fragile skin in volunteers.

Occlusive patches containing 0.25% SDS (60 μ L) were applied on the anterior surface of the forearm of subjects for 24 h (to induce skin stress), followed by repeated application (2 mg/cm² twice daily for 9 days) of ROP-based product. Controls consisted of a neutral control zone (without SDS and without repair product), a negative control zone (with SDS but without repair product) and a positive control zone (with SDS and with repeated [twice daily for 9 days] application of Vaseline). TEWL was measured using AquaFlux[®].

Prior to application of SDS and test/control products (Day 0), demographic data, concomitant mediations and associated pathologies were recorded. Test measurement zones were marked on the subject's forearm. Baseline TEWL measurements were performed and the SDS patch was applied. After 24 h (Day 1), the patch was removed, and test/control product was applied (according to randomization). Tolerance and TEWL were assessed on Day 2.

All data required by the study protocol were recorded on a case report form, completed by the investigator and/or clinical research technician. This study was undertaken in compliance with the Declaration of Helsinki.

Statistical analysis For *in vitro*, statistical significance was determined using Mann–Whitney tests. The statistical significant was retained when the *P*-value was less than 0.05.

Responses to the active test product and controls were evaluated by analysis of variance between Day 0 and Day 2, with the value at Day 0 used as a covariable. The threshold for statistical significance was 5%.

Results

In vitro fragile skin models

We hypothesized that barrier dysfunction in fragile skin influences sensitivity to any stresses, i.e. fragile skin is less resistant to an additional, environmental stress. As a consequence, fragile skin response is amplified.

We firstly generated models of barrier-weakened cells or RHE by treatment with SDS and we secondarily exposed them to an environmental stress using dehydration (Fig. 1). In all experiments, individual stresses were analysed in parallel of the double stress.

Fragile human keratinocytes model

NHKs exposed to SDS treatment showed decreased phalloidin staining, suggesting depolymerization of the actin filaments, and reduction of filaggrin staining 24 h after treatment (Fig. 2). These features suggest that cells structural organization and differentiation were altered by SDS exposure. Furthermore, when cells were secondarily exposed to dehydration stress (Fig. 2, double stress), they showed a more severe alteration compared to SDS or dehydration stresses applied individually (Fig. 2, SDS or hydration). The cytoskeleton network was disrupted and filaggrin expression was even greater reduced as compared to individual stresses (Fig. 2, SDS and dehydration). Interestingly, we observed that the staining of tight junction marker, claudin 1, which was observed altered by the dehydration, single stress, was dramatically down-regulated, suggesting that barrier function was compromised.

Fragile human reconstructed epidermis model

We also explored the responses of RHE firstly exposed to SDS and secondarily submitted to a dehydration stress (Fig. 1). The inflammatory response was analysed by measuring IL1 α and IL8 production. In double-stressed RHE, both IL1 α and IL8 production were upregulated compared to individual stressed-RHE (Fig. 3a), suggesting an exacerbation of inflammatory response.

The increase in either IL1 α or IL8 production by double stress was significant compared with that by SDS stress alone ($P < 0.001$). While no significance was found between the dehydration single stress and double stress, a clear tendency of increase of cytokines production by the double stress was observed.

We subsequently analysed tissue morphology by hematoxylin/eosin staining and immunolabeling of filaggrin and claudin 1 proteins by confocal analyses. Morphological alteration was denoted by the disappearance of keratohyalin granules in the granular layer. In comparison to individually stressed-RHE (Fig. 3b), a notable loss of filaggrin was observed within the granular layer in double stressed-RHE. The distribution of claudin 1 was also altered, with a decrease in claudin-1 staining in the upper layers of the epidermis.

In conclusion, the data on both NHK and RHE models demonstrated that the second stress induced a specific and amplified response compared to individual stress, which could be considered a hallmark of fragile skin.

Rhealba[®] Oat plantlets extract evaluation in the *in vitro* fragile models

When ROP extract (100 $\mu\text{g/mL}$) was added into the medium of SDS weakened-NHKs, before exposure to the second stress of dehydration, it preserved f actin filaments organization (Fig. 4a). Moreover, filaggrin expression was similar to that in the untreated control cells. Finally, the characteristic staining of claudin-1 at the cell membranes, which was lost upon double stress, was maintained under ROP extract treatment (Fig. 4a). Similarly, ROP extract (300 $\mu\text{g/mL}$) was added onto the medium of RHE. As observed in NHKs, ROP extract prevented loss of filaggrin detection and slightly restrained the reduction of claudin 1 staining (Fig. 4b).

We next evaluated the effect of a topical application of ROP extract-containing formulation by application onto the surface of RHE. As it was observed by confocal analysis, immunohistochemistry showed a disappearance of filaggrin staining in the

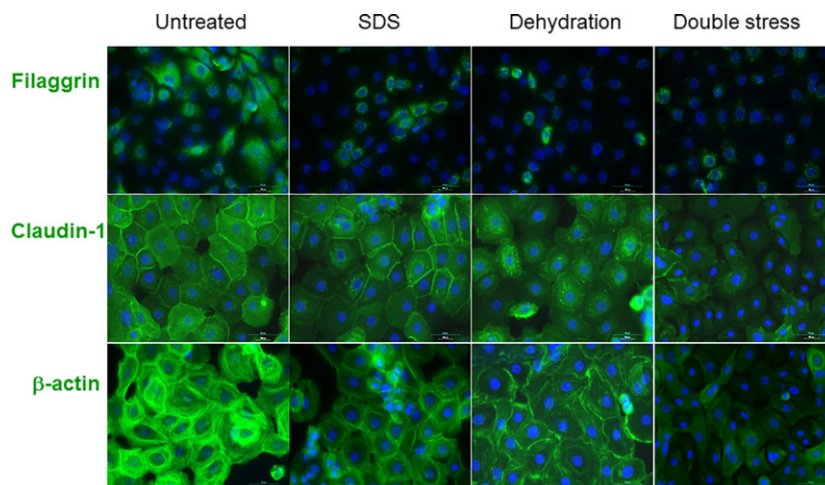


Figure 2 Development of a fragile normal human keratinocyte cell model. Immunofluorescence staining for actin, filaggrin and claudin-1 proteins in cells exposed to individual stresses (SDS or dehydration) or double stress (SDS followed by dehydration).

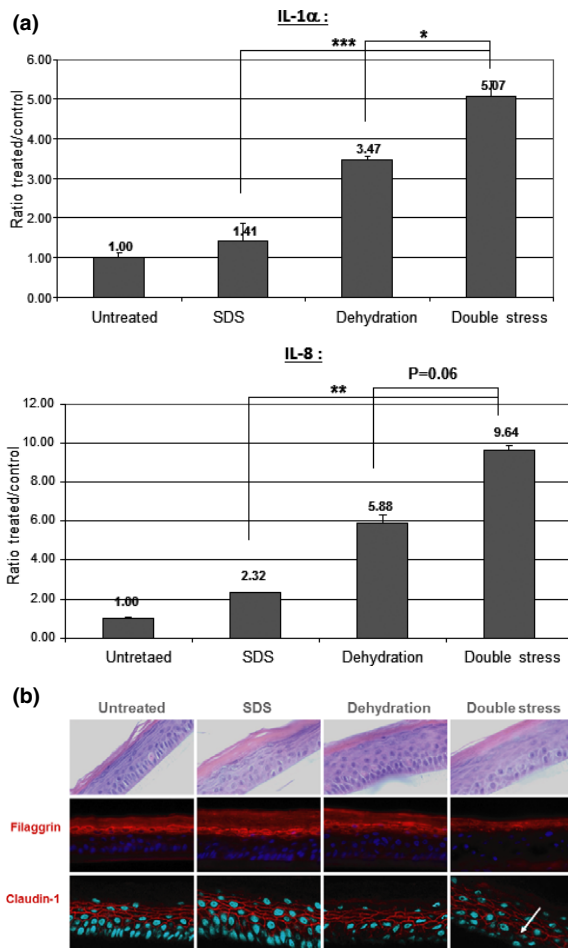


Figure 3 Development of a fragile skin tissue model. Analysis of reconstructed human epidermis (RHE) upon exposure to individual stresses (SDS or dehydration) or double stress (SDS followed by dehydration). (a): Measurement of IL-1 α and IL-8 secretion. Ratios represent cytokine production from stressed RHE vs. untreated controls (mean \pm SD of 4 RHE in duplicate (IL-1 α) or triplicate (IL-8) from one representative experiment). Statistical analyses were performed vs. double stress using Mann–Whitney test: * $P < 0.05$ vs. double stress, ** $P < 0.01$ vs. double stress, *** $P < 0.001$ vs. double stress. (b): Hematoxylin-eosin staining, filaggrin and claudin-1 immunolabeling. Dotted white dash delimites the granular layer, where filaggrin staining is localized. Filaggrin staining was abrogated in the double stress_RHE while claudin-1 staining in the upper layers was reduced.

granular layer and dispersed claudin-1 labelling in double-stress RHE. As compared to the placebo formulation, ROP extract application provided some protection against the reduction of filaggrin, but an efficient protection of claudin-1 labelling (Fig. 5a). Finally, inflammation was significantly modulated by ROP extract-containing formulations (3% or 5% ROP extract) in double-stressed RHE, as shown by a decrease in IL1- α compared to double-stressed RHE (Fig. 5b). This effect was not

observed with the placebo formulation, suggesting a specific anti-inflammatory activity of ROP extract.

Altogether, our *in vitro* data highlight that ROP extract would be efficient for protecting barrier-weakened epidermal keratinocytes to dehydration challenge.

Clinical model to determine fragile skin in volunteers and an exploratory clinical study

A total of 58 women [mean age 30.54 (range 19–49) years] participated in the clinical assessment of response to 0.25% SDS and development of a test to determine fragile skin. Analysis of the response of the skin's epidermal barrier to stress caused by the SDS patch enabled the population to be divided into two groups: 18 (31%) subjects had fragile skin with a TEWL ratio > 1.3 (mean TEWL ratio = 1.63 ± 0.31) at 24 h after SDS patch removal and 40 (69%) individuals had normal skin (mean TEWL ratio = 0.88 ± 0.31). The TEWL increase following SDS stress was significantly ($P = 0.0001$) higher in the fragile skin group (16.76 ± 5.08) than in the normal skin group (9.25 ± 8.45). The between-group difference in TEWL evolution was statistically significant ($P < 0.0001$).

In the subsequent exploratory study, a total of 19 women (mean age 33.26 [range 23–49] years) were included, with no premature withdrawals or protocol deviations. At 24 h after SDS patch removal, the mean TEWL ratio in seven (37%) subjects was 1.60 (fragile skin group) compared with 0.84 in 12 (67%) subjects (normal skin group). The evolution of TEWL (change compared with untreated control) in the zone receiving SDS alone is shown in Fig. 6. A significant hyper-reactivity of the skin barrier was observed during the 48 h after SDS stress (after removal of the patch) in the fragile skin group compared with the normal skin group (24 h: $P < 0.0001$; 48 h: $P = 0.0042$); thus, subsequent observations focused on the 48 h after SDS patch removal.

In the 'normal skin' group, there were no significant differences between the negative control zone, the zone that received vaseline or the zone that received ROP-based product after the SDS patch was removed (Fig. 7). In the 'fragile skin' group, application of ROP-based product as soon as the SDS patch was removed significantly limited the reactivity peak of the epidermal barrier in comparison with the negative control zone ($P = 0.0007$) and the zone receiving vaseline ($P = 0.0005$) (Fig. 8). There was no significant difference ($P = 0.5$) in TEWL evolution between the negative control zone of the 'normal skin' group and the zone of the 'fragile skin' group that received the ROP-based product (Fig. 9).

No reported adverse effects in recipients of the ROP-based product.

Discussion

The studies reported herein provide previously unprecedented evidence from the development of a broad research programme with the objective of modelling and characterizing fragile skin from the cellular, tissue and clinical perspective.

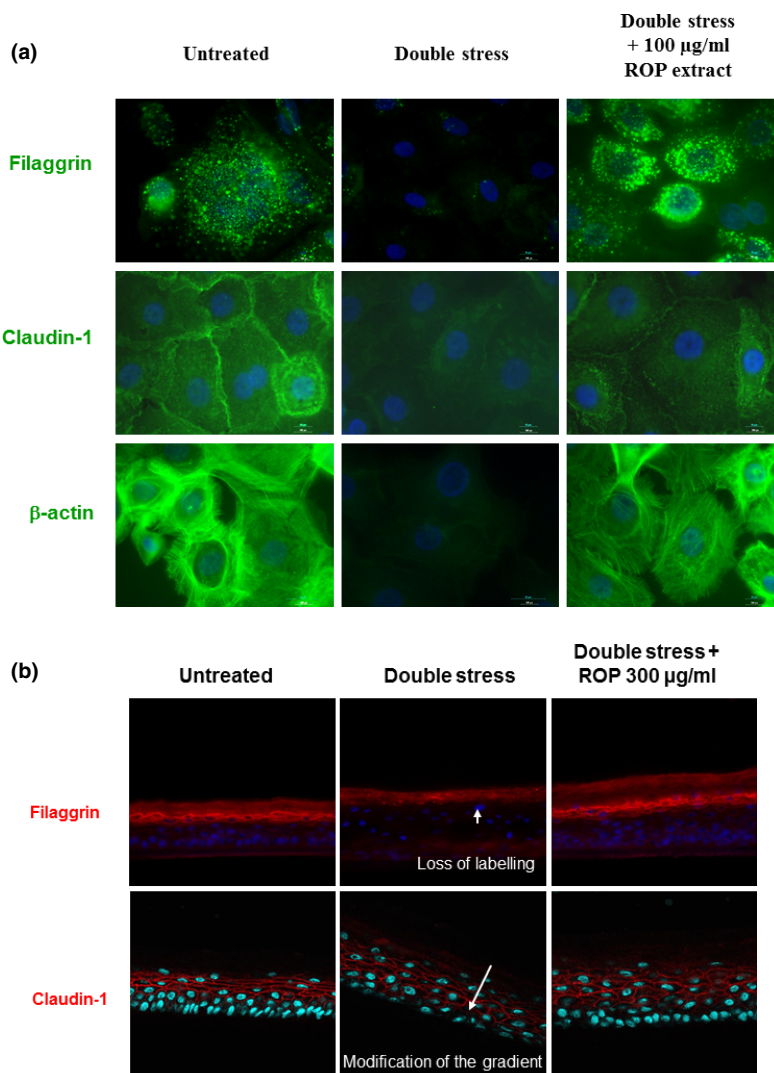


Figure 4 Analysis of the protective effect of Rhealba[®] Oat plantlets (ROP) extract against dehydration stress, when added into the medium of ‘SDS-weakened’ cells or tissues. (a): Immunofluorescence staining for filaggrin, claudin-1 and actin proteins in cells exposed to double stress \pm ROP. (b): Filaggrin and claudin-1 immunostaining on reconstructed human epidermis exposed to double stress \pm ROP.

With regard to the cellular aspect, we developed a double-stress model which enabled us to characterize and develop a weakened cell (keratinocyte) model. An altered barrier function (disorganization of the actin network, tight junctions and filaggrin staining) was observed when the cells were subjected to a double stress (SDS and dehydration). The first stress appeared to weaken the cells, thus amplifying the response to the second stress. The model enabled the protective effect of the active ingredient to be assessed on the ‘weakened’ cells against the action of a subsequent environmental stress.

It has been shown previously that ROP extract exerted an efficient anti-inflammatory activity.⁴⁸ Here, our *in vitro* data show that ROP extract was efficient to preserve major structural

proteins important for barrier function that were altered in the fragile skin models. Thus, properties of ROP extract made this compound of interest for alleviating homeostasis imbalance in keratinocyte.

It has been shown previously that the contribution of tight junctions to regulating the diffusion of solutes via paracellular pathways confers an important role in skin barrier function.³⁶ In general, a change in the expression or location of tight junction adhesion proteins results in abnormal permeability of the barrier function and a deterioration of the horny layer, and it has been shown recently that tight junction dysfunction in the stratum granulosum results in aberrant stratum corneum formation and barrier function.⁵⁰ Indeed, Furuse and colleagues⁵¹ demonstrated

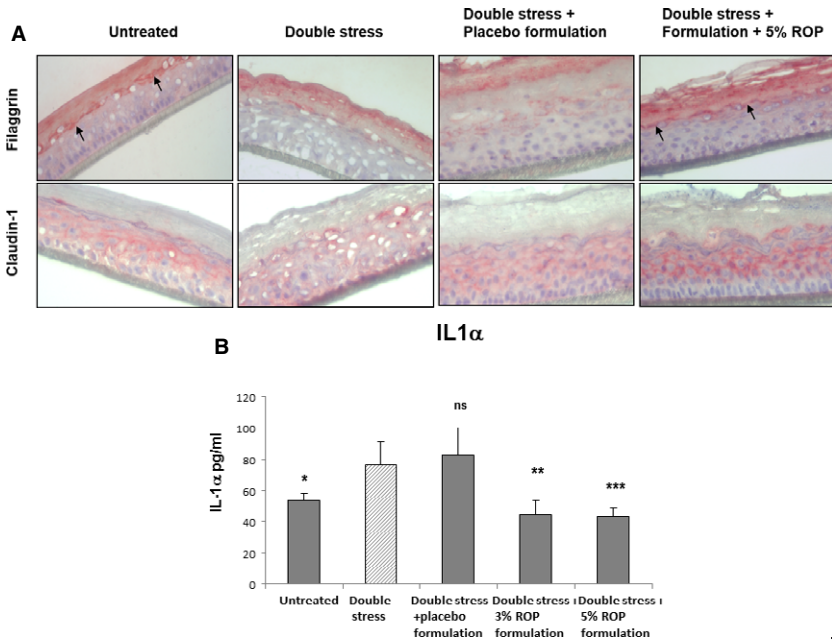


Figure 5 Analysis of the protective effect of Rhealba® Oat plantlets (ROP) extract in formulation against dehydration stress, when added topically onto ‘SDS-weakened’ tissues. (a): Filaggrin and claudin-1 immunostaining on reconstructed human epidermis (RHE) exposed to double stress upon topical application of control formulation (placebo) and formulation containing ROP 5%. Black arrow points out specific filaggrin staining in the granular layer (b): Measurement of IL-1 α secretion from RHE upon exposure to double stress \pm control formulation or the formulation containing ROP 3% (mean \pm SD on 3 RHE in duplicate from one representative experiment). Statistical analyses were performed vs. double stress using Mann–Whitney test: * $P < 0.05$ vs. double stress, ** $P < 0.01$ vs. double stress, *** $P < 0.001$ vs. double stress.

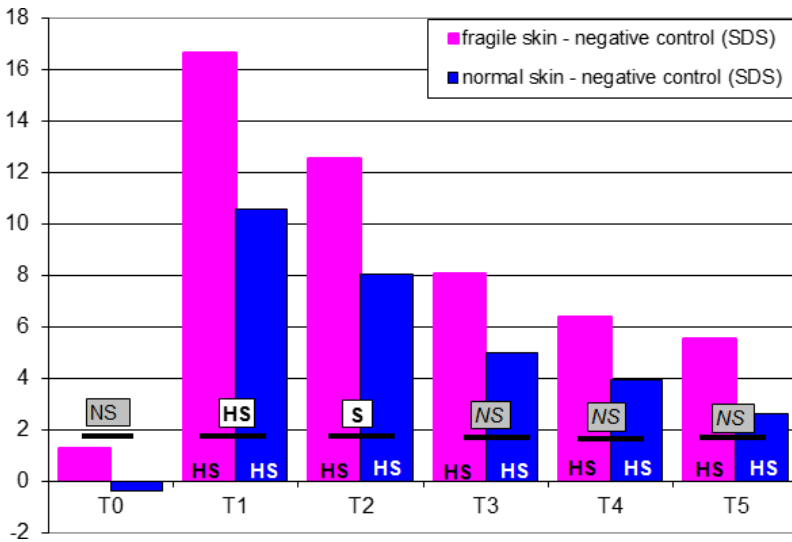


Figure 6 Evolution of trans-epidermal water loss (TEWL) in subjects with fragile or normal skin. Change in TEWL (in relation to untreated control) in the zone receiving SDS alone. T1 = 1 day after removal of the SDS patch; T2 = 3 days after removal of the SDS patch; T3 = 6 days after removal of the SDS patch; T4 = 8 days after removal of the SDS patch; T5 = 10 days after removal of the SDS patch. HS: highly statistically significant ($P < 0.0001$); S: statistically significant ($0.0001 < P < 0.05$); NS: not statistically significant ($P > 0.05$).

that decreased expression of claudin-1 causes excessive water loss in the epidermis confirming its essential role in creating and maintaining the barrier function.

Our model using reconstructed epidermal tissue also highlighted an alteration of the barrier function following single stresses with SDS and dehydration, as well as on a double-stress model equivalent to that carried out on the cells. The tissue model also demonstrated decreased filaggrin staining, disorganization of the tight junctions (alteration of claudin 1 staining) and increased inflammation (IL-1 α and IL-8). ROP extract incorporated into a simple cream formulation was also evaluated

on this RHE model and showed interesting protective properties regarding the second stress subjected after a first stress. The study performed on RHE therefore appears to validate the results obtained on the cell model. Based on these findings, we propose that active ingredients can be evaluated initially using cell models; then, those selected for further development can be evaluated on reconstructed skin models before being tested clinically.

The subsequent development of a clinical test enabled two distinct groups of individuals to be discriminated objectively, based on TEWL ratio after SDS stress: individuals with ‘nor-

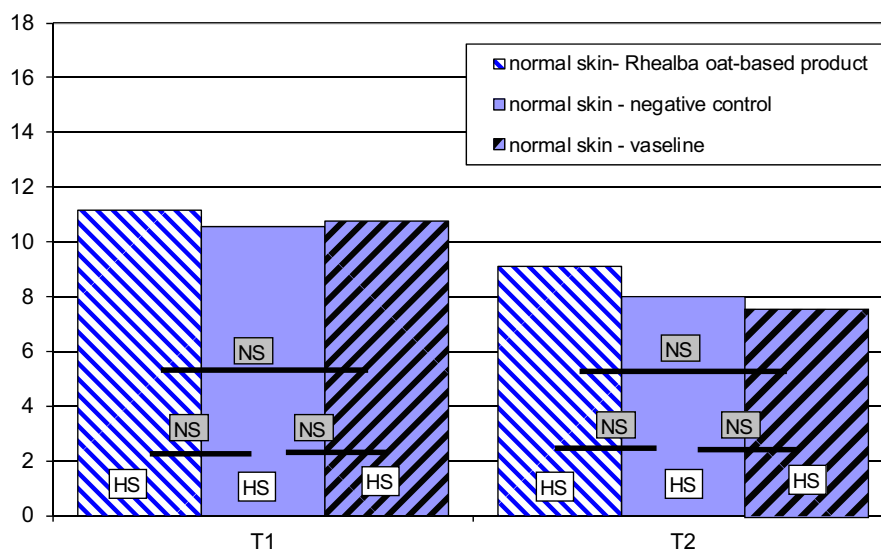


Figure 7 Evolution of trans-epidermal water loss (TEWL) in subjects with normal skin. Change in TEWL (in relation to untreated control) in the negative control zone and zones receiving Vaseline or Rhealba® Oat plantlets (ROP)-based product after removal of the SDS patch. T1 = 1 day after removal of the SDS patch and one application of product (ROP-based product or Vaseline); T2 = 3 days after removal of the SDS patch and four applications of product (ROP-based product or Vaseline). HS: highly statistically significant ($P < 0.0001$); S: statistically significant ($0.0001 < P < 0.05$); NS: not statistically significant ($P > 0.05$).

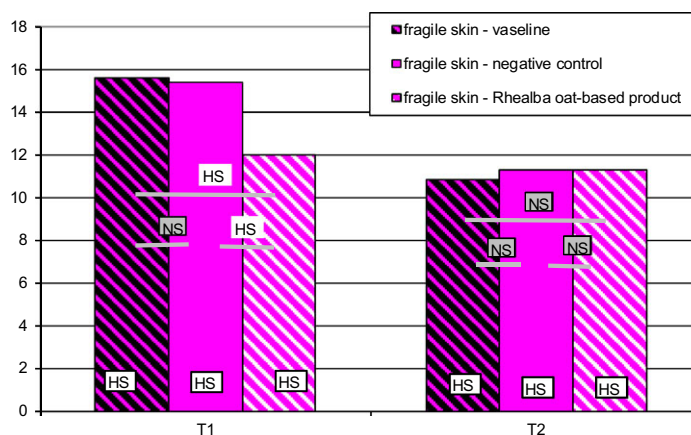


Figure 8 Evolution of trans-epidermal water loss (TEWL) in subjects with fragile skin. Change in TEWL (in relation to untreated control) in the negative control zone and zones receiving Vaseline or Rhealba® Oat plantlets (ROP)-based product after removal of the SDS patch. T1 = 1 day after removal of the SDS patch and one application of product (ROP-based product or Vaseline); T2 = 3 days after removal of the SDS patch and four applications of product (ROP-based product or Vaseline). HS: highly statistically significant ($P < 0.0001$); S: statistically significant ($0.0001 < P < 0.05$); NS: not statistically significant ($P > 0.05$).

mal' reactivity to SDS stress, with a TEWL ratio < 1.3 , corresponding to the response of 'normal' skin; those with hyper-reactivity to SDS stress, with a TEWL ratio > 1.3 , corresponding to the response of 'fragile' skin. In our clinical model, based on a TEWL ratio > 1.3 for fragile skin, 31% of individuals in the evaluated population had 'fragile skin'. This percentage is consistent with the data obtained during an

epidemiological survey of a representative sample of the Caucasian female population.¹

In our clinical model, there was no significant difference ($P = 0.5$) in TEWL evolution between the negative control zone of the 'normal skin' group and the zone of the 'fragile skin' group that received a single topical application of ROP-based product after SDS stress (Fig. 9).

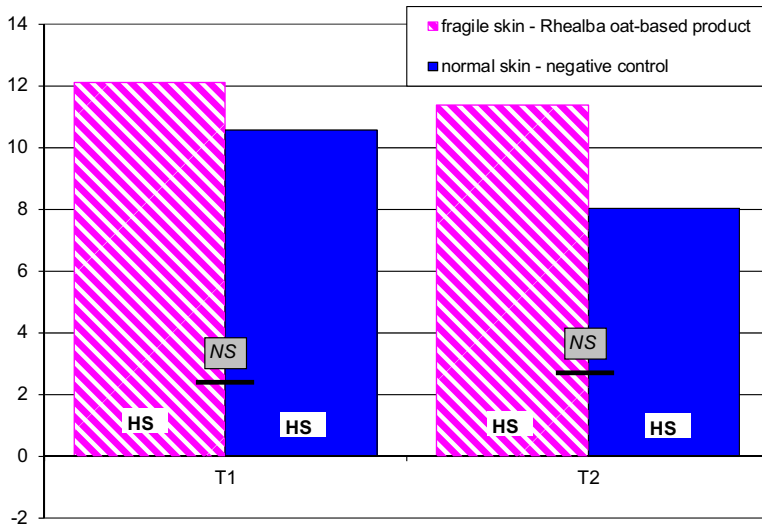


Figure 9 Change in trans-epidermal water loss (in relation to untreated control) between the negative control zone of the 'normal skin' group and zone of the 'fragile skin' group that received the Rhealba® Oat plantlets (ROP)-based product. T1 = 1 day after removal of the SDS patch and one application of ROP-based product for fragile skin group; T2 = 3 days after removal of the SDS. HS: highly statistically significant ($P < 0.0001$); S: statistically significant ($0.0001 < P < 0.05$); NS: not statistically significant ($P > 0.05$)

In tandem with the *in vitro* fragile skin models described herein, the results from the clinical model strengthen the fact that *in vitro* and *in vivo* models of fragile skin provide a valuable starting point for characterizing weakened skin and evaluating potential skin protective and repair formulations. However, given that the clinical model has currently only evaluated in a relatively small number of individuals, wider use and further refinement will augment our initial findings from the exploratory phase. Moreover, from the 'real world' clinical perspective, our exploratory evaluation only assessed fragile skin, and the repair/recovery of fragile skin, in Caucasian females; wider use of our clinical test to assess fragile skin in males and other ethnic groups will further enhance our preliminary clinical observations.

Importantly, the development of cellular and tissue models provides an alternative method to animal testing, which is prohibited by the European Commission Regulation (EC) No 1223/2009.⁵² These models should enable an initial evaluation of the capability of cosmetic creams to protect and restore the barrier function, and aid in the development of active ingredients and cosmetic creams for individuals with fragile skin. Moreover, although larger, well-controlled clinical studies are warranted, the subsequent development and exploratory evaluation of a clinical test in humans further enhances the findings from the cellular and tissue models, and provides initial evidence that ROP-based products could be beneficial in preventing fragile skin from moving towards severe homeostatic imbalance.

Acknowledgements

The authors thank David P. Figgitt PhD, Content Ed Net, for providing editorial assistance in the preparation of the manuscript, with funding from Laboratoires Dermatologiques A-

Derma, France. The authors also thank Christophe Lauze, Pierre Fabre Biometrie, for statistical analysis of clinical data, and Laetitia Courrech, Agnès Mas, Laurence Laffaye, Pascale Murat, Amandine Rouquier, Romain Simon, Morgane Perrotte, Hélène Le Hô, and Aurélia Aidi, Pierre Fabre Dermo-Cosmétique, for practical realization of the study.

Fragile Skin Classification

Physiological Fragile Skin

Skin and skin barrier in newborns and infants

U. Blume-Peytavi

Department of Dermatology and Allergy, Clinical Research Center for Hair and Skin Science, Charité-Universitätsmedizin, Berlin, Germany

Within their first days of life, newborns' skin undergoes various adaptation processes that needed to accommodate the transition from the wet uterine environment to the dry atmosphere. The skin of newborns and infants is considered as a *physiological fragile skin*, a skin with lower resistance to aggressions. Fragile skin is divided into four categories up to its origin: physiological fragile skin (age, location), pathological fragile skin (acute and chronic), circumstantial fragile skin (due to environmental extrinsic factors or intrinsic factors such as stress) and iatrogenic fragile skin.²

Extensive research of the past 10 years have proven evidence that at birth albeit showing a nearly perfect appearance, newborn skin is structurally and functionally immature compared to adult skin undergoing a physiological maturation process after birth at least throughout the first year of life.⁵³

Structural and functional deficiencies and maturation

The most important function of the skin is to maintain internal homeostasis by preventing water loss, regulating body temperature and to protect from absorption of noxious substances, intrusion of microorganisms and physical trauma. The function of the skin barrier begins to develop *in utero* with a well-developed epidermis emerging at 34 weeks of gestation,⁵⁴ and reaching complete maturity at this period of gestation⁵⁵ with complete SC maturation varying between 30 and 37 weeks.⁵⁶ The important protective and regulative skin barrier function resides primarily within the *stratum corneum* (SC), the top layer of the epidermis. Histologic and biophysical investigations of the SC have demonstrated that the skin barrier is competent at birth in healthy, full-term neonates to prevent organ dehydration.^{54,56,57} Although the SC is only 7–35 μm thick, it plays a vital role in forming this outer defence wall.⁵⁸

Overall, infant skin appears to have thinner epidermis and stratum corneum (SC) with a suprapapillary epidermis including on average 20% and 30% thinner in infants compared to adults. In addition, in newborn, corneocytes are smaller in size at least until the second year of life⁵⁹; cell proliferation increased, but cell maturation activity reduced.

Newborn skin is more susceptible to traction and shear forces due to an only weakly undulated dermo-epidermal junction with flat rete ridges at birth, requiring a developmental process till reaching an increasingly undulated dermo-epidermal junction strengthening the protective wall.⁵⁴

In addition, adaptation to the extrauterine environment comprises functional changes, namely changes in stratum corneum hydration (SCH), surface pH and SC permeability to water, measured as transepidermal water loss (TEWL);⁵³ the time to reach mature or adult levels varies depending on skin functional parameter and anatomical region. The water-handling properties are not fully developed before the end of the first year and infant SC contains more water and less amounts of natural moisturizing factors.⁵⁹ Skin hydration at birth is reduced, transepidermal water loss increased and pH is within the basic range. Garcia Bartels *et al.*^{60,61} showed that SCH and skin surface pH continuously change between birth and at least week 4 of life and that the rate of change depends on the body site. Overall, neonatal skin after birth is considerably drier compared with that of adults.⁶² However, during the first month of life, the difference in SC hydration between infants and adults is reversed,^{62,63} leading to increased skin hydration in older infants (aged 3–24 months) relative to adult skin.^{64,65} As skin becomes more hydrated, the SC that is initially rough smoothens.⁶² Skin water content also influences skin barrier function by regulating the activity of hydrolytic enzymes that are involved in SC maturation and corneocyte desquamation.⁵⁸ Interestingly, there is a recent report clearly indicating a higher number of closed polygons (NCP)/mm², a reproducible parameter for characterizing the skin surface topography compared to adults and aged persons.⁶⁶

Pooled *Transepidermal water loss* (TEWL) estimates indicate a competent basal epidermal permeability barrier function in neonates⁵⁵ and infants without cutaneous diseases at most anatomical sites.⁶⁷ Interestingly, there is a large interperson variability, in particular in younger infants, compared to older infants and adults.⁶⁴ In some body regions, TEWL was already comparable to that of adults at day 2.^{60,61}

At birth, pH is in the basic range and undergoes the major alteration regarding skin surface pH during the first month of life. An accelerated acidification phase is observed in the first postnatal week with the uniformly nearly neutral to neutral pH levels of the first 1.5 days showing a steep decline homogeneously across the different anatomical areas.⁶⁷ Here also, the SC serves important functions in its slightly acidic pH⁶⁸ providing additional protection against pathogens. Establishing the *acid mantle* with a balanced physiological microbiome together with maturation of the immune defence system puts the newborn and infant fragile skin at higher risk for invasion of microorganism and infections.

Recently, the role of the pro-inflammatory cytokine *interleukin-1alpha* (IL-1 α) was suggested to influence fetal skin barrier maturation. Rather low levels of IL-1 α were found to increase during the neonatal period as measured with a promising non-invasive method in healthy skin of full terms.⁶⁹ These findings indicate that IL-1 α does not only act as pro-inflammatory cytokine but may also promote skin barrier maturation in humans.⁶⁹

Early *microbial colonization* is expected to influence the development of immune function in skin. The composition of the cutaneous microflora evolves over the first year of life.⁶² Microbial colonization of the human skin begins immediately after birth, however, it needs at least months up to the end of first year of life to get balanced and sometimes even beyond.⁷⁰ Timely and proper establishment of a healthy skin microbiome (commensal genera) has a pivotal role in maintaining the defence wall with adequate protective function against potentially infectious microbes. According to Capone *et al.*⁷⁰ already in this early period, longtime stability of the microbiome is influenced. It is even hypothesized that the microbial colonization of infant skin is expected to importantly affect the development of the skin immune function and perhaps the maturation of other skin barrier functions, as well as the development of the systemic immune system.⁷⁰

Thus, also the skin's immune defence system consisting of immediate, non-specific mechanisms (innate immunity) and delayed, stimulus-specific responses (adaptive immunity) need a maturation processes contributing to the fragile skin character in this susceptible period. Further investigations are needed to characterize the further evolution of the human skin microbiome during the first few years of life to determine if commensal bacteria play a role in the maintenance of skin barrier function beyond serving as sentinels of innate immune defence.⁷¹

The skin of neonates and infants exhibits distinct anatomical and functional properties that might be clinically reflected by its characteristic susceptibility to skin barrier disruption.

Skin care recommendations

Current skin care practices in infants vary between populations and are still based mainly on tradition, experience and cultural factors. However, in 2009, a first approach in European recommendations for best skin care practices from a round table has been published in order to provide evidence-based recommendations on recently performed clinical studies in this field. Skin care practices should preserve skin integrity, allow physiologic neonatal skin barrier adaptation, prevent toxicity and address concerns such as potential sensitivity from chemical exposure.

Based on recently published randomized controlled clinical studies, the current guidelines⁶⁰ recommend the first bath after the umbilical cord has fallen. They state that bathing is generally superior to washing, provided basic safety procedures are followed and that bathing has psychological benefits for the infant and parents. Based on current studies, bathing is recommended 2–3 times per week (water temperature 37–38 °C, at a room temperature of >22 °C) with a bath duration not longer than 5–10 min with subsequent infant patting dry. When bathing infants with a liquid cleanser, a mild one not altering the normal pH of the skin surface or causing irritation to skin or eyes should be chosen. It can currently be concluded that bathing infants twice weekly followed by a baby cream application does not harm skin maturation and is significantly superior to water alone.^{53,61} For cleansing, the diaper area either tap water alone or baby wipes can be used, as clinical data showed that skin barrier maturation in this area was not harmed using either skin care regimen.^{69,72}

If basic safety procedures are followed and frequency of bathing is limited to 2–3 times a week, bathing does not harm the infant.^{60,61} Indeed, bathing is superior to washing and has psychological benefits for the infant and parents/caregivers. Liquid cleansers that contain an emollient may have additional advantages, particularly in babies and infants at high risk of atopic dermatitis. Further clinical research is now needed to investigate more fully the potential benefits of appropriate skin care regimen for fragile skin especially in atopic dermatitis predisposed newborns and infants.

Pathological Fragile Skin

Atopic Dermatitis

Atopic dermatitis: a typical example of fragile skin

F. Boralevi

Pediatric Dermatology, Pellegrin Hospital, Bordeaux, France

As we make headway into the 21st century, recent scientific advances into skin barrier research have raised new insights on

atopic dermatitis (AD). Theories that pitched against one another, on the one hand the inside-out hypothesis, and on the other hand the outside-in hypothesis, along with the most recent data on the skin barrier, lead to new perspective on the disease. The consequences exceed the purely pathophysiological field and concern patient management, with both clinical and therapeutic implications, including the development of prevention strategies.

What about the Inside/Out strategy?

Since Coca et Cooke (1923) and the establishment of the atopy concept, and then the notion of atopic dermatitis developed by Wise and Sulzberger (1933), immunologists have held debates throughout the last century, resulting in AD being considered as a result of immunological problems (inside-out hypothesis). Definitions of the disease indicated ‘hypersensitivity mediated by IgE in response to antigens from the environment’ or ‘hypersensitivity to harmless environmental factors in non-atopic persons’.⁷³ Nonetheless, no studies have managed to convince scientists that genetic predisposition to AD – even if undeniably established – was linked to a genetic polymorphism directly impacting immunity.

The so-called hygiene theory strengthened the inside-out hypothesis with solid epidemiological arguments.⁷⁴ It has indeed been proven that AD was more common in industrialized countries than in developing countries, more common in children living in cities than those in the countryside, more common among wealthier social groups compared to those of more modest means or, on the contrary, less common if a dog lived in the home or if mattresses had high endotoxin concentration. It has also been proven that AD prevalence and sensitization to aeroallergens was twice as high in children receiving prophylactic anti-parasite treatment compared to those observed in untreated children.⁷⁵ In other words, improved hygiene coincides with the appearance of atopy. The underlying hypothesis is that early contact with various infectious, bacterial and parasitic agents stimulates innate immunity and polarizes the body’s response in an anti-infection and not atopic mode. These concepts require qualification, since certain bacteria such as *Staphylococcus aureus* could very well participate in T_H2 polarization in patients with atopy.

Abnormalities in the epidermal barrier

The epidermal barrier, ‘la raison d’être’ of the epidermis,⁷⁶ protects the skin from the external environment. The alteration of its integrity, clinically evaluated by measuring transepidermal water loss, shows that infants developing AD experience early epidermal barrier alteration.^{77,78} There are multiple mechanisms involved in skin barrier alterations.

The main mechanism is filaggrin (FLG) gene defects The FLG gene, that belongs to the epidermal differentiation complex located on the 1q21 chromosome, encodes the FLG protein, whose determining role in epidermal barrier function is linked to its ability to

aggregate keratin filaments (filaggrin is a contraction of filament aggregating protein). It is first produced in the form of profilaggrin, which makes up an essential part of keratohyalin granules, and then it develops into filaggrin combined with keratin before being broken down into urea, urocanic acid and other natural moisturizing factors in the skin. It has been well established that loss-of-function mutations within the FLG gene cause ichthyosis vulgaris and represents strong predisposing factors for AD. This also encourages AD-associated asthma, eczema herpeticum, polyallergies and nickel-contact eczema. In clinical practice, the detection of palmo-plantar hyperlinearity is a simple, cost-effective way of considering the presence of a filaggrin mutation.⁷⁹

Tight junction abnormalities Alteration of the interkeratinocyte cellular cohesion also disrupts epidermal permeability and encourages AD. The expression of claudin-1 and claudin-23 proteins, components of the tight junction, is significantly reduced in AD patients.⁸⁰ As is the case with filaggrin, a weak expression of these proteins can be genetically determined (here by Claudin-1 gene mutations) or can be secondary, due to a T_H2 cytokine environment.

Imbalance in protease/protease inhibitor ratio An increase in skin permeability can also be facilitated by excessive protease activity in the upper part of the epidermis. Two mechanisms can lead to this situation: either an up-regulation in epidermal serine proteases (kallikrein 5 and 7, especially when the pH increases), or a decrease in activity of protease-inhibitors such as LEKTI. The complete absence of this protein by homozygote mutation of the SPINK5 gene, causes Netherton disease, a severe syndromic ichthyosis with hair anomalies and constantly associated with severe AD.

Others causes of barrier alteration The extracellular matrix of the epidermis can be altered because of deficient production of ceramides and other epidermal lipids. Skin inflammation can also play an unfavourable role against the epidermal barrier, by inhibiting the expression of filaggrin and other proteins involved (hornerin, filaggrin 2, claudin, etc.). Other causes to be considered are the intrinsic proteolytic activity of some organisms in the environment (house dust mites, bacteria), use of detergents and heating method used.

However, the epidermal barrier is not merely a physical barrier. It is closely linked to innate immunity and adaptive immunity, which in its entirety all defines the notion of triple barrier exposed to an environment where microbiota and allergens coexist.⁸¹

Development of AD

In infants, skin barrier permeability seems to play a determining role in developing AD. This encourages the transcutaneous passage of several atopens from the environment that stimulates the infant's immature immune system. The resulting premature acti-

vation causes a primarily T_H2/T_H22 reaction. Once triggered, this reaction disrupts the synthesis of antimicrobial peptides, encourages the synthesis of proinflammatory cytokines such as TSLP, inhibits filaggrin expression and perpetuates a true vicious circle.

In practice: Reinforcing the barrier

The pathophysiological elements discussed above should help us in practice, to communicate with patients and also to guide therapeutic decisions.

During inflammatory flare-ups, the primary aim of treatment will be to neutralize the inflammation, and will therefore require topical corticosteroids or local tacrolimus. However, there will be a rapid shift in objective, to strengthen the barrier with emollients. Between two flare-ups, persistent xerosis and alteration of the barrier will lead to long-term emollient application. Emollients have been proven to have several beneficial effects during AD treatment: need for less quantities of topical corticosteroids, decrease in xerosis, improvement in quality of life, protection against the effects of irritant factors, and to a certain extent, decrease in disease intensity.^{82,84} The steroid-sparing effect was proven in a randomized, multicenter prospective study including 162 children under the age of 1 year, with moderate to severe atopic dermatitis.⁸² In this study, the consumption of potent topical corticosteroids was reduced by over 40% in the emollient group. The efficacy of emollient use for xerosis was clearly proven in a more recent study, also randomized and multicenter, including 251 children between the ages of 2 and 6 years.⁸³ The xerosis score was even further reduced in a significant manner in the emollient group, compared to the group applying a placebo.

Identifying abnormalities in the epidermal barrier as the cause of AD onset also serves to promote early protection of the skin barrier in high-risk patients, in order to reduce the risk of developing the disease. The efficacy of this prevention strategy was initially proven in a pilot study, confirmed on a larger group of 124 newborns at risk for AD, systematically treated by applying emollients every day for the first 6 months.⁸⁵ In the group that had applied the emollient, the risk of developing AD was cut in half. A 32% decrease was reported in a similar study conducted in Japan.⁸⁶ If these results are confirmed, this cost-effective, well-tolerated preventive method should become widespread. The effects on later onset of asthma and allergic sensitizations are also expected.

Acne

Cutaneous fragility in acne in newborns, children and adolescents

G. Fabbrocini

Department of Dermatology, University Hospital of Naples, Naples, Italy

Among the numerous functions of skin, the defensive one is the most important. The skin offers an interface between a

hostile external environment and the host, providing a barrier between the body and the outside environment. Most of the defensive functions of the human skin are localized to the stratum corneum (SC), consisting of several layers of cornified keratinocytes embedded in a lipid matrix. Included in the armamentarium of the epidermal barrier against microbial invasion are surface pH, SC lipids and specialized antimicrobial peptides such as defensins and cathelicidins, enzymes and enzyme inhibitors, chemokines and epidermal toll-like receptors. Filaggrin (FLG) is a key component of the epidermis that contributes to its physical strength as well as many other physicochemical properties. When one or more of these defensive functions are impaired skin results more fragile. Fragile skin can be classified into four categories up to its origin: physiological fragile skin (age, location), pathological fragile skin (acute and chronic), circumstantial fragile skin (due to environmental extrinsic factors or intrinsic factors such as stress) and iatrogenic fragile skin. One of the more frequently defensive function impairment in fragile skin is *FLG*. In newborn, *FLG* loss-of-function mutations are identified as the cause of ichthyosis vulgaris, a common Mendelian trait characterized by dry, scaly skin and frequent atopic dermatitis.^{87–89} Infant skin is critical to the newborn child's transition from the womb environment to the journey to self-sufficiency. Healthy full-term newborn skin is well-developed and functional at birth, with a thick epidermis and well-formed SC layers. Transepidermal water loss is very low at birth, equal to, or lower than adults, indicating a highly effective skin barrier. Skin barrier impairment in newborn and infants evaluated through transepidermal water loss measurement, has demonstrated to be a predictor of atopic dermatitis development. Acne can affect newborn (*Acne neonatorum*): it occurs in up to 20 percent of newborns.⁹⁰ It typically consists of closed comedones on the forehead, nose and cheeks, although other locations are possible. Open comedones, inflammatory papules and pustules can also develop. Neonatal acne is thought to result from stimulation of sebaceous glands by maternal androgens. However, severe, unrelenting neonatal acne accompanied by other signs of hyperandrogenism should prompt an investigation for adrenal cortical hyperplasia, virilizing tumours or underlying endocrinopathies. *Infantile acne* is a rare occurrence and has its onset at 3–6 months and is less common than neonatal acne. Clinically, the lesions range from comedones to inflammatory papulopustules to cysts. It is probably associated with a premature secretion of gonad androgens. These patients may develop severe acne as teenagers. Both in newborn and in children, acne acts on a basal 'age-related' skin fragility. In adolescence, when acne vulgaris became the most frequent dermatosis, the incidence of skin fragility is more controversial. Within acne lesions, there is an increase in filaggrin expression in keratinocytes lining the follicle wall. In addition, *P. Acnes* has been shown to increase filaggrin expression in cultured keratinocytes

and also in explants of human skin. Importantly, it is not known that if the changes in filaggrin expression noted in acne vulgaris are primary or secondary events. Moreover, although in acne, filaggrin expression seems to be augmented, in acne affected skin, we curiously find different parameters typically associated with a filaggrin function impairment: Yamamoto et al⁹¹ observed that patients with acne vulgaris exhibited markedly greater TEWL and lower skin hydration with an evident permeability barrier impairment. The increase in TEWL and decrease in skin hydration were greater in patients with acne vulgaris of moderate severity as compared to those with mild acne severity and as compared to normal control subjects, suggesting that the degree of stratum corneum permeability barrier impairment correlates directly with the severity of acne vulgaris. Another consideration: if filaggrin, that is a protein with an important activity against bacterial colonization, is increased in acne, why we observe in acne affected skin an abnormal bacterial colonization? All this apparent contradictions can be probably explained considering not only quantitative, but also qualitative representation of filaggrin.

In fact, in acne lesions, augmented levels of filaggrin coexist with a functional impairment of this protein. That could be unable or less able to complete its natural maturation from pro-filaggrin, through filaggrin, to natural moisturizing factors (NMFs), the final filaggrin products, essential to maintain skin hydration, normal TEWL and skin permeability, and to contrast bacterial colonization. Finally, we can affirm that skin fragility is a light motive in acne both in the earlier phases of development (neonatal and infantile age) and in adolescent one.

Rosacea

Evaluation and management of facial erythema in adolescents

J. Tan^{1,2} and S. Boyal²

¹Department of Medicine, Faculty of Medicine, Schulich School of Medicine and Dentistry, Western University Windsor campus Windsor, ON, Canada

²Windsor Clinical Research Inc. Windsor campus Windsor, ON, Canada

Facial erythema in adolescence is common and may be due to normal variation or disease, including acne, atopic dermatitis, psoriasis, keratosis pilaris rubra and rosacea. Clinical symptoms and morphological features help to distinguish between these conditions, which have different underlying pathogeneses.

Facial erythema in adolescence is a common occurrence in those with light phototypes due to the ready visibility of underlying cutaneous vasculature through thin and pale young skin. However, facial erythema can also be due to a variety of skin diseases such as acne, atopic dermatitis, keratosis pilaris rubra and

rosacea. Due to its localization on an exposed region, facial erythema may lead to embarrassment, self-consciousness and stigmatization. Of the physical features associated with attractiveness identified by both genders in ninth and 10th grades of high school, among the most commonly identified was the face.⁹² For those with various acquired or congenital craniofacial conditions, stigma experiences were reported by 1/3 of those affected. These undesirable experiences included being stared at, and overhearing others talking about their facial appearance.⁹³ Furthermore, in a survey of women in college, over 70% reported appearance related teasing and criticism during their mid-childhood to early adolescent years – with the face being one of the most common physical features for teasing.⁹⁴

In view of these findings, this study will address common skin conditions associated with facial erythema and review the evaluation and management of facial erythema in adolescents. We also review pathogenesis within the context of a common pathway to skin barrier dysfunction and discuss related management options.

A literature search was conducted using PubMed to July 2nd, 2015 with keywords: *erythema, redness, adolescent, youth, facial, rosacea, keratosis pilaris, atopic eczema, psoriasis, dermatitis, seborrheic dermatitis, acne*. An additional search was conducted with keywords: *prevalence, frequency, adolescent, youth, facial, atopic eczema, rosacea, keratosis pilaris, psoriasis, dermatitis, seborrheic dermatitis, acne, skin barrier, skin barrier impairment, skin barrier function*. Only relevant studies conducted in English were included for further review.

The global prevalence of acne is 9.4%, and it is ranked as the eighth most prevalent disease.^{95,96} Within the general population, prevalence peaks between the ages of 16–20^{97,98} although initial onset may be earlier, in association with onset of puberty.^{99,100} The current hypothesis on acne pathogenesis is based on: androgenic stimulation leading the follicular ductal epithelial cornification and sebum hypersecretion, intrafollicular proliferation of propionibacterium acnes, and perifollicular inflammation.¹⁰¹ Clinically, acne is characterized by lesional tenderness or pain, not itching. Additionally, facial erythema in acne is typically discretely perifollicular, localized to inflammatory acne lesions except in the most severe cases where interfollicular erythema may be observed as indurated plaques.

Atopic eczema is considered to be one of the most burdensome skin conditions globally⁹⁶ – estimated to affect 10–12% of adolescents, with girls more commonly affected than boys.¹⁰² In a Swedish study of eczema in adolescents, almost half the patients had onset within the first 2 years of life and a quarter had onset in adolescence. Furthermore, 20% had facial involvement.¹⁰² On the face, the clinical presentation of atopic dermatitis is characterized by itching and eczematous morphology with associated xerosis. Impaired skin barrier function in atopic eczema has been demonstrated to be related to abnormalities in genes encoding structural proteins such as filaggrin, stratum cor-

neum proteases and protease inhibitors.¹⁰³ Filaggrin acts to aggregate keratin fibres within corneocytes facilitating their flattening into discs with large surface areas, and their metabolites are used in production of natural moisturizing factor.¹⁰³ Thus, mutations in genes encoding this protein can be expected to increase barrier impairment and reduce levels of moisturization. Specific stratum corneum proteases are key enzymes involved in desquamation and their activity is regulated by protease inhibitors. Increased expression and activity of the former and/or reduced activity of the latter have been demonstrated in atopic dermatitis and Netherton's syndrome respectively.¹⁰³ The primary role of barrier dysfunction in atopic dermatitis was recently demonstrated in a recent neonate study. Daily application of moisturizer during the first 32 weeks of life was shown to reduce the risk of atopic dermatitis in infants at high risk by half (hazard ratio 0.48; 95% CI, 0.27–0.86).¹⁰⁴

Keratosis pilaris has been observed in 7% of children aged 11–12 years, and develops in the vast majority (~90%) of those affected within the first two decades of life. The face is affected in 6%.¹⁰⁵ Erythromelanosis follicularis faciei *et* colli is considered to be a variant of keratosis pilaris rubra featuring hyperpigmentation, follicular hyperkeratosis and erythema at face, particularly preauricular regions, and lateral aspects of neck. Inheritance may be autosomal recessive. In view of its association with keratosis pilaris at arms and shoulders, this condition may be more common than previously thought but prevalence studies are lacking.¹⁰⁶

Rosacea is a chronic facial dermatosis characterized by central facial erythema and flushing with varying presentations comprising papules, pustules, phymatous features and ocular irritation. Childhood and adolescent rosacea has been noted in case reports and case series.^{107–109} In a consecutive series based on a retrospective review from a pediatric dermatology unit over a 9 year period, 20 patients were observed – six with solely cutaneous involvement, three solely ocular and 11 combined. The mean age at presentation was 4.6 years and the most common cutaneous presentation was a papulopustular eruption with background of telangiectasia.¹⁰⁹

While the pathogenesis of rosacea is still unknown, recent investigations suggest involvement of the innate immune system and cutaneous neurovascular dysregulation.^{110,111} In this condition, increased serine protease activity activates protease-activated receptors and may upregulate transient receptor potential channels (TRPs). In rosacea, there is increased expression of both the pro-peptide and 37 amino acid cathelicidin, LL-37. There is also increased expression of a stratum corneum serine protease, KLK 5, the enzyme cleaving the pro-peptide to LL-37.¹¹² These peptides have pro-inflammatory and vasoactive properties. Activation of stratum corneum serine protease, KLK 5, may result from increased TLR-2 expression from keratinocytes. TLRs or toll-like receptors are pathogen-associated

sensor molecules, which act to detect and signal the presence of microbial structures. Potential triggers for TLR-2 in rosacea include the saprophytic mite *Demodex folliculorum*, mite-related bacteria such as *Bacillus oleronius*, and the cutaneous commensal *Staphylococcus epidermidis*.¹¹⁰ Additionally, reactive oxygen species, as induced by UV light, may activate TLR-2 and activate neurogenic receptors.¹¹³ Transient receptor potential channels (TRPs) expressed on neural tissues, keratinocytes and endothelial cells can be activated by heat, ethanol, spicy food (TRPV1) or cold, formalin, or other chemicals (TRPA1) – inducing release of substance P and calcitonin gene-related peptide leading to pain/edema and vasodilation respectively.¹¹⁴ Clinical symptoms of rosacea include stinging and burning sensations which occur more frequently in rosacea subjects than controls.¹¹⁵

Primary diagnostic features of rosacea include flushing (transient erythema), non-transient erythema, inflammatory papules and pustules, and telangiectasia in a centrofacial distribution.¹¹⁶

Impairment of skin barrier function can be macroscopically evaluated by determination of transepidermal water loss (TEWL) and skin conductance parameters, reflecting the integrity of the epidermis to mitigate evaporative loss and epidermal moisturization respectively. Untreated acne vulgaris subjects with moderate or greater severity has been associated with greater TEWL and decreased skin conductance compared to controls and to those with mild acne. The finding of an association with lower levels of sphingolipids (ceramides and free sphingosine) suggests the deficiency of the latter may be contributing the barrier impairment.¹¹⁷ In atopic dermatitis and rosacea, subjects with a lower irritant threshold to sodium lauryl sulphate had higher TEWL and lower skin conductance. These abnormalities were detected only on the face in rosacea subjects, but affected both face and arm in those with atopic dermatitis – implying a specific regional vs. generalized dysfunction respectively.¹¹⁸ This localized epidermal barrier impairment in rosacea corroborates the finding that in rosacea patients compared to healthy controls, TEWL was increased at the perinasal cheek and lateral nose but not the lateral chin.¹¹⁹

While a discussion of treatments for these individual conditions is beyond the scope of this paper, there is one common pathogenic pathway: epidermal barrier dysfunction. Addressing the underlying factors leading to barrier dysfunction such as reduced production of natural moisturizing factor (as in atopic eczema) and inflammatory pathway activation (including serine protease activity as in atopic eczema and rosacea) leading to epidermal injury will facilitate repair and re-establishment of barrier integrity. To facilitate this outcome, a component of standard skin care should also include gentle cleansers (such as with synthetic detergents) to avoid further epidermal damage which may occur with soaps, and regular use of emollients to improve skin barrier function.

Hand eczema and irritant contact dermatitis

D. Tennstedt, A. Herman

Department of Dermatology, Saint-Luc University Clinics, Brussels, Belgium

Hand eczema and irritant contact dermatitis remain a challenge for any dermatologist. These types of dermatitis form part of the vast domain of fragile skin, and their ‘mechanical’ action together with their ‘immunological’ action make weakened skin, whose barrier function has already been affected by one or more irritant factors, more vulnerable to developing full-blown allergic contact dermatitis. The transcutaneous absorption of daily allergens is therefore facilitated and encouraged by the increased permeability of the skin barrier.

These two conditions, which are often found together, come under the scope of pathological fragile skin.

In addition, new allergens are constantly appearing in the environment. Ignorance of the allergenic potential of the various molecules we encounter during both our daily lives and our professional activities makes patients who come into contact with them tend to be less wary. The result is that new forms of hand eczema are frequently being described. This branch of dermatology is therefore constantly changing and every dermatologist has a duty to ensure he is up to date with the latest allergy knowledge.

Taking a detailed description of the patient’s environment and activities is therefore an essential stage in identifying the causative trigger. Any topical agents already applied should also be recorded.^{120–122}

- It is important to differentiate between two main conditions:
- Irritant contact dermatitis
- Allergic contact eczema

Irritant contact dermatitis is not, strictly speaking, a form of eczema, although due to its anatomical and clinical similarities we feel it ought to be included in this general review of environmental and/or occupational hand eczema.

Irritant contact dermatitis^{123,124}

Irritant dermatitis involves perturbations in skin barrier integrity, but with no immunological component, caused by an irritant touching the skin. It occurs very specifically in the regions which came into direct contact with the substance and there is no generalized spread. The intensity of the symptoms varies depending on the irritative (or caustic) strength of the product, the area affected, and the frequency and duration of contact.

Acute irritant dermatitis occurs upon first contact with a caustic substance such as solvents or highly acidic or alkaline agents, if inadequate protection is used. Maculopapules and erythematous plaques develop, sometimes with a scattering of

vesiculobullae, accompanied by itching or pain. A first-degree chemical burn may also occur.

Chronic irritant dermatitis is caused by repeated or prolonged exposure of the skin to minor irritants. It affects the hands in different ways:

- Intense dryness with fine desquamation of the backs of the hands and sometimes hyperkeratosis.
- Fingertip eczema through abrasion.
- Deep and painful cracks on the palms and fingertips.

Cleaners, maintenance personnel, and hairdressers are particularly affected by this problem. Irritant dermatitis is often a multifactorial condition, whereby permanent contact with irritants (e.g. soap, detergents, shampoo) is combined with microtrauma, and exposure to the cold and damp. Various oils, fats and hydrocarbons used professionally can also trigger this type of dermatitis. We may also look at endogenous factors to explain individual susceptibility to aggression, such as xeroderma, transpiration and an atopic predisposition. All these elements help weaken the integument (pathological fragile skin).

Allergic contact eczema^{124,125}

Classifying the various clinical forms is not easy because it can be done based on the stage of the eczematous process or the exact topology of the lesions on the hands.

The clinical features of the eczema reflect a dynamic sequence of inflammatory changes to the epidermis and underlying dermal structures. The series of cutaneous signs includes the appearance of erythema and edema at 5–7 days after the initial contact with the allergen, or within 24–48 h in cases of rechallenge. Clear vesicles then form and may sometimes join to form bullae of varying size. This acute eczema may gradually dry out or the vesicles may rupture, leaving small punctiform erosions. A certain amount of serous fluid may also rise to the surface of the skin or coagulate and form small crusts. In a chronic presentation, the eczema is covered with scales which are sometimes very fine, flaky and powdery, and at other times thicker and larger, depending on the disruption to the keratinization process. Cracks and fissures cover the overly dry and rough skin. Excoriations appear with a thickening of the skin in a grid-like pattern, as the incessant itching causes lichenification to occur. The patient may also develop secondary events such as infected lesions.

However, there are also much more discrete types of eczema, limited to a simple itching, dryness or fingertips cracking, which pose the question of what degree of severity is needed to form a diagnosis of contact eczema.

Whether acute or chronic, the eczema develops on the area of the skin that came into contact with the allergen. However, it may subsequently be spread by the hands to other parts of the body, in particular the face and neck, triggering the formation of eczematous plaques in these areas.

There are also specific clinical aspects of hand eczema depending on its exact location on the backs, palms or fingertips.

On the backs of the hands, acute contact eczema presents as weeping vesicles which become dry and squamous if the pathology becomes chronic. In this case, it is often accompanied by changes to the nails, which develop irregular striae running parallel to the nail matrix and turn black due to encrustation. This onychodystrophy heralds the chronicity of the dermatosis, e.g. in builders.

On the palms, contact eczema is rarer and harder to diagnose since it is similar to other forms of dermatitis with varying etiologies. It manifests, on the palms of the hands and on the palmar face of the fingertips, as itchy, erythematovesicular or purely vesicular plaques, causing pseudo-dyshidrosis.

The chronicity of the eczema is marked by an erythematous squamous rash with a flaky appearance or generally scaly on the surface.

When limited to the fingertips, allergic contact eczema is not really any different to other varieties of fingertip eczema (Table 2). The fingerprints are eroded, the pads are rough, cracked and fissured, and the skin snags on the slightest contact. When the cracks deepen and begin to bleed, the itching gives way to pain. Allergic contact fingertip dermatitis can be found among gardeners (bulb dermatitis), chefs (garlic and onion dermatitis), and even among dentists (allergy to local anaesthetics and acrylates). It primarily affects the dominant hand but may also spread to the other hand, e.g. if used for gripping (e.g. garlic).

Atopy and dyshidrosis¹²⁶

Several studies have demonstrated an increased risk of hand eczema among atopic subjects compared to non-atopic subjects as well as in those with dyshidrosis. The alterations to the stratum corneum and the reactive mechanisms (immunological or otherwise) presented by these patients explain this association.

Atopic patients and those with dyshidrosis are therefore more prone to developing allergic dermatitis in response to contact with metals and other professional products, and are more likely to present irritant and protein contact dermatitis.

Table 2 Etiology of dry fingertip dermatitis

Allergic contact eczema
Irritant dermatitis
Protein contact dermatitis
Psoriasis
Atopic dermatitis
Residual fingertip dermatitis following recovery from contact eczema
Idiopathic

Occupational exposure¹²⁷

Some occupations are known for their risk of hand eczema:

- Hairdressers experience a higher rate of occupational dermatosis. They become sensitized to the PPD in dyes, the thioglycolates used to make permanent waves, and the ammonium sulfate in bleaching agents. Irritant dermatitis is also a problem, as is contact urticaria in response to ammonium persulfate, potassium, latex etc.
- Construction workers handle many types of allergen (chromates, cobalt, resins, rubbers etc.) and irritant (solvents, oils, acids etc.) likely to cause hand eczema.
- Medical practitioners are another at-risk group due in particular to the use of gloves, topical agents and soaps, dental resins and antibiotics.
- People working in the food industry also develop numerous types of hand eczema, such as irritant dermatitis, allergic contact eczema, contact urticaria and protein contact dermatitis. Phototoxic reactions and systemic contact dermatitis have also been described. These various rashes are triggered by exposure to foods and spices, but also through contact with many types of food additive (flavourings, preservatives, antioxidants etc.).

Humidity

The skin barrier is disrupted by humidity, which facilitates the penetration of allergenic and irritant substances. Humid working conditions double the risk of hand eczema compared to dry work. Nurses, maintenance staff, and chefs are therefore more prone to hand dermatitis than office workers.

Preexisting dermatosis

Hands already suffering from dermatosis (irritant forms in particular) have reduced protection from allergens, especially if there is occlusion. The contact eczema therefore develops in addition to the dermatosis and gradually worsens through a cyclical process.

Age and sex

The highest incidence of hand dermatitis is observed in the 20–50 year age group, this being the working population which is more exposed to sensitizing products. The frequency of contact allergies reduces with age, probably due to a change in cell-mediated immune response.

Hand contact dermatitis is predominant in women (sex ratio 2 : 1) due to their greater use of soaps, detergents, and water during housework and childcare.

Main allergens responsible for hand contact eczema

Taking a detailed description of the patient's environment and activities is an essential stage in identifying the causative trigger. Any topical agents already applied should also be recorded.

Occupational allergens

- Chromates (cement, leather, bleach etc.)
- Phenylenediamine (hair dyes, fabric dyes, shoe polish etc.)
- Thiurams (rubber, automotive, naval, and aviation industries etc.)
- Cobalt (often associated with chromium salts, sometimes on its own, in various industrial processes etc.)
- Epoxy resins and hardeners (plastic materials, two-part glues etc.)
- Formaldehyde (maintenance products, textiles industry, medical products etc.)
- Acrylates (dental filling resins, paints, printer inks, plastics etc.)
- Preservatives, especially isothiazolinone (oils, cutting fluids, water-based paints etc.)
- Sesquiterpene lactones and primin (florists, wood industry etc.).

Food and spices

Garlic and onion are ingredients often implicated in allergic contact eczema. Garlic is a member of the allium family. Its major allergen, diallyl disulfide, often affects the first three fingers of the non-dominant hand. In the USA, five spices have been recognized as a source of sensitization: Cayenne pepper, vanilla, nutmeg, clove and cinnamon. Balsam of Peru, fragrances, and cinnamaldehyde are potential indicators of hypersensitivity to spices.

Gloves

Contact eczema can be triggered by numerous components of gloves, such as plastic, rubber, leather, textiles and metals. Of these, rubber gloves are the leading cause of contact dermatitis, both irritant and allergic types I and IV. Allergic contact eczema is related to the agents added to the latex during manufacture, such as accelerators and antioxidants. Clinically, these reactions occur mainly on the backs of the hands and wrists. They tend to spare the thicker skin on the palms.

Barrier creams

The primers, preservatives, and perfumes found in moisturizing creams are all potential allergens. In addition, preparations marked as 'invisible gloves' make people less wary of the risk posed by the allergens in their environment.

Treatment strategy

Remove the allergen Any treatment is bound to fail unless automatically combined with measures to avoid the causative allergens, which can be identified using skin tests. Patients can then be provided with a list of products containing these allergens, and a list of available alternatives.

Symptomatic treatment Local treatment should be regularly adapted to the successive stages of eczema. Topical treatment based on Rhealba Oat[®], copper sulphate and zinc oxide suits perfectly to irritant dermatitis. The aim is to reduce the inflammatory response, repair the epidermis, and calm the itching. Acute, vesicular (weeping) eczema can be dried out using antiseptic aqueous solutions, applied on soaked compresses or with hand baths. Chronic, dry and cracked eczema can be treated with emollients and occlusive oils, as well as topical corticosteroids.

Summary

Hand eczema is an inflammatory skin reaction caused by clearly defined external causative triggers. It forms part of the vast domain of pathological fragile skin.

This exogenous dermatitis affects certain parts of the body more frequently than others. Hands are particularly prone due to the multiple natural and synthetic products handled throughout our daily lives and professional activities. A cream with Rhealba[®] Oat Plantlets extract with copper sulphate and zinc oxide is indicated for irritant and contact dermatitis.

The dermatologist plays a key role and has to identify the respective part played by the various agents that come into contact with our skin, and which in certain cases can create complex interactions.

Circumstantial (environmental) Fragile Skin

Fragile skin model exposed to ultraviolet irradiation (UV)

A new *in vitro* model of 'fragile skin' on keratinocytes exposed to ultraviolet irradiation: protective effect of Rhealba[®] Oil

H. Hernandez-Pigeon, M.F. Galliano, S. Bessou-Touya, N. Castex-Rizzi

Pierre Fabre Dermo-Cosmétique, Pierre Fabre Research and Development Center Pharmacology Division, Toulouse, France

Fragile skin is worth being considered and requires appropriate management and skin care products. Currently, there are no reliable *in vitro* models of fragile skin. We have recently developed a new *in vitro* model allowing analysing the specific response of 'fragile cells' to environmental stress such as dryness after barrier was compromised by SDS. In this model, we observed that barrier-weakened cells ('fragile cells') were effectively more sensitive to dryness stress than normal cells. We then demonstrated that Rhealba[®] Oat plantlets prevented epidermal barrier alteration and protected cells from inflammation.²

In this study, we aim to generate and characterize a cellular model of 'fragile skin' exposed to ultraviolet (UV) irradiation. We firstly generated models of barrier-weakened cells by treatment of primary human keratinocytes with SDS and we secondarily exposed them to sunscreen UV irradiation. The last stressor impact was investigated by monitoring the expression of key structural proteins using immunolabelling and mRNA expression of genes of interest. The protective effect of Rhealba[®] Oil was evaluated on this model.

In vitro 'fragile cells' are more sensitive to UV irradiation

We firstly compared the response to UV irradiation of barrier-weakened cells (SDS treated-cells or 'fragile cells') to untreated cells. We found that the barrier function was more severely hindered in 'fragile cells' as shown by a more pronounced alteration of the cytoskeleton associated with depolymerization of the actin-filaments and a marked reduction or disorganization of the tight-junction marker, claudin-1 (Fig. 10). mRNA expression analysis showed that inflammation was increased in 'fragile cells' as found for SPRR1B and CXCL14 but also a notable up-regulation of genes markers of late cornification such as LOR and CNFN (Fig. 11) suggesting that terminal differentiation and cornification could be compromised upon UV stress in fragile cells.

These data suggest that the specific, amplified response of barrier-weakened cells to UV exposure could hence be considered as a hallmark of 'fragile skin'.

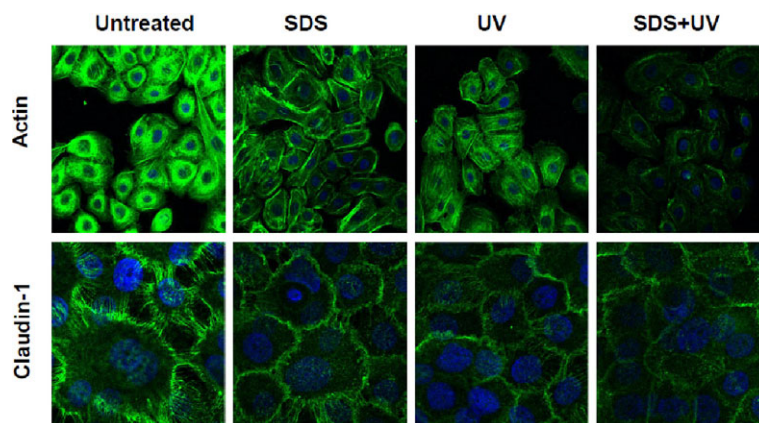


Figure 10 Development of a fragile human keratinocyte cell model. Immunofluorescence staining for actin and claudin-1 protein in keratinocytes exposed to individual stresses (SDS or UVs) or double stress (SDS followed by UVs).

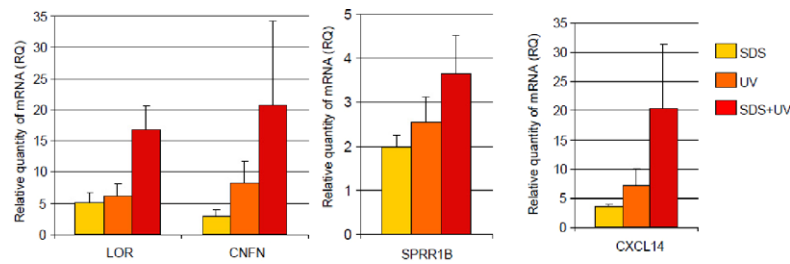


Figure 11 Relative quantity of mRNA expression of loricrin (LOR), cornifelin (CNFN), small proline-rich protein family SPRR1B and the chemokine CXCL14 on cells exposed to individual stress (SDS or UVs) or the double stress (SDS followed by UVs). mRNA quantification was performed by Rt-qPCR 24 h after UV stress. Relative quantity of mRNA (RQ) represents fold induction vs. untreated ($n = 8 \pm$ SEM).

Rhealba® Oil prevented *in vitro* ‘fragile cells’ from barrier dysfunction aggravation and inflammation increase upon UV stress exposure

Rhealba® Oil at 10 $\mu\text{g/ml}$ and 30 $\mu\text{g/ml}$ was added onto the cells after the first SDS stress and before UV challenge. Rhealba® Oil 30 $\mu\text{g/ml}$ strongly protect the cells structural organization (Fig. 12). Interestingly, Rhealba® Oil 30 $\mu\text{g/ml}$ was even able to repair alteration of the cytoskeleton induced by SDS treatment. Additionally, Rhealba® Oil 30 $\mu\text{g/ml}$ hampered the reduction of claudin-1 staining supporting that tight-junction functionality and barrier were preserved from UV-induced injury. This was further confirmed with mRNA analysis showing that Rhealba® Oil modulated the up-regulation of LOR and CNFN differentiation-genes expression as well as the inflammation genes SPRR1B and CXCL4 in a range-dependent way (Fig. 13).

In conclusion, we have developed an *in vitro* model of ‘fragile skin’ by applying two consecutive stresses on primary human keratinocytes. Barrier-weakened cells were strongly reactive to an UV irradiation. This model should enable initial evaluation of the capability of active ingredients to protect skin exposed to sunscreen irradiation and assessing efficiency of active ingredients

or compounds for skin care and protection. Rhealba® Oil could be beneficial for preventing ‘fragile skin’ from UV irradiation.

Iatrogenic Fragile Skin

Skin surgery

Skin surgery: general principles in order to avoid skin fragility in children and in adults

R. Soares-Oliveira

Department of Dermatology, Lisbon, Portugal

The skin is the largest organ of the body, providing a protective barrier against bacteria, chemicals and physical insults while maintaining homeostasis of the internal environment. This barrier is disrupted by the surgeon in a controlled way for a high purpose causing iatrogenic fragile skin.² The first objective of a surgeon is to preserve life; secondly, preserve function; finally, whenever feasible, to preserve or to improve cosmesis. Effective wound healing is the basis of all surgery. When wound persists, it usually is due to inadequate blood supply to the area or infection. Haematoma and excessive

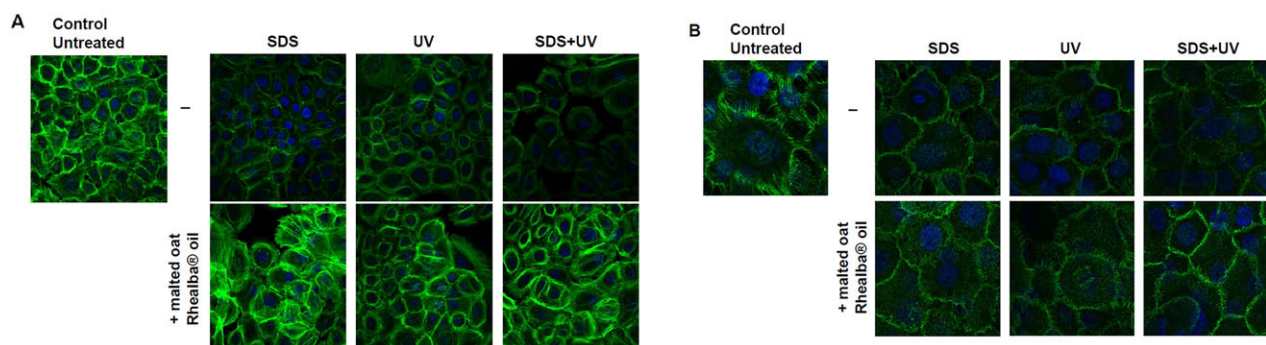


Figure 12 Immunofluorescence staining for filamentous actin (phalloidin) (a) and claudin-1 (b) in keratinocytes exposed to the simple stress or double stress, \pm Rhealba® Oil 30 $\mu\text{g/ml}$.

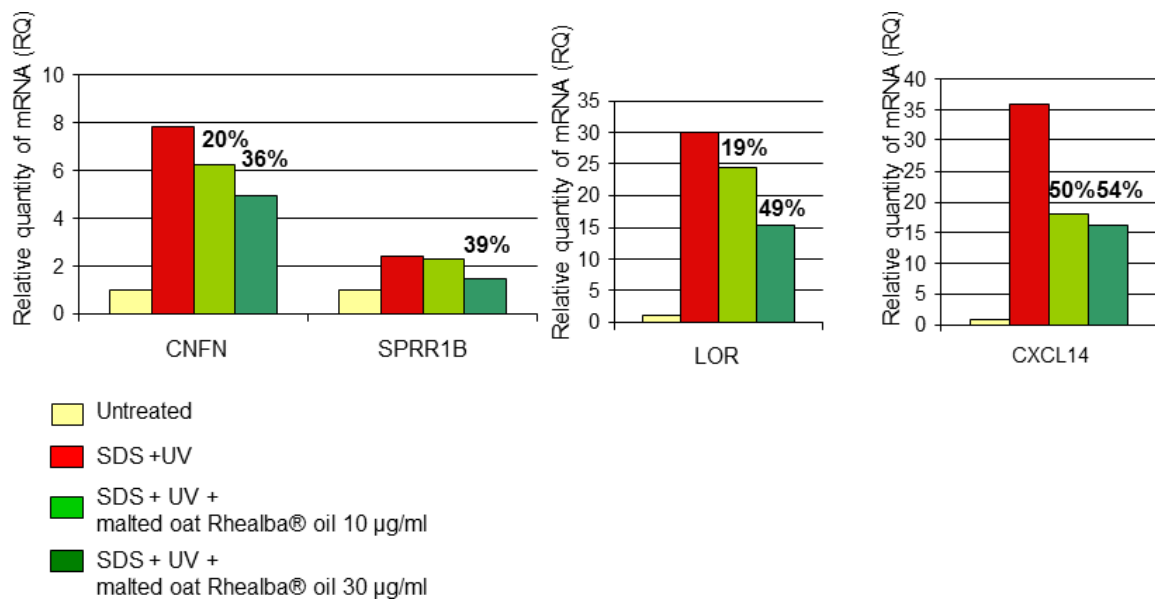


Figure 13 Relative quantity of mRNA expression of loricrin (LOR), cornifelin (CNFN), small proline-rich protein family SPRR1B and the chemokine CXCL14 on NHK exposed to the double stress (SDS followed by UVs) \pm Rhealba[®] Oil at 10 and 30 μ g/mL. Percentage of mRNA expression inhibition by Rhealba[®] Oil.

tension are the commonest causes for blood supply impairment. They predispose to ischemic necrosis and wound breakdown. Necrosis secondary leads to infection. In order to avoid infection, there should be proper asepsia, careful use of antibiotics and debriding of dead tissue is essential.¹²⁸ The third vertex for obtaining epithelialization is a moist environment.

The aim of suturing is to approximate wound edges thoroughly in layers to eliminate dead space, and minimal scar is required to bridge the gap. Damaged skin margins should be resected and sutures placed vertically through the tissues to approximate the full depth of the wound, with least number and least calibre required to maintain closure. They should be close to the wound edge and be removed before cross-hatching marks can occur.

Incisions are used to excise skin lesions and to gain access to deeper structures. In either case, their design should be directed towards minimizing scars. Fine scars must be placed parallel to facial crease lines (Langer's lines) and, especially in older patients, they will look imperceptible. Lesions should be excised in an elliptical form with their axis in the direction of Langer's lines. Incisions should not transgress cavities or flexion creases. Because all linear scars contract, an incision in such sites will heal with webbing and tenting of skin across the hollow and cause contracture or limitation of full extension across joints. Incisions should therefore curve around the concavity or be closed in a fashion that achieves lengthening or relaxation of the line.

Sometimes, direct closure is impossible or will determine too much tension. Where tissue is missing, suturing under tension may lead to suboptimal scarring, often inducing hypertrophic reaction that will resolve to a wide, stretched scar. Alternatively, tension may result in distortion of local anatomy, especially in the face, causing ectropion or asymmetry. Primary skin grafting or flap repair may obviate the problem. A graft is a piece of tissue that is totally detached from the body, and after reapplication, reassumes function back to life. Its survival depends on revascularization from its bed. Avascular beds will prevent graft take. Fluid collection between the graft and its bed, such as haematoma, seroma or pus, will impair revascularization (traditionally a pressure dressing is applied to the graft to maximize adhesion to the bed). A flap is a piece of tissue that is repositioned but keeping a tissue connection with the original location. This connection allows adequate blood support. Usually, the skin is similar in thickness and colour and this is an advantage over a graft. We may use advancement, rotation or transposition flaps and combinations of those. A delayed correction of the future defect may involve tissue expansion – involves progressive stretching of immediate adjacent tissue until enough is created to advance it directly into the defect. Scalp defects are an optimal indication^{129,130} as this technique reproduces the unique hair-bearing skin. It involves implanting one or more tissue expanders underneath the skin adjacent to the defect to be closed. Progressively over approximately 2 months, the expander, which has a valve port, is injected percutaneously until sufficient volume is obtained. At this point, the expander is removed

and the redundant expanded skin is advanced to close the defect.

As a general rule, facial sutures should be removed at approximately 1 week and sutures elsewhere at 10–15 days. Genetically, predisposition and the site of the scar determine its nature rather than how it was created or who repairs it. The eyelid skin may almost leave invisible scars, but rarely elsewhere. The pre-pectoral and deltoid regions are the worst areas in the body for scarring. The face generally heals nicely.

Surgery in children follows the same basic rules. There are, however, some particularities:

The body is quickly changing due to growing (for example, penile skin bridge, glandular adhesion of remnant foreskin, concealed penis and a penile epidermal inclusion may be long-term complications of neonatal circumcision¹³¹) and scars usually increase over time. Healing is enhanced by higher division skills of young cells and this is an advantage. Some diseases specific of children: for example, a proliferative haemangioma. Atopic dermatitis is more frequent in children and this means increased colonization of *Staphylococcus aureus* in particular within areas affected. It is mandatory to control eczema before scheduling the surgery.^{132,133} Another difference is that you will have to deal with the parents. They will be focussed in your work and in every word you say. The surgeon must be skilled in saying the right things at the right time. Parents experience anxiety and concern about their children's anaesthesia and surgeries, which can adversely affect the children's outcomes.¹³⁴ Therefore, it is important to identify the factors that influence parental fear.

Surgical excision of giant congenital nevi is recommended by principle for dermatological reasons. Malignant potential is real, but its incidence remains widely discussed. Their excision represents a surgical challenge, but is also a real assault course for the child and his family. The sequelae and the psychological effects can be important.¹³⁵ Can an incomplete excision to limit these aesthetic after-effects and relieve the surgical treatment be acceptable? The pediatric surgeon faces this dilemma.

Developments in autologous cell-harvesting systems for epidermal replacement¹³⁶ in patients with post-traumatic scars that had not improved with any other surgical procedure are a hope to the post-operation of giant nevi.

In the past, procedural pain control in young children was undertreated as it was incorrectly alleged that their neuronal pain pathways were undeveloped. However, it is now recognized that even neonates are able to experience pain. Moreover, intensely painful physical experiences in childhood can have persisting physiological and psychological consequences.¹³⁷ Therefore, the management of acute pain is essential. Behaviour facing pain perception is different. The use of EMLA anaesthesia, as well as a vibrator device may be a huge help. In some cases, we will need general anaesthesia. Anaesthesiologists are increasingly provid-

ing care for children undergoing dermatologic out-of-operating room procedures.

It is common to use peeling and microdermabrasion to treat acne scars in adolescents. The skin barrier function is damaged¹³⁸ after the glycolic acid peeling and aluminium oxide crystal microdermabrasion procedure, but recovers within 1–4 days.¹³⁹ Therefore, repeating the superficial peeling procedure at 2-week intervals will allow sufficient time for the damaged skin to recover its barrier function.

Finally, always remember that the surgeon is part of a team with the paediatrician, oncologist, psychiatrist, physiotherapists, nurses, etc. and the harmful multidisciplinary team is as important as the individual skills of each one in order to achieve the best result.

Fragile Skin Treatment Approach: the place of Rhealba® Oat in Management of Fragile Skin

Rhealba® Oat Plantlets extract tolerability: Skin sensitization risk assessment

A skin sensitization risk assessment of raw material derived from Rhealba® Oat leaf/stem Extract

E. Clouet¹, P.J. Ferret¹

¹*Pierre Fabre Dermo-Cosmétique Research & Development Center, Toxicology division, Vigoulet, France*

Abbreviations

7-AAD: 7-Aminoactinomycin D; ACN: Acetonitrile; AOP: Adverse Outcome Pathway; ARE: Antioxidant Response Element; CD54: Cluster of Differentiation 54; CD86: Cluster of Differentiation 86; DC: Dendritic Cell; DMF: Dimethyl formamide; DMSO: Dimethyl sulfoxide; DNCB: Dinitrochlorobenzene; DPRA: Direct Peptide Reactivity Assay; ECVAM: European Centre for the Validation of Alternative Methods; EFSA: European Food Safety Authority; EU: European Union; FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting; Fb: FACS Buffer; FDA: Food and Drug Administration; FITC: Fluorescein isothiocyanate; GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry; h-CLAT: human Cell Line Activation Test; HCA: Hexylcinnamaldehyde; HET-CAM: Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane; HPLC: High Pressure Liquid Chromatography; HRIPT: Human Repeated Insult Patch Test; Ig: Immunoglobulin; ITS: Integrated Testing Strategy; LLNA: Local Lymph Node Assay; mAb: Monoclonal Antibody; MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time-of-Flight mass spectrometer; MFI: Mean Fluorescence Intensity; NaCl: Sodium chloride; NRR: Neutral Red Release Assay; OECD TG: Organisation for Economic Co-operation and Development Test Guideli-

nes; PBS: Phosphate-buffered saline; RHE: Reconstructed Human Epidermis; RFI: Relative Fluorescence Intensity; ROS: Reactive oxygen species; RNA: Ribonucleic acid; RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction; SLS: Sodium lauryl sulfate; SI: Stimulation Index; TMA: Trimellitic anhydride; TNBS: Trinitrobenzenesulfonic acid; TFA: Trifluoroacetic acid.

Topical treatments of atopic dermatitis (AD) may be responsible for cutaneous allergies. Percutaneous sensitization to oat used in emollients/moisturizers has already been reported. Our objectives were to measure whether or not a raw material derived from Rhealba® Oat leaf/stem Extract can induce a risk of skin sensitization and to assess its relevance in view of the current impacts of the EU Cosmetics Regulation for the Safety Assessor.

The pathways involved have recently been formally described in the OECD adverse outcome pathway (AOP) for skin sensitization. One single non-animal test method is not sufficient to fully address this AOP and in many cases, the use of a battery of tests is necessary. A number of methods are now fully developed and validated. In order to facilitate acceptance of these methods by both the regulatory and scientific communities, we selected and carried out three validated or under validation test methods (DPRA, h-CLAT and SENS-IS), that were integrated in an integrated testing strategy (ITS) to predict the respective AOP key events with high accuracy. We also qualitatively compared the previous results obtained with both animal and human data. While a number of methods are at various stages of development and use, such as the local lymph node assay (LLNA), currently it is not possible to rank chemicals for their sensitizing potency. Despite this absence of sensitization potency with *in vitro* methods, and in consideration of the obtained data, the presented strategy can be integrated in the regulatory assessment of the skin sensitization hazard potential. By using a weight-of-evidence approach, the obtained experimental results of the non-animal test methods together with the reliability of the previous data based on *in vivo* animals enable us to draw conclusions about the risk assessment pertaining to Dry Extract of Rhealba® Oat Plantlet and its safety under normal or foreseeable conditions of use in consumer health products.

Introduction

Oat is an annual herbaceous plant belonging to the Gramineae family and corresponding to the species *Avena sativa* L. The origin of oat is attributed to Indo-European countries. The oldest testimony of oat existence comes from Egypt and would date from the Middle Kingdom (-2000 years before C).¹⁴⁰ The earliest evidence of cultivation of oat is found in Switzerland and would date from the Bronze Age. Historically, oat was used for animal food, although the energetic value of seed oat is less than that of wheat or barley. For human food, oat has been used for

thousands of years mainly as oat flakes, gruel, oatmeal, biscuits and *oatmeal stout* beer. Since the 1990s, various studies have demonstrated a decrease in the cholesterol level in the blood and in the postprandial glycemic response of people having a diet rich in beta-glucans (a naturally present polysaccharide in oat bran).¹⁴¹ In 1997, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) authorized the food-processing industry to claim that a beta-glucans rich diet is linked to decreased cholesterol levels and reduced coronary risk. In 2010–2011, the European Food Safety Authority (EFSA) allowed similar health claims to be made in Europe.¹⁴² The use of oat flakes as a topical skincare treatment to reduce inflammation and redness is largely known since the Roman age. Its benefits were mentioned in medical texts written by Pliny the Elder and his contemporaries.¹⁴³ Due to these natural properties, the *Avena sativa* subspecies *Rhealba*® Oat variety has recently been selected from among 80 others as a skincare product with exceptional qualities, for instance anti-irritant, soothing, repairing, moisturizing and for its effects against free radicals.^{48,143–145} However, some cases of oat and wheat sensitization have been reported in the literature.^{146–148}

For several years, we have been developing a new extract (Dry Extract of Rhealba® Oat Plantlet) without traces of proteins to avoid the risk of allergy as far as possible. The main objective of this study was to assess the absence of sensitization risk of dry extract of oat plantlet by means of the integrated testing strategy (ITS) using several *in vitro* studies, and to compare the obtained results with those previously obtained *in vivo*.

Material and Methods

Description, nature and processing of Dry Extract of Rhealba® Oat Plantlet

Plantlets of Rhealba® Oat leaf/stem are extracted with 80% acetone and water (v/v). After filtration, the raw material is concentrated in order to eliminate the acetone and precipitate lipophilic compounds. After a new filtration, the extract is sterilized and further concentrated up to 40–50% of dried extract. The medium is then stabilized and dried with maltodextrin. The resulting composition of the extract is as follows: Rhealba® Oat leaf/stem extract, 75% (containing 60% of sugars, 7–10% of flavonoids, 1% of saponins and no traces of proteins) and maltodextrin, 25%.

Analysis of the Dry Extract of Rhealba® Oat Plantlet showed that the allergens listed in European Union (EU) Regulation 1223/2009⁵² were below the detection level as measured by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), i.e. quantities below 20 ppm of heavy metals in total (As, Cd, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Zn, Ag, Ba, Se, Sb, Cr and Co < 20 ppm), and that the pesticide concentrations were compliant with the EU Pharmacopeia (Table 3).¹⁴⁹

Table 3 General description of Rhealba® Oat leaf/stem extract

	Dry extract of Rhealba® Oat plantlet
Chemical names	Rhealba Oat leaf/stem extract (and) Maltodextrin
CAS	84012-26-0 (and) 9050-36-6
EINECS	232-940-4 (and) 232-940-4
Extract	Dry extract
Part of the plant used	Oat Plantlet*
Process and extraction solvent used	Acetone extraction, filtration, removing of acetone, filtration, drying on maltodextrin
Composition	60% of sugars, 7–10% of flavonoids, 1% of saponins, absence of detected proteins by electrophoresis (<10 ppm and <2.5 kDa)
Pesticides dosage†	Absence or content below limits of detection
Heavy metals dosage‡	In compliance to internal specifications (<20 ppm)
Allergens dosage	Absence or content below limits of detection (<10 ppm)
Physical form	Powder, orange
Solubility	Soluble in water, ethanol

*Rhealba® Oat Plantlet: oat stem and leaf at beginning to end of stem elongation and before coming into ear.

†Pesticides dosage according to European Pharmacopeia in force Chapter 2.8.13.

‡Allergens dosage realized according to Cosmetic Regulation (EC) NO 1223/2009 and latest amendment.

In vitro skin sensitization studies

Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) The correlation of skin reactivity and skin sensitization is well established.^{150–153} Gerberick *et al.*^{154,155} have developed a Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for screening the skin sensitization potential of chemicals by measuring peptide depletion following incubation with allergens and non-allergens.

The DPRA was performed according to the OECD TG 442C.¹⁵⁶ Briefly, dry extract of oat plantlet was solubilized in 50% acetonitrile (ACN) and 50% dimethyl sulfoxide (DMSO). For the test, the final concentration was at 100 mM. The test item was mixed with the peptides each solubilized in 100 mM phosphate buffer (pH 7.5, cysteine peptide) or 100 mM ammonium acetate buffer (pH 10.2, lysine peptide) and was incubated

mass was verified by MALDI-TOF with Voyager DE-RP Software (Perceptive Biosystems). The eluted materials were then characterized by mass spectrometer analysis (MALDI-TOF MS). The negative control was a solution containing the peptides in the absence of chemicals. The positive control for the cysteine peptide was diethyl maleate and glyoxal for the lysine peptide. The classification is given by OECD TG 442C using the average percentage of cysteine and lysine depletion.¹⁵⁶

Human Cell Line Activation Test (h-CLAT)

The h-CLAT test is an *in vitro* flow cytometry method measuring the expression of CD86 and CD54 protein markers on the cell surface of the human monocytic leukaemia cell line THP-1, used as a surrogate for human dendritic cells (DC), and following controlled exposure to test chemicals.^{157–161} The h-CLAT has been validated by ECVAM and is under validation by OECD.^{162,163}

Based on preliminary cytotoxicity, using the 7-Aminoactinomycin D (7-AAD from Santa Cruz Biotech) inclusion method, the final test item concentrations able to induce around 70% cytotoxicity were selected. THP-1 cells were cultured in 24-well plates (1*10⁶ cells/mL/well) and treated for 24 h at 470–700 µg/mL of dry extract of oat plantlet. After treatment, the cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% (w/v) bovine serum albumin identified as FACS buffer (Fb). Then, the cells were stained for 30 minutes at 4 °C with the following fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated monoclonal antibodies (mAbs): anti-human CD54 from DAKO (Glostrup, Denmark), anti-human CD86 from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) and FITC labelled-mouse IgG1 from DAKO. THP-1 were incubated with above mAbs at 6 µL/3*10⁵ cells/50 µL for the anti-human CD86 mAb and 3 µL/3*10⁵ cells/50 µL for the anti-human CD54 mAb. FITC labelled-mouse IgG1 was used as an isotype control at a dilution of 3 µL 3*10⁵ cells/50 µL. Then, the cells were stained also with 7-AAD for 30 minutes at 4 °C. After washing and resuspension with Fb, the fluorescence intensities of the THP-1 cell surface markers were analysed by flow cytometer (on Cytometer GUAVA (Merck Millipore, France) and InCyte software).

The relative fluorescence intensity (RFI) was used as an indicator of CD86 and CD54 expression. The RFI was calculated with the following formula using MFI (mean fluorescence intensity):

$$RFI = \frac{MFI \text{ of test item-treated cells} - MFI \text{ of test item-treated isotype control cells}}{MFI \text{ of vehicle control cells} - MFI \text{ of vehicle isotype control cells}}$$

at 20 °C for 24 h. Thereafter, the samples were analysed by C18-reversed HPLC with a 0% to 60% gradient of buffer B (ACN plus 0.08% trifluoroacetic acid (TFA)) in buffer A (water plus 0.1% TFA) for 20 min at a wavelength of 230 nm. The peptide

Explorative sensitization prediction test (SENS-IS test)

This model is used to assess the potential of the test products to specifically induce the expression of irritation and/or sensitization biomarkers in an *in vitro* 3D skin model.

The SENS-IS is based on the overexpression analysis of three sets of genes defined by Cottrez *et al.*,¹⁶⁴ one specifically reflecting the irritant potential and the other two sets of genes (ARE and SENS-IS genes) correlating with the sensitization potential. Antioxidant response element (ARE) genes control the expression of proteins critical in the detoxication and elimination of reactive oxygen species (ROS) and electrophiles.¹⁶⁵

Dry Extract of Rhealba[®] Oat Plantlet was used pure and diluted in PBS at the concentrations of 50% and 10%. A quantity of 30 μl (26.3 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) of each dilution was applied on the top of each reconstituted epidermis (Episkin model), using a positive displacement pipette. The test product was gently spread on the epidermis surfaces to ensure complete coverage of the surface. After 15 minutes exposure, the Episkin was rinsed with PBS. The epidermis was then incubated at 37 °C for 6 h. After incubation, the complete epidermis was collected, placed in a RNazol solution and the total RNA was isolated by homogenization of the skin. After reverse transcription, quantitative gene expression was measured by RT-PCR (LC480 Roche) using a SYBR green buffer and specific biomarker primers defined for the SENS-IS test. Three negative controls (PBS, olive oil and DMSO treated skins), a positive irritation control (5% sodium lauryl sulfate (SLS)) and two positive sensitization controls (hexylcinnamaldehyde (HCA) at 50% in olive oil and trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) at 1% in PBS) were used to validate each assay.

In vivo studies

Local Lymph Node Assay (LLNA) Two independent LLNA on two different batches were realized according to OECD TG 429.¹⁶⁶

Study 1 The sensitizing potential of various concentrations of Dry Extract of Rhealba[®] Oat Plantlet (batch 1) were tested in groups of female CBA/Ca-oLa-Hsd mice (nulliparous and not pregnant). Four animals were used per sensitization group (1%, 10%, 25%, 50% and 70%) receiving both induction and challenge treatments. Four animals were used in the control group receiving the positive reference (HCA). The concentrations for the definitive study were selected on the basis of a preceding investigation to determine the maximum concentration causing minor irritation in mouse topical application. Based on these results, the different groups received a series of topical applications (consisting of a mix of Dry Extract of Rhealba[®] Oat Plantlet at 1%, 10%, 25%, 50%, 70% and propylene glycol/water (v/v)) on the mouse ear on 3 consecutive days (25 μl per ear at D1, D2 and D3). In the same conditions, a negative group [propylene glycol/water (v/v)] and a positive reference group (HCA) were treated. At day 6, the animals received an intradermic injection of ³H-methyl thymidine. The animals were killed and their bodyweights recorded. The draining (auricular) lymph nodes were excised, counted and pooled for each experimental group

in a small volume (approximately 2 mL) of PBS. The lymphocytes proliferation was measured by counting the radioactivity inside the auricular lymph node. The vehicle selection was dictated by the relative solubility of the test material. In this case, propylene glycol (PG)/water 50% (p/p) was used.

Study 2 After determination of the non-irritating maximum concentration, five female CBA/Ca mice/group received the vehicle, dimethyl formamide (DMF) or 30% HCA (positive control in the DMF) or 2.5%, 5%, 10%, 15% and 25% w/v of Dry Extract of Rhealba[®] Oat Plantlet in DMF on days 1–3. On day 6, the uptake of ³H-methyl thymidine into the auricular lymph nodes draining the site of test item application was measured five hours post-administration.

IgE (Type I Hypersensitivity)

Over the past couple of decades, several research groups have challenged the view that all immediate hypersensitivity reactions are triggered by IgE.¹⁶⁷ Studies with mouse models demonstrate the classic pathway mediated by IgE for systemic anaphylaxis.¹⁶⁸ An IgE-mediated hypersensitivity was also researched for Dry Extract of Rhealba[®] Oat Plantlet. CBA/Ca mice received diluted raw material (0.5%, 5% and 30%) in the outer ear on D1, D2, D3, D15 and D20 (25 μl per ear) and a positive control, trimellitic anhydride (TMA). Total IgE were measured with the Elisa method using the Bethyl[®] kit at D21 and the outer ears were weighed.

Human data/clinical sensitization exposure

Numerous Human Repeated Insult Patch Tests (HRIPT) according to an adaptation of the methodology described by Marzulli and Maibach were realized.¹⁶⁹ The final product containing Dry Extract of Rhealba[®] Oat Plantlet was applied pure or diluted (depending on the nature of the finished product, i.e. leave-on or rinsed-off) under an occlusive patch on the back of usually 100 volunteers in two phases. The patch was applied nine times to the same site (induction site) over a period of three consecutive weeks followed by a challenge phase after a minimal two-week rest period, under occlusive patch, to the induction site and to a virgin site for 48 h.

Results

In vitro skin sensitization studies

DPRA The peptide depletion was assessed by measuring the decreased area corresponding to the remaining free peptide after reaction completion (24 h incubation). The positive and negative controls were within the normal range allowing validation of these experiments. For the negative control, lysine depletion was 0% and cysteine depletion was 0.05%. No analytical interference due to the test substance was observed at the retention

times of cysteine and lysine peptides under the used test conditions. For Dry Extract of Rhealba® Oat Plantlet, the results were 1.3% of lysine depletion and 9% of cysteine depletion (Table 4). According to the OECD classification in TG 442C, Dry Extract of Rhealba® Oat Plantlet can be ranked as a minimal reactive compound but with a prediction as a non-sensitizer.

h-CLAT

Preliminary Study: Cell toxicity assays The highest solubility reached was 500 mg/mL in NaCl. The highest dose used in this study was 5000 µg/mL after dilution in medium. First, the cytotoxicity profile of the test item was assessed with the 7-AAD dye. Based on the cell toxicity assays, the maximum dose level selected for the main study was 600 µg/mL.

Main Study: Activation test, CD54/86 expression The negative controls (NaCl) showed cell viability values with a mean of 97% which is acceptable regarding the acceptance criteria. The positive control, dinitrochlorobenzene (DNCB), showed an increase in CD54/86 expression (RFI \geq 200/150 respectively) compared to the negative control (Fig. 14). No dose-response increase was noticed for the CD54 and CD86 expression with the test item. Based on these results, Dry Extract of Rhealba® Oat Plantlet did not demonstrate an *in vitro* sensitizing potential under the conditions of the experimental human Cell Line Activation Test.

SENS-IS Test The Dry Extract of Rhealba® Oat Plantlet did not induce a significant number of ARE genes (only six at 100% and 50% and four at 10% of Dry Extract of Rhealba® Oat Plant-

Table 4 Overall summary of Sensitization studies

	Study type	GLP studies	Species	Endpoint	Exposure [Concentrations]	Results
<i>In vivo</i>	LLNA	GLP study	Mouse CBA/Ca - oLa - Hsd	Lymphocyte proliferation	1, 10, 25, 50, 70% in Propylene Glycol/Water (1 application by day/3days)	SI=0.7, 0.6, 0.9, 1.8, 4.4 EC ₃ =59% → Not sensitizer for concentrations below 50%
	LLNA	GLP study	Mouse CBA/Ca	Lymphocyte proliferation	2.5, 5, 10, 15 and 25% w/v in DMF (1 application by day/3days)	SI=1.28, 1.01, 1.57, 2.01 and 2.04 No EC ₃ determination → Not sensitizer until 25%
	Hypersensitivity type I	Non GLP	Mouse Cba/Ca	IgE proliferation	0.5, 30, 100% in DMSO (w/w), D1-3, 14 D of rest, D15-20	Total IgE Dry Extract of Oat Plantlet detected < Total IgE Negative group control → No immediate hypersensitivity
<i>In vitro</i>	DPRA	Non GLP	<i>In chemico</i>	Molecular reactivity - peptide depletion	100 mM of Dry extract (50% ACN and 50% DMSO) + 5mM cysteine/25mM lysine	Minimal reactivity with lysine and cysteine peptide. 1.3% of Lysine depletion and 9% of Cysteine depletion → Not sensitizer
	h-CLAT	Non GLP	DC like (THP-1)	CD54 and CD86 (RFI)	470-700 µg/mL	RFI < CD86 EC ₁₅₀ RFI < CD54 EC ₂₀₀ → Not sensitizer
	SENS-IS	Non GLP	Reconstructed epidermis	Genomic expression (Irritant, ARE, SENS-IS genes)	10, 50 and 100%	Irritant if >7 genes are overexpressed → Irritant (16, 11 and 18 genes expressed) Sensitizer if >7 genes are overexpressed → Not sensitizer (4, 6 and 6 genes overexpressed)

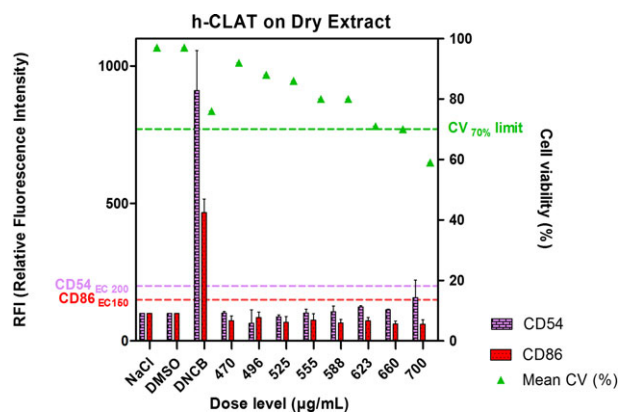


Figure 14 CD54 and CD86 expression are analysed by Flow Cytometer after exposure during 24 h to raw materials and dose ranging from 470 to 700 $\mu\text{g/mL}$. Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA. Results are presented as geometrical mean \pm SEM from three independent experiments ($P < 0.0001$).

let, Table 2) or SENS-IS genes (below five at all different concentrations) and was not identified as a skin sensitizer under the conditions of this screening assay. However, the Extract of Rhealba[®] Oat Plantlet induced the over expression of a high number of irritant-related genes (>7 genes), as is expected of an irritant. The number of genes expressed in the ARE and SENS-IS groups were below the threshold. Therefore, it can be classified as non-sensitizer.

In vivo studies

LLNA Study 1. The different results are shown in Table 2. According to Gerberick *et al.*,¹⁵³ if the Stimulation Index (SI) is three or greater, the chemical is considered to have a significant potential to cause contact sensitization. It was demonstrated that Dry Extract of Rhealba[®] Oat Plantlet exhibited no potential to induce dermal sensitization in mouse in the Local Lymph Node Assay when tested until 50%. Some local irritations sign were noticed at 50% and 70% concentrations of Dry Extract of Rhealba[®] Oat Plantlet.

Study 2. The test item Dry Extract of Rhealba[®] Oat Plantlet did not elicit erythema at the tested concentrations and had no significant effect on bodyweight gain.

The test item at dose concentrations of 2.5%, 5%, 10%, 15% and 25% w/v elicited proliferative response with SI of 1.28, 1.01, 1.57, 2.01 and 2.04, respectively, in comparison with the vehicle-treated mice (Table 2).

The Dry Extract of Rhealba[®] Oat Plantlet did not demonstrate dermal sensitization potential in the mouse LLNA, as the lymph nodes draining the area of topical application did not elicit a proliferative response greater than the $3\times$ threshold.

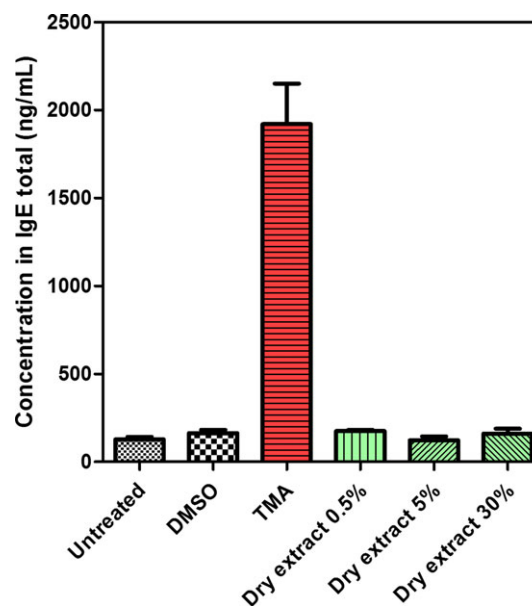


Figure 15 Measurement of IgE total (ng/mL) in Mice CBA/Ca \pm negative control, DMSO, Dry Extract of Rhealba[®] Oat Plantlet (0.5%, 5% and 30%) and positive control, Trimellitic anhydride (TMA). Statistical analysis was performed using One-way ANOVA (and non-parametric). All values are mean \pm SEM ($n = 6$), $P < 0.0001$.

IgE (Type I Hypersensitivity)

Neither IgE rate nor weights were modified. The auricular lymph nodes were taken and observed. No modification was noticed. It was concluded that Dry Extract of Rhealba[®] Oat Plantlet did not induced immediate hypersensitivity (Fig. 15).

Human data/clinical sensitization exposure

A total of 1,130 panellists were subjected to an HRIPT, with a finished product containing Dry Extract of Rhealba[®] Oat Plantlet. The tested concentrations were 0.1%–0.5% of dry Rhealba[®] Oat extract depending on the finished product. None of the finished products had an irritant or sensitizer effect on patients with healthy skin whatever the dose tested.

Discussion

The ‘sensitization testing strategy’ is a sensitization safety assessment approach which incorporates the latest validated (or under validation) sensitization methods and can be applied by the cosmetic safety assessor to assess raw material. Various strategies are actually proposed.¹⁷⁰ The outcome of the approach suggested here meets the requirements of the EU Cosmetics Regulation, by providing a sensitization profile for Dry Extract of Rhealba[®] Oat Plantlet, by covering all available sensitization endpoints required to make a sensitization safety decision. In addition, to a certain extent, this approach overcomes the challenges of the animal testing ban. Finally, this approach was con-

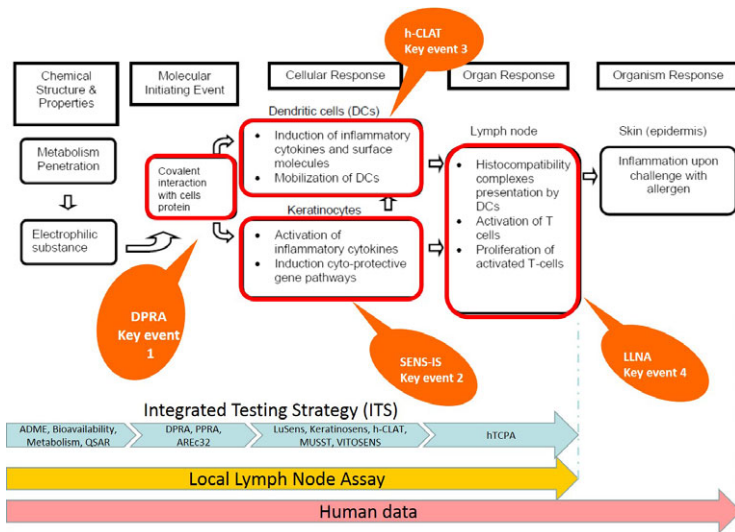


Figure 16 Schematic ITS proposed according to the AOP for skin sensitization of OECD and its key events.

firmed by previous *in vivo* tests and human data on Dry Extract of Rhealba® Oat Plantlet. It is important to underline that we present only our proposed ITS in terms of skin sensitization in this review, but that we have also realized a complete toxicological profile of Dry Extract of Rhealba® Oat Plantlet in parallel (eye and skin irritation, mutagenicity, genotoxicity, phototoxicity and subchronic toxicity) and that all results were satisfactory.

In order to facilitate acceptance of *in vitro* sensitization methods by regulatory committees, results of the single test methods as well as simple '2 out of 3' ITS¹⁷¹ have been compiled and qualitatively compared to both animal and human data. The sensitizing potential of Dry Extract of Oat Plantlet was investigated in three explorative *in vitro* tests, DPRA, SENS-IS and h-CLAT, validated or under validation by the OECD (OECD DPRA, ECVAM h-CLAT). These three methods covered three of the four key events (Fig. 16) defined by the OECD adverse outcome pathway (AOP) for skin sensitization.¹⁷² The results of the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) suggested a minimal reactivity, the SENS-IS test was negative, and the h-CLAT was clearly not sensitizing. In SENS-IS, the test item appeared to be irritant but this was not confirmed with other validated tests (HETCAM, NRR, RHE). *In vivo* local lymph node assay of the dry extract tested at much higher concentrations than in use exhibited no potential to induce dermal sensitization. Sensitization in LLNA starts at 59% (EC₃ = 59%). Likewise, no signs of irritation and sensitization mediated by IgE were shown for Dry Extract of Oat Plantlet at 0.5%, 5% and 30%. Unfortunately, despite a good correlation between this proposed ITS and the results obtained by LLNA and human data, it is currently impossible to conclude on potency based on only *in vitro* methods.¹⁷³ In sum, considering that Dry Extract of Oat Plantlet is used in final cosmetic products at low concentrations, between 0.1% and 0.5%, and using a weight-of-evidence approach, it can be concluded that there is no risk of skin sensitization to consumers

from these concentration exposures. This strategy allows the safety assessor to meet the requirements of the EU Cosmetics Regulation and to overcome the challenges presented by the animal testing ban in term of skin sensitization. Furthermore, the products containing Dry Extract of Oat Plantlet shown in Table 5 were or are currently marketed and none of them have been the object of adverse cosmetovigilance reports, which confirms and validates this strategy.

Rhealba® Oat in Pathological Fragile Skin

Atopic Dermatitis

In vitro model

Rhealba® Oat Plantlets-based emollient in AD: focus on TSLP

M.F. Galliano, C. Carrasco, H. Delga, H. Hernandez-Pigeon, B. Guiraud, S. Bessou-Touya, N. Castex-Rizzi, H. Duplan
Pierre Fabre Dermo-Cosmétique, Pierre Fabre Research and Development Center Pharmacology Division, Toulouse, France

Atopic dermatitis (AD) is characterized by the production of thymic stromal lymphopoietin (TSLP), a marked T_H2 polarization and a profound alteration in epidermal barrier function. Recent studies have emphasized the central role of TSLP in triggering inflammation and pruritus. We have recently developed a model of reconstructed human epidermis (RHE) that displays features of an atopic dermatitis-like phenotype upon exposure to an inflammatory stimulation (manuscript in revision). We showed that RHE exposed to the stimulation responded by (i) a robust secretion of TSLP in a NFκB-dependant manner, (ii) a strong up-regulation of

Table 5 Human exposure/clinical data

% Dry extract in Final product	Type of study	Type of cosmetic product	Target population	n=	Application site	% finished products tested	Result
0.5%	HRIPT	Bath gel	Adult, Healthy skin	99	back, patch, Finnchamber (50 µL)	2%	No irritant/allergic reaction
0,25%	HRIPT	Body lotion	Adult, Healthy skin	213	back, patch, Finnchamber (50 µL)	100%	No irritant/allergic reaction
0,25%	HRIPT	Shampoo	Adult, Healthy skin	100	back, patch, Finnchamber (50 µL)	2%	No irritant/allergic reaction
0.1%	HRIPT	Bath and shower oil	Adult, Healthy skin	102	back, patch, Finnchamber (50 µL)	2%	No irritant/allergic reaction
0.1%	HRIPT	Diapers creams	Adult, Healthy skin	102	back, patch, occlusive (50 µL)	100%	No irritant/allergic reaction
0.1%	HRIPT	Body lotion	Adult, Healthy skin	102	back, patch, occlusive (50 µL)	100%	No irritant/allergic reaction
0.1%	HRIPT	Body lotion	Adult, Healthy skin	310	back, patch, occlusive (50 µL)	100%	No irritant/allergic reaction
0.1%	HRIPT	Shower gel	Adult, Healthy skin	104	back, patch, semi-occlusive (0.2 mL)	1%	No irritant/allergic reaction

gene expression of inflammatory mediators and markers of AD together with a down-regulation of genes markers of differentiation, and (iii) a significant decrease in epidermal barrier function, as illustrated by increased Lucifer Yellow (LY) dye penetration through the epidermis.

The aim of this study was to investigate the protective effect of Rhealba[®] Oat plantlets extract on this atopic dermatitis-like model.

Generation and characterization of the *in vitro* RHE model of atopic dermatitis (AD)

Human reconstructed epidermises (RHE) were prepared from keratinocytes of the outer root sheath (ORS) of hair follicles,

as described elsewhere.¹⁷⁴ After 14 days of air-medium interface culture, RHE were stimulated with a mixture of inflammatory stimuli (IL-1 β and TLR2/TLR3 ligands) for 24 h of incubation (Fig. 17). The complete characterization of the model is described elsewhere in a manuscript currently under revision.

Rhealba[®] Oat Plantlets-based emollient or two concurrent products (LipiKar AP+ and Atoderm Intensive) was applied to the surface of RHE before exposure to the inflammatory stimulation for a 24 h incubation. Production of TSLP was then analysed by Elisa. mRNA expression of genes were analysed by RT-Q-PCR. The epidermal barrier was assessed by Lucifer Yellow (LY) permeability assay.

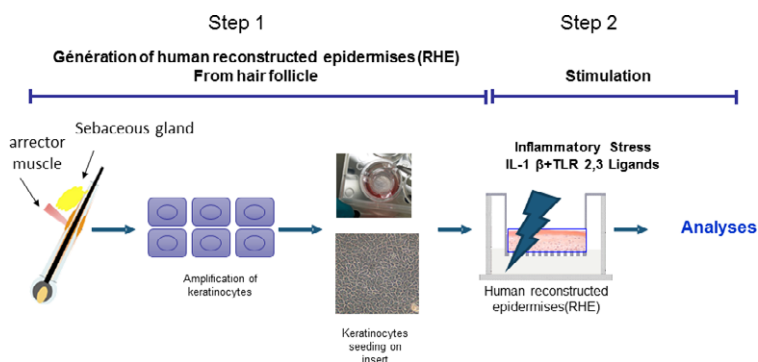


Figure 17 Schematic representation of the human reconstructed model of atopic dermatitis (a) and some main features of the model (b). Arrows point out loss of keratohyalin granules upon stimulation. Filaggrin staining is significantly reduced while Lucifer Yellow dye penetrates deeper through the stratum corneum after stimulation. TSLP release is strongly induced by stimulation and markedly reduced when an NFkB inhibitor was added.

Rhealba® Oat Plantlets-based emollient reduces significantly TSLP release from RHE-keratinocytes induced by the stimulation

Upon stimulation of normal RHE with the inflammatory stimulation (IL-1 β and TLR2/TLR3 ligands), we observed a robust TSLP production by keratinocytes (Fig. 18). We found that both Rhealba® Oat Plantlets-based emollient and the two concurrent balms inhibit significantly the TSLP release. Rhealba® Oat Plantlets-based emollient was significantly more efficient than Lipikar AP+ to hamper TSLP production while efficacy of Rhealba® Oat Plantlets-based emollient and Atoderm intensive were found equivalent.

Rhealba® Oat Plantlets-based emollient strongly inhibits inflammation induced by the stimulation while stimulating epidermal renewal

Analysis of mRNA expression shows that the inflammatory stimulation induces a strong up-regulation of inflammatory mediators notably cytokines and chemokines which are markers of AD (CCL2, -5, -7 -20 and -27) (Table 6). At the opposite, expression of skin proteins and markers of differentiation such as FLG,

KRT10 but also INV, KLK5 and KLK7 is down-regulated, which is consistent with that the inflammatory stimulation alters terminal differentiation.

Treatment with Rhealba® Oat Plantlets-based emollient strongly inhibits the up-regulation of expression of inflammatory mediators (Table 6 and Fig. 19). Inhibition by Rhealba® Oat Plantlets-based emollient was more pronounced than those exerted by Lipikar AP+ and Atoderm Intensive. None of the treatment with the three balms was found capable of reversing the down-regulation of genes markers of terminal differentiation such as filaggrin (not shown). However, Rhealba® Oat Plantlets-based emollient strongly stimulates genes of involucrin (marker of early differentiation), keratin-16 (marker of epidermal proliferation) and the proteases inhibitors KLK5 and KLK7 (control of desquamation) suggesting that Exomega balm promotes epidermal renewal. Compared to Rhealba® Oat Plantlets-based emollient, Lipikar AP+ poorly stimulates involucrin and keratin-16 gene expression, Atoderm Intensive poorly induces involucrin and KLK5 gene expression but stimulates KRT16 to the same extent than Rhealba® Oat Plantlets-based emollient.

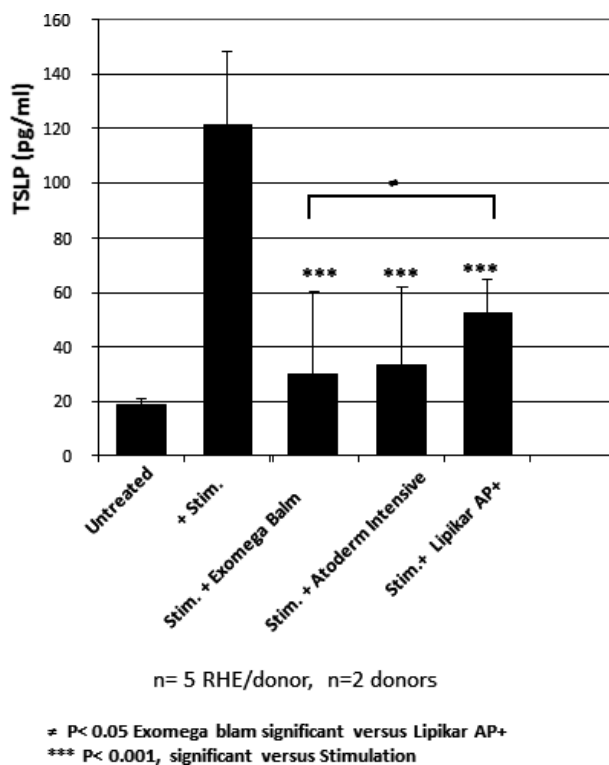


Figure 18 TSLP Effect of Rhealba® Oat Plantlets-based emollient, Atoderm Intensive and Lipikar AP+ on stimulation-induced TSLP secretion (Elisa, n = 2 donors, mean of 10 RHE). Statistical analyses, Mann-Whitney test.

Rhealba® Oat Plantlets-based emollient improves barrier integrity when challenged by the stimulation

LY assay was performed using standard procedure. Briefly, RHE were treated with a solution of LY (1 mM in PBS) for 2 h, fixed and immediately frozen. Cryosections were counterstained with DAPI, mounted on slides and rapidly analysed under a fluorescent microscope. Fluorescence was quantified by using a Pierre Fabre's software on at least five individual pictures/condition assay.

LY is a small hydrophilic fluorescent dye that is retained in the stratum corneum indicative of a normal, functional outside-in permeability (Fig. 20). Upon stimulation, LY penetrated deeper into the stratum corneum, indicating that the outside-in permeability was modified as a consequence of barrier alteration. Treatment with Rhealba® Oat Plantlets-based emollient significantly limits the permeability of LY through the epidermis while Lipikar AP+ and Atoderm Intensive do not (Fig. 20).

Conclusion

We have developed a *in vitro* model of RHE that displays the major hallmarks of atopic dermatitis. In this model, we compared Rhealba® Oat Plantlets-based emollient with two concurrent products based on three complementary and informative analyses:

- 1 TSLP measure as key marker of AD and pruritus.
- 2 Gene expression of inflammatory mediators and epidermal differentiation/renewal markers.
- 3 Barrier function by analysing Lucifer yellow permeability.

Table 6 Effect of the different treatments on mRNA expression

Effect of the different treatments on mRNA expression. RQ: Relative Quantity of mRNA. Red- and blue- hightened genes are genes respectively induced and repressed by the stimulation. For each donor (n=2 donors, 2 RHE/donor), the % relative expression is calculated as $(RQ_{treated\ condition} / RQ_{stimulation}) \times 100$. The % of Relative Expression reported is the mean of the 2 donors. Colors-arbitrary classification is chosen for better visualization of the effect of the different treatments.

GENES	Stimulation		Stim + Exomega balm			Stim + Lipikar AP+			Stim + Atoderm Intensive		
	RQ donor1	RQ donor2	RQ donor1	RQ donor2	% Relative expression	RQ donor1	RQ donor2	% Relative expression	RQ donor1	RQ donor2	% Relative expression
CCL2	119.44	59.58	9.4	0.4	4.3	74.0	11.2	40.4	53.0	1.0	23.1
CCL20	14.56	18.36	7.2	6.0	41.0	15.3	13.0	87.8	9.5	3.6	42.5
CCL27	8.04	18.41	4.9	4.2	41.7	3.1	12.9	64.7	6.4	7.8	60.7
CCL5	106.23	42.89	43.0	9.4	34.2	37.7	12.5	32.3	43.5	5.9	27.4
CCL7	14.05	21.11	3.4	1.1	14.6	9.2	7.3	50.2	14.0	4.0	59.3
CXCL10	104.10	45.43	11.1	5.7	11.6	25.6	15.3	29.2	21.0	2.9	13.3
HBD2	39.83	23.13	19.2	8.4	42.2	69.1	24.8	140.3	27.6	7.3	50.5
IVL	0.59	0.78	1.2	1.6	205.9	0.8	1.5	164.8	0.8	1.9	190.4
KLK5	0.60	0.76	3.3	1.7	386.8	0.6	0.8	101.4	0.8	1.5	162.1
KLK7	0.63	0.55	1.2	1.1	198.0	0.5	0.7	97.0	0.6	1.1	144.9
KRT16	0.73	0.76	2.4	3.4	384.3	1.0	1.8	186.6	1.7	2.9	309.8

Effect of treatment	
<30%	Strong inhibition
>30% et < 50%	Inhibition
>50% < 75%	weak Inhibition
>150% < 200%	weak Stimulation
>200% < 300%	stimulation
>300%	Strong stimulation

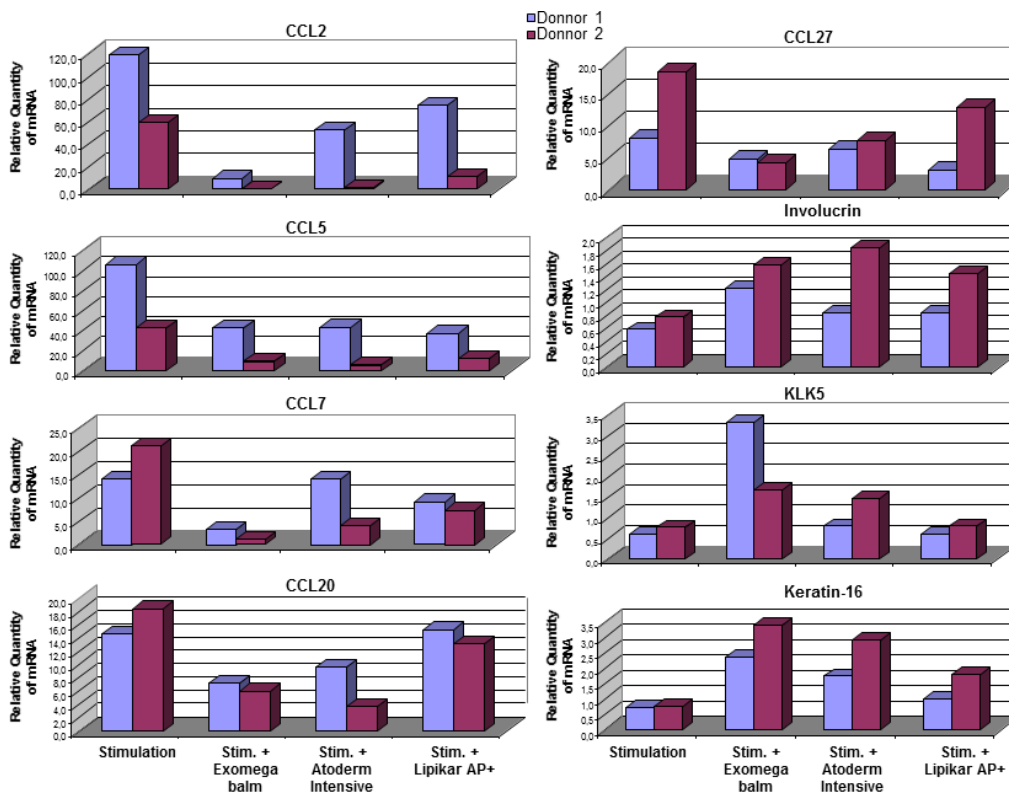


Figure 19 Effect of Rhealba® Oat Plantlets-based emollient, Atoderm Intensive and Lipikar AP+ on mRNA expression of genes modulated by the inflammatory stimulation (markers of inflammation and epidermal differentiation/regeneration). RQ represents the relative quantity of mRNA vs. untreated control.

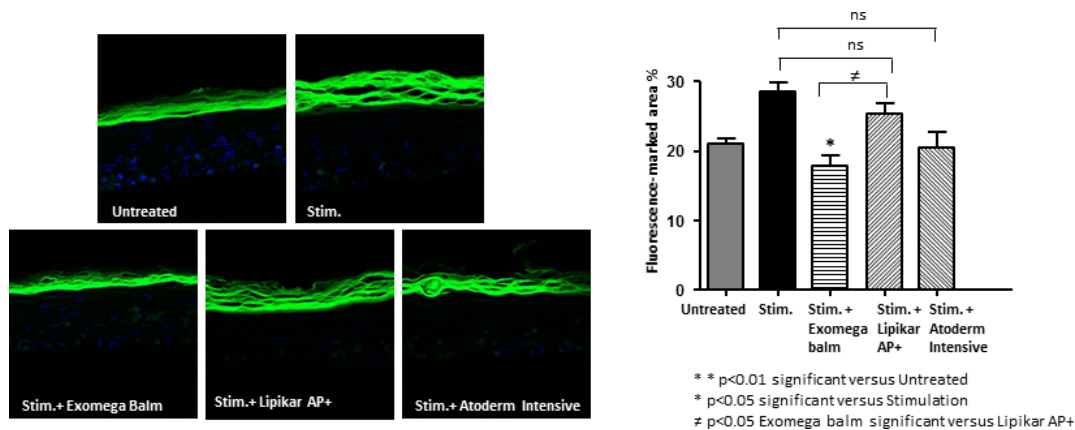


Figure 20 Lucifer yellow (LY) permeability through the stratum corneum of RHE. Images are representatives from the different condition assays. Fluorescence is represented as % Fluorescence/total surface of the stratum corneum. Statistical analyses, Mann–Whitney test.

In this model, Rhealba[®] Oat Plantlets-based emollient was found overall better than Lipikar AP+ on the three parameters. Rhealba[®] Oat Plantlets-based emollient was found slightly more efficient than Atoderm intensive.

Collectively, our data support the efficacy of Rhealba[®] Oat Plantlets-based emollient for AD prevention and treatment.

Clinical cases

Fragile skin: illustrative clinical cases of Atopic Dermatitis

A. Torrelo

Pediatric Dermatology, Hospital del Niño Jesús, Madrid, Spain

Atopic dermatitis (AD) is a genetic disease of the skin in which an ineffective epidermal barrier leads to overexposure to external irritant and allergenic substances that will cause eczema.¹⁸⁰ The genetically impaired skin barrier leads to a state of skin disease in the form of inflammation and further skin barrier fractures, thus closing a circle that self-perpetuates in time. The disease activity may range from normal-looking to severely inflamed skin, but low degrees of eczema with faint erythema and scaling are often seen, giving thus the appearance of an ‘easily fractured skin’. In all cases, a double and sequential approach to AD management is desirable, first with pharmacologic agents to subside inflammation, and then with appropriate emollients to overcome the defective ‘fragile’ skin barrier and thus allow for long-term remissions of AD without pharmacologic agents.

Three cases are shown that illustrate the potential in the use of appropriate emollients to patients with AD.

Case 1

Case report A 7-year-old girl had atopic dermatitis since infancy. She had started with eczema at the age of 6 months and had received intensive emollient treatment along with topical

corticosteroids. Her control was poor during the first year of life. She developed milk allergy that was under control with elimination diet. She had a continuous course of moderate AD during her first 5 years of life that was poorly controlled with topical corticosteroids. At the age of 7, her AD severity markedly increased, requiring short periods of oral corticosteroids that were only partially effective, and became resistant to topical corticosteroids. She suffered from intense irritation when most topical emollients were applied on her skin. The patient was sent to our Department; on examination, the patient showed full skin involvement by erythema, edema, oozing and crusting, as well as very severe lichenification in many of the involved parts (Fig. 21). She had intractable itch and severe psychological and sleep disturbance.

After initial laboratory evaluation, she was treated with oral cyclosporine A (5 mg/kg/day) and during the following 12 weeks she achieved a dramatic improvement in her skin that showed at that time minimal erythema and widespread, fine scaling with just a few scratching lines due to slight persistent itch (Fig. 22); no edema, oozing or crusts were observed, and lichenification had markedly improved. Tolerance to cyclosporine was optimal. Once daily therapy with Rhealba[®] Oat Plantlets-based emollient was begun, and after 3 weeks, she had a marked improvement in erythema and scaling, to yield almost intact skin (Fig. 23).



Figure 21 Patient 1 Before cyclosporine treatment.



Figure 22 Patient 1 Before Rhealba® Oat Plantlets-based emollient treatment.



Figure 23 Patient 1 3 weeks after Rhealba® Oat Plantlets-based emollient treatment.

Discussion

This case illustrates the need for patients with AD to achieve an adequate control of AD before approaching an intensive emollient therapy with appropriate products.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ In patients with severe, active eczema, skin irritability is usually induced by the application of regular emollients, leading to worsening of AD and reluctance to their application by the patients.^{178,179} Once eczema is brought under control, emollient therapy with appropriate products leads to decreased scaling, improvement of fragile skin and even reduction in the residual activity of AD. In our patient, resistance to topical corticosteroids and a severe disease prompted starting therapy with oral cyclosporine A, an immunosuppressant agent that has been largely used in children with severe AD.¹⁸¹ It is quite common that patients with severe AD who are under good control with oral cyclosporine A still exhibit a minimal residual activity that may need extensive use of topical corticosteroids. Our patient experienced a marked improvement in scaling and residual activity of AD after cyclo-



Figure 24 Patient 2 before Rhealba® Oat Plantlets-based emollient treatment.

sporine A treatment, that allowed for a better quality of life, less use of topical corticosteroids and eventually to reduced dose of oral cyclosporine A.

Case 2

Case report A 10-year-old girl was seen in our Department because of lesions on the flexures of her elbows and knees. These lesions had started at the age of 5, and experienced phases of improvement and worsening, sometimes related with cold weather or other less clear triggers such as sweating. She had been using topical corticosteroids that had been successful, but she required many courses of topical corticosteroids to achieve healing. At consultation, her mother reported having used topical corticosteroids until last week. On examination, the patient showed mild involvement on her flexures of the elbows and knees, consisting of faint erythema, and areas of scaling and some scratching lines (Fig. 24). She was instructed to apply Rhealba® Oat Plantlets-based emollient once daily after bathing on her elbow and knee flexures, and after 2 weeks, she had experienced a marked improvement in erythema and scaling, with no further scratching (Fig. 25). Pruritus was also markedly decreased.

Discussion

Some patients need continuous use of topical corticosteroids to achieve an appropriate control of AD. For those cases, several approach strategies have been advocated, including maintenance therapy with corticosteroids for up to 16 weeks^{182,183} or proactive therapy with topical calcineurin inhibitors for up to 12 months.¹⁸⁴ Although both strategies have proved safe and effective, still the use of emollients is recommended for all patients with AD, and it would be ideal to even avoid safe treatments to be applied on the skin. Certain emollients may



Figure 25 Patient 2 2 weeks after Rheelba[®] Oat Plantlets-based emollient.



Figure 26 Patient 3 before Rheelba[®] Oat Plantlets-based emollient treatment, left elbow.

have the capability of improving the skin appearance and reduce itch in cases of residual or mild eczema, well after having used appropriately the current topical medications approved for the AD flare-ups.

The author, as well as others,¹⁸⁵ does not advocate the use of topical emollients on the skin affected by intense, active eczema because some irritation can occur and for such instances, a rapid relief of eczema and itch is most desirable. However, in minimal residual skin involvement after topical drugs have been appropriately applied, certain emollients can induce further improvement, and are expected to be able to delay the apparition of new AD flare-ups.

Case 3

Case report A 4-year-old boy was sent for evaluation of persistent eczema located on the flexural areas of his elbows and knees. He had had mild atopic dermatitis during infancy, but was later under good control with only topical emollients. During the latest 4 weeks, he had developed lesions on his elbow and knee flexures that had been treated with topical corticosteroids, but rapidly recurred. He was sent for evaluation because of resistant AD. On examination, we saw areas of erythema, oozing and crusting on all four elbow and knee flexures. Additionally, a few pearly, skin coloured, crusted papules were overimposed on these areas (Fig. 26). A diagnosis of molluscum contagiosum (MC) was done, and the patient was treated with topical Rheelba[®] Oat Plantlets-based emollient for 2 weeks. On follow-up, skin eczema had improved, and in certain areas MC lesions had disappeared (Fig. 27), whereas in others, despite improvement in eczema, some MC papules still remained (Fig. 28).



Figure 27 Patient 3 2 weeks after Rheelba Oat Plantlets, based emollient, left elbow.

These were easily removed by curettage and the patient did not recur from eczema thereafter.

Discussion

This case highlights the need to be aware of situations that can trigger, worsen or perpetuate AD. By far, bacterial infection, mostly by Staphylococci is the most common complication of AD.¹⁸⁶ Viral infections, especially herpes simplex, can complicate the course of AD.¹⁸⁷ In school children, molluscum contagiosum (MC) is a very prevalent viral infection that has been reported to be more common in children with AD.¹⁸⁸ MC can



Figure 28 Patient 3 Molluscum contagiosum lesion on the right elbow.

spread more easily in the skin affected with eczema, both by a defective skin resistance to viruses and by self-inoculation by scratching. Alternatively, MC is known to worsen or trigger flare-ups of AD. Many children appear concomitantly with both AD and MC, and both need to be treated. Available treatments for AD, including topical corticosteroids and topical calcineurin inhibitors, can hypothetically decrease the immune system of the skin, and thus help to spread the MC infection. On the other hand, treatments for MC can be unacceptable for use on the skin affected by eczema due to severe irritation, pain or bleeding.¹⁸⁹

Ideally, skin eczema should be treated first to permit a minimally aggressive removal of MC and to permit an easy individualization of MC lesions that can be difficult to see in children with concomitant AD. In cases with severe eczema, topical corticosteroids are preferred, but in mild cases, a proper emollient can be used to reduce symptoms and signs of eczema, and then treat MC accordingly, to achieve a complete and long-lasting cure of both diseases.

Acne

Preadolescent acne: clinical benefit of a dermocosmetic in young population

M.D. Thouvenin,¹ J. Mangold,¹ Ana-Beatris Rossi^{1,2}

¹Pierre Fabre Dermo-Cosmétique Research & Development, Clinical Division, Toulouse, France

²Department of Dermatology, Toulouse University hospital, France

Background *Acne vulgaris* is the most prevalent dermatosis in the adolescent population, and there is some evidence that it is increasing in the preadolescent population. The earlier age of

onset of acne is thought to be related to the earlier onset of puberty. Most of acne drugs have been studied in patients above 12 years and little is known about the epidemiology and the benefit of topical treatments, including drugs or dermocosmetics, in the preadolescent acneic population.

Objective To access the epidemiological data and natural evolution of the condition in preadolescents 9–11 years old with *acne vulgaris*, and evaluate the efficacy and the tolerance of a dermocosmetic skin care product.

Methods We followed up 38 preadolescents aged 9–11 years old with facial acne (with at least five non-inflammatory lesions) with no treatment for 24 weeks, and evaluated their acne at baseline and after 4, 12 and 24 weeks (lesions counts and IGA). In parallel, 41 preadolescents 9–11 years old with mild to moderate facial acne (five to 50 total acne lesions with at least five non-inflammatory lesions) received a dermocosmetic product having actions on four parameters of acne one daily for 3 months.

-AHA/BHA keratolic effect

-Rhealba[®] Oat Plantlets Extract: anti inflammatory and anti *P. acnes* effect

-Sebolia[®]: antiseborrheic effect and

-Zincol

Lesions counts, IGA and tolerance evaluation were performed at baseline and after 4 and 12 weeks of product application.

Results Seventy-nine preadolescents (9–11 years old, mean age 10,6) have been included and analysed in the two groups, with similar baseline characteristics between both groups. The mean number of acne lesions was 24.87 at baseline in the overall population (24.07 non-inflammatory and 0.84 inflammatory lesions). After 24 weeks, there was a significant increase ($P < 0.05$) of 47.4% in non-inflammatory lesions in the non-treated group, whereas in the treated group, there was a significant reduction ($P < 0.05$) of 13.2% after 12 weeks of dermo-cosmetic application. For 78% of subjects, the product induced a perceived improvement of acne at week 12, 44% had a reduction in non-inflammatory lesions, whereas in the non-treated group, 61% of subjects experienced an increase in the non-inflammatory lesions count. Compliance was high and the studied product was very well tolerated.

Conclusion In the natural course of acne in preadolescents, the number of non-inflammatory lesions tends to increase overtime. The daily use of a dermocosmetic-containing hydroxy acids and Rhealba[®] Oat Plantlets extract for 12 weeks, reverse this situation and improve their acne, being well tolerated, well accepted and appreciated by this population.

Introduction

Acne vulgaris has an estimated prevalence of 50 to 90% in adolescents^{184–187} and there are increasing reports of acne in children under 12 years old.^{189–199}

The preadolescent acne includes patients from 7 to 11 years of age and is characterized by a predominance of comedones on the forehead and central face with relatively few inflammatory lesions.^{200–202}

Acne is considered as the result of normal adrenarche and testicular/ovarian maturation, with an increase production of androgenic hormones including dihydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) by the adrenal cortex, which stimulates sebum production in both sexes.^{195,201,203,204} The number of sebum secreting follicles is initially small and increases with age. Sebum production and propionibacterial densities are higher with increasing age in children who developed acne compared with children who did not.²⁰⁴

The earlier age of onset of acne is thought to be related to the earlier onset of puberty.^{195,198–201}

History and clinical examination are generally sufficient to evaluate acne of preadolescents unless there are signs of unusual severity, excess of androgens or unresponsive to treatment, which lead to perform further workup in order to identify a polycystic ovary syndrome (PCOS) or another endocrinologic pathology.^{200,201} Nevertheless, early onset of comedonal acne is a predictor of acne severity, which may be minimized by controlling acne early.²⁰⁵

The majority of clinical trials for acne drugs are conducted in patients 12 years of age or older and there are few publications regarding the safety and efficacy of drugs in paediatric patients.^{201,206–210} However, none of these studies included European population.

Evidence-based recommendations for the diagnosis and the treatment of paediatric acne have been published in 2013.²⁰¹ The algorithm for preadolescent acne management is essentially the same as for adolescents, highlighting that the least aggressive effective treatment should be recommended. The main problem in this age group is the lack of compliance, as children are often less concerned than their parents about their condition, and are not willing to invest time and effort into their acne treatment.¹⁸⁸ The lack of compliance may also be associated with local reactions. Of note, the drugs proposed in the algorithm are approved in the US but not in Europe for this age range.

We have performed two studies in parallel including 84 preadolescents with facial *acne vulgaris* to evaluate the natural evolution of facial *acne vulgaris* over 24 weeks in one group, and the benefit of a dermocosmetic care product over 12 weeks in another group with same baseline characteristics. The study product active ingredients are hydroxy acids and Rhealba[®] Oat Plantlets extract. Both groups were recruited and evaluated in parallel and over the same season by a single investigator dermatologist in a clinical centre in Lisbon, Portugal.

Material and methods

Study population

Forty-three subjects aged 9–11 years old with facial *acne vulgaris* with at least five non-inflammatory lesions were enrolled in the observational group. Forty-one Subjects aged 9–11 years old with mild to moderate facial *acne vulgaris* (5–50 total acne lesions with at least five non-inflammatory lesions) were enrolled in the product group. Main non-inclusion criteria for the product group were: Use of systemic or topical treatment for acne during the previous month (6 months for systemic isotretinoin); Use of anti-acneic or anti-seborrheic cosmetic care during the 15 previous days. Subjects with clinical signs of hormonal dysfunction or hyperandrogenism or with other cutaneous pathology on the face liable to interfere with the data of the study were not eligible.

Study design

The studies were performed following the principles of Good Clinical Practices (CPMP/ICH/135/95). The protocols and test conditions were approved by an Independent Ethical Committee. Prior to enrolment, the parent(s) or guardian(s) of subjects provided their written informed consent, according to the national regulations.

The observational group was evaluated at baseline, 4, 12 and 24 weeks after inclusion. Subjects in the product group had evaluations at baseline, 4 and 12 weeks after inclusion. The Subjects applied the product once a day in the evening, on clean skin, around a pea-sized amount of the product to the entire face.

Outcomes and methods of assessment

At each visit, the following evaluations were performed in both groups: acne lesions counts on overall face following Lucky's counting system and including nose area, Investigator Global Assessment of acne severity (IGA) based on the FDA guidelines for acne assessment.

Standardized photographs (full face and 2 profiles at 45 °, parallel and cross-polarized light, fluorescent light) were also performed at each visit.

Additionally, in the product group, the following evaluations were performed:

- 1 Tolerance assessment (at D1, before and after the first product application and at each visit) based on the evaluation of physical signs (redness, oedema, desquamation, dryness, vesicles, papules) and functional signs (burning sensation, warm sensation, itching, tightness, stinging/tingling, discomfort) using a five-point scale (0: none, 1: very mild, 2 mild, 3 moderate, 4 severe). The investigator also evaluated the overall tolerance of the product at the end of the study, according to a five-point grade (excellent, very good, good, moderate, bad tolerance).

- 2 Evaluation of the impact of the product by subjects and their caregivers on the Global improvement of acne through a six-point scale (-1: Worsening, 0: No change, 1: Mild improvement, 2: Moderate improvement, 3: Good improvement, 4: Very good improvement) at week 4 and 12.
- 3 Cosmetic acceptability by the Subjects and caregivers, based on standardized questionnaires at week 4 and 12.

Statistical analysis

The statistical analysis of the two groups was performed with SPSS 20[®] (IBM). Descriptive statistics (Mean, standard deviation, min, max and median) were calculated for all of the parameters (lesion counts, IGA scores, tolerance scores and questionnaire results). Comparative analysis of each visit vs. baseline was performed with parametric statistics (student *t*-test) or non-parametric statistics (Wilcoxon rank-signed test or Mann–Whitney) according with the parameters evaluated (continue or discrete).

Statistical comparisons between the two groups were performed using SPSS 21 (IBM, USA) on data obtained at baseline, 4 weeks and 12 weeks. The variables used to the comparison were: Demographic data (age, gender, phototype, height, weight and BMI); Lesion count evaluation; IGA scores.

A normality test was applied to all the continuous variables in order to select the parametric or non-parametric type of hypothesis test. A student *t*-test was used if the comparison is performed with parametric tests. A Wilcoxon signed-ranks test for paired samples or a Mann–Whitney test for independent samples were used when the non-parametric approach was chosen. A significance level of 95% was defined, consequently a *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Forty-three and 41 Subjects were included in the observational and product group respectively. Five Subjects were excluded from the analysis in the observational group (two due to lost to follow-up and three due to the use of topical products for acne).

We define the subjects who applied the product as the ‘treated group’ and the non-treated sub-population of the observational group as the ‘non-treated group’.

In the non-treated and treated group, 38 Subjects aged 9–11 years (22 girls and 16 boys, mean age 10.6 years) and 41 Subjects aged 9–11 years (20 girls and 21 boys, mean age 10.5 years), respectively, completed the study.

The following demographic data – age, gender, height, weight and BMI – were not significantly different (*P* < 0.05) between the two populations at baseline (Table 1). The gender distribution was, respectively, 58% of girls and 42% of boys vs. 49% of girls and 51% of boys in the non-treated and treated group.

The non-treated group had a 0.23–3.84 year of history of acne with an average duration of 1.43 years. The mean age of onset was equal to 9.68, ranged from 7 to 11 years old. A total of 34% of subjects had one or two parent(s) with a history of acne. To determine the onset of puberty, the following signs were reported: pubic hair, axillary hair, breast development, menarche, genital development and change in body odour. Twenty-nine preadolescents (76%) – 91% of the girls and 56% of the boys – had at least one sign of advanced puberty.

The treated group had a 0.06–2.98 year of history of acne with an average duration of 1.35 years. The mean age of onset was equal to 9.73, ranged from 8 to 11 years old. A total of 20% of subjects had one or two parent(s) with history of acne. Sixteen preadolescents (39%) – 55% of the girls and 24% of the boys – had at least one sign of advanced puberty.

Acne lesions counts (non-inflammatory, inflammatory and total) were not significantly different (*P* < 0.05) between the two groups at baseline (Table 7).

In the treated group, there was a 13.2% statistically significant reduction (*P* < 0.05) in non-inflammatory lesions at week 12 compared to baseline. In the non-treated group, there was a

Table 7 Demography and baseline characteristics

		Treated group (N = 41)	Non-treated group (N = 38)
Gender, n (%)	Male	21 (51)	16 (42)
	Female	20 (49)	22 (58)
Age, year	Mean ± SD	10.5 ± 0.71	10.6 ± 0.60
	9 years old, %	12	5
	10 years old, %	24	34
	11 years old, %	64	61
Phototype, n (%)	I	0	0
	II	11 (27)	3 (8)
	III	30 (73)	31 (82)
	IV	0	2 (5)
	V	0	2 (5)
Body mass, kg		44.8	48.6
Height, cm		151	153
BMI, kg/cm ²		19.5	20.6
Mean lesions counts, n	Total	24.2	25.53
	Non-inflammatory	23.3	24.84
	Inflammatory	1.0	0.68
History of acne	Years	1.35	1.43
	Mean age of appearance, years	9.73	9.68
	1 or 2 parents with history of acne, %	19.51	34.15
Subjects with puberty signs at baseline, n (%)	Total	16 (39)	29 (76)
	Male	5 (24)	9 (56)
	Female	11 (55)	20 (91)

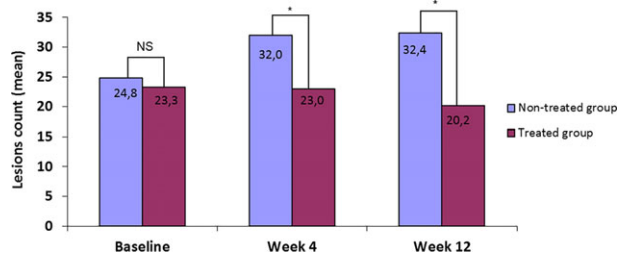


Figure 29 Change in the mean non-inflammatory lesions count in the non-treated group and in the treated group at baseline, week 4 and 12; NS: non-significant, * $P < 0.05$.

27.5% and 29.0% statistically significant increase ($P < 0.05$) in non-inflammatory lesions, respectively, at week 4 and week 12 compared to baseline. There was a significant difference ($P < 0.05$) of the non-inflammatory lesions at week 4 and 12, between the two groups in favour of the treated group (Fig 29). At week 12, 44% of Subjects in the treated group had a reduction in non-inflammatory lesions, whereas 61% of Subjects in the non-treated group experienced an increase compared to baseline.

In the treated group, there was a significant reduction ($P < 0.05$) in inflammatory lesions at week 4 and 12 compared to baseline. In the non-treated group, there was a statistically non-significant decrease ($P < 0.05$) in inflammatory lesions at week 4 and 12 compared to baseline. There was no significant difference ($P < 0.05$) of the inflammatory lesion at week 4 and 12 between the 2 groups; the mean values of inflammatory lesions in the two groups were very low (≤ 1) at baseline (Table 8).

Figures 30 and 31 represent, respectively, the evolution observed for a non-treated and a treated Subject.

The mean values of Investigator Global Assessment of acne severity at baseline in the non-treated and treated group were, respectively, 1.39 and 1.1. In the non-treated group, there was no significant evolution of the IGA mean score at week 4 and 12. In the treated group, there was a 12.8% significant reduction ($P < 0.05$) of the IGA mean score at week 12. Subjects in the treated group and their caregivers evaluated the Global improvement of their acne. There was an improvement of acne for a great majority of Subjects (83% at week 4 and 78% at week 12). No Subject reported worsening.

Table 8 Mean lesions count at baseline, week 4 and week 12

	Treated group (N = 41)			Non-treated group (N = 38)		
	Baseline	Week 4	Week 12	Baseline	Week 4	Week 12
Open comedones	4.3	3.7	2.7	3.7	4.4	4.6
Closed comedones	19.0	19.3	17.5	21.1	27.6	27.8
Non-inflammatory lesions	23.3	23.0	20.2	24.8	32.0	32.4
Papules	1.0	0.1	0.0	0.6	0.2	0.5
Pustules	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0
Inflammatory lesions	1.0	0.1	0.0	0.7	0.3	0.5

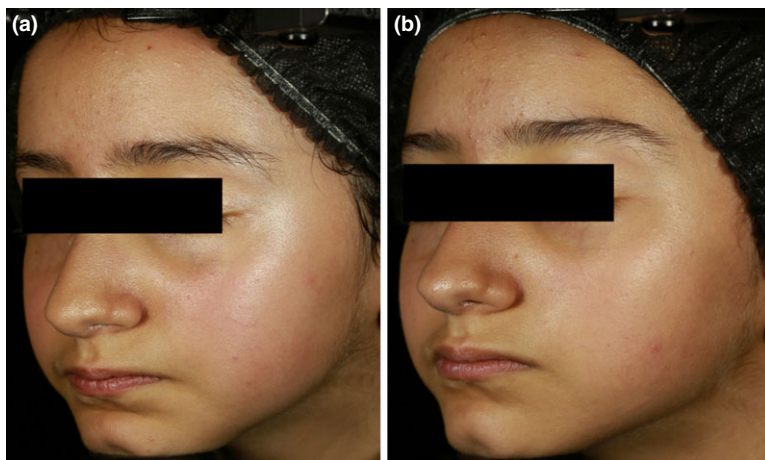


Figure 30 Photographs of a non-treated Subject (9 years old girl) (a) at baseline (35 total lesions) and (b) after 12 weeks of study (54 total lesions).

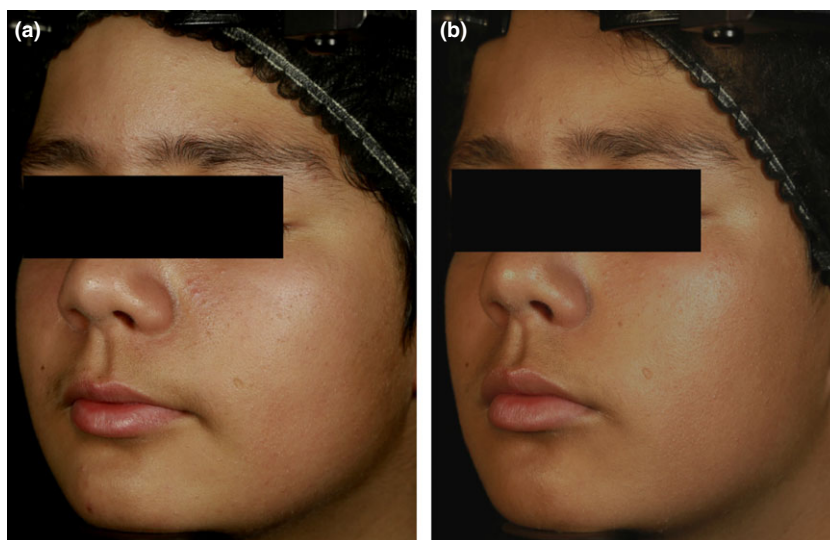


Figure 31 Photographs of a treated Subject (11 years old girl) at (a) baseline (45 total lesions) and (b) after 12 weeks of the product use (29 total lesions).

Investigator considered the cutaneous tolerance of the product during the study as excellent. There were neither physical signs reported by the investigator nor functional/physical signs reported by subjects related to the tested product.

The global agreement of the product (cosmetic acceptability and subjective efficacy of the product) was evaluated by the subjects and their caregivers with a mean note of 8.4 in a [0–10] scale at week 12.

The product was mainly appreciated by its practical packaging, ease of application, pleasant consistency, light texture, rapid absorption time and its pleasant fragrance. After 12 weeks of use, subjects noticed a reduction in the ‘blemishes’, ‘number of spots’ and ‘blackheads’ and perceived a smoother skin.

Discussion

Little is known on the prevalence of acne in preadolescents in the European population. One of the objectives of this 6-month observational study in preadolescents with facial acne was to evaluate the natural course of acne in a European country.

The clinical presentation of acne in our studies was similar to the literature data, with predominance of non-inflammatory lesions and very rare inflammatory lesions.

In the observational group, 41 Subjects were included and analysed. Among them, only 7% (3 subjects) had a medical treatment and/or cosmetic care for acne. In a cross-sectional study among school children in Lithuania, nearly a half of the 1019 subjects (aged 7–19) with specialist-confirmed acne had never been treated.²¹¹ Our results highlight the poor management of acne of the preadolescents.

The changes in IGA were not significant despite of the difference observed in lesions counts in the observational population. This could be explained by the fact that the IGA scale used is the

one proposed in the FDA recommendation and may be not appropriate to evaluate acne in this population. Other scales^{209,210} have been proposed for this specific population. However, the comparison between FDA scale and one proposed paediatric acne severity scale failed to demonstrate a difference between both.²⁰⁹ This may be due to the small number of lesions seen in this population, so a much larger sample size may be needed to demonstrate differences between scales.²⁰⁹

For the 38 non-treated subjects, there was a significant increase ($P < 0.05$) of the non-inflammatory lesions during the 6 months of follow-up study (+29.0% and +47.4% at week 12 and 24 respectively). The study took place from February to August 2015 (winter to summer) and no negative impact of the season was expected.

A 5-year American longitudinal cohort study in young girls showed a progressive increase in the number of acne lesions with age and maturation, with a predominance of comedonal acne rather inflammatory acne lesions, regardless of age.²⁰⁵ Our results confirm the natural worsening of acne in preadolescents, underlining the rapid increase of lesions in a short time.

There are few longitudinal studies looking into the natural history of acne and more studies are required to best determine the natural evolution kinetic of acne and to identify risk factors for severe disease.¹⁹⁷

Predictors of acne severity include a young age of beginning of acne.¹⁹⁷ Studies have shown that adolescents and young adults with severe acne almost always first developed mild comedonal acne between 9 and 12 years of age, which usually went untreated until they were teenagers.^{188–194,212} The impact of acne in the emotional well-being has also been demonstrated by Smithard *et al.*¹⁸⁴ Preadolescents and adolescents are psychologically most vulnerable and there is evidence that both the physical and emotional scars of untreated acne in adolescence can

significantly affect quality of life, persist into adulthood, and negatively impact normal interpersonal, social and professional functioning.^{212–215} The association of acne with anxiety, depression, social isolation, disturbance of relationships with reduce self-esteem is well reported.^{196,197}

Early adequate, effective treatment is fundamental to prevent the development of more severe acne, especially in preventing the progression of comedones to inflamed lesions.^{209,210,216} This early management of acne can also limit the psychological and emotional burden of disease.^{196,216}

Very few studies have evaluated the tolerance and efficacy of treatments in preadolescents. Nevertheless, a wide variety of treatments is used in this population.²⁰⁶ Evidence-based clinical guidelines for the management of paediatric acne have been published recently. As acne severity is mainly mild in this population, treatment will usually begin with topical therapy which includes topical retinoid, benzoyl peroxide (BPO) or combinations of topical retinoids, antibiotics and BPO.²⁰¹ However, cutaneous irritations are common with topical acne medications, particularly at the start of a new treatment.²⁰⁸ At least 20% of subjects had experienced local reactions in two studies on preadolescents.^{209,210}

Tolerability can strongly impact adherence with an acne treatment, particularly on young children who may not feel as concern as older patients. Management of acne in preadolescent should focus on tolerance, ease of use and simplicity of regimen in order to have a good compliance to treatment.^{201,208}

Taking in consideration both the potential risk of developing severe acne and the lack of treatment options in preadolescents in Europe, we have also evaluated the tolerance and efficacy of a dermocosmetic-containing hydroxy acids in this population.

Hydroxy acids have been used in a large range of dermatological indications for than three decades. The most prominent compounds in this class are glycolic acid, lactic acid and salicylic acid.^{217,218} The mechanism of action in acne is based on reduction of the calcium ion concentration in the epidermis and remotion of calcium ions from the cell adhesions by chelation.²¹⁷ Treatment with 4% glycolic acid twice daily for 3 weeks increased desmosomal breakdown in the stratum disjunctum, promoting a loss of cohesion and desquamation.²¹⁸ Activity of hydroxy acids is strongly dictated by the pH of the formulation. The lower the pH, the stronger the activity. A pH of 3.5 is the ideal pH in antiacneic treatment for maximum efficacy without skin irritation.^{219–221}

The studied product is a gel cream emulsion containing 9% of alpha and beta hydroxy acids and Rhealba[®] Oat Plantlets extract. The formula includes glycolic acid (6%), lactic acid (2%) and salicylic acid (1%), as active anti-comedogenic agents.²²¹ Rhealba[®] Oat Plantlets extract has anti-irritating and

anti-inflammatory properties, demonstrated by *in vitro* studies.^{2,48}

In an observational study performed in 2014–2015 involving 274 physicians in France, 839 acne patients were treated by this product, 652 in association with drug treatment and 187 with the product alone or associated with other products of the range. Efficacy and tolerance of the product alone or in association were considered as good or very good by the majority of the Investigators (A-Derma observational study 2015, data on file).

The comparative analysis between the non-treated and treated groups demonstrated a significant difference ($P < 0.05$) of the non-inflammatory lesions in favour of the treated group. Moreover, the subjective evaluation of efficacy has shown that 78% of subjects/caregivers perceived an improvement in their acne. The advantage of the subject-based measure is transforming the various dimensions of acne into a single perceived one. There is evidence that the correlation between patient's evaluations and quality-of-life is higher than with clinically reported measures of acne severity.¹⁸⁸

Taken together, these results suggest the interest of the dermocosmetic product in controlling and reducing non-inflammatory lesions in preadolescents and possibly avoiding the increase of acne severity later on.

Cosmetic acceptability and tolerance are major factors for compliance in this age range. The product had an excellent tolerance during the 12 weeks of study with neither functional signs nor physical signs reported by the subjects or observed by the investigator. Moreover, all subjects included finished the study and continued applying the product during the 12 weeks. The questionnaire filled by parents and subjects confirmed the very good cosmetic acceptability of the product.

Dermocosmetic skin care products which are very often used by adolescents and adults can be proposed by the dermatologists in association with medical treatments, or alone.

Our results demonstrated the very good tolerance of the product on a preadolescent European population. The results on lesion counts suggest the interest of the product to minimize the natural worsening of acne in this population. Larger studies, in particular longitudinal ones, are needed to explore the natural history of acne in paediatric population. In addition, the interest of dermocosmetic skin care products in this population should further be explored.

Acknowledgements

Dr Marketa Saint Aroman, of A-Derma[®], contributed to the design and review of the study protocol, and Dr Leonor Girão, from Lisbon was the investigator. The authors also acknowledge the assistance of Pedro Contreiras Pinto as Scientific Manager, from PhD Trials, for project management. Pascale Besinet and Francis Carriere were the formulators who developed the tested product.

Rhealba Oat in Circumstantial (environmental) Fragile Skin

Ultraviolet irradiation (UV)

Rhealba® Oat in Environmental Fragile Skin: UV protection

M.F. Galliano¹, C. Carrasco¹, K. Biniek², R. Dauskardt², S. Bessou-Touya¹, H. Duplan¹

¹Pierre Fabre Dermo-Cosmétique, Pierre Fabre Research and Development Center, Pharmacology division, Toulouse, France

²Department of Materials Science and Engineering, Stanford University hospital, Stanford CA, USA

The aim of this study was to investigate the benefits of A-Derma sunscreen products containing Rhealba® Oat Plantlet Oil for patients with fragile skin when they are exposed to UV?

To address this question, we first investigate the efficacy of A-Derma sunscreen products to restore barrier impairment after SDS treatment on human skin biopsies. We found that the sunscreen products containing Rhealba® Oat Plantlet Oil markedly recovered barrier function after impairment induced by the SDS treatment. Additionally, we showed that the sunscreen products when applied on the surface of normal reconstructed human epidermis (RHE) stimulated the neosynthesis of lipids such as ceramides and cerebrosides that play a major role in establishing the barrier function. Finally, we demonstrated that the sunscreen products strongly protect the mechanical properties of the stratum corneum *ex vivo* exposed to UV radiation.

A-Derma sunscreen products containing Rhealba® Oat Plantlet Oil restores barrier dysfunction on SDS-treated human skin explants

To induce barrier injury, a solution of 10% SDS was applied on the surface of explants obtained from normal human skin and allowed to incubate for 2 h. After a gentle wash with PBS, three

A-Derma sunscreen products SP50 + (cream-fluid-spray) were applied to the cutaneous surface explants in dose of 5 mg/cm² and incubated was carried on for 16 hrs. Controls included non-treated and SDS-treated skin biopsies. In parallel, a jellified water-based formulation was applied as an additional control. To evaluate the efficacy of A-Derma sunscreen products on barrier repair the following parameters were evaluated: (1) skin barrier integrity by analysis of permeability of the fluorescent dye Lucifer Yellow (LY) through the stratum corneum and (2) tight junction integrity through analysis of claudin-1 immunolabelling.

LY assay was performed using a standard procedure. Briefly, skin explants were treated with a solution of LY (1 mM in PBS) and incubation was carried on for 2 h. After that, a punch biopsy was prepared, fixed and immediately frozen. Cryosections were counterstained with DAPI, mounted on slides and rapidly analysed under a fluorescent microscope. Fluorescence was quantified by using a Pierre Fabre's software on at least five individual pictures/condition assay.

LY is a small hydrophilic fluorescent dye that was retained in the stratum corneum indicative of a normal, functional outside-in permeability (Fig. 32, control untreated). In contrast, after SDS treatment, LY penetrated much deeper into the stratum corneum, indicating that the outside-in permeability was modified as a consequence of barrier alteration. While the application of the jellified-water formulation after SDS treatment did not prevent the increase of LY penetration through the stratum corneum, penetration of the dye was dramatically reduced when any of the 3 A-Derma sunscreen products were applied. Quantification of the fluorescence found inside the stratum corneum confirmed that the % fluorescence/total surface was dramatically increased after SDS treatment indicative of alteration of the barrier (Fig. 33). In the conditions with treatment with the A-Derma sunscreen products, the penetration of the LY was comparable with the untreated condition. In contrast, for the condition with the jellified-water formulation, the % fluorescence/total surface was similar to that of SDS treatment alone.

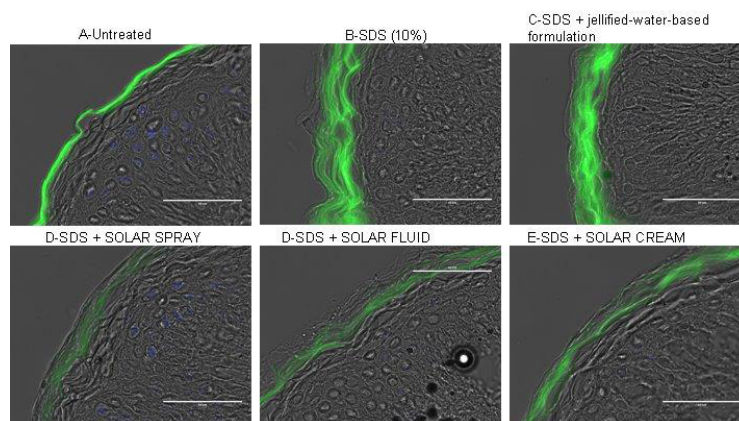


Figure 32 Lucifer yellow (LY) permeability through the stratum corneum of human skin explants. Images are representatives from the different condition assays.

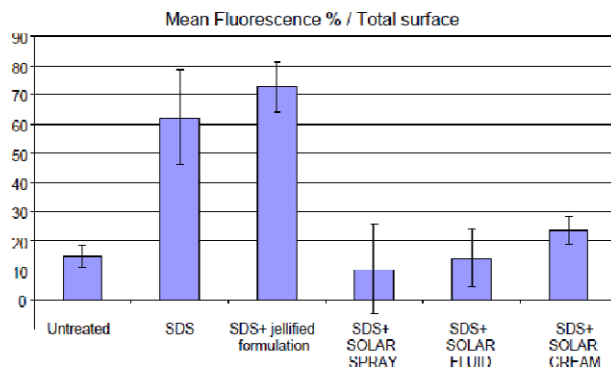


Figure 33 Quantification of LY fluorescence through the stratum corneum. Mean Fluorescence represented as % Fluorescence/total surface of the stratum corneum was calculated from images taken for the different condition assays.

Claudin-1 immunofluorescence labelling was processed on paraffin-embedded sections according to a standard protocol. The slides were mounted using Prolong with DAPI to show cell nuclei and examined using a Nikon A1 confocal microscope.

On normal human skin biopsies, claudin-1 staining was found in all suprabasal living cell layers while a very weak

intensity can be found in the basal cell layer. Its main localization was found at the cell membrane (Fig. 34a). After SDS treatment, the localization of claudin-1 was found to be profoundly altered as evidenced by a marked reduction of the labelling intensity, likely associated with disruption of the membrane staining and broader localization in the cytoplasm compartment (Fig. 34b and c). The data clearly show that claudin-1 staining was markedly altered by SDS treatment. Application of the sunscreen product A-Derma cream completely restored claudin-1 membrane staining in comparison with the untreated skin control (Fig. 34d). To a lesser extent, application of the spray and fluid products (Fig. 34d) restored claudin-1 labelling as well.

A-Derma sunscreen products containing Rhealba® Oat Plantlet Oil stimulate the neosynthesis of lipids involved in forming the lipid barrier on normal reconstructed human epidermis

We then analysed the properties of A-Derma sunscreen products in terms of strengthening or at least maintaining the lipid cement. Normal reconstructed human epidermis (RHE) were treated with A-Derma sunscreen products SP50 + (cream and fluid) or left untreated. Vitamin C 200 µg/mL applied systemi-

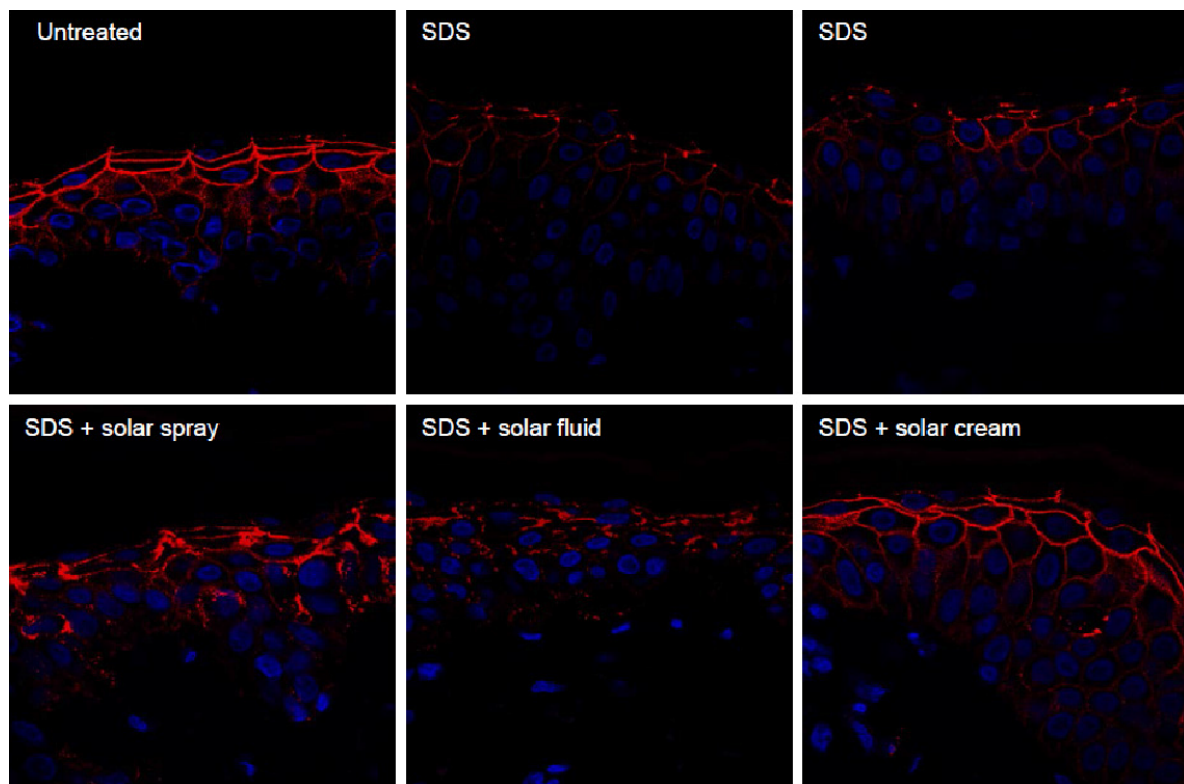


Figure 34 Immunofluorescence staining of claudin-1 (red labelling) counter-stained with Dapi (blue nuclei).

cally was used as a positive reference. A radiolabelled precursor, [14C]-acetate, was then introduced into the culture medium for 2 days. The epidermises were then placed in test medium containing no radioactive tracer for two or more days. The lipids that were neosynthesized during these 2 days of incubation would therefore have incorporated the radioactive precursor. At the end of the incubation period, the epidermal lipids were extracted and then analysed using thin-layer chromatography. Semi-quantitative densitometric analysis of the various lipid species was performed using Multigauge version 3.0 (Fujifilm). The data show that vitamin C increased the neosynthesis of polar ceramides and cerebroside, which play an important role in establishing the barrier function (Fig. 35). This result validates the test. The two A-Derma sunscreen products strongly increased the neosynthesis of sphingomyelin, phospholipids, and the group of ceramides and cerebroside. These increases were all significant (Fig. 35). All these lipids play a major role in establishing the barrier function: sphingomyelin is a precursor for ceramides, phospholipids are precursors for free fatty acids, and polar ceramides are particularly involved in forming the lipid barrier.

Both A-Derma sunscreen products also clearly stimulated the neosynthesis of cholesterol sulfate, which can be transformed into cholesterol in the stratum corneum under the influence of steroid sulfatase. Cholesterol is the third major constituent of the lipid barrier, together with ceramides and free fatty acids.

These data demonstrate that A-Derma sunscreen products containing Rhealba® Oat Plantlet Oil significantly stimulated the neosynthesis of lipids. Lipid neosynthesis stimulation helps

strengthen the lipid barrier and therefore indicates an overall improvement in the epidermal barrier function.

A-Derma sunscreen products containing Rhealba® Oat Plantlet Oil protect the mechanical properties and cohesion of human stratum corneum when exposed to UV radiation

The effect of sunscreen UV on the natural mechanical barrier function of the skin is still not completely understood but it is clear that the stratum corneum (SC), as the first line of defence against sunscreen UV radiations, is an essential actor in maintaining the integrity of the mechanical properties of the skin. It has been shown that UV exposure has marked effects on mechanical integrity of the SC and corneocyte cohesion.^{222,223} These studies suggest that fragile skin with weakened-barrier function should be highly susceptible to severe skin damage after UV exposure.

In a model for measuring the mechanical properties of the SC developed by RH Dauskardt (Stanford University, CA) based on a delamination testing protocol (Fig. 36), we applied a formulation containing sunscreen (SP50 +) with 0.1% Rhealba® Oat Plantlet Oil before exposure to UV radiation. Controls included untreated SC ± UV radiation, the placebo formulation (no sunscreen no Rhealba® Oat Plantlet Oil) and the sunscreen formulation-treated SC without UV radiation. As expected, UV radiation was found to significantly alter cohesion within the SC leading to a marked decrease in the energy required for the successive delaminating procedures (Fig. 37a). In contrast, treat-

Treatment	Sphingomyelins					Phosphoglycerides					Cholesterol sulfate				
	Relative Intensity (AU)	Mean (AU)	% Control (%)	sem (%)	p ⁽¹⁾	Relative Intensity (AU)	Mean (AU)	% Control (%)	sem (%)	p ⁽¹⁾	Relative Intensity (AU)	Mean (AU)	% Control (%)	sem (%)	p ⁽¹⁾
Control	33616		100	3	-	47453		100	1	-	19123		100	3	-
	34728	35155				47446	47949				20125	20202			
	37120					48948					21359				
Vitamin C	43179		111	6	ns	54150		98	8	ns	23051		104	6	ns
	37443	38937				44850	47082				20404	20910			
	36189					42246					19275				
SOLAR PRODUCT-Fluid	78034		229	4	***	103630		221	5	***	34271		191	12	**
	80416	80544				103904	106009				39053	38625			
	83182					110493					42550				
SOLAR PRODUCT-Cream	89506		233	13	***	122745		241	9	***	43978		207	6	***
	82084	81956				116536	115690				39728	41826			
	74279					107788					41771				

Treatment	Ceramide and cerebroside (series 1, polar lipids)					Ceramide and cerebroside (series 2, slightly polar lipids)				
	Relative (AU)	Mean (AU)	% Control (%)	sem (%)	p ⁽¹⁾	Relative (AU)	Mean (AU)	% Control (%)	sem (%)	p ⁽¹⁾
Control	50857		100	6	-	228942		100	0	-
	56489	56933				231026	229675			
	63452					229058				
Vitamin C	87559		164	3	***	287032		106	5	ns
	81760	93642				237402	244587			
	81606					229325				
SOLAR PRODUCT-Fluid	134895		215	15	**	373531		181	11	**
	124803	122122				411911	414870			
	106688					459187				
SOLAR PRODUCT-Cream	123082		186	22	*	427832		181	5	***
	112772	105818				392325	416224			
	81600					426418				

(1) - Threshold for statistical significance
 ns : > 0.05, Not significant
 * : 0.01 to 0.05, Significant
 ** : 0.001 to 0.01, Very significant
 *** : < 0.001, Extremely significant

Figure 35 Neosynthesis of the phospholipids and sphingolipids species. After semi-quantification of the chromatography plates, the relative quantity of lipids compared to the control (untreated RHE) was recorded.

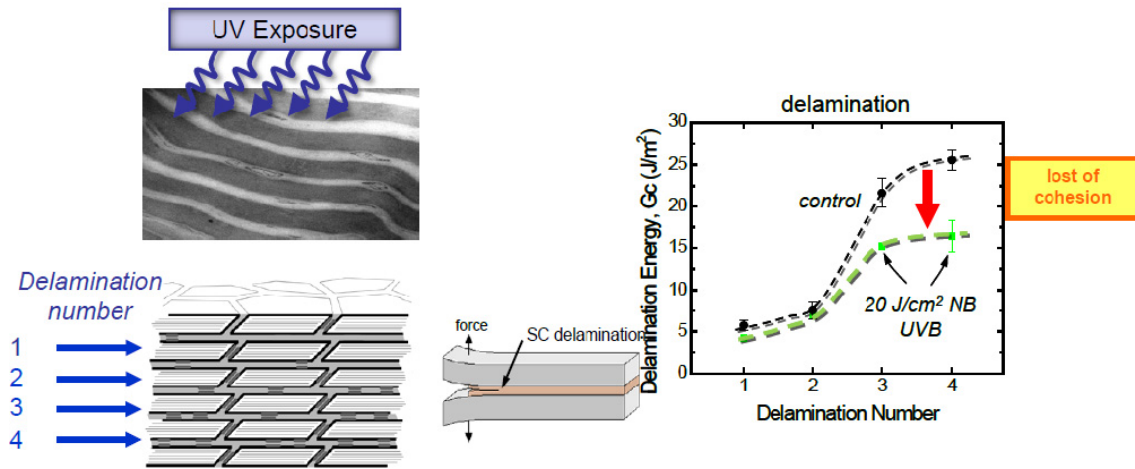


Figure 36 Schematic representation of the delamination model protocol established by K. Biniek and Reinhold Dauskardt (Stanford university, CA). Cohesion force was recorded from three successive delamination processes.

ment with the sunscreen product protects the SC from UV damage (Fig. 37b): loss of cohesion was prevented as the delamination energy is identical to conditions with no UV (i.e. sunscreen product-treated-SC, no UV and placebo formulation, no UV). Thus, these data demonstrate that barrier integrity of the SC was preserved from UV-induced alteration when the sunscreen product was applied before UV radiation.

Conclusion

Altogether our data demonstrate that A-Derma sunscreen products containing Rhealba[®] Oat Plantlet Oil help strengthen barrier function of the skin. They could prevent efficiently the fragile skins from aggravations when exposed to stressors such as UV.

Rhealba Oat efficacy: focus on anti-inflammatory properties

M.F. Aries

Pierre Fabre Dermo-Cosmétique, Pierre Fabre Research and Development Center, Pharmacology division, Toulouse, France

Modulation of endothelial cell nitric oxide synthase

During cutaneous inflammatory diseases, the neuro-immuno-cutaneous system is impaired. In atopic dermatitis pathology, a perturbation of neuromediators release such as substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP) and bradykinin (BK) could be in part involved in the neurogenic inflammatory

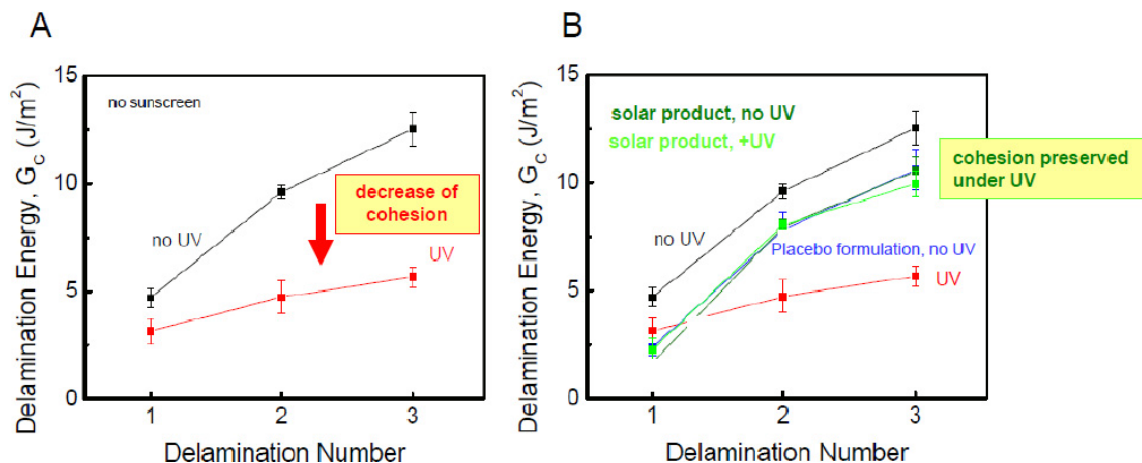


Figure 37 Plot graphs of delamination tests recorded from the different condition assays. (a) Delamination force was decreased after UV radiation. (b) Delamination force recordings with the sunscreen product-treatments were equivalent (no UV & UV).

state;^{224–229} both of these peptides identified in human skin are potent inducers of vasodilatation and may induce pruritus. Endothelial-dependent vasodilatation of blood vessels is mediated, at least in part, by Nitric Oxide (NO). NO, considered as a major intra- and intercellular messenger, is a radical generated by Nitric Oxide Synthases (NOS) enzymes identified in several cell types in the skin. Three isoforms of NOS have been identified, including a constitutively expressed endothelial cell NOS (eNOS). NO displaying vasodilator properties, is constitutively released and can also be synthesized in response to inflammatory mediators such as neuropeptides.

The anti-inflammatory activity of *Avena Rhealba* oat meal was evaluated on the neurogenic inflammation induced by SP on eNOS mRNA expression in endothelial cells. Endothelial cells were preincubated with different concentrations of *Avena Rhealba* roasting extract or alcoholic extract (10, 30, 50 µg/mL) for 24 h, and then stimulated by 10pM SP for 1h.

According to our RT-PCR studies, human endothelial cells incubated with SP showed a significant stimulation (+18%) on transcriptional level of the eNOS gene. *Avena Rhealba* significantly inhibited this SP-induced expression of eNOS: alcoholic extract activity was dose-dependent and reached 34% of inhibition for 50 µg/mL concentration; roasting extract exhibited 28% of inhibition for 10 µg/ml concentration. *Avena Rhealba* alcoholic extract showed more interesting capacities to inhibit the significant 10pM SP induction of eNOS mRNA expression.(Fig. 38)

Nitric oxide (NO) is a multifunctional signalling molecule and play an important role in human skin; it's a potent mediator of endothelium-dependent vasodilatation and is released by human endothelial cells, constitutively and in response to vasodilator neuropeptides; its synthesis is catalysed by the constitutively expressed enzyme endothelial nitric oxide synthase

(eNOS); its involvement in various cutaneous inflammatory diseases is strongly suggested. In this study, we have demonstrated the induction of eNOS mRNA expression by Substance P and the modulation of this response by *Avena Rhealba* extracts. Our results show the regulator properties of *Avena Rhealba* with respect to neurogenic inflammatory response showing, therefore, a real interest of *Avena Rhealba* in atopic dermatitis inflammatory pathology.

Activity on cutaneous wound healing process

Cutaneous wound healing is a dynamic process that involves a well-orchestrated complex series of cellular, molecular and biochemical events normally resulting in the restoration of structural integrity and functional properties of the damaged tissue. Growth factors synthesized by cells present in the wound form a dense communication network which connects and coordinates cell proliferation, protein synthesis and cell migration involved in the healing process. Successful healing and reorganization of the scars depend on such regulatory sequence of molecular events that confer to the tissue their initial functional structures.

- The activity of *Avena Rhealba* roasting extract was evaluated on cellular responses involved in wound healing; three models have been investigated: the expression of the angiogenic factor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) in cultured SVK14 human keratinocytes cell line, the migratory response of HaCaT human keratinocytes cell line using the modified Boyden chambers, the contraction process of collagen lattices by human fibroblasts.

A quantity of 1 mg/mL *Avena Rhealba* roasting extract significantly increased the spontaneous production of VEGF by 40% after 24 h exposure and showed *Avena Rhealba* potential to promote wound healing through its capacity to significantly induce this angiogenic factor production VEGF (EIA Assay) Fig. 39.

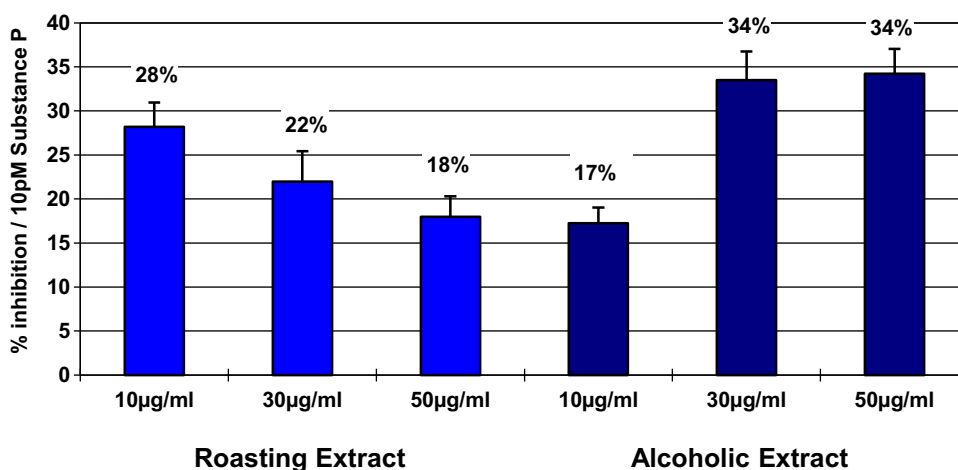


Figure 38 Substance P-induced expression of e-NOS mRNA by human endothelial cells – Rhealba® Oat extract activity.

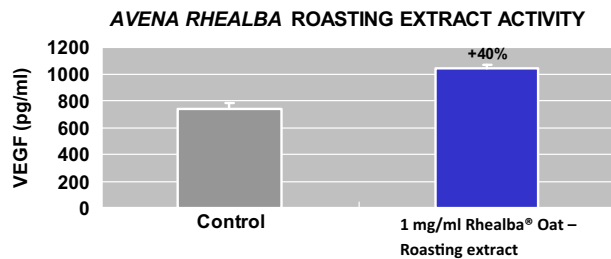


Figure 39 Angiogenic factor VEGF production – Rhealba® Oat roasting extract activity.

- The activity of *Avena Rhealba* roasting extract was evaluated on the contraction kinetics of the collagen lattices (measurement of the surface area of the dermis vs. time) in the presence of a fixed population of fibroblasts (4×10^5 cells) and compared to conditions of normal (5% FCS, Foetal Calf Serum) and low metabolic activity (1% FCS). The activity of 500 $\mu\text{g/ml}$ *Avena Rhealba* roasting extract was similar to that of the 5% FCS positive control: 51% retraction after 19 h, 65% after 27 h and 73% after 45 h. In our experimental conditions, the 1% FCS control was clearly slower than the 5% FCS control in the contraction of the collagen gel: the percentages of retraction of the derms were lower from 19 h (12% of retraction for the 1% FCS control vs. 53% for the 5% FCS control). The time lag persisted over the following days and still had not been caught up after 4 days of culture.

This significant activity shows the beneficial effect of *Avena Rhealba* on the *in vitro* organization of the extracellular matrix and its potential role in healing wounds Fig. 40.

- The migratory response of human keratinocytes cell line was evaluated using the modified Boyden chambers. The growth factor EGF (Epidermal Growth Factor, 10 ng/mL) develops chemotaxy: migration of 28 keratinocytes was counted per microscope field. In the presence of *Avena Rhealba* roasting extract, orientated migration of keratinocytes was significantly enhanced. The increase was dose-dependent: migration occurred for 30, 84 and 155 keratinocytes per field for of 100 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$, and 1 mg/mL roasting extract respectively. *Avena Rhealba* is therefore able to enhance keratinocyte migration, an important step in wound healing Fig. 41.

Avena Rhealba significantly induced VEGF production (+40% for 24 h exposition) by keratinocytes and increased keratinocytes migration (+41% for 16 h exposition); *Avena Rhealba* significantly accelerated rearrangement of collagen fibrils by fibroblasts (65% retraction after 27 h exposure). Since angiogenesis, increased vascular permeability and keratinocytes migration are a prerequisite for cutaneous wound healing and since contraction of collagen lattices is dependent of cells activities, our results demonstrate that *Avena Rhealba* is able to induce these cellular responses involved in wound healing and so to improve wound healing process both at epidermal and dermal levels.

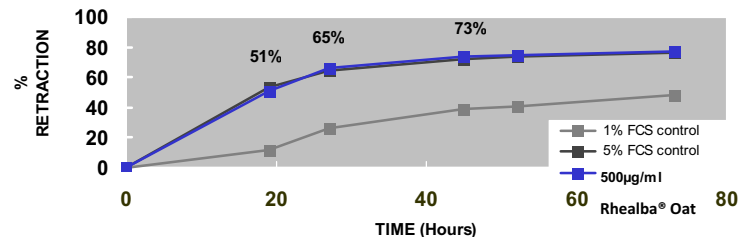


Figure 40 Contraction kinetics of collagen lattices – Rhealba® Oat roasting extract activity.

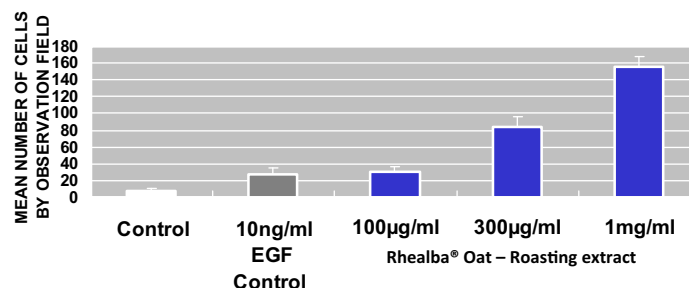


Figure 41 Keratinocyte migration – Rhealba® Oat roasting extract activity.

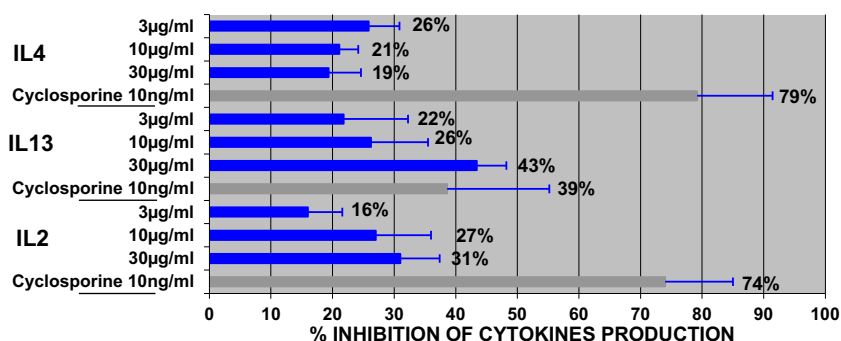


Figure 42 TH2 and TH1 cytokines production – Rhealba® Oat Plantlet extract activity.

Immunomodulatory activity

The immune mechanisms which play a central role in the pathogenesis of atopic dermatitis and other inflammatory dermatoses are centred around the activation of T lymphocytes and result from the complex interaction of several cells including keratinocytes, endothelial cells, eosinophils, Langerhans cells and T cells, as well as numerous cytokines and mediators. The both role of T-helper 1 (Th1) and Th2 cells which differ in their secretory patterns of cytokines is postulated in the disease process, albeit at different stages, and make the use of topical potent immunosuppressive agents logical therapeutic considerations.

The aim of this study was to evaluate the activity of *Avena Rhealba* extracts on immune cellular responses. Two models have been investigated: – the expression by cultured human keratinocytes cell line of the anti-inflammatory cytokine transforming growth factor β (TGF β 1) which is a potent regulator of lymphocyte regulation, plays a negative regulatory role on the development of Th2 cells and is able to induce an immune privilege, – the production by human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of interleukine 2 (Th1 cytokine) and interleukine 4 (Th2 cytokine), which are up-regulated in atopic dermatitis.

Avena Rhealba roasting extracts significantly increased TGF β 1 production by keratinocytes: +34% and +69% for 500 µg/ml and 1 mg/ml concentrations.

Avena Rhealba® Oat plantlet extract significantly down-regulated Th2 and Th1 cytokines at 3, 10 and 30 µg/ml, respectively, 26%, 21%, 19% for IL4 production, 15%, 17%, 5% for IL5 production, 22%, 26%, 43% for IL13 production, and 16%, 27%, 31% for CD4 + cells IL2 level ($P < 0.001$). Fig. 42

Our results demonstrate that *Avena Rhealba* extracts are potent regulator of immune responses and suggest that *Avena Rhealba* topical preparations could be able to improve atopic dermatitis disease.

References

- 1 Haftek M, Coutanceau C, Taïeb C. Epidemiology of “fragile skin”: results from a survey of different skin types. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2013; **6**: 289–294. doi:10.2147/CCID.S55223.

- 2 Stalder JF, Tennstedt D, Deleuran M *et al.* Fragility of epidermis and its consequence in dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014; **28** (Suppl 4): 1–18.
- 3 Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J Cell Biol* 1998; **141**: 1277–1286.
- 4 Park AC, Phillips CL, Pfeiffer FM *et al.* Homozygosity and heterozygosity for null Col5a2 alleles produce embryonic lethality and a novel classic Ehlers-Danlos Syndrome-related phenotype. *Am J Pathol* 2015; **185**: 2000–2011. doi:10.1016/j.ajpath.2015.03.022.
- 5 Carulli S, Contin R, De Rosa L, Pellegrini G, De Luca M. The long and winding road that leads to a cure for epidermolysis bullosa. *Regen Med* 2013; **8**: 467–481. doi:10.2217/rme.13.33.
- 6 Wenzel D, Bayerl J, Nyström A, Bruckner-Tuderman L, Meixner A, Penninger JM. Genetically corrected iPSCs as cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Sci Transl Med* 2014; **6**: 264ra165. doi: 10.1126/scitranslmed.3010083.
- 7 Al-Himdani S, Ud-Din S, Gilmore S, Bayat A. Striae distensae: a comprehensive review and evidence-based evaluation of prophylaxis and treatment. *Br J Dermatol* 2014; **170**: 527–547. doi:10.1111/bjd.12681.
- 8 Calleja-Agius J, Brincat M, Borg M. Skin connective tissue and ageing. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2013; **27**: 727–740. doi:10.1016/j.bpobgyn.2013.06.004.
- 9 Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 1991; **54**(6 Suppl): 1135S–1140S.
- 10 Schumann H, Kiritsi D, Pigors M *et al.* Phenotypic spectrum of epidermolysis bullosa associated with $\alpha 6\beta 4$ integrin mutations. *Br J Dermatol* 2013; **169**: 115–124. doi:10.1111/bjd.12317.
- 11 Whittock NV, Haftek M, Angoulvant N *et al.* Genomic amplification of the human plakophilin 1 gene (PKP1) and detection of a new mutation in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *J Invest Dermatol* 2000; **115**: 368–374.
- 12 Whittock NV, Wan H, Morley SM *et al.* Compound heterozygosity for non-sense and mis-sense mutations in desmoplakin underlies skin fragility/woolly hair syndrome. *J Invest Dermatol* 2002; **118**: 232–238.
- 13 Seltmann K, Cheng F, Wiche G, Eriksson JE, Magin TM. Keratins stabilize hemidesmosomes through regulation of $\beta 4$ -integrin turnover. *J Invest Dermatol.* 2015; **135**: 1609–1620. doi:10.1038/jid.2015.46.
- 14 Coulombe PA, Lee CH. Defining keratin protein function in skin epithelia: epidermolysis bullosa simplex and its aftermath. *J Invest Dermatol.* 2012; **132**(3 Pt 2): 763–775. doi:10.1038/jid.2011.450.
- 15 Chamcheu JC, Siddiqui IA, Syed DN, Adhami VM, Liovic M, Mukhtar H. Keratin gene mutations in disorders of human skin and its appendages. *Arch Biochem Biophys* 2011; **508**: 123–137. doi:10.1016/j.abb.2010.12.019.

- 16 Stanley JR, Amagai M. Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. *N Engl J Med* 2006; **355**: 1800–1810.
- 17 Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P et al. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology* 2004; **127**: 1386–1390.
- 18 Shull GE, Miller ML, Prasad V. Secretory pathway stress responses as possible mechanisms of disease involving Golgi Ca²⁺ pump dysfunction. *BioFactors* 2011; **37**: 150–158.
- 19 Gedicke MM, Traupe H, Fischer B, Tinschert S, Hennies HC. Towards characterization of palmoplantar keratoderma caused by gain-of-function mutation in lorincrin: analysis of a family and review of the literature. *Br J Dermatol* 2006; **154**: 167–171.
- 20 Kiritsi D, Cosgarea I, Franzke CW et al. Acral peeling skin syndrome with TGM5 gene mutations may resemble epidermolysis bullosa simplex in young individuals. *J Invest Dermatol* 2010; **130**: 1741–1746. doi:10.1038/jid.2010.23.
- 21 Oji V, Eckl KM, Aufenvenne K et al. Loss of corneodesmosin leads to severe skin barrier defect, pruritus, and atopy: unraveling the peeling skin disease. *Am J Hum Genet* 2010; **87**: 274–281. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.07.005
- 22 Jonca N, Guerrin M, Hadjiolova K et al. Corneodesmosin, a component of epidermal corneocyte desmosomes, displays homophilic adhesive properties. *J Biol Chem* 2002; **277**: 5024–5029.
- 23 Blaydon DC, Nitou D, Eckl KM et al. Mutations in CSTA, encoding Cystatin A, underlie exfoliative ichthyosis and reveal a role for this protease inhibitor in cell-cell adhesion. *Am J Hum Genet* 2011; **89**: 564–571. doi:10.1016/j.ajhg.2011.09.001.
- 24 Fortugno P, Furio L, Teson M et al. The 420K LEKTI variant alters LEKTI proteolytic activation and results in protease deregulation: implications for atopic dermatitis. *Hum Mol Genet* 2012; **21**: 4187–4200.
- 25 Horner ME, Alikhan A, Tintle S, Tortorelli S, Davis DM, Hand JL. Cutaneous porphyrias part I: epidemiology, pathogenesis, presentation, diagnosis, and histopathology. *Int J Dermatol* 2013; **52**: 1464–1480. doi:10.1111/ijd.12305.
- 26 Lasry I, Seo YA, Ityel H et al. A dominant negative heterozygous G87R mutation in the zinc transporter, ZnT-2 (SLC30A2), results in transient neonatal zinc deficiency. *J Biol Chem* 2012; **287**: 29348–29361. doi:10.1074/jbc.M112.368159.
- 27 Elias PM, Brown BE, Ziboh VA. The permeability barrier in essential fatty acid deficiency: evidence for a direct role for linoleic acid in barrier function. *J Invest Dermatol*. 1980; **74**: 230–233.
- 28 Schwartz RA, McDonough PH, Lee BW. Toxic epidermal necrolysis: Part I. Introduction, history, classification, clinical features, systemic manifestations, etiology, and immunopathogenesis. *J Am Acad Dermatol* 2013; **69**: 173. e1-13.
- 29 Hanakawa Y, Stanley JR. Mechanisms of blister formation by staphylococcal toxins. *J Biochem* 2004; **136**: 747–750.
- 30 Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2008; **358**: 1483–1494. doi:10.1056/NEJMra074081.
- 31 Schuijs MJ, Willart MA, Vergote K et al. Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science* 2015; **349**: 1106–1110.
- 32 McAleer MA, Irvine AD. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **131**: 280–291.
- 33 Nishifuji K, Yoon JS. The stratum corneum: the rampart of the mammalian body. *Vet Dermatol* 2013; **24**: 60–72.
- 34 Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol* 2012; **30**: 257–262.
- 35 Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 2008; **17**: 1063–1072.
- 36 Brandner JM, Haftek M, Niessen CM. Adherens junctions, desmosomes and tight junctions in epidermal barrier function. *The Open Dermatology Journal* 2010; **4**: 14–20.
- 37 Haftek M, Callejon S, Sandjeu Y et al. Compartmentalization of the human stratum corneum by persistent tight junction-like structures. *Exp Dermatol* 2011; **20**: 617–621.
- 38 Haftek M, Teillon MH, Schmitt D. Stratum corneum, corneodesmosomes and *ex vivo* percutaneous penetration. *Microsc Res Tech* 1998; **43**: 242–249.
- 39 Kirschner N, Brandner JM. Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Ann N Y Acad Sci* 2012; **1257**: 158–166.
- 40 Del Rosso JQ, Levin J. The clinical relevance of maintaining the functional integrity of the stratum corneum in both healthy and disease-affected skin. *J Clin Aesthet Dermatol* 2011; **4**: 22–42.
- 41 Humbert P. Functional consequences of perturbation of cutaneous lipids. *Pathol Biol (Paris)* 2003; **51**: 271–274.
- 42 Elias PM, Feingold KR, Fluhr JW. Skin as an organ of protection. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI (eds), 6th edn, Mc-Graw Hill: New York, 2003; pages 107–118.
- 43 Schindler CA, Mikhailov TA, Kuhn EM et al. Protecting fragile skin: nursing interventions to decrease development of pressure ulcers in pediatric intensive care. *Am J Crit Care* 2011; **20**: 26–34.
- 44 Elias PM, Eichenfield LF, Fowler JF Jr, Horowitz P, McLeod RP. Update on the structure and function of the skin barrier: atopic dermatitis as an exemplar of clinical implications. *Semin Cutan Med Surg* 2013; **32**(2 Suppl 2): S21–S24.
- 45 Eichenfield LF, Elias PM, Fowler JF Jr, Horowitz P, McLeod RP. Understanding skin barrier differences: a demographic, cultural, and medical diversity viewpoint. *Semin Cutan Med Surg* 2013; **32**(2 Suppl 2): S16–S20.
- 46 McLeod RP, Elias PM, Eichenfield LF, Fowler JF Jr, Horowitz P. A lifetime of well skin care: practical recommendations for clinicians and patients. *Semin Cutan Med Surg* 2013; **32**(2 Suppl 2): S28–S29.
- 47 Poumay Y, Coquette A. Modelling the human epidermis *in vitro*: tools for basic and applied research. *Arch Dermatol Res* 2007; **298**: 361–369.
- 48 Mandeau A, Aries MF, Boé JF et al. Rhealba® oat plantlet extract: evidence of protein-free content and assessment of regulatory activity on immune inflammatory mediators. *Planta Med* 2011; **77**: 900–906.
- 49 Tupker RA, Willis C, Berardesca E et al. Guidelines on sodium lauryl sulfate (SDS) exposure tests. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis* 1997; **37**: 53–69.
- 50 Sugawara T, Iwamoto N, Akashi M et al. Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice. *J Dermatol Sci* 2013; **70**: 12–18.
- 51 Furuse M, Hata M, Furuse K et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 2002; **156**: 1099–1111.
- 52 Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetics products. Official Journal of the European Union. 2009.
- 53 Blume-Peytavi U, Hauser M, Stamatias GN, Pathirana D, Garcia Bartels N. Skin care practices for newborns and infants: review of the clinical evidence for best practices. *Pediatr Dermatol* 2012; **29**: 1–14.
- 54 Evans NRN. Development of the epidermis in the newborn. *Biol Neonate* 1986; **49**: 74–80.
- 55 Blume-Peytavi U, Cork MJ, Faergemann J, Szczapa J, Vanaclocha F, Gelmetti C. Bathing and cleansing in newborns from day 1 to first year of life: recommendations from a European round table meeting JEADV. *JEADV* 2009; **23**: 751–759.
- 56 Fluhr JW, Darlenski R, Taieb A et al. Functional skin adaptation in infancy—almost complete but not fully competent. *Exp Dermatol* 2010; **19**: 483–492.
- 57 Kalia YN, Nonato LB, Lund CH, Guy RH. Development of skin barrier function in premature infants. *J Invest Dermatol*. 1998; **111**: 320–326.

- 58 Telofski LS, Morello AP 3rd, Mack Correa MC, Stamatas GN. The Infant Skin Barrier: Can We Preserve, Protect, and Enhance the Barrier? *Dermatol Res Pract*. 2012; **2012**: 198789.
- 59 Stamatas GN, Nikolovski J, Mack MC, Kollias N. Infant skin physiology and development during the first years of life: a review of recent findings based on *in vivo* studies. *Int J Cos Sci*. 2011; **33**: 17–24.
- 60 Garcia BN, Mleczo A, Schink T, Proquitt H, Wauer RR, Blume-Peytavi U. Influence of bathing or washing on skin barrier function in newborns during the first four weeks of life. *Skin Pharmacol Physiol*. 2009; **22**: 248–257.
- 61 Garcia BN, Scheufele R, Prosch F *et al*. Effect of standardized skin care regimens on neonatal skin barrier function in different body areas. *Pediatr Dermatol* 2010; **27**: 1–8.
- 62 Hoeger PH, Enzmann CC. Skin physiology of the neonate and young infant: a prospective study of functional skin parameters during early infancy. *Pediatr Dermatol* 2002; **19**: 256–262.
- 63 Visscher MO, Chatterjee R, Munson KA, Pickens WL, Hoath SB. Changes in diapered and nondiapered infant skin over the first month of life. *Pediatr Dermatol* 2000; **17**: 45–51.
- 64 Nikolovski J, Stamatas G, Kollias N, Wiegand BC. Barrier function and water-holding and transport properties of infant stratum corneum are different from adult and continue to develop through the first year of life. *J Invest Dermatol*. 2008; **128**: 1728–1736.
- 65 Giusti F, Martella A, Bertoni L, Seidenari S. Skin barrier, hydration, and pH of the skin of infants under 2 years of age. *Pediatr Dermatol* 2001; **18**: 93–96.
- 66 Trojahn C, Dobos G, Schario M, Ludriksone L, Blume-Peytavi U, Kottner J. Relation between skin micro-topography, roughness, and skin age. *Skin Res Technol* 2015; **21**: 69–75.
- 67 Ludriksone L, Garcia Bartels N, Kanti V, Blume-Peytavi U, Kottner J. Skin barrier function in infancy: a systematic review. *Arch Dermatol Res* 2014; **306**: 591–599.
- 68 Yosipovitch G, Maayan-Metzger A, Merlob P, Sirota L. Skin barrier properties in different body areas in neonates. *Pediatrics* 2000; **106**: 105–108.
- 69 Garcia BN, Massoudy L, Scheufele R *et al*. Standardized diaper care regimen: a prospective, randomized pilot study on skin barrier function and epidermal IL-1 α in newborns. *Pediatr Dermatol* 2012; **29**: 270–276.
- 70 Capone KA, Dowd SE, Stamatas GN, Nikolovski J. Diversity of the human skin microbiome early in life. *J Invest Dermatol*. 2011; **131**: 2026–2032.
- 71 Wanke I, Steffen H, Christ C *et al*. Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways. *J Invest Dermatol*. 2011; **131**: 382–390.
- 72 Garcia BN, Lunnemann L, Strouf A, Kottner J, Serrano J, Blume-Peytavi U. Effect of diaper cream and wet wipes on skin barrier properties in infants: a prospective randomized controlled trial. *Pediatr Dermatol* 2014; **31**: 683–691.
- 73 Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD *et al*. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 2004; **113**: 651–657.
- 74 Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; **347**: 911–920.
- 75 Endara P, Vaca M, Chico ME *et al*. Long-term periodic anthelmintic treatments are associated with increased allergen skin reactivity. *Clin Exp Allergy* 2010; **40**: 1669–1677.
- 76 Madison KC. Barrier function of the skin: “la raison d’être” of the epidermis. *J Invest Dermatol* 2003; **121**: 231–241.
- 77 Kelleher M, Dunn-Galvin A, Hourihane JO *et al*. Skin barrier dysfunction measured by transepidermal water loss at 2 days and 2 months pre-dates and predicts atopic dermatitis at 1 year. *J Allergy Clin Immunol* 2015; **135**: 930–935.
- 78 Boralevi F, Hubiche T, Léauté-Labrèze C *et al*. Epicutaneous aeroallergen sensitization in atopic dermatitis infants - determining the role of epidermal barrier impairment. *Allergy* 2008; **63**: 205–210.
- 79 Ezzedine K, Droitcourt C, Ged C *et al*. Usefulness of a global clinical ichthyosis vulgaris scoring system for predicting common FLG null mutations in an adult caucasian population. *Br J Dermatol* 2012; **167**: 1165–1169.
- 80 De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY *et al*. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2011; **127**: 773–786.
- 81 Novak N. New insights into the mechanism and management of allergic diseases: atopic dermatitis. *Allergy* 2009; **64**: 265–275.
- 82 Grimalt R, Ménégaud V, Cambazard F *et al*. The steroid-sparing effect of an emollient therapy in infants with atopic dermatitis: a randomized controlled study. *Dermatology* 2007; **214**: 61–67.
- 83 Boralevi F, Saint Aroman M, Delarue A *et al*. Long-term emollient therapy improves xerosis in children with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014; **28**: 1456–1462.
- 84 Gelmetti C, Boralevi F, Seité S *et al*. Quality of life of parents living with a child suffering from atopic dermatitis before and after a 3-month treatment with an emollient. *Pediatr Dermatol* 2012; **29**: 714–718.
- 85 Simpson EL, Berry TM, Brown PA *et al*. A pilot study of emollient therapy for the primary prevention of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2010; **63**: 587–593.
- 86 Horimukai K, Morita K, Narita M *et al*. Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **134**: 824–830.
- 87 Sears MR, Holdway MD, Flannery EM, Herbison GP, Silva PA. Parental and neonatal risk factors for atopy, airway hyper-responsiveness, and asthma. *Arch Dis Child* 1996; **75**: 392–398.
- 88 Portelli MA, Hodge E, Sayers I. Genetic risk factors for the development of allergic disease identified by genome-wide association. *Clin Exp Allergy* 2015; **45**: 21–31.
- 89 Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006; **38**: 441–444.
- 90 Katsambas AD, Katoulis AC, Stavropoulos P. Acne neonatorum: a study of 22 cases. *Int J Dermatol* 1999; **38**: 128–130.
- 91 Yamamoto A, Takenouchi K, Ito M. Impaired water barrier function in acne vulgaris. *Arch Dermatol Res* 1995; **287**: 214–218.
- 92 Jones DC. Social comparison and body image: attractiveness comparisons to models and peers among adolescent girls and boys. *Sex Roles* 2001; **45**: 645–664.
- 93 Strauss RP, Ramsey BL, Edwards TC *et al*. Stigma experiences in youth with facial differences: a multi-site study of adolescents and their mothers. *Orthod Craniofac Res* 2007; **10**: 96–103.
- 94 Cash TF. Developmental teasing about physical appearance: retrospective descriptions and relationships with body image. *Soc Behav Personal* 1995; **23**: 123–130.
- 95 Vos T, Flaxman AD, Naghavi M *et al*. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; **380**: 2163–2196.
- 96 Hay RJ, Johns NE, Williams HC *et al*. The Global Burden of Skin Disease in 2010: An Analysis of the Prevalence and Impact of Skin Conditions. *J Invest Dermatol* 2014; **134**: 1527–1534.
- 97 Shen Y, Wang T, Zhou C *et al*. Prevalence of acne vulgaris in Chinese adolescents and adults: a community-based study of 17,345 subjects in six cities. *Acta Derm Venereol* 2012; **92**: 40–44.
- 98 Augustin M, Herberger K, Hintzen S *et al*. Prevalence of skin lesions and need for treatment in a cohort of 90 880 workers. *Br J Dermatol* 2011; **165**: 865–873.
- 99 Lucky AW, Biro FM, Huster GA *et al*. Acne vulgaris in early adolescent boys. Correlations with pubertal maturation and age. *Arch Dermatol* 1991; **127**: 210–216.
- 100 Lucky AW, Biro FM, Huster GA *et al*. Acne vulgaris in premenarchal girls. An early sign of puberty associated with rising levels of dehydroepiandrosterone. *Arch Dermatol* 1994; **130**: 308–314.

- 101 Thiboutot D, Gollnick H, Bettoli V *et al.* New insights into the management of acne: an update from the Global Alliance to Improve Outcomes in Acne group. *J Am Acad Dermatol* 2009; **60**(5 Suppl): S1–S50.
- 102 Johansson EK, Ballardini N, Bergström A, Kull I, Wahlgren CF. Atopic and non-atopic eczema in adolescence: is there a difference? *Br J Dermatol* 2015; **173**(4): 962–8. doi:10.1111/bjd.13901.
- 103 Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y *et al.* Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2009; **129**: 1892–1908.
- 104 Horimukai K, Morita K, Narita M *et al.* Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2014; **134**: 824–830.
- 105 Poskitt L, Wilkinson JD. Natural history of keratosis pilaris. *Br J Dermatol* 1994; **130**: 711–713.
- 106 Augustine M, Jayaseelan E. Erythromelanosis follicularis faciei et colli: relationship with keratosis pilaris. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2008; **74**: 47–49.
- 107 Drolet B, Paller AS. Childhood Rosacea. *Pediatr Dermatol* 1992; **9**: 22–26.
- 108 Bamford JT, Gessert CE, Renier CM *et al.* Childhood stye and adult rosacea. *J Am Acad Dermatol* 2006; **55**: 951–955.
- 109 Chamailard M, Mortemousque B, Boralevi F *et al.* Cutaneous and ocular signs of childhood rosacea. *Arch Dermatol* 2008; **144**: 167–171.
- 110 Two AM, Wu W, Gallo RL, Hata TR. Rosacea: part I. Introduction, categorization, histology, pathogenesis, and risk factors. *J Am Acad Dermatol* 2015; **72**: 749–758.
- 111 Steinhoff M, Schaubert J, Leyden JJ. New insights into rosacea pathophysiology: a review of recent findings. *J Am Acad Dermatol* 2013; **69**(6 Suppl 1): S15–S26.
- 112 Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A *et al.* Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat Med* 2007; **13**: 975–980.
- 113 Graepel R, Fernandes ES, Aubdool AA, Andersson DA, Bevan S, Brain SD. 4-oxo-2-nonenal (4-ONE): evidence of transient receptor potential ankyrin 1-dependent and -independent nociceptive and vasoactive responses *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; **337**: 117–124.
- 114 Sulk M, Seeliger S, Aubert J *et al.* Distribution and expression of non-neuronal transient receptor potential (TRPV) ion channels in rosacea. *J Invest Dermatol* 2012; **132**: 1253–1262.
- 115 Lonne-Rahm SB, Fischer T, Berg M. Stinging and Rosacea. *Acta Derm Venereol* 1999; **79**: 460–461.
- 116 Wilkin J, Dahl M, Detmar M *et al.* Standard classification system of rosacea: report of the National Rosacea Society Expert Committee on the classification and staging of Rosacea. *J Am Acad Dermatol* 2002; **46**: 584–587.
- 117 Yamamoto A, Takenouchi K, Ito M. Impaired water barrier function in acne vulgaris. *Arch Dermatol Res* 1995; **287**: 214–218.
- 118 Darlenski R, Kazandjieva J, Tsankov N, Fluhr JW. Acute irritant threshold correlates with barrier function, skin hydration and contact hypersensitivity in atopic dermatitis and rosacea. *Exp Dermatol* 2013; **22**: 752–753.
- 119 Dirschka T, Tronnier H, Folster-Holst R. Epithelial barrier function and atopic diathesis in rosacea and perioral dermatitis. *Br J Dermatol* 2004; **150**: 1136–1141.
- 120 Veien NK, Hattel T, Laurberg G. Hand eczema: causes, course and prognosis. *Contact Dermatitis* 2008; **58**: 330–334.
- 121 Halioua B, Bensefa-Colas L, Bouquiaux B *et al.* Occupational contact dermatitis in 10,582 French patients reported between 2004 and 2007: a descriptive study. *Dermatology* 2012; **225**: 354–363.
- 122 Diepgen TL, Andersen KE, Brandao FM *et al.* Hand eczema classification: a cross-sectional, multicentre study of aetiology and morphology of hand eczema. *Br J Dermatol* 2009; **160**: 353–358.
- 123 Halioua B, Richard MA. Update on chronic hand eczema. *Ann Dermatol Venereol*. 2010; **137**: 315–327.
- 124 Lachapelle JM. La main: quelques caractéristiques anatomo-cliniques actualisées et leur implication en pathologie. *Nouv Dermatol* 2013; **32** (Suppl.3): 5–9.
- 125 Lachapelle JM. Certains eczemas des mains gardent-ils leur secret?. *Nouv Dermatol* 2013; **32**(Suppl.3): 11–14.
- 126 Tennstedt D. Le monde des dysidroses. In: Progrès en dermatologie-allergologie, Lyon 2013. John Libbey Eurotext, 2013: 117–127.
- 127 Le Coz CJ. Hand eczema and occupational disorders. *Ann Dermatol Venereol* 2010; **137**(Suppl 3): S104–S110.
- 128 Heal CF1, Buettner PG, Drobetz H. Risk factors for surgical site infection after dermatological surgery. *Int J Dermatol* 2012; **51**: 796–803.
- 129 Bauer BS, Few JW, Chavez CD, Galiano RD. The role of tissue expansion in the management of large congenital pigmented nevi of the forehead in the pediatric patient. *Plast Reconstr Surg* 2001; **107**: 668–675.
- 130 Neale HW1, Kurtzman LC, Goh KB, Billmire DA, Yakuboff KP, Warden G. Tissue expanders in the lower face and anterior neck in pediatric burn patients: limitations and pitfalls. *Plast Reconstr Surg* 1993; **91**: 624–631.
- 131 Tempark T, Wu T, Singer C, Shwayder T. Dermatological complications of circumcision: lesson learned from cases in a pediatric dermatology practice. *Pediatr Dermatol* 2013; **30**: 519–528.
- 132 Mann JA *et al.* Update on pediatric dermatologic surgery from tots to teens. *Curr Opin Pediatr* 2014; **26**: 452–459.
- 133 Pittaway AJ. Pediatric dermatologic procedures performed outside the operating room. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2012; **25**: 498–500.
- 134 Hoetzenecker W1, Guenova E, Krug M *et al.* Parental anxiety and concern for children undergoing dermatological surgery. *J Dermatolog Treat*. 2014; **25**: 367–370.
- 135 Cousin-Verhoest S, Heusse JL, Verhoest G, Aillet S, Watier E. Surgical excision of giant congenital naevi: how far can we go with surgery? *Ann Chir Plast Esthet* 2012; **57**: 177–182.
- 136 Cervelli V1, De Angelis B, Spallone D, Lucarini L, Arpino A, Balzani A. Use of a novel autologous cell-harvesting device to promote epithelialization and enhance appropriate pigmentation in scar reconstruction. *Clin Exp Dermatol* 2010; **35**: 776–780.
- 137 Yeo LF1, Eichenfield LF, Chan YC. Skin surgery in children: local anaesthesia and sedation techniques. *Expert Opin Pharmacother* 2007; **8**: 317–327.
- 138 Dinulos JG. Cosmetic procedures in children. *Curr Opin Pediatr* 2011; **23**: 395–398.
- 139 Song JY, Kang HA, Kim MY, Park YM, Kim HO. Damage and recovery of skin barrier function after glycolic acid chemical peeling and crystal microdermabrasion. *Dermatol Surg* 2004; **30**: 390–394.
- 140 Gibson L, Benson G. Origin, History, and Uses of Oat (*Avena sativa*) and Wheat (*Triticum aestivum*). 2002. Available from: http://agron-www.agron.iastate.edu/Courses/agron212/Readings/Oat_wheat_history.htm
- 141 Othman RA, Moghadasian MH, Jones PJH. Cholesterol-lowering effects of oat beta-glucan. *Nutr Rev* 2011; **69**: 299–309.
- 142 Efsa. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to beta-glucans from oats and barley. *EFSA J*. 2011; **9**: 1–21.
- 143 European Medicines Agency. Assessment Report on *Avena sativa* L., *Herba* and *Avena sativa* L., *Fructus*. 2008.
- 144 Vié K, Cours-Darne S, Vienne MP, Boyer F, Fabre B, Dupuy P. Modulating effects of oatmeal extracts in the sodium lauryl sulfate skin irritancy model. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2002; **15**: 120–124.
- 145 Boisnic S, Branchet MC, Ermosilla V. Healing effect of a spray containing Rheelba oat colloidal extract in an *in vitro* reconstitution model of skin. *Int J Tissue React Switzerland*; 2005; **27**: 83–89.
- 146 Pootongkam S, Nedorost S. Oat and wheat as contact allergens in personal care products. *Dermatitis*. 2013; **24**: 291–295.
- 147 Novak N, Bieber T, Leung DYM. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; **112**: 128–139.

- 148 Vansina S, Debilde D, Morren MA, Goossens A. Sensitizing oat extracts in cosmetic creams: Is there an alternative? *Contact Dermatitis*. 2010; **63**: 169–171.
- 149 European Commission. European Pharmacopoeia. 2014. 5849–5904 p.
- 150 Landsteiner K, Jacobs J. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. II. *J Exp Med*; The Rockefeller University Press; 1936; **64**: 625–639.
- 151 Jordan WP. Allergic contact dermatitis to simple chemicals: A molecular approach. *J Am Acad Dermatol* 1983; **8**: 575.
- 152 Rastogi SC, Lepoittevin JP, Johansen JD *et al*. Fragrances and other materials in deodorants: search for potentially sensitizing molecules using combined GC-MS and structure activity relationship (SAR) analysis. *Contact Dermatitis*. Denmark; 1998; **39**: 293–303.
- 153 Gerberick F, Aleksic M, Basketter D *et al*. Chemical reactivity measurement and the predictive identification of skin sensitizers. *The report and recommendations of ECVAM Workshop 64. Altern Lab Anim*. England; 2008; **36**: 215–242.
- 154 Gerberick GF, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, Lepoittevin J-P. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol Sci* 2004; **81**: 332–343.
- 155 Gerberick GF, Troutman JA, Foertsch LM *et al*. Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system. *Toxicol Sci* 2009; **112**: 164–174.
- 156 Organisation for Economic Cooperation and Development. OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 422C: In Chemico Skin Sensitisation Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). 2015.
- 157 Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M *et al*. Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol In Vitro* 2006; **20**: 767–773.
- 158 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*. England; 2010; **38**: 275–284.
- 159 Sakaguchi H, Ashikaga T, Miyazawa M *et al*. Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol In Vitro* 2006; **20**: 774–784.
- 160 Sakaguchi H, Ashikaga T, Miyazawa M *et al*. The relationship between CD86/CD54 expression and THP-1 cell viability in an *in vitro* skin sensitization test - Human cell line activation test (h-CLAT). *Cell Biol Toxicol* 2009; **25**: 109–126.
- 161 Sakaguchi H, Ryan C, Ovigne J-M, Schroeder KR, Ashikaga T. Predicting skin sensitization potential and inter-laboratory reproducibility of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) in the European Cosmetics Association (COLIPA) ring trials. *Toxicol In Vitro* 2010; **24**: 1810–1820.
- 162 European Commission. EURL ECVAM Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. 2015.
- 163 Aeby P, Ashikaga T, Bessou-Touya S *et al*. Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa's research and method development program. *Toxicol Vitro*. 2010; **24**: 1465–1473.
- 164 Cottrez F, Boitel E, Auriault C, Aeby P, Groux H. Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model. Development of the SENS-IS assay. *Toxicol Vitro*. 2015; **29**: 787–802.
- 165 Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* 2009; **284**: 13291–13295.
- 166 Organisation for Economic Cooperation and Development. Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429. Guideline for testing of chemicals. 2010.
- 167 Burton OT, Oettgen HC. Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases. *Immunology* 2012; **242**: 128–143.
- 168 Finkelman FD, Katona IM, Urban JF. Control of *In vivo* IgE Production in the Mouse by Interleukin 4. In: Ciba Foundation Symposium 147 - IgE, Mast Cells and the Allergic Response. John Wiley & Sons, Ltd.; 2007. p. 3–22.
- 169 Marzulli FN, Maibach HI. Contact allergy: predictive testing in man. *Contact Dermatitis*. Denmark; 1976; **2**: 1–17.
- 170 Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, Ezen-dam J. Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol*. Elsevier Inc.; 2014; **69**: 371–379.
- 171 Bauch C, Kolle SN, Ramirez T *et al*. Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012; **63**: 489–504.
- 172 Organisation for Economic Cooperation and Development. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. ENV/JM/MONO(2012)10/PART1. 2012.
- 173 Bauch C, Kolle SN, Fabian E *et al*. Intralaboratory validation of four *in vitro* assays for the prediction of the skin sensitizing potential of chemicals. *Toxicol In Vitro* 2011; **25**: 1162–1168.
- 174 Guiraud B *et al*. Characterisation of a human epidermis model reconstructed from hair follicle keratinocytes and comparison with two commercially models and native skin. *Int J Cosmet Sci* 2014; **36**: 485–493.
- 175 Slater NA, Morrell DS. Systemic therapy of childhood atopic dermatitis. *Clin Dermatol* 2015; **33**: 289–299.
- 176 Peserico A, Städtler G, Sebastian M, Fernandez RS, Vick K, Bieber T. Reduction of relapses of atopic dermatitis with methylprednisolone aceponate cream twice weekly in addition to maintenance treatment with emollient: a multicentre, randomized, double-blind, controlled study. *Br J Dermatol* 2008; **158**: 801–807.
- 177 Hanifin J, Gupta AK, Rajagopalan R. Intermittent dosing of fluticasone propionate cream for reducing the risk of relapse in atopic dermatitis patients. *Br J Dermatol* 2002; **147**: 528–537.
- 178 Thaçi D, Reitamo S, Gonzalez Ensenat MA *et al*. Proactive disease management with 0.03% tacrolimus ointment for children with atopic dermatitis: results of a randomized, multicentre, comparative study. *Br J Dermatol* 2008; **159**: 1348–1356.
- 179 Gelmetti C, Wollenberg A. Atopic dermatitis - all you can do from the outside. *Br J Dermatol* 2014; **170**(Suppl 1): 19–24.
- 180 Ong PY. Recurrent MRSA skin infections in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2014; **2**: 396–399.
- 181 Wollenberg A. Eczema herpeticum. *Chem Immunol Allergy* 2012; **96**: 89–95.
- 182 Dohil MA, Lin P, Lee J, Lucky AW, Paller AS, Eichenfield LF. The epidemiology of molluscum contagiosum in children. *J Am Acad Dermatol* 2006; **54**: 47–54.
- 183 Hanna D, Hatami A, Powell J *et al*. A prospective randomized trial comparing the efficacy and adverse effects of four recognized treatments of molluscum contagiosum in children. *Pediatr Dermatol* 2006; **23**: 574–579.
- 184 Smithard A, Glazebrook C, Williams H.C. Acne prevalence, knowledge about acne and psychological morbidity in mid-adolescence: a community-based study. *Br J Dermatol* 2001; **145**: 274–279.
- 185 Kilkenny M, Merlin K, Plunkett A, Marks R. The prevalence of common skin conditions in Australian school students: 3 Acne vulgaris. *Br J Dermatol* 1998; **139**: 840–845.
- 186 Nijsten T, Rombouts S, Lambert J. Acne is prevalent but use of its treatments is infrequent among adolescents from the general population. *J Eur Acad Drem Venereol* 2007; **21**: 163–168.
- 187 Tan JKL, Bhat K. A global perspective on the epidemiology of acne. *Br J Dermatol* 2015; **172**(Suppl 1): 3–12.

- 188 Cantatore-Francis JL, Glick SA. Childhood acne: evaluation and management. *Dermatol Ther* 2006; **19**: 202–209.
- 189 Yang YC, Cheng YW, Lai CS, Chen W. Prevalence of childhood acne, epheles, warts, atopic dermatitis, psoriasis, alopecia areata and keloid in Kaohsiung County, Taiwan: a community-based clinical survey. *J Eur Acad Derm Venereol* 2007; **21**: 643–649.
- 190 Jansen T, Burgdorf WH, Plewig G. Pathogenesis and treatment of acne in childhood. *Pediatr Dermatol* 1997; **14**: 17–21.
- 191 Herane MI, Ando I. Acne in infancy and acne genetics. *Dermatol* 2003; **206**: 24–28.
- 192 Marcoux D, McCuaig CC, Powell J. Prepubertal acne: clinical presentation, evaluation, and treatment. *J Cutan Med Surg* 1998; **2**(Suppl 3): 2–6.
- 193 Lucky AW. Review of infantile and pediatric acne. *Dermatology* 1998; **196**: 95–98.
- 194 Burrows N, Roebuck HL. Acne: Intervene early. *Nurse Pract* 2006; **31**: 24–43.
- 195 Lucky AW, Biro FM, Huster GA, Leach AD, Morrison JA, Ratterman J. Acne vulgaris in premenarchal girls. An early sign of puberty associated with rising levels of dehydroepiandrosterone. *Arch Dermatol* 1994; **130**: 308–314.
- 196 Schnopp C, Mempel M. Acne vulgaris in children and adolescents. *Minerva Pediatr* 2011; **63**: 293–304.
- 197 Bhate K, Williams HC. Epidemiology of acne vulgaris. *Br J Dermatol* 2013; **168**: 474–485.
- 198 Mancini AJ, Baldwin HE, Eichenfield LF, Friedlander SF, Yan AC. Acne life cycle: the spectrum of pediatric disease. *Semin Cutan Med Surg* 2011; **30**(3 Suppl): S2–S5.
- 199 Goldberg JL, Dabade TS, Davis SA, Feldman SR, Krowchuk DP, Fleischer AB. Changing age of acne vulgaris visits: another sign of earlier puberty? *Pediatr Dermatol* 2011; **28**(6): 645–648.
- 200 Admani S, Barrio VR. Evaluation and treatment of acne from infancy to preadolescence. *Dermatol Ther* 2013; **26**: 462–466.
- 201 Eichenfield LF, Krakowski AC, Piggott C et al. American Acne and Rosacea Society. Evidence-based recommendations for the diagnosis and treatment of pediatric acne. *Pediatrics* 2013; **131**(Suppl 3): S163–S186.
- 202 Bree AF, Siegfried EC. Acne vulgaris in preadolescent children: recommendations for evaluation. *Pediatr Dermatol* 2014; **31**: 27–32.
- 203 Odland V, Carlström K, Michaëlsson G, Vahlqvist A, Victor A, Mellbin T. Plasma androgenic activity in women with acne vulgaris and in healthy girls before, during and after puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1982; **16**: 243–249.
- 204 Mourelatos K, Eady EA, Cunliffe WJ, Clark SM, Cove JH. Temporal changes in sebum excretion and propionibacterial colonization in preadolescent children with and without acne. *Br J Dermatol* 2007; **156**: 22–31.
- 205 Lucky AW, Biro FM, Simbartl LA, Morrison JA, Sorg NW. Predictors of severity of acne vulgaris in young adolescent girls: results of a five-year longitudinal study. *J Pediatr* 1997; **130**: 30–39.
- 206 Davis SA, Sandoval LF, Gustafson CJ, Feldman SR, Cordoro KM. Treatment of preadolescent acne in the United States: an analysis of nationally representative data. *Pediatr Dermatol* 2013; **30**: 689–694.
- 207 Eichenfield LF, Matiz C, Funk A, Dill SW. Study of the efficacy and tolerability of 0.04% tretinoin microsphere gel for preadolescent acne. *Pediatrics* 2010; **125**: e1316–e1323.
- 208 Eichenfield LF, Draelos Z, Lucky AW et al. Approach to pediatric acne treatment: an update. *Semin Cutan Med Surg* 2011; **30**(3Suppl): S16–S21.
- 209 Eichenfield LF, Hebert AA, Schachner L, Paller AS, Rossi AB, Lucky AW. Tretinoin microsphere gel 0.04% pump for treating acne vulgaris in preadolescents: a randomized, controlled study. *Pediatr Dermatol* 2012; **29**: 598–604.
- 210 Eichenfield LF, Draelos Z, Lucky AW et al. Preadolescent moderate acne vulgaris: a randomized trial of the efficacy and safety of topical adapalene-benzoyl peroxides. *J Drugs Dermatol* 2013; **12**: 611–618.
- 211 Karčiauskienė J, Valiukevičienė S, Gollnick H, Stang A. The prevalence and risk factors of adolescent acne among schoolchildren in Lithuania: a cross-sectional study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014; **28**: 733–740.
- 212 Ayer J, Burrows N. Acne: more than skin deep. *Postgrad Med J* 2006; **82**: 500–506.
- 213 Cunliffe WJ. Acne and unemployment. *Br J Dermatol* 1986; **115**: 386.
- 214 Yosipovitch G, Tang M, Dawn AG et al. Study of psychological stress, sebum production and acne vulgaris in adolescents. *Acta Derm Venereol* 2007; **87**: 135–139.
- 215 Gupta MA, Johnson AM, Gupta AK. The development of an Acne Quality of Life scale: reliability, validity, and relation to subjective acne severity in mild to moderate acne vulgaris. *Acta Derm Venereol* 1998; **78**: 451–456.
- 216 Dreno B. The changing faces of acne. *Br J Dermatol* 2015; **172**(Suppl 1): 1–2.
- 217 Kornhauser A, Coelho S, Hearing V. Applications of hydroxy acids: classification; mechanisms; and photoactivity. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2010; **20**: 135–142.
- 218 Fartasch M, Teal J, Menon GK. Mode of action of glycolic acid on human stratum corneum: ultrastructural and functional evaluation of the epidermal barrier. *Arch Dermatol Res* 1997; **289**: 404–409.
- 219 Andersen FA. Final report on the safety assessment of glycolic acid, ammonium, calcium, potassium, and sodium glycolates, methyl, ethyl, propyl, and butyl glycolates, and lactic acid, ammonium, calcium, potassium, sodium, and TEA-lactates, methyl, ethyl, isopropyl, and butyl lactates, and lauryl, myristyl, and cetyl lactates. *Int J Toxicol*. 1998; **17**(Suppl 1): 1–241.
- 220 Andersen FA. Safety assessment of salicylic acid, butyloctyl salicylate, calcium salicylate, C12–15 alkyl salicylate, capryloyl salicylic acid, hexyldodecyl salicylate, isocetyl salicylate, isodecyl salicylate, magnesium salicylate, MEA-salicylate, ethylhexyl salicylate, potassium salicylate, methyl salicylate, myristyl salicylate, sodium salicylate, TEA-salicylate, and tridecyl salicylate. *Int J Toxicol*. 2003; **22**(Suppl 3): 1–108.
- 221 Fabbrocini G, Saint Aroman M. Cosmeceuticals based on Rhealba[®] Oat plantlet extract for the treatment of acne vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014; **28**(Suppl 6): 1–6.
- 222 Biniek K, Levi K, Dauskardt RH. Sunscreen UV radiation reduces the barrier function of human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; **109**: 17111–17116.
- 223 Levi K, Baxter J, Meldrum H, Misra M, Pashkovski E, Dauskardt RH. Effect of corneodesmosome degradation on the intercellular delamination of human stratum corneum. *J Invest Dermatol*. 2008; **128**: 2345–2347.
- 224 Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease - a review. *Arch Dermatol Res* 1998; **29**: 643–651.
- 225 Rossi R, Johansson O. Cutaneous innervation and the role of neuronal peptides in cutaneous inflammation: a minireview. *Eur. J. Dermatol*. 1998; **8**: 299–306.
- 226 Bull HA, Hothersall J, Chowdhury N, Cohen J, Dowd PM. Neuropeptides induce release of Nitric Oxide from human dermal microvascular endothelial cells. *J. Invest. Dermatol*. 1996; **106**: 655–660.
- 227 Garzorz N, Eyerich K. NOS2 and CCL27: clinical implications for psoriasis and eczema diagnosis and management. - Expert Rev. *Clin Immunol* 2015; **11**: 167–169.
- 228 Bao L, Shi VY, Chan LS. IL-4 up-regulates epidermal chemotactic, angiogenic, and pro-inflammatory genes and down-regulates antimicrobial genes *in vivo* and *in vitro*: relevant in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Cytokine* 2013; **61**: 419–425.
- 229 Kubanov AA1, Katunina OR, Chikin VV. Expression of neuropeptides, neurotrophins, and neurotransmitters in the skin of patients with atopic dermatitis and psoriasis. *Bull Exp Biol Med* 2015; **159**: 318–322.

ARTICLE 4



Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database

Sebastian Hoffmann, Nicole Kleinstreuer, Nathalie Alépée, David Allen, Anne Marie Api, Takao Ashikaga, Elodie Clouet, Magalie Cluzel, Bertrand Desprez, Nichola Gellatly, Carsten Goebel, Petra S. Kern, Martina Klaric, Jochen Kühnl, Jon F. Lalko, Silvia Martinozzi-Teissier, Karsten Mewes, Masaaki Miyazawa, Rahul Parakhia, Erwin van Vliet, Qingda Zang & Dirk Petersohn

To cite this article: Sebastian Hoffmann, Nicole Kleinstreuer, Nathalie Alépée, David Allen, Anne Marie Api, Takao Ashikaga, Elodie Clouet, Magalie Cluzel, Bertrand Desprez, Nichola Gellatly, Carsten Goebel, Petra S. Kern, Martina Klaric, Jochen Kühnl, Jon F. Lalko, Silvia Martinozzi-Teissier, Karsten Mewes, Masaaki Miyazawa, Rahul Parakhia, Erwin van Vliet, Qingda Zang & Dirk Petersohn (2018): Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database, *Critical Reviews in Toxicology*, DOI: [10.1080/10408444.2018.1429385](https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429385)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429385>



© 2018 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



Published online: 23 Feb 2018.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 40



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database*

Sebastian Hoffmann^a, Nicole Kleinstreuer^b, Nathalie Alépée^c, David Allen^d, Anne Marie Api^e, Takao Ashikaga^{f,†}, Elodie Clouet^g, Magalie Cluzel^h, Bertrand Desprezⁱ, Nichola Gellatly^{j,‡}, Carsten Goebel^k, Petra S. Kern^l, Martina Klaricⁱ, Jochen Kühnl^m, Jon F. Lalko^{e,S}, Silvia Martinozzi-Teissier^c, Karsten Mewesⁿ, Masaaki Miyazawa^o, Rahul Parakhia^e, Erwin van Vliet^p, Qingda Zang^d and Dirk Petersohnⁿ

^aseh consulting + services, Paderborn, Germany; ^bNIH/NIEHS/DNTP/NICEATM, Research Triangle Park, NC, USA; ^cL'Oréal Research and Innovation, Aulnay-sous-Bois, France; ^dILS, Research Triangle Park, NC, USA; ^eThe Research Institute for Fragrance Materials (RIFM), Woodcliff Lake, NJ, USA; ^fShiseido Global Innovation Center, Hayabuchi, Kanagawa, Japan; ^gPierre Fabre, Toulouse, France; ^hLVMH, St Jean de Braye, France; ⁱCosmetics Europe, Brussels, Belgium; ^jUnilever, Bedford, United Kingdom; ^kCoty, Darmstadt, Germany; ^lProcter and Gamble Services Company NV, Strombeek-Bever, Belgium; ^mBeiersdorf AG, Hamburg, Germany; ⁿHenkel AG and Co. KG, Düsseldorf, Germany; ^oKao Corporation, Tochigi, Japan; ^pServices and Consultations on Alternative Methods (SeCAM), Magliaso, Switzerland

ABSTRACT

Cosmetics Europe, the European Trade Association for the cosmetics and personal care industry, is conducting a multi-phase program to develop regulatory accepted, animal-free testing strategies enabling the cosmetics industry to conduct safety assessments. Based on a systematic evaluation of test methods for skin sensitization, five non-animal test methods (DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay), KeratinoSensTM, h-CLAT (human cell line activation test), U-SENSTM, SENS-IS) were selected for inclusion in a comprehensive database of 128 substances. Existing data were compiled and completed with newly generated data, the latter amounting to one-third of all data. The database was complemented with human and local lymph node assay (LLNA) reference data, physicochemical properties and use categories, and thoroughly curated. Focused on the availability of human data, the substance selection nevertheless resulted in a high diversity of chemistries in terms of physico-chemical property ranges and use categories. Predictivities of skin sensitization potential and potency, where applicable, were calculated for the LLNA as compared to human data and for the individual test methods compared to both human and LLNA reference data. In addition, various aspects of applicability of the test methods were analyzed. Due to its high level of curation, comprehensiveness, and completeness, we propose our database as a point of reference for the evaluation and development of testing strategies, as done for example in the associated work of Kleinstreuer et al. We encourage the community to use it to meet the challenge of conducting skin sensitization safety assessment without generating new animal data.

ARTICLE HISTORY

Received 6 July 2017
Revised 11 December 2017
Accepted 3 January 2018

KEYWORDS

Skin sensitization; LLNA; human reference data; non-animal; test methods; *in vitro*; *in chemico*; database; defined approach; testing strategy

Table of contents

Introduction	2	U-SENS TM	5
Materials and methods	3	SENS-IS	5
Substance selection	3	The database	6
Description of the selected substances	3	Data analysis	6
In vivo reference data	3	Results	6
Human	3	Description of the database	6
LLNA	4	Concordance of reference results	7
Non-animal test methods	4	Predictivity of individual test methods	9
DPRA	4	Exploration of the applicability of individual test methods	10
KeratinoSens TM	5	DPRA	10
h-CLAT	5	KeratinoSens TM	10
		h-CLAT	10

CONTACT Martina Klaric  mklaric@cosmeticseurope.eu  Cosmetics Europe, Avenue Herrmann Debroux 40, 1160 Brussels, Belgium

*This manuscript is part of a set of papers; the companion manuscript can be found here: <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429386>.

†Current address: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), National Institute of Health Sciences (NIHS), 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo, Japan.

‡Current address: NC3R, Gibbs Building, 215 Euston Road, London NW1 2BE, United Kingdom.

SCurrent address: Estee Lauder Companies, 155 Pinelawn Road, Suite 300 South, Melville, NY 11747, USA.

© 2018 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

U-SENS TM	10
SENS-IS	11
Discussion	11
Acknowledgements	13
Declaration of interest	13
Supplemental material	13
References	13

Introduction

Skin sensitization is one of the key adverse effects to be addressed in the human hazard characterization and risk assessment of chemicals and cosmetic ingredients. Skin sensitization, is the first step in the development of allergic contact dermatitis (ACD). It is induced when dermal exposure occurs at sufficient levels to result in T-cell activation and proliferation. ACD is then elicited with subsequent dermal exposures. The adverse effect is triggered during elicitation by a response of the immune system, resulting in dermal symptoms of ACD, including erythema formation, itching, and burning (Kimber et al. 2002).

Traditionally, the skin sensitization potential of substances has been addressed by using animal models, ranging from guinea pig models (Buehler 1965; Magnusson and Kligman 1969; OECD 1992) to the murine LLNA (OECD 2010). The LLNA quantifies the induction phase of the response by measuring lymphocyte proliferation as a predictive biomarker of skin sensitization (Kimber et al. 1994). In addition, it derives an EC3 (the test substance concentration inducing a three-fold proliferation compared to concurrent vehicle-treated controls) as a measure of relative potency, which is inversely proportional to the potency of a skin sensitizer (Basketter et al. 2000; Gerberick et al. 2007; Loveless et al. 2010).

An increasing political and ethical demand to replace animal experiments resulted in the regulatory requirement in Europe to assess the safety of cosmetic ingredients without testing on animals (EU 2009). Moreover, a recent amendment of the industrial chemical regulation explicitly requests information on skin sensitization from non-animal test methods and prescribes that animal testing can only be conducted if the non-animal methods are not applicable or the obtained results are inadequate for classification and risk assessment purposes (EU 2016). Alongside these political developments, the OECD has summarized the detailed understanding of the biological mechanism of skin sensitization (Vandebriel and van Loveren 2010) by structuring the various biological steps in the process into an Adverse Outcome Pathway (AOP). The four key events (KE); covalent binding to skin proteins (KE1), keratinocyte responses (KE2), activation of dendritic cells (KE3), and T-cell proliferation (KE4) that lead to the adverse outcome of allergic contact dermatitis/contact hypersensitivity have been described (OECD 2012). In addition, general and skin sensitization-specific guidance documents have been published to support structuring of information derived via integrated approaches to testing and assessment (IATA), key elements of which are defined approaches with fixed data interpretation

procedures (OECD 2016a, 2016b). A number of non-animal test methods, addressing one or more of the first three key events, are currently at different stages of development. Some methods are in the phase of optimization and standardization (Hennen and Blömeke 2016), others, such as SENS-IS and GARD, while others are undergoing validation or peer review (Teunis et al. 2013; Cottrez et al. 2016; Forreryd et al. 2016). So far, five test methods have completed this process and have achieved this acceptance: (1) the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA), an *in chemico* test method that addresses KE1 by measuring depletion of synthetic peptides (Gerberick et al. 2004; OECD 2015a), (2) the KeratinoSensTM, an *in vitro* assay that is based on the activation of the Keap1-Nrf2-ARE pathway and addresses KE2 (Emter et al. 2010; OECD 2015 b), and three *in vitro* assay measuring biomarkers of dendritic cell activation and thus addressing KE3 (OECD 2017), i.e. the human cell line activation test (h-CLAT) (Ashikaga et al. 2006), the U937 cell line activation test (U-SENSTM) (Alépée et al. 2015) and the IL-8 Luc assay (Kimura et al. 2015). The landscape of non-animal test methods for skin sensitization also includes methods similar to or improving on existing ones: the LuSens method is closely related to the KeratinoSensTM and the Peroxidase Peptide Reactivity Assay (PPRA) is a refined version of the DRPA, i.e. by using liquid chromatography and tandem mass spectrometry, and by introducing oxidative capacity via the addition of horseradish peroxidase (Gerberick et al. 2009; Ramirez et al. 2016). Note that, despite considerable efforts, no sufficiently standardized non-animal test methods are currently available to address the KE 4 of T-cell proliferation for the purpose of skin sensitization assessment (van Vliet et al. 2017).

For the cosmetic industry, this demand for replacement comprises the specific challenge of conducting risk assessment. In response, Cosmetic Europe has set-up a four-step scientific program to achieve regulatory accepted animal free testing strategies that enable the cosmetic industry to conduct skin sensitization safety assessments, if possible by 2020. In the first phase, we have reviewed and evaluated many of the existing test methods (Reisinger et al. 2015). While continuously observing new developments, we prioritized the five test methods DPRA, KeratinoSensTM, h-CLAT, U-SENSTM, and SENS-IS for the second phase of our program, i.e. to evaluate and possibly to amend existing testing strategies for skin sensitization. Alongside with this effort, we explored human data as a reference for assessing the predictivity of individual test methods and testing strategies (Basketter et al. 2014), potentially reducing the uncertainty introduced by the use of animal data in human risk assessment.

The results of the second phase of the program are summarized here and in Kleinstreuer et al. (2018). In this work, we present a database compiled of existing and newly generated data of the test methods together with LLNA and human reference data for 128 substances. We describe the database in detail and make use of it to evaluate the individual test methods' predictivity and aspects of applicability in a harmonized way. Kleinstreuer et al. (2018) complement these evaluations by assessing the twelve defined approaches and IATA for skin sensitization that have been proposed to the OECD as case studies (OECD 2016c; Ezendam et al. 2016).

In particular, the predictive performance of six of these approaches using the information held within our database was analyzed.

In the third phase of Cosmetic Europe's program, the database will be expanded with substance of high relevance for the cosmetic industry, such as hair dyes and UV filters, whereas in the fourth phase risk assessment approaches exclusively based on non-animal data will be developed.

With our work presented here, we aim to advance the understanding of strengths and weaknesses of test methods and defined approaches and inform the assessments of variability, applicability domains, and uncertainties. Such knowledge is indispensable for developing a comprehensive and modern safety assessment approach for skin sensitization.

Materials and methods

Substance selection

The primary substance selection criterion for inclusion in our database was the availability of human data and associated potency categorization according to Basketter et al. (2014). Another pre-requirement was the availability of LLNA data, preferably accompanied by information on the maximum dose tested and the solvent/vehicle used. In addition, the substances needed to be commercially available in a sufficient quantity for testing. Metals and metal-containing substances were excluded because of their very limited relevance for the development of new cosmetic ingredients. Of the 131 substances in Basketter et al. (2014), 98 fulfilled the selection criteria. Using the same selection criteria, further 30 eligible fragrances were identified in collaboration with the Research Institute for Fragrance Materials (RIFM), resulting in a total of 128 selected substances.

Description of the selected substances

Substances were assigned to primary use categories (fragrances, preservatives, actives (e.g. acrylates), surfactants, dyes, pharmaceuticals, UV filters, other cosmetic use, or no cosmetic use) according to their main historical or actual use in cosmetic products, where applicable. In addition, chemical categories data were retrieved from the CPCat (Chemical and Product Categories) Database of the U.S. EPA (<http://actor.epa.gov/cpcat>; accessed on January 3, 2017) to more broadly describe the use categories covered (Dionisio et al. 2015). Substances were assigned to one or several use categories as defined in the Aggregated Computational Toxicology Resource (ACToR) database.

Where possible (i.e. excluding the natural extracts), the molecular structures of the substances were expressed in Daylight SMILES format (see [Supplemental Table 1](#)). Data on six physicochemical properties related to skin penetration and skin protein binding, i.e. octanol-water partition coefficient (LogP), water solubility (LogS), melting point (MP), boiling point (BP), vapor pressure (LogVP) and molecular weight (MW) were collated. If experimental measurements were not available in the Estimation Program Interface (EPI) Suite Data, a publicly available data source (<http://esc.syrres.com/>

interkow/EPIsuiteData.htm; accessed January 3, 2017), these properties were predicted using quantitative structure–property relationship (QSPR) models (Zang et al. 2017).

Mechanistic domains of chemical reactions were extracted in a sequential manner from Roberts et al. (2007a, 2007b) and Urbisch et al. (2015). For substances not included in any of these three references or with multiple assigned domains, the protein binding alerts for skin sensitization in the OECD QSAR toolbox 4.1 (freely available at www.qsartoolbox.org) and the skin sensitization reactivity domains of Toxtree v2.6.13 (freely available at www.toxtree.sourceforge.net) were obtained (Patlewicz et al. 2008). In cases when either the OECD QSAR toolbox or Toxtree predicted a domain and the other model did not, the predicted domain was used. In addition, it is indicated if a substance has been reported to require (metabolic) activation in the skin (pro-hapten) or external activation (pre-hapten) by Patlewicz et al. (2016) or by Urbisch et al. (2015). Structurally, the substances were characterized by investigating the occurrences of important structural or functional groups by inspection (data not shown, but presented in the [Supplemental Table 1](#), worksheet 4).

Non-animal test method data was collated from the literature and completed with newly generated data, the latter amounting to approximately one-third of all data. Substances that were newly tested were either obtained from Sigma-Aldrich (Milan, Italy; Hamburg, Germany) with an average purity of 98%, where applicable, or, in case of the fragrances identified in collaboration with RIFM, directly from the suppliers (in commercial quality).

For the existing data, (im-)purities of the substances are largely unknown. We acknowledge that sensitizing impurities might lead to false positive results in any test method. However, it can reasonably be assumed that these cases are rare and thus of limited impact, and require substance-specific discussion, which are beyond scope here.

In vivo reference data

Human

Human data and the resulting human potency category for 98 substances were available from Basketter et al. (2014) and for additional 30 fragrances from Api et al. (2017). The human evidence comprised of data from human maximization tests (HMT) and human repeat insult patch tests (HRIPT) and diagnostic patch test (DPT) data. In addition, use information, especially annual volumes, but also typical maximum use levels, has been used for some fragrances. The relevant information was collected by exploiting various sources, such as standard contact dermatitis textbooks and the dermatological literature. Whilst Basketter et al. (2014) describe criteria for translation of the available evidence into six potency categories, Api et al. (2017) provide a comprehensive table that summarizes how the human evidence is used to assign substances to the six potency categories, with categories 5 and 6 being basically non-sensitizers and categories 1–4 being sensitizers ranging from extreme to weak. In brief, a preliminary category is determined based on no observed effect levels (NOEL) from HRIPT or HMT, accounting for information on dose-response.

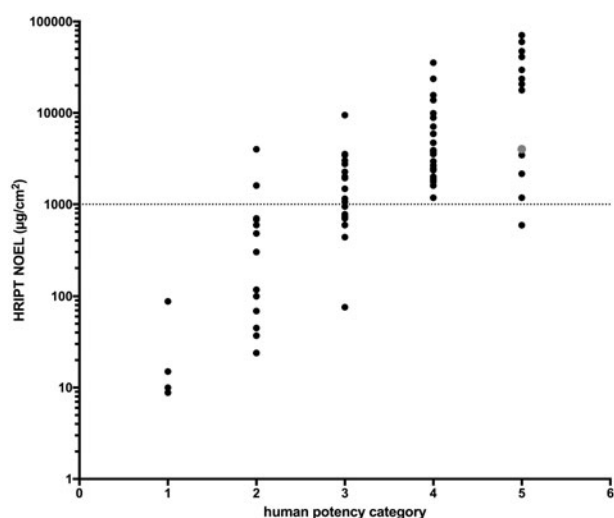


Figure 1. HRIPT no observed effect levels (NOEL) as $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for the human potency categories for 79 substances, for which Basketter et al. (2014) or Api et al. (2017) reported NOEL.

This preliminary category is subsequently refined by DPT data accounting for the amount and severity of the clinical data and for some fragrances by the use information, primarily by relating it to the frequency of positive DPT (Api et al. 2017). Through this procedure, direct human induction (HRIPT) and pre-clinical induction data (LLNA) have been combined with human clinical data, building on an approach of translating clinical data into a frequency of contact allergy in a general population (Thyssen et al. 2009). The impact of the modifications becomes evident when correlating the HRIPT NOEL of the 128 substances, where available in Basketter et al. (2014) and Api et al. (2017), with the human categories (Figure 1). For example, the potency category of α -methyl-1,3-benzodioxole-5-propionaldehyde, which has an HRIPT NOEL of $4016 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (grey dot in Figure 1), has been modified from category 4 to 5 based on the substantially higher HRIPT lowest observed effect level (LOEL) of $15\,000 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, which is supported by an HMT NOEL of $13\,800 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, and few positive DPT data, despite a high annual use volume (Api et al. 2017).

While the categorization process is transparently described, it is acknowledged, depending on the amount, quality, and consistency of the available evidence, expert judgment is required.

LLNA

Existing LLNA data were available for all 128 substances. These data were collected from the literature, the NICEATM LLNA database (which includes data from studies from 1989 to 2010), included in NTP's integrated chemical environment (Bell et al. 2017) and from the proprietary database of the Research Institute for Fragrance Materials (RIFM). The LLNA studies were conducted according to the OECD test guideline 429 'Skin sensitization: local lymph node assay' (OECD 2010) or similar protocols. For inclusion of positive/sensitizing results, the LLNA EC3 value (i.e. estimated concentration [by interpolation] of a substance expected to produce a stimulation index of 3, the threshold value for a substance to be considered a sensitizer in the LLNA), highest dose tested and

vehicle identity were required. In total, 575 LLNA studies were included that covered a broad spectrum of EC3 values, ranging from 0.001% (1,4-phenylenediamin; CAS no. 106-50-3) to 95.8% (Xylene; CAS no. 1330-20-7), and also contained 92 negative studies. For approximately 45% (57/128) of the substances, more than one LLNA study was available.

An appropriate approach to estimate the location of repeat test results of a substance, i.e. provide a representative value for each substance was required to allow for comparison of assay predictions with the LLNA. The conservative approach of using the lowest EC3 value available was considered inappropriate as it depends on the number of repeats, so that no fixed location parameter, i.e. a specific quantile, is estimated (e.g. lowest value of three repeats is the 33%-quantile, while the lowest value of five repeats is the 20%-quantile of the underlying distribution). Likewise, we refrained from selecting one test result, e.g. by expert judgment, as this approach has a high risk of personal bias and disregards valuable information on variability/uncertainty. Also other, widely applied approaches that estimate a fixed quantile, such as the arithmetic and the geometric mean, or even the median of the positive EC3 values (neglecting negatives), cannot adequately account for the entire response spectrum of LLNA results, which comprises of quantitative EC3 values and the qualitative information 'negative' (associated with the highest concentration tested). Therefore, we specifically constructed a median-like location parameter. This parameter was defined as the median for substances with repeat studies with an EC3 in more than 50% of the repeats. For substances with at least 50% negative repeat studies, i.e. no EC3 value was available, the parameter was defined as the modified median. The first step in deriving the modified median was to review the negative studies in detail: when the maximum concentration tested in a given study was lower than the median EC3 of the positive studies for the same chemical, the respective negative study was excluded, because it was considered a limited validity as tested concentrations were too low. From the remaining negative and all positive studies, the median was used as a location parameter (modified median). In the case of 50% of repeat studies being negative and 50% being positive, the highest EC3 value was defined as the modified median. Among the 12 substances with such mixed repeat results, the approach can best be described with resorcinol, for which two positive (EC3 of 6.3% and 5.5%) and three negative studies were available. Two of the negative studies tested resorcinol up to 25%, i.e. well above the median of 5.9% of the two positive studies, and were considered valid, while the third negative study was excluded as its maximum 2.5% ($< 5.9\%$) as the maximum concentration was too low. From the remaining two positive and two negative studies, the maximum EC3 value of 6.3% resulted as the modified median. Note that studies testing the same substance were considered as repeats regardless of the solvents/vehicles used.

Non-animal test methods

DPRA

The Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) determines the reactivity of a test substance towards synthetic cysteine

(C)- and lysine (K)-containing peptides as a model for the compound's potential to haptinize proteins and peptides *in vivo* (Gerberick et al. 2004). Briefly, dissolved test substances were incubated with peptides in ratios of 1:10 (for C-peptide) or 1:50 (for K-peptide) for 24 h at room temperature and the remaining non-depleted peptide concentration was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with gradient elution and UV-detection at 220 nm. Test substances without a specific molecular weight were dissolved at a concentration of 100 mM assuming a molecular weight of 375 g/mol and a purity of 100%, and incubated in ratios of 1:5 (for C-peptide) or 1:24 for (K-peptide) based on absolute mass. Further, a co-elution control was performed with each test substance in order to detect possible interference with the peptides. C- and K-peptide depletion relative to solvent control were reported for each test substance, whereas negative values in the range from 0% to -10% were considered as no depletion, i.e. reported as 0%, and negative below -10% were reported unmodified as they indicate co-elution. Data on 126 substances, which were generated and interpreted in accordance with the OECD test guideline 442C (OECD 2015a), are presented here. Of these, 32 were newly tested, 75 were published earlier mainly (Natsch et al. 2013), and data on 19 substances were personally communicated by the test developer.

KeratinoSens™

The KeratinoSens™ assay evaluates the activation of the Keap1-Nrf2-ARE-pathway by a test substance as published by Emter et al. (2010), using an immortalized adherent cell line derived from HaCaT human keratinocytes, stably transfected with a luciferase gene under the control of the ARE-element of the human gene AKR1C2. Twelve concentrations of a DMSO or cell culture media-dissolved test substance (ranging from 0.98 to 2000 µM) were applied to the cells for 48 h in at least two independent repetitions. Mixtures or test substances lacking a defined molecular weight (MW) were diluted considering a pro forma molecular weight of 200 g/mol, resulting in 12 test concentrations ranging from 0.195 µg/mL to 400 µg/mL. Luciferase induction is summarized as EC1.5, EC2 and EC3, i.e. the interpolated concentration inducing a 1.5-, 2- and 3-fold response as compared to vehicle control, respectively. In addition, the test concentration with the highest induction is defined as the *I*_{max}. Cytotoxicity was determined by the MTT assay and expressed as IC₅₀, i.e. the concentration inducing 50% of the maximum cytotoxicity. KeratinoSens™ data were available for all 128 substances and were produced and interpreted according to procedure described in the OECD test guideline 442D (OECD 2015 b). Data for 27 of these substances were newly generated, while data on 99 substances were obtained from the literature, mainly Natsch et al. (2015). In addition, the test developer provided data on two substances through personal communication.

h-CLAT

The h-CLAT quantifies changes in the cell surface expression of the co-stimulatory molecules CD86 and CD54 in THP-1

cells after 24 h exposure to a test substance (Ashikaga et al. 2006). For dose finding, the CV75 value, i.e. a concentration showing 75% THP-1 cell survival (25% cytotoxicity), was obtained by cytotoxicity tests using propidium iodide staining. Anchored around the CV75, eight concentrations were tested in one experiment consisting of at least two independent runs. After 24 h of exposure, the expression levels of CD86 and CD54, and cell viability were analyzed using flow cytometry. The relative fluorescence intensity (RFI) of CD86 and CD54 for positive control cells and substance-treated cells were calculated. The data presented were obtained and interpreted in accordance with the OECD test guideline 422E, which essentially describes the test protocol used since 2010 (Ashikaga et al. 2010). h-CLAT data on 127 substances are presented, comprising of 41 newly tested substances, 85 from Urbisch et al. 2015 (based on Nukada et al. 2012) and data on one substance provided by the test developer through personal communication.

U-SENS™

The U-SENS™ method is based on the human histiocytic lymphoma U937 cell line and measures CD86 expression as a marker of skin sensitization (Piroird et al. 2015). After 45 h incubation with test substances, cells were stained with propidium iodide and CD86 antibodies for flow cytometry analysis. Propidium iodide-stained cultures were used to determine cell viability for each of the test concentrations. For the test concentrations with at least 70% viability, CD86 staining served to determine the stimulation index (S.I.) in relation to the corresponding solvent/vehicle control. From these data, the EC150 (concentration with a S.I. of 150) was calculated by linear interpolation. A U-SENS™ experiment comprised at least two valid runs. While the six test concentrations of the first run are fixed, the 4 to 6 test concentrations of subsequent runs were adjusted if necessary on the basis of the CD86 induction and/or the cytotoxicity observed in previous runs. U-SENS™ data were available for 105 substances, which were obtained and interpreted in accordance with the OECD test guideline 442E (OECD 2017). Five substances were newly tested. The data for the remaining 100 substances, for most of which data have been published earlier using a different prediction model (Piroird et al. 2015), were re-interpreted (using the actual prediction model) and provided by the test developer through personal communication.

SENS-IS

The SENS-IS assay uses quality-controlled reconstituted human epidermis (SkinEthic's Episkin model). Appropriately dissolved test substance was applied onto the stratum corneum of two-week cultured epidermis for 15 min at 37 °C and 5% CO₂. Test concentrations were 0.1%, 1%, 10%, 50%, and 100% v/v, whereas 10% and 50% are usually tested first and, if necessary, subsequent concentrations were chosen based on the obtained results. After a washing step with PBS, the epidermis was further incubated under the same conditions for another six hours. At the end of the incubation

period, the epidermis was snap frozen in liquid nitrogen and the total RNA was extracted for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. Transcript amounts for 61 genes were normalized to the mean expression levels of three house-keeping genes. The genes are categorized into three groups: 23 genes as indicators of skin irritation, 21 “SENS-IS” genes, and 17 “Redox” genes. The first group of genes was used for assay acceptance, i.e. the test was rejected and the substance was tested at a lower concentration if >20 these irritation genes were over-expressed ($> 1.25 \times$ control vehicle value). The relative expression of the “SENS-IS” and “Redox” genes were used for the prediction of a test substance’s skin sensitizing potency. While the identity of irritation-associated genes has been published (Cottrez et al. 2015), the identity of the genes of the “SENS-IS” and “Redox” genes has been disclosed in a patent. The cycle threshold value of the HSPAA1 gene was used for the evaluation of tissue destruction and had to be $\leq 110\%$ to be acceptable. The prediction model, which was developed to predict the LLNA, was based on the number of over-expressed genes in the SENS-IS and REDOX group and the test substance concentration. To be considered as a skin sensitizer, a test substance had to induce at least a 1.25-fold increase in the expression of at least seven genes in either the SENS-IS or REDOX group. The lowest concentration meeting these requirements determined the potency prediction: 100% or 50% = weak sensitizer, 10% = moderate sensitizer, 1% = strong sensitizer, and 0.1% = extreme sensitizer. If none of the test concentrations met these criteria, the substance was considered negative. Relative gene expression data are provided in [Supplemental Table 1](#) (worksheet 4). SENS-IS data are presented for 126 substances, comprising of new test data for 73 substances and published data on 53 substances, obtained mainly from Cottrez et al. (2016).

The database

The following information was entered in the database ([Supplemental Table 1](#)). Substances were identified by substance name, CAS number, SMILES, and primary use category. For each individual LLNA study, the EC3 was recorded together with vehicle, maximum dose tested, and reference (see [Supplemental Table 1](#), worksheet 2). In addition, the modified median EC3 and the human potency category of each substance are captured. For the non-animal test methods, the following information was entered into the database and referenced:

- DPRA: C- and K-peptide depletion (in %)
- KeratinoSensTM: EC1.5; EC3; IC50; I_{max} (all in μM ; for natural extracts in $\mu\text{g/mL}$)
- h-CLAT: CD86 EC150; CD54 EC200, CV75 (all in $\mu\text{g/mL}$)
- U-SENSTM: CD86 EC150; CV70 (all in $\mu\text{g/mL}$)
- SENS-IS: potency prediction, vehicle and gene expression data.

Note that the variables recorded for the DPRA, KeratinoSensTM, and h-CLAT allow ready application of the standard prediction models of the respective test methods

(OECD 2015a, 2015b, 2017). Moreover, the database includes for each substance: data on six physicochemical properties related to skin penetration and skin protein binding, mechanistic reaction domain classification(s) and an indication if the substance is a pre- or pro-hapten.

Primary data extraction involved a review of the studies, identification of relevant results, and data entry into the database. Quality assurance (of extraction) was conducted by another individual that reviewed the same studies and confirmed that the appropriate data had been entered into the database. Any differences between the two reviewers were discussed to obtain consensus.

Data analysis

The predictions were calculated using the standard prediction models of the test methods for both the human and the LLNA reference dataset. The skin sensitization potential predictivity of the individual test methods was described using the standard parameters of specificity, i.e. the proportion of the non-sensitizing substances predicted as non-sensitizers, sensitivity, i.e. the proportion of the sensitizing substances predicted as sensitizers, accuracy (or concordance), i.e. the proportion of the correctly predicted substances, and balanced accuracy, i.e. the mean of specificity and sensitivity. The predictivity of skin sensitization potency classes of the SENS-IS was described for both reference datasets by contingency tables and accuracy. Correlations of physico-chemical properties were evaluated using Pearson’s correlation coefficient. Applicability domains of the individual test methods were explored descriptively and with the Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparison (using GraphPad Prism 7.0c, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

Description of the database

The database contains 128 substances, which were identified by substance name and CAS number ([Supplemental Table 1](#)). With the exception of six natural extracts (Jasmine absolute [grandiflorum], Jasmine absolute [sambac], oakmoss, tree-moss, tea leaf absolute, and ylang-ylang), the included substances were well-defined single substances. Three substances were considered as solutions (glutaraldehyde [act. 50%], formaldehyde [act. 37%] and glyoxal [act. 40%]). With the exception of data missing for 2-hexylidene cyclopentanone (no DPRA h-CLAT and SENS-IS data) and for menthadiene-7-methyl formate (no SENS-IS data), which was at the time of testing not commercially available, and data on 23 substances for the U-SENSTM, failing quality control primarily due to deviations from the standard protocol, the data are complete.

The substances comprised of 58 fragrances, 16 preservatives, nine actives (e.g. acrylates), seven surfactants, seven dyes, six pharmaceuticals, one UV filter, eight substances with other cosmetic uses, and 16 substances without any known cosmetic use. In addition, the chemical and product categories (CPCat) from EPA were used to more broadly describe

the use categories covered. Substances were assigned to one or more use categories as defined in the aggregated computational toxicology resource (ACToR) database (Table 1). Overall, 12 use categories were covered by the 128 substances, most of them well-populated. Most substances have multiple use categories, resulting in an average number of 4.2 use categories per substance. For example, penicillin G is used only as a pharmaceutical, whereas isopropanol and phenol have the most use categories. This broad coverage demonstrates the diversity of the included substances in terms of their uses. Consequently, the database and the results are not limited to cosmetic ingredients, but apply to a broad range of chemical uses.

The included substances also covered all mechanistic domains of chemical reaction. Domains have been assigned to 122 substances, comprising of 38 Michael acceptors, 21 Schiff base electrophiles, eleven S_N2 electrophiles (including three substance with proposed S_N2 -reaction at the S-atom), nine acyl transfer agents, two S_NAr electrophiles, and 41 substances without a domain (Supplemental Table 1: worksheet 1).

The chemical space covered by the database was also described in terms of physicochemical properties, either experimentally determined or estimated, excluding the natural extracts. The MW ranged from 30 g/mol to 605 g/mol. The vast majority of the substances (95%) had a MW of less than 400 g/mol. The range of logP values covered almost 17 log-orders, while the logP of 97% of the substances ranged

between -3 and 6. The water solubility (logS) of the substances spanned nine log-orders from -7 to 2. Boxplots of the distributions of the individual properties are shown in Figure 2. As to be expected, some properties were highly correlated. Pearson correlation coefficients >0.7 or <-0.7 were observed for the pairs MW-BP, MW-logVP, BP-logVP, and logP-logS.

Concordance of reference results

The results for the LLNA and human data are presented in Supplemental Table 1. The substances covered the six human potency categories with six substances in category 1, 24 in category 2, 29 in categories 3, 29 in category 4, 25 in category 5, and 15 in category 6.

In the LLNA, 95 substances were sensitizing and 33 non-sensitizing. For 54.7% of the substances, only one LLNA study was available. The median number of studies for the 58 substances, for which repeat studies were available, was 4.5, with the maximum of 44 studies on isopropanol. The individual repeat LLNA EC3 for each substance (regardless of the vehicle used) are presented in Figure 3, whereas studies that did not reach a three-fold stimulation index, i.e. are considered negative in the LLNA, are shown with an EC3 value of 100% for plotting purposes.

For substances with repeat LLNA studies, the median-like location parameter was used to compare the LLNA with the human reference data (Figure 4). We evaluated the concordance of classification of these two sets of reference data for three various degrees of resolution. First, we dichotomized the two standards. Substances with the human categories 1, 2, 3, and 4 were considered as sensitizers and the categories 5 and 6 as non-sensitizers. Substances in human category 5 were considered as non-sensitizer as they were characterized by either high NOELs ($\geq 10,000 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) or at best, low incidence of cases of human sensitization reported in DPT, which we considered as not sufficient to justify a classification as a sensitizer. The LLNA data were discriminated into sensitizers and non-sensitizers using the modified median. This dichotomization allowed us to compare the two reference data sets by means of a 2×2 contingency table, resulting in an accuracy of 74% (95/128), with 20 non-sensitizers and 75 sensitizers predicted concordantly (Table 2A). Of the discordant substances, 20 (16%) were predicted as sensitizers in the

Table 1. Use category of substances based on ACToR Use DB Categories in CPCat (106 of the 128 substances were associated with more than one category).

ACToR use category	Number of substances assigned to use category
Industrial use	99
Personal care	85
Consumer use	80
Inert ingredient	65
Food additive	48
Pharmaceutical	43
Fragrance	41
Pesticide	41
Colorant	24
Antimicrobial	17
Petrochemical	5
Chemical warfare	1

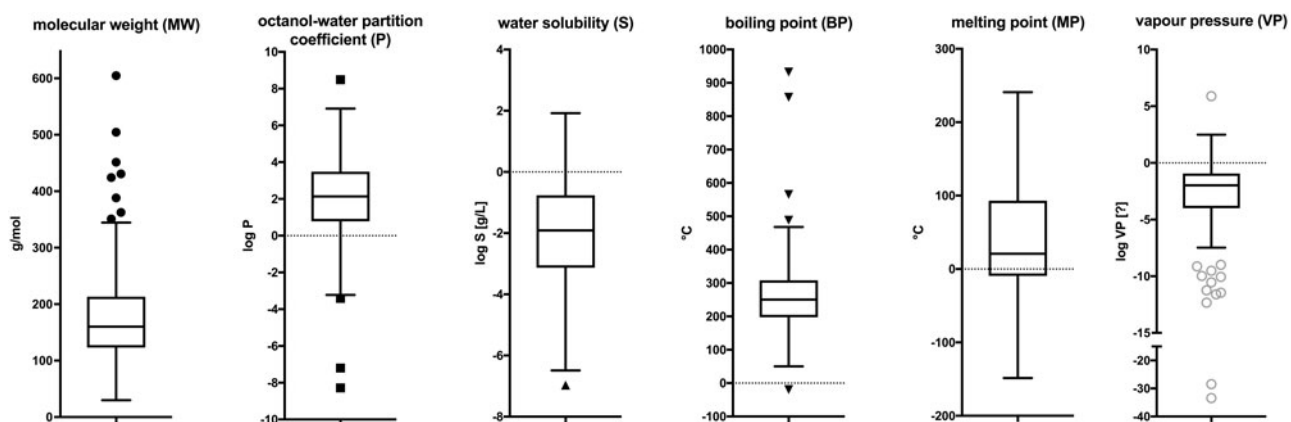


Figure 2. Boxplots of six physicochemical properties for 122 substances.

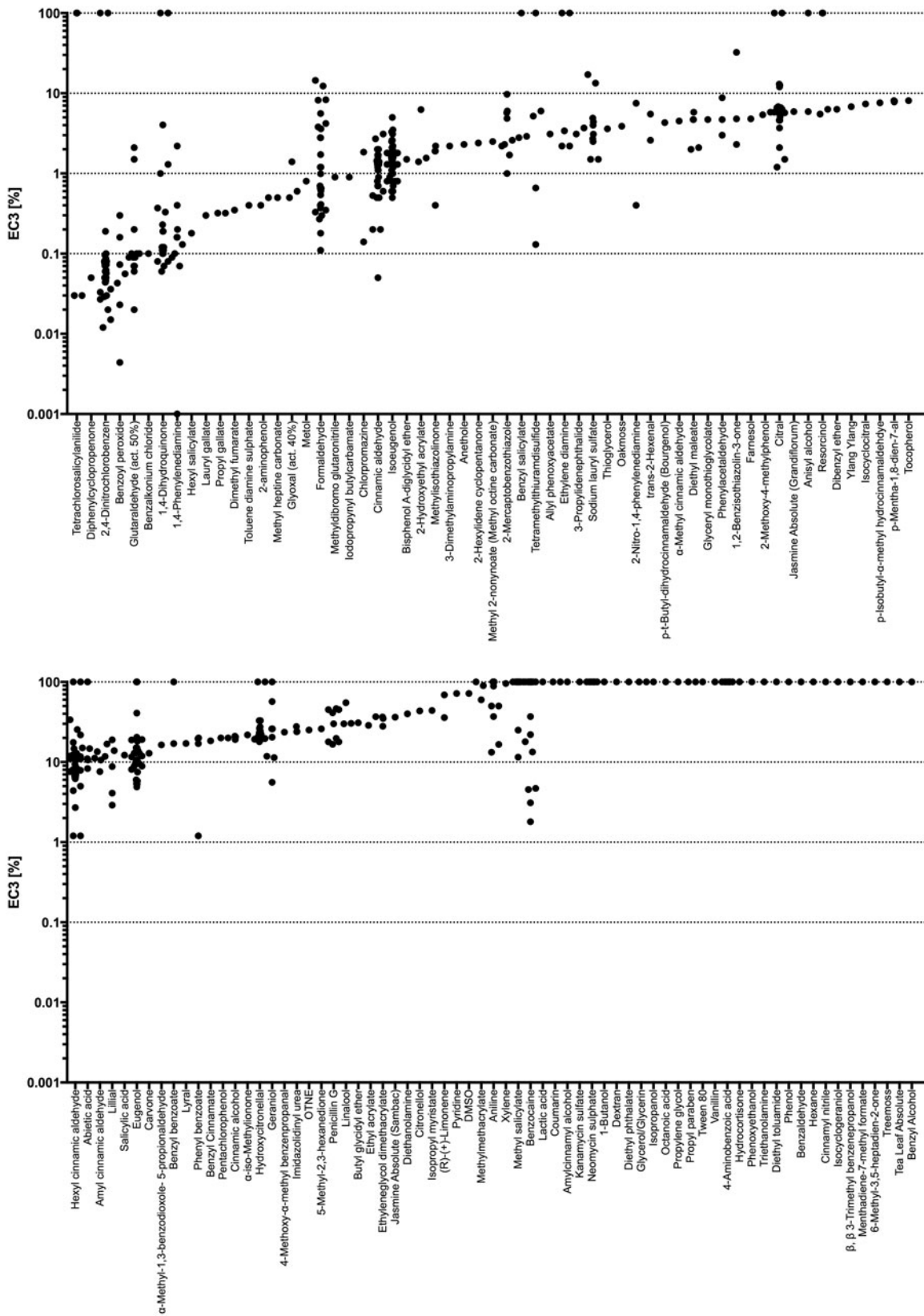


Figure 3. Distribution of LLNA EC3 values for substances: substances with multiple LLNA EC3 values are plotted in order from most to least potent based on the modified median (top: <10% EC3; bottom: > 10% EC3), where the y-axis is in log scale. Potency categories are delineated by horizontal dotted lines. Negative LLNA are displayed with an EC3 of 100%.

LLNA, but classified as not sensitizing in humans, and 13 (10%) were sensitizing to humans, but not in the LLNA. Categorizing both human (categories 5 and 6 as non-sensitizers, categories 3 and 4 as lower potency sensitizers and categories 1 and 2 as higher potency sensitizers) and LLNA (non-sensitizers, modified median EC3 \geq 1% as weak/moderate sensitizers and modified median EC3 < 1% as strong/extreme sensitizers) in three groups resulted in an accuracy to 59% (76/128) (Table 2B). Of the discordant substances, 25 (20%) were classified into a higher category and 27 (21%) into a lower category in the LLNA compared to humans. Accounting for all six human classes, whereby categories 5 and 6 were still considered as non-sensitizers, and for five LLNA potency classes (modified median EC3 < 0.1%: extreme; 0.1% \leq modified median EC3 < 1%: strong; 1% \leq modified

median EC3 < 10%: moderate; 10% \leq modified median EC3 \leq 100%: weak; otherwise non-sensitizer) resulted in an accuracy of 45% (58/128) (Table 2C). Among the 33 (26%) substances, which were classified into a higher category in the LLNA compared to humans, 24 (i.e. 20% of the total 128) were over-classified by one class. In addition, the LLNA classified 37 (29%) substances into a lower category. Of these, 29 (i.e. 23% of the total 128) were under-classified by one class.

Predictivity of individual test methods

We analyzed the predictivity of the test methods, most of which have been evaluated by others in detail, e.g. by Urbisch et al. (2015), using the parameters specificity, sensitivity, and (balanced) accuracy compared to human and to the LLNA using the same dichotomization of the reference standards as described above (Table 3). In the absence of human-specific prediction models for the individual test methods, we applied the standard prediction models, which were developed for predicting LLNA results, also for the comparison with human data. For both references, specificity and sensitivity was almost equally balanced for the DPRA and the KeratinoSensTM, while the other three test methods had higher sensitivity, but lower specificity. Accuracy with human data ranged from 72% to 79%, being lowest for the DPRA, while the balanced accuracy was slightly lower (70% to 76%), being highest for the KeratinoSensTM. Accuracy with LLNA data was lower for the DPRA and KeratinoSensTM as compared to the h-CLAT, U-SENSTM, and SENS-IS, while balanced accuracies were very similar across test methods.

The SENS-IS test method has established a prediction model to assign substances to one of five potency classes. Compared to human categories, the SENS-IS predicted the

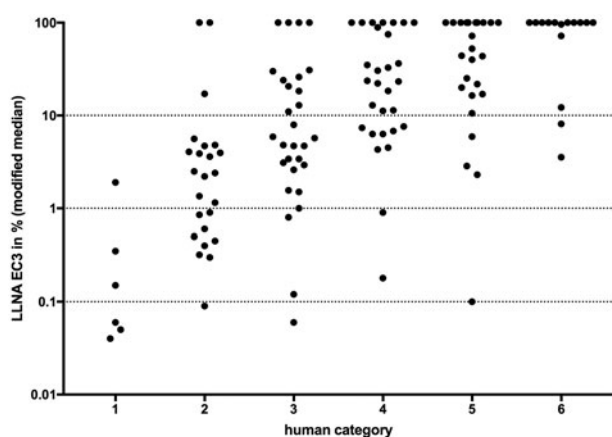


Figure 4. Plot of LLNA EC3 modified median against the six human categories for all 128 substances. LLNA Potency categories are delineated by horizontal dotted lines. Negative LLNA are displayed with an EC3 of 100%.

Table 2. Contingency tables (A: 2 \times 2; B: 3 \times 3; C: 5 \times 5) comparing human and LLNA reference data for 128 substances.

LLNA reference data	Human reference data categories														
	A: 2 \times 2				B: 3 \times 3				C: 5 \times 5						
NS	20	13	33	NS	20	11	2	33	NS	20	7	4	2	0	33
S	20	75	95	EC3 > 1%	19	42	14	75	EC3 \geq 10%	14	13	8	1	0	36
Σ	40	88	128	EC3 < 1%	1	5	14	20	1% \leq EC3 < 10%	5	7	14	12	1	39
				Σ	40	58	30	128	0.1% \leq EC3 < 1%	1	2	2	8	2	15
									EC3 < 0.1%	0	0	1	1	3	5
									Σ	40	29	29	24	6	128
Accuracy	95/128 = 74.2%				76/128 = 59.4%				58/128 = 45.3%						

Table 3. Skin sensitization potential predictivity of individual test methods and the mechanistic domains compared to both human and LLNA reference data, incl.

Test method	Sample size	Human				LLNA			
		Specificity	Sensitivity	Accuracy	Balanced accuracy	Specificity	Sensitivity	Accuracy	Balanced accuracy
LLNA	128	50.0%	85.2%	74.2%	67.6%	–	–	–	–
DPRA	124*	74.4%	72.9%	73.4%	73.6%	67.7%	66.7%	66.9%	67.2%
KeratinoSens TM	128	77.5%	75.0%	75.8%	76.3%	66.7%	67.4%	67.2%	67.0%
h-CLAT	127 ^o	52.5%	89.7%	78.0%	71.1%	51.5%	86.2%	77.2%	68.9%
U-SENS TM	105 [#]	44.7%	95.5%	77.1%	70.1%	48.0%	90.0%	80.0%	69.0%
SENS-IS	126 ^u	47.5%	93.0%	78.6%	70.3%	50.0%	90.4%	80.2%	70.2%
Mechanistic reaction domain	122**	75.0%	86.6%	82.8%	80.8%	77.4%	81.3%	80.3%	79.4%

The predictivity of the LLNA compared to human data.

*Two substances possibly co-eluted with cysteine, one substance commercially not available and one substance not testable.

^oOne substance commercially not available.

[#]Two substances commercially not available and 21 substances excluded due to noncompliance with the protocol during testing.

^uTwo substances commercially not available.

**Excluding six natural extracts.

Table 4. Contingency table of skin sensitization potency predictions of the SENS-IS for 126 substances compared to human reference data categories (grey indicates concordant predictions).

	Human categories					
	1	2	3	4	5	6
SENS-IS						
Extreme	3	0	0	1	0	0
Strong	2	12	4	1	0	0
Moderate	0	7	16	10	2	0
Weak	1	3	6	14	17	2
NS	0	1	2	3	6	13
Sum (<i>n</i> = 126)	6	23	28	29	25	15

same potency for 51% (64/126) substances (Table 4). Fifty-one substances (40%) were assigned to an adjacent class; 33 substances (26%) to the next higher class and 18 (14%) to the next lower class. Four substances (3%) were over-classified by more than one class and seven (6%) were under-classified by more than one class. The extreme human sensitizer that was classified by the SENS-IS as weak was tetrachlorosalicylanilide (CAS no. 1154–59-2). In a re-test, tetrachlorosalicylanilide was solubilized at 65 °C and an 'extreme' potency was predicted (data not shown).

In addition, we also compared the predictivity of the mechanistic reaction domain classifications. When dichotomizing the substances by considering those with an assigned domain as skin sensitizers and those without a domain as non-sensitizers, (balanced) accuracies were higher than those of the individual test methods for both human and LLNA reference data (Table 3).

Exploration of the applicability of individual test methods

We explored the applicability of the individual test methods to better describe their strengths and limitations. Therefore, we focused on several aspects: the testability of substances, the ability to predict pre- and pro-haptens, patterns in predictivity (as compared to human data) related to physico-chemical properties, as well as patterns related to mechanistic reaction domains. Due to the limited number of substances, features were analyzed independently from each other and mainly descriptively.

DPRA

Of the 127 commercially available substances, 124 could be tested in the DPRA. Two substances likely co-eluted with cysteine, so that no reliable peptide depletion data could be obtained, and one (Dextran) was not testable due to its physico-chemical properties. Interestingly, these three substances had relatively high molecular weights (> 300). Of the 21 human sensitizing pre- and pro-haptens, for which DPRA results were available, eight were predicted as non-sensitizers, seven being pro- or pre/pro-haptens according to Patlewicz et al. (2016). Regarding the mechanistic reaction domains, no pattern deviating from the overall predictivity was observed, with the exception that the substances reacting by acyl transfer were correctly predicted as positive as compared to human data.

Comparing the distributions of the physico-chemical properties between the four groups of correctly predicted human sensitizers and non-sensitizers, and the respective false negative and positive predictions, no significant differences were detected (Kruskal–Wallis test *p* values > .25).

KeratinoSens™

All 128 substances could be tested in the KeratinoSens™. Seven of the 22 human sensitizing pre- and pro-haptens were predicted as non-sensitizers, five being pro- or pre/pro-haptens according to Patlewicz et al. (2016). While this relation is less clear as for the DPRA, it may still be relevant for applicability considerations.

Predictivity in the mechanistic reaction domains was similar to the overall predictivity. However, in contrast to the DPRA, four of the nine substances reacting by acyl transfer were false negative.

The comparison of the physico-chemical properties revealed that false positive substances have a significantly higher molecular weight, logP and boiling point than correct negative substances. In addition, the logS of the false positive substances were significantly lower than that of the correct positives and negatives. While the sample of the false positive was small (*n* = 9) and the physico-chemical properties were correlated, this pattern could potentially be used to refine the applicability domain of the KeratinoSens™.

h-CLAT

All 127 available substances could be tested in the h-CLAT. With 20 of the 22 human sensitizing pre- and pro-haptens correctly predicted, the h-CLAT was as sensitive for these substances as for substances not needing any activation.

Regarding the mechanistic reaction domains, no particular pattern in predictions was obvious, except that 23 of 41 substances without any assigned domain were predicted as sensitizers. However, 14 of these 23 were human non-sensitizers. As the prediction model of the h-CLAT was developed to obtain a high sensitivity, this highlights that applicability domain assessments based on predictions is of limited usefulness, as it is directly influenced by the subjective choices made in prediction model development.

As for the DPRA, no significant differences were detected (Kruskal–Wallis test *p* values > .22) when comparing the distributions of the physico-chemical properties. In particular, the frequency of false negative predictions for substances with a logP > 3.5 (2/18 = 11.1%) is similar as the respective frequency for substances with a logP < 3.5 (7/63 = 11.1%).

U-SENS™

While all 126 available substances could be tested in the U-SENS™, only the 105 that were tested according to the standard protocol were considered. The 21 human sensitizing pre- and pro-haptens tested in the U-SENS™ were correctly predicted. Also, the prediction model of the U-SENS™ was developed to reduce the number of false negative predictions, resulting in only three false negative substances. Therefore, the insight to be gained by the analysis of patterns

regarding mechanistic reaction domains and physico-chemical properties using predictions is limited.

Similar to the h-CLAT, 19 of 36 substances without any assigned domain were predicted as sensitizers, 14 of which were not being human sensitizers. Regarding the physico-chemical properties, the small group of false negative substances had a significantly larger molecular weight than the correct negatives and, partly correlated to this, a lower vapor pressure compared to the correct negatives and positives.

SENS-IS

All 126 commercially available substances could be tested in the SENS-IS. All 22 human sensitizing pre- and pro-haptens were correctly identified as sensitizers. With a prediction model reducing the number of false negatives, further analysis of the applicability domains based on false and correct prediction is of limited generalizability.

Regarding the mechanistic reaction domains, most false positives have been observed for substances without an assigned domain. Differences in closely correlated physico-chemical properties were detected for the five false negative substances: their molecular weight was significantly larger and their vapor pressure was significantly lower as compared to the correct negatives, while their boiling points were significantly higher than those of the correct positives and negatives.

Discussion

Based on a systematic evaluation of available test methods for skin sensitization (Reisinger et al. 2015), we selected five non-animal test methods for the compilation of a comprehensive database of 128 substances. Existing and newly generated data for the test methods were obtained according to standard protocols. Across the five non-animal test methods, a total of 613 test results have been compiled. About a third of these (202) are unpublished results, the vast majority from new testing (179), but also from personal communications (23). The primary output data of the test methods were recorded, e.g. the depletion values of the synthetic peptides used in the DPRA. In addition, the predictions of skin sensitization potential and, if applicable, potency were reported for each test method according to the standard prediction models (as included in the respective OECD test guidelines or publications). Our dataset has several advantages compared to other dataset, such as Asturiol et al. (2016), Urbisch et al. (2015), or Natsch et al. (2013), which were compiled for different purposes. It includes a substantial set of newly generated data, systematically reviewed reference data (especially LLNA) and a level of harmonization that allows meaningful comparative assessments. In particular, the comprehensiveness and level of detail presented enables the use of our database for data-mining purposes, e.g. the evaluation of defined approaches for skin sensitization (Kleinstreuer et al. 2018).

The main selection criterion for the substances was the availability of both human and LLNA reference data. For many substances, several LLNA studies were identified (Supplemental Table 1). These were summarized by a

modified median EC3. While the general variability of the LLNA has been discussed in detail, e.g. by Hoffmann (2015), Roberts et al. (2016), and Dumont et al. (2016), care needs to be taken when addressing individual substances, especially regarding the suitability of the solvent used and the concentrations tested. For example, xylene, which was tested once in the LLNA giving an EC3 of 95.8% and was therefore considered for the purpose of this work as positive in the LLNA, was consistently negative in all non-animal test methods and is also not considered a human skin sensitizer. This difference leads to discordance when assessing the skin sensitization potential, but is of low-practical relevance for the assessment of skin sensitization potency, e.g. in the risk assessment of chemical ingredients.

The substance selection process resulted in a high diversity of chemistry in the database in terms of ranges of physicochemical properties covered, mechanistic reaction domains and use categories. While the majority of the included substances have specific cosmetic uses, other use categories are also well represented. Natural extracts pose specific challenges. Their composition is defined by natural material and extraction process, so that it cannot be defined unambiguously and is likely to vary over time. Consequently, comparison with existing data, which usually lack proper documentation of composition, is compromised.

All data included in the database were extensively curated and are provided in Supplemental Table 1.

We made use of the database to compare the two reference datasets – LLNA and human data. In dichotomizing the human data, potency categories 5 and 6 were grouped as negative, because we considered that the human evidence on skin sensitization for group 5 substances would justify no classification, e.g. according to CLP. However, we acknowledge that this, like any dichotomization of a continuum, might create the need for discussion of specific cases. The overall accuracy of predictions of skin sensitization potential was 74% and thus lower than the 82% reported by Urbisch et al. (2015). Potential reasons for this are differences in the respective substance samples and in the reference data used. When focusing on the prediction of potency, the accuracy between the reference datasets was 59% for three categories and 45% for five categories. As expected, this decrease is inversely dependent on the number of categories considered. However, this quantification provides for the first time a systematically derived basis for the assessment of potency predictions of individual test methods or testing strategies, such as defined approaches, for skin sensitization. For example, the SENS-IS that discriminates five potency categories predicted human categories with an accuracy of 51%.

The general performance of the individual test methods to predict skin sensitization potential was analyzed with the parameters of specificity, sensitivity, and (balanced) accuracy. Even though the standard prediction models of the test methods were developed using the LLNA as a reference, we focused our assessment on the comparison to human data, primarily because such a direct comparison with the target species eliminates uncertainty introduced by interspecies differences. However, the results when comparing to the LLNA were also calculated. Similar to the accuracy of human and

LLNA data, the accuracies of the test methods ranged from 67% to 80% (balanced accuracies from 67% to 70%). The DPRA and the KeratinoSensTM prediction models equally balanced specificity and sensitivity, whereas the prediction models of the other three test methods were more sensitive and less specific. Such differences can at least partly be explained by choices the test developers made when developing the original prediction models, i.e. defining prediction thresholds either to optimize overall accuracy or to increase sensitivity, while maintaining a reasonable specificity. Accuracies for predicting human skin sensitization potential reported in the literature are consistently higher than those reported here: by about 5% for the KeratinoSensTM and h-CLAT (Urbisch et al. 2015), by about 10% for the DPRA (Urbisch et al. 2015) and the U-SENSTM (Piroird et al. 2015) and by 19% for the SENS-IS (Cottrez et al. 2016). This tendency could be explained by differences in the substance samples.

In addition, we analyzed the several aspects of applicability of the individual test methods. With very few exceptions, all substances could be tested in any of the five test methods. While the DPRA and the KeratinoSensTM showed limited predictivity, especially for pro-haptens, the other test methods correctly predicted the human sensitizing pre- and pro-haptens. Accounting for this limitation, e.g. by excluding the pro- or pre/pro-haptens for the DPRA, possibly opens up means to explore the predictivity in more detail that could also inform potency assessment. While such an analysis is beyond the scope presented here, we would like to point to potential opportunities with an example for the DPRA, for which cysteine depletion alone correlated significantly better with human potency categories than the average depletion of cysteine and lysine. The analysis of the relation of misclassifications to physico-chemical properties revealed that the KeratinoSensTM, the U-SENS, and the SENS-IS predicted sensitizing substances with a high MW more likely as non-sensitizers than lower MW substances. In particular, we could not confirm the results of Takenouchi et al. (2013), who found a higher false-negative rate for substances with a logP >3.5, most likely due to differences in the sets of high logP substances. Finally, we investigated predictivity in the various mechanistic reaction domains. No specific limitation or strengths were identified, with the exception that the KeratinoSensTM tended to predict sensitizing substances reacting by acyl transfer as non-sensitizers.

Many of the applicability aspects that are well described for the individual test methods in the respective OECD test guidelines (OECD 2015a, 2015b, 2017), except for the SENS-IS, for which no such guideline is available, were confirmed. However, we would like to stress that the usefulness of applicability assessment based on prediction models and the resulting predictive parameters of sensitivity, specificity, and accuracy, is limited, as preferences in developing those models clearly differed between test methods.

This limitation is further increased when operating under the assumption that no individual test method will be sufficiently informative for hazard and risk assessment purposes, because prediction models were developed in isolation optimizing the predictive performance of an individual test method. More informative measures of predictive

performance such as receiver operating characteristic curves and predictive values are better suited to comprehensively understand the predictivity individual test methods (Hoffmann and Hartung 2005). Also, classification loss functions weighing mispredictions, e.g. penalizing false negative predictions higher than false positives, are an informative tool for prediction model development and predictivity assessment, which is recommended for the validation of (quantitative) structure-activity relationship models (OECD 2007), but is rarely applied to non-animal test methods (Hoffmann et al. 2008). However, for the more challenging aims of using the data of the individual test methods for skin sensitization and potency and risk assessment, individual test methods' prediction models should be abandoned and the focus placed on the primary data, as provided here (Supplemental Table 1).

In summary, this database provides a wealth of high quality information that can be used for a range of purposes, but especially for advancing the understanding of strengths and weaknesses of test methods and testing strategies, including defined approaches, but possibly also IATA. Here, we used it as a common basis to conduct a harmonized assessment of the various reference and non-animal test methods involved. In this way, we exclude uncertainties introduced by differences in substance sample used and by differences in reference values. As another example, we utilized the data to assess the predictive performance of six defined approaches for skin sensitization, resulting in an independent and harmonized evaluation (Kleinstreuer et al. 2018). We propose our database as a point of reference for example for the evaluation and development of testing strategies and encourage the community to use it to meet the challenge of conducting skin sensitization safety assessment without generating new animal data. However, we are aware of aspects requiring further considerations. First, the variability and uncertainties in all relevant information sources, i.e. in all data used in testing strategies and in the reference data used for assessment of test methods and testing strategies, should be identified, qualified, and if possible, quantified. While the variability of the LLNA has been well described (Hoffmann 2015; Dumont et al. 2016; Dimitrov et al. 2016), confidence in the human data has not yet been addressed systematically. Another issue related to human data is that it will be available for a limited number of substances only. Variability of non-animal test method results is usually investigated to some extent in validation studies, which should include an experimental evaluation of within- and between laboratory reproducibility. However, the impact of this variability has not yet been fully accounted for when assessing the predictive performance of individual test methods and testing strategies. On the level of individual test methods, a first attempt to evaluate the effect of variability in the context of prediction thresholds and models has been published by Leontaridou et al. (2017). On the level of testing strategies, the impact of variability of input data is even more complex to account for, as the propagation of variability and error is difficult to model and quantify. In addition, we are aware that inclusion of further substances in our database increases the power of statistical analyses. This, in turn, may allow more detailed analyses of

uncertainties and applicability of individual test and testing strategies. Ultimately, an increased substance sample may enable developing statistically sound sub-group analysis, e.g. based on physicochemical properties of substances, for specific purposes, e.g. identifying groups of substances, which can be predicted well or poorly.

Therefore, we are continuing this work in the frame of Cosmetics Europe's program to achieve regulatory acceptance of animal free testing strategies that enable cosmetic industries to conduct skin sensitization safety assessments, which was initially described by Reisinger et al. (2015). While some regulatory acceptance of non-animal test methods for the prediction of skin sensitization potential of chemicals has been achieved (EU 2016), the need of cosmetic industry to distill information on skin sensitization potency from these methods in order to facilitate human safety assessment remains a challenge. As a next step, we will complete the U-SENSTM dataset, add the PPRA method, and expand the database by approximately 40 substances, which are of high relevance for cosmetic industry. With the enlarged database including two test methods (SENS-IS and PPRA), which have not yet been used in defined approaches and IATA for skin sensitization, we will explore optimizations of existing and the construction of new testing strategies to predict potency, maintaining the focus on human reference data where possible. This work will go hand-in-hand with our efforts to develop safety assessment approaches based on non-animal data only. Including information on bioavailability and metabolism, we intend to highlight opportunities and limitations of the use of the non-animal test method data presented here for safety assessment purposes through case studies.

Acknowledgements

The authors thank Eileen Phillips (ILS, USA) for supporting the data curation, Andreas Natsch (Givaudan, Switzerland) for providing KeratinoSensTM data for some substances and Dori Germolec (NIH, NIEHS, USA) and Nicola Gilmour (Unilever, UK) for reviewing the manuscript. In addition, the authors gratefully acknowledge the constructive comments of the reviewers, which were very helpful in improving the manuscript.

Declaration of interest

This work has been conceived, planned, and executed by Cosmetic Europe's Skin Tolerance Task Force (CE STTF) in collaboration with the Research Institute for Fragrance Materials (RIFM) and NIH/NIEHS/DNTP/NICEATM (Nicole Kleinstreuer), supported by ILS (Dave Allen, Qingda Zang).

Cosmetics Europe is the European trade association for the cosmetics and personal care industry. The members include cosmetics and personal care manufacturers, and also associations representing our industry at national level, right across Europe (for more information see: <https://www.cosmeticseurope.eu/>). Since several years, Cosmetics Europe is driving research in the area of non-animal testing for the safety evaluation of cosmetics and personal care products and, in particular, in the field of skin sensitization assessment. Cosmetic Europe facilitated scientific meetings of the CE STTF and coordinated the overall project management and administrative tasks relating to the completion of this work. The CE STTF is composed of cosmetic company experts (see affiliations on cover page), who are not paid for their work on the task force, external consultants (Sebastian Hoffmann and Erwin van Vliet paid by Cosmetics Europe) and Cosmetics Europe staff (Bertrand Desprez and Martina Klaric employed by Cosmetics Europe). The CE STTF members carried out the

work, i.e. the collection of existing data, sponsoring and monitoring the generation of new data, the data analyses and drafting of the paper.

Anne-Marie Api, Jon Lalko, and Rahul Parakhia are/were employees of RIFM, contributing to this work with data and their interpretation on, depending on the test method, up to 30 fragrances. Nicole Kleinstreuer is employed by NIH/NIEHS/DNTP/NICEATM. The work conducted, primarily the description of the diversity of the database (in terms of uses, physico-chemical properties and functional groups) at NIH/NIEHS/DNTP/NICEATM was supported with federal funds from the National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health under Contract No. HHSN273201500010C to ILS in support of NICEATM. Dave Allen and Qingda Zang are employed by ILS. ILS was contracted by Cosmetics Europe to perform the data curation.

The opinions expressed herein and the conclusions of this publication are those of the authors and do not necessarily represent the views of Cosmetics Europe nor those of its member companies.

During this work, Sebastian Hoffmann has been supporting the development and validation of three test methods mentioned here (U-SENSTM, LuSens, Hennen and Blömeke (2016)) as a paid consultant, primarily in the role of an independent statistician. Other authors have no conflicts of interest. None of the authors has appeared in any legal or regulatory proceedings in the last five years related to the contents of this paper.

The companies of the CE STTF members, the NIEHS, and RIFM have approved this work for publication.

This work was supported by Cosmetics Europe and RIFM.

Supplemental material

Supplemental material for this article is available online [here](#).

References

- Alépée N, Piroird C, Aujoulat M, Dreyfuss S, Hoffmann S, Hohenstein A, Meloni M, Nardelli L, Gerbeix C, Cotovio J. 2015. Prospective multi-centre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro*. 30:373–382.
- Api AM, Parakhia R, O'Brien D, Basketter DA. 2017. Fragrances categorized according to relative human skin sensitization potency. *Dermatitis*. 28:299–307.
- Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. 2006. Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: the human cell line activation test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol In Vitro*. 20:767–773.
- Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. 2010. 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*. 38:275–284.
- Asturiol D, Casati S, Worth A. 2016. Consensus of classification trees for skin sensitisation hazard prediction. *Toxicol In Vitro*. 36:197–209.
- Basketter DA, Balikie L, Dearman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR, Rycroft RJ. 2000. Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Derm*. 42:344–348.
- Basketter DA, Alepee N, Ashikaga T, Barroso J, Gilmour N, Goebel C, Hibatallah J, Hoffmann S, Kern P, Martinozzi-Teissier S, et al. 2014. Categorization of chemicals according to their relative human skin-sensitizing potency. *Dermatitis*. 25:11–21.
- Bell S, Phillips J, Sedykh A, Tandon A, Sprankle C, Morefield S, Shapiro A, Allen D, Shah R, Maull E, et al. 2017. An integrated chemical environment to support 21st-century toxicology. *Environ Health Perspect*. 125:054501
- Buehler EV. 1965. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arch Dermatol*. 91:171–177.
- Cottrez F, Boitel E, Auriault C, Aeby P, Groux H. 2015. Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model. Development of the SENS-IS assay. *Toxicol In Vitro*. 29:787–802.

- Cottrez F, Boitel E, Ourlin JC, Peiffer JL, Fabre I, Henaoui IS, Mari B, Vallauri A, Paquet A, Barbry P, et al. 2016. SENS-IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: Reproducibility and predictivity results from an inter-laboratory study. *Toxicol In Vitro*. 32:248–260.
- Dimitrov S, Detroyer A, Piroird C, Gomes C, Eilstein J, Pauloin T, Kuseva C, Ivanova H, Popova I, Karakolev Y, et al. 2016. Accounting for data variability, a key factor in *in vivo/in vitro* relationships: application to the skin sensitization potency (*in vivo* LLNA versus *in vitro* DPRA) example. *J Appl Toxicol*. 36:1568–1578.
- Dionisio KL, Frame AM, Goldsmith M-R, Wambaugh JF, Liddell A, Cathey T, Smith D, Vail J, Ernstoff AS, Fantke P, et al. 2015. Exploring consumer exposure pathways and patterns of use for chemicals in the environment. *Toxicol Rep*. 2:228–237.
- Dumont C, Barroso J, Matys I, Worth A, Casati S. 2016. Analysis of the local lymph node assay (LLNA) variability for assessing the prediction of skin sensitisation potential and potency of chemicals with non-animal approaches. *Toxicol In Vitro*. 34:220–228.
- Emter R, Ellis G, Natsch A. 2010. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol*. 245:281–290.
- EU. 2009. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. *Off J Eur Union L*. 342:1–59.
- EU. 2016. Commission regulation (EU) 2016/1688 of 20 September 2016 amending Annex VII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals (REACH) as regards skin sensitisation. *Off J Eur Union L*. 59:14–16.
- Ezendam J, Braakhuis HM, Vandebriel RJ. 2016. State of the art in non-animal approaches for skin sensitization testing: from individual test methods towards testing strategies. *Arch Toxicol*. 90:2861–2883.
- Forryerd A, Zeller KS, Lindberg T, Johansson H, Lindstedt M. 2016. From genome-wide arrays to tailor-made biomarker readout – Progress towards routine analysis of skin sensitizing chemicals with GARD. *Toxicol In Vitro*. 37:178–188.
- Gerberick GF, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, Lepoittevin JP. 2004. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol Sci*. 81:332–343.
- Gerberick GF, Ryan CA, Dearman RJ, Kimber I. 2007. Local lymph node assay (LLNA) for detection of sensitization capacity of chemicals. *Methods*. 41:54–60.
- Gerberick GF, Troutman JA, Foertsch LM, Vassallo JD, Quijano M, Dobson RL, Goebel C, Lepoittevin JP. 2009. Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system. *Toxicol Sci*. 112:164–174.
- Hennen J, Blömeke B. 2016. Keratinocytes improve prediction of sensitization potential and potency of chemicals with THP-1 cells. *ALTEX*. 34:279–288.
- Hoffmann S, Hartung T. 2005. Diagnosis: toxic!—trying to apply approaches of clinical diagnostics and prevalence in toxicology considerations. *Toxicol Sci*. 85:422–428.
- Hoffmann S, Saliner AG, Patlewicz G, Eskes C, Zuang V, Worth AP. 2008. A feasibility study developing an integrated testing strategy assessing skin irritation potential of chemicals. *Toxicol Lett* 180:9–20.
- Hoffmann S. 2015. LLNA variability: an essential ingredient for a comprehensive assessment of non-animal skin sensitization test methods and strategies. *ALTEX*. 32:379–383.
- Kimber I, Dearman RJ, Scholes EW, Basketter DA. 1994. The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicology*. 93:13–31.
- Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF, Dearman RJ. 2002. Allergic contact dermatitis. *Int Immunopharmacol*. 2:201–211.
- Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, Aiba S. 2015. Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro*. 29:1816–1830.
- Kleinstreuer N, Hoffmann S, Alépée N, Allen D, Ashikaga T, Casey W, Clouet E, Cluzel M, Desprez B, Gellatly N, et al. Forthcoming 2018. Assessment of non-animal defined approaches for predicting skin sensitization. *Crit Rev Toxicol*.
- Leontaridou M, Urbisch D, Kolle SN, Ott K, Mulliner DS, Gabbert S, Landsiedel R. 2017. Quantification of the borderline range and implications for evaluating non-animal testing methods' precision. *ALTEX*. 34:525–538.
- Loveless SE, Api AM, Crevel RW, Debruyne E, Gamer A, Jowsey IR, Kern P, Kimber I, Lea L, Lloyd P, et al. 2010. Potency values from the local lymph node assay: application to classification, labelling and risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*. 56:54–66.
- Magnusson B, Kligman AM. 1969. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Invest Dermatol*. 52:268
- Natsch A, Ryan C, Foertsch L, Emter R, Jaworska J, Gerberick F, Kern P. 2013. A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *J Appl Toxicol*. 33:1337–1352.
- Natsch A, Emter R, Gfeller H, Haupt T, Ellis G. 2015. Predicting skin sensitizer potency based on *in vitro* data from KeratinoSens and kinetic peptide binding: global versus domain-based assessment. *Toxicol Sci*. 143:319–332.
- Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. 2012. Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human cell line activation test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol In Vitro*. 26:1150–1160.
- OECD. 1992. Test No. 406: skin sensitisation. Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2007. Guidance document on the validation of (quantitative) structure-activity relationship [(Q)SAR] models. Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2010. Test No. 429: skin sensitisation: local lymph node assay. Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2012. The adverse outcome pathway for skin sensitization initiated by covalent binding to proteins. Part 1: scientific evidence; Part 2: use of the AOP to develop chemical categories and integrated assessment and testing approaches. Series on testing and assessment No. 168. Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2015a. Test No. 442C: *In chemico* skin sensitisation: direct peptide reactivity assay (DPRA). Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2015b. Test No. 442D: *In vitro* skin sensitisation: ARE-Nrf2 luciferase test method. Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2016a. Guidance document on the reporting of defined approaches to be used within integrated approaches to testing and assessment. Series on testing and assessment No. 255. Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2016b. Guidance document on the reporting of defined approaches and individual information sources to be used within integrated approaches to testing and assessment (IATA) for skin sensitisation. Series on testing and assessment No. 256. Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2016c. Annex I: case studies to the guidance document on the reporting of defined approaches and individual information sources to be used within integrated approaches to testing and assessment (IATA) for skin sensitisation. Series on testing and assessment No. 256. Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2017. Test No. 442E: *In vitro* skin sensitisation assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitisation. Paris: OECD Publishing.
- Patlewicz G, Jeliakova N, Safford RJ, Worth AP, Aleksiev B. 2008. An evaluation of the implementation of the Cramer classification scheme in the Toxtree software. *SAR QSAR Environ Res*. 19:495–524.
- Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin JP, Worth AP, Aschberger K. 2016. Can currently available non-animal methods detect pre and pro-haptens relevant for skin sensitization? *Regul Toxicol Pharmacol*. 82:147–155.
- Piroird C, Ovigne JM, Rousset F, Martinozzi-Teissier S, Gomes C, Cotovio J, Alépée N. 2015. The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol In Vitro*. 29:901–916.
- Ramirez T, Stein N, Aumann A, Remus T, Edwards A, Norman KG, Ryan C, Bader JE, Fehr M, Burtleson F, et al. 2016. Intra- and inter-laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: a reporter gene-cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers. *Toxicol In Vitro*. 32:278–286.

- Reisinger K, Hoffmann S, Alépée N, Ashikaga T, Barroso J, Elcombe C, Gellatly N, Galbiati V, Gibbs S, Groux H, et al. 2015. Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol In Vitro*. 29:259–270.
- Roberts DW, Aptula AO, Patlewicz G. 2007a. Electrophilic chemistry related to skin sensitization. Reaction mechanistic applicability domain classification for a published data set of 106 chemicals tested in the mouse local lymph node assay. *Chem Res Toxicol*. 20:44–60.
- Roberts DW, Patlewicz G, Kern PS, Gerberick F, Kimber I, Dearman RJ, Ryan CA, Basketter DA, Aptula AO. 2007b. Mechanistic applicability domain classification of a local lymph node assay dataset for skin sensitization. *Chem Res Toxicol*. 20:1019–1030.
- Roberts DW, Api AM, Aptula AO. 2016. Chemical applicability domain of the local lymph node assay (LLNA) for skin sensitisation potency. Part 2. The biological variability of the murine local lymph node assay (LLNA) for skin sensitisation. *Regul Toxicol Pharmacol*. 80:255–259.
- Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. 2013. Predictive performance of the human cell line activation test (h-CLAT) for lipophilic chemicals with high octanol-water partition coefficients. *J Toxicol Sci*. 38:599–609.
- Teunis M, Corsini E, Smits M, Madsen CB, Eltze T, Ezendam J, Galbiati V, Gremmer E, Krul C, Landin A, et al. 2013. Transfer of a two-tiered keratinocyte assay: IL-18 production by NCTC2544 to determine the skin sensitizing capacity and epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency. *Toxicol In Vitro*. 27:1135–1150.
- Thyssen JP, Menné T, Schnuch A, Uter W, White I, White JM, Johansen JD. 2009. Acceptable risk of contact allergy in the general population assessed by CE-DUR-a method to detect and categorize contact allergy epidemics based on patient data. *Regul Toxicol Pharmacol*. 54:183–187.
- Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. 2015. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol*. 71:337–351.
- Vandebriel RJ, van Loveren H. 2010. Non-animal sensitization testing: state-of-the-art. *Crit Rev Toxicol*. 40:389–404.
- van Vliet E, Kühnl J, Göbel C, Martinozzi-Teissier S, Alépée N, Ashikaga T, Blömeke B, del Bufalo A, Cluzel M, Corsini E, et al. 2017. Cosmetics Europe Skin Tolerance Task Force Workshop: current state-of-the-art and new options for assessing T-cell activation by skin sensitizers. *ALTEX*. <https://doi.org/10.14573/altex.1709011>
- Zang Q, Mansouri K, Williams AJ, Judson RS, Allen DG, Casey WM, Kleinstreuer NC. 2017. *In silico* prediction of physicochemical properties of environmental chemicals using molecular fingerprints and machine learning. *J Chem Inf Model*. 57:36–49.

ARTICLE 5



Non-animal methods to predict skin sensitization (II): an assessment of defined approaches

Nicole C. Kleinstreuer, Sebastian Hoffmann, Nathalie Alépée, David Allen, Takao Ashikaga, Warren Casey, Elodie Clouet, Magalie Cluzel, Bertrand Desprez, Nichola Gellatly, Carsten Göbel, Petra S. Kern, Martina Klaric, Jochen Kühnl, Silvia Martinozzi-Teissier, Karsten Mewes, Masaaki Miyazawa, Judy Strickland, Erwin van Vliet, Qingda Zang & Dirk Petersohn

To cite this article: Nicole C. Kleinstreuer, Sebastian Hoffmann, Nathalie Alépée, David Allen, Takao Ashikaga, Warren Casey, Elodie Clouet, Magalie Cluzel, Bertrand Desprez, Nichola Gellatly, Carsten Göbel, Petra S. Kern, Martina Klaric, Jochen Kühnl, Silvia Martinozzi-Teissier, Karsten Mewes, Masaaki Miyazawa, Judy Strickland, Erwin van Vliet, Qingda Zang & Dirk Petersohn (2018): Non-animal methods to predict skin sensitization (II): an assessment of defined approaches, *Critical Reviews in Toxicology*, DOI: [10.1080/10408444.2018.1429386](https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429386)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429386>



Published online: 23 Feb 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 7



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Non-animal methods to predict skin sensitization (II): an assessment of defined approaches^{**}

Nicole C. Kleinstreuer^a, Sebastian Hoffmann^b, Nathalie Alépée^c, David Allen^d, Takao Ashikaga^{e*}, Warren Casey^a, Elodie Clouet^f, Magalie Cluzel^g, Bertrand Desprez^h, Nichola Gellatlyⁱ, Carsten Göbel^j, Petra S. Kern^k, Martina Klaric^h, Jochen Kühnl^l, Silvia Martinozzi-Teissier^c, Karsten Mewes^m, Masaaki Miyazawaⁿ, Judy Strickland^d, Erwin van Vliet^o, Qingda Zang^d and Dirk Petersohn^m

^aNIH/NIEHS/DNTP/NICEATM, Research Triangle Park, NC, USA; ^bSEH Consulting + Services, Paderborn, Germany; ^cL'Oréal Research & Innovation, Aulnay-sous-Bois, France; ^dILS, Research Triangle Park, NC, USA; ^eShiseido, Yokohama-shi, Kanagawa, Japan; ^fPierre Fabre, Toulouse, France; ^gLVMH, St Jean de Braye, France; ^hCosmetics Europe, Brussels, Belgium; ⁱUnilever, London, UK; ^jCoty, Darmstadt, Germany; ^kProcter & Gamble Services Company NV, Strombeek-Bever, Belgium; ^lBeiersdorf AG, Hamburg, Germany; ^mHenkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf, Germany; ⁿKao Corporation, Haga, Tochigi, Japan; ^oServices & Consultations on Alternative Methods (SeCAM), Magliaso, Switzerland

ABSTRACT

Skin sensitization is a toxicity endpoint of widespread concern, for which the mechanistic understanding and concurrent necessity for non-animal testing approaches have evolved to a critical juncture, with many available options for predicting sensitization without using animals. Cosmetics Europe and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods collaborated to analyze the performance of multiple non-animal data integration approaches for the skin sensitization safety assessment of cosmetics ingredients. The Cosmetics Europe Skin Tolerance Task Force (STTF) collected and generated data on 128 substances in multiple *in vitro* and *in chemico* skin sensitization assays selected based on a systematic assessment by the STTF. These assays, together with certain *in silico* predictions, are key components of various non-animal testing strategies that have been submitted to the Organization for Economic Cooperation and Development as case studies for skin sensitization. Curated murine local lymph node assay (LLNA) and human skin sensitization data were used to evaluate the performance of six defined approaches, comprising eight non-animal testing strategies, for both hazard and potency characterization. Defined approaches examined included consensus methods, artificial neural networks, support vector machine models, Bayesian networks, and decision trees, most of which were reproduced using open source software tools. Multiple non-animal testing strategies incorporating *in vitro*, *in chemico*, and *in silico* inputs demonstrated equivalent or superior performance to the LLNA when compared to both animal and human data for skin sensitization.

ARTICLE HISTORY

Received 6 July 2017
Revised 11 December 2017
Accepted 3 January 2018

KEYWORDS

Skin sensitization; defined approaches; hazard assessment; potency assessment; integrated testing strategy; human reference data; LLNA reference data; new approach methodologies; adverse outcome pathway

Table of contents

Introduction	2	JRC CCT	6
Methods	2	Givaudan ITS	6
Selection of defined approaches	2	Shiseido ANN-EC3	6
Qualitative evaluation criteria	3	Procter & Gamble BN-ITS 3	7
Database	3	Kao STS	7
Predictive performance assessment	3	Kao ITS	7
Results	4	Unilever SARA	7
Qualitative evaluation	4	Summary of qualitative evaluation	7
BASF "2 out of 3"	5	LLNA and human reference data	8
RIVM STS	5	Quantitative performance assessments	8
DuPont IATA-SS	5	BASF "2 out of 3"	9
L'Oreal Stacking Meta-model	6	Kao STS	9
ICCVAM SVM	6	Kao ITS	9
		ICCVAM SVM	10

CONTACT Nicole C. Kleinstreuer ✉ nicole.kleinstreuer@nih.gov 📧 NIH/NIEHS/DNTP/NICEATM, P.O. Box 12233, Mail Stop K2-16, Research Triangle Park, NC 27709, USA

*Present Address: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), National Institute of Health Sciences (NIHS) 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo, Japan.

**This manuscript is part of a set of papers; the companion manuscript can be found here: <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429385>.

This work was authored as part of the Contributor's official duties as an Employee of the United States Government and is therefore a work of the United States Government. In accordance with 17 U.S.C. 105, no copyright protection is available for such works under U.S. Law.

<i>Shiseido ANN</i>	10
<i>P&G BN ITS-3</i>	10
<i>Common test set</i>	11
<i>Concordance across substances</i>	11
Discussion	11
Acknowledgements	14
Declaration of interest	14
Supplemental material	14
References	14

Introduction

Skin sensitization is a common toxicity endpoint of concern and accounts for 10–15% of known occupational illnesses in the U.S. and Europe (Anderson et al. 2011). It is estimated that 15–20% of the general population will become sensitized to one or more chemicals in commerce at some point in their lifetime (Bruckner et al. 2000; Thyssen et al. 2007). Skin sensitizers can cause a local skin reaction characterized by redness, swelling and itching, also known as allergic contact dermatitis (Murphy et al. 2012). There are two stages to allergic contact dermatitis: induction and elicitation. Induction (sensitization) occurs when allergen-specific T cells are generated in response to a substance exposure, and elicitation occurs when a previously sensitized individual is re-exposed to the substance, resulting in a pruritic rash. The latency period between exposure to a substance and appearance of the rash shortens with subsequent exposures. Due to its prevalence, persistence, and impact on quality of life, skin sensitization is recognized as an important occupational and environmental health issue (Kimber et al. 2011). There are a variety of national and regional regulatory requirements for chemical testing to identify skin sensitizers.

European, U.S., and other regulatory agencies from around the world have different requirements for skin sensitization data depending on the substance use category and the agency, but almost all have traditionally relied upon regulatory tests using animal models (Luebke 2012; Birnbaum 2013; Daniel et al. 2018). However, in March 2013, the European Union's 7th Amendment of the Cosmetic Directive placed a complete ban on animal testing for all cosmetics ingredients, necessitating the rapid development and use of non-animal testing methods (European Union 2003). Furthermore, the European Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH) regulation calls for the use of non-animal methods. While REACH in general mandates that animal tests should be used as a last resort, a 2017 update of the regulation requires the uses of *in vitro* and *in silico* methods as the first choice for skin sensitization and permits animal testing under exceptional circumstances, at times including potency assessment (EU 2016; Sauer et al. 2016). Despite this, there are currently no stand-alone non-animal methods for identifying skin sensitizers (Natsch 2014).

Mechanisms of skin sensitization have been investigated intensively for many years and are documented by the Organization for Economic Co-operation and Development

(OECD) in its publication, "The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitization Initiated by Covalent Binding to Proteins" (OECD 2012). The adverse outcome pathway (AOP) includes four key mechanistic events: (1) binding of haptens to endogenous proteins in the skin, (2) keratinocyte activation, (3) dendritic cell activation, and (4) proliferation of antigen-specific T cells. The most commonly used animal test, the murine local lymph node assay (LLNA), is based on the understanding of this complex series of events underlying the immune response after exposure to a chemical sensitizer, and covers all key events (Gerberick et al. 2000; Williams et al. 2015). However, the construction of the AOP for skin sensitization has enabled the development of a multitude of non-animal test methods that are associated with one or more of the AOP key events (Mehling et al. 2012; Reisinger et al. 2015). While certain methods show great promise for the prediction of skin sensitization potential (Gerberick et al. 2004; Natsch and Emter 2008; Nukada et al. 2012), each method, when used individually or in combination, has its own set of limitations. Further, the complexity of the underlying biology indicates that no single measurement is yet sufficient to predict sensitizer potency (Rovida et al. 2015; Urbisch et al. 2015). Therefore, it is generally assumed that only a combination of several methods in an integrated testing strategy will obviate the need for animal testing, although methods that can serve as stand-alone replacements may be developed in the future (MacKay et al. 2013; Steiling 2016). Consequently, many testing strategies combining non-animal methods have been submitted to the OECD as "defined approaches" that form part of integrated approaches to testing and assessment (IATA) of skin sensitization (OECD 2016a, 2016b).

This paper presents an evaluation of defined approaches (DAs) representing non-animal skin sensitization testing strategies that were submitted to the OECD (OECD 2016a, 2016b). Here, the Cosmetics Europe skin tolerance task force (CE STTF) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) partnered to reproduce a subset of these DAs in a transparent manner, and evaluated them using a large, partly novel data set of 128 substances chosen based on the availability of both animal and human skin sensitization information (Hoffmann et al. 2018). This evaluation provides insight into the complexity and applicability of the DAs and harmonizes their assessment by using the same high-quality dataset.

Methods

Selection of defined approaches

Our evaluation considered 12 case studies submitted as examples for the OECD reporting guidance (OECD 2016a, 2016b), covering DAs with fixed data interpretation procedures as well as IATA incorporating expert judgment. Five of the DAs are consensus and decision-tree models that either predict skin sensitization hazard (sensitizer versus non-sensitizer) or assign the test substance to one of three skin sensitization potency categories. Within this group are "BASF '2

out of 3' – Sens ITS", "KAO STS", "KAO ITS", "RIVM STS", and the "JRC CCT". Another group of approaches apply more complex statistical techniques ("P&G BN-ITS-3", "Shiseido ANN-EC3", "ICCVAM-SVM", the "L'Oreal stacking model", and "Givaudan ITS") that provide categorical or continuous predictions of either hazard or potency. The remaining two approaches are the "DuPont IATA-SS", which is a decision framework integrating all possibly relevant information for hazard identification, and the "Unilever SARA", which provides a framework for risk assessment.

Qualitative evaluation criteria

To allow for a harmonized and systematic evaluation, qualitative evaluation criteria were predefined. We evaluated the most important technical and practical aspects of the 12 approaches in a manner that facilitated comparison and selection for the second stage of the evaluation, which would assess the approaches' predictive performance. Six criteria categories were used (Table 2). The category "characteristics" included basic information, such as the purpose of the approach and pivotal information sources used for the evaluation. The category "input data" described the information sources, e.g. *in vitro*, *in chemico*, *in silico*, and expert systems, used by the approach. The category "prediction algorithm" described the procedure used by the approach to process input data to predict skin sensitization hazard potential or potency. The "mechanistic relevance" of the approach was characterized with respect to the OECD AOP and the relevant key event(s). Information on the "applicability domain" included chemical space coverage and assay limitations. Finally, "practical aspects" addressed characteristics such as relative cost factors and availability through contract research organizations (CROs).

Using these criteria, and placing particular emphasis on the availability of input data and the feasibility of reproducing the algorithm using open-source software, we chose six of the 12 DAs for evaluation of their predictivity. This evaluation used the database described in the companion manuscript (Hoffmann et al. 2018).

Database

To evaluate the predictivity of these six DAs, the CE STTF collected or generated data on 128 substances with high-quality human and animal data using previously evaluated non-animal test methods (Reisinger et al. 2015). LLNA data in the NICEATM Integrated Chemical Environment resource (Bell et al. 2017) and human potency classifications according to (Basketter et al. 2014) were curated for all substances as *in vivo* reference standards for comparison, described in detail in (Hoffmann et al. 2018). The *in vitro* assays and *in silico* prediction tools used here are described briefly here and in more detail in Hoffmann et al. (2018). The direct peptide reactivity assay (DPRA) is an *in chemico* test that measures the ability of a substance to form a hapten-protein complex (Gerberick et al. 2004, 2007; OECD 2015a), and corresponds to the molecular initiating event in the skin sensitization AOP as

described by OECD (2012). An *in vitro* cell-based assay available commercially under the trade name KeratinoSens™ (Givaudan) [an equivalent method called LuSens is also available (Ramirez et al. 2014)] assesses the activation of the Nrf2 pathway in keratinocytes, indicating a substance's ability to induce cytoprotective responses and release of cytokines by keratinocytes, the second key event in the AOP (Emter et al. 2010; OECD 2015b). *In vitro* cell activation assays (e.g. the Human Cell Line Activation Test, h-CLAT; and U937 cell line activation Test, U-SENS™) measure induction of the third key event in the AOP, the ability of a substance to activate and mobilize dendritic cells in the skin (Ashikaga et al. 2006; Alepee et al. 2015; Piroird et al. 2015; OECD 2017). Software tools used to generate structure-based predictions of skin sensitization hazard included the proprietary software tools DEREK (Macmillan et al. 2016) and TIMES (Patlewicz et al. 2007), and the open-source read-across tool OECD Toolbox (OECD 2014a). Finally, experimental data on six physicochemical properties relevant to skin exposure and penetration (octanol:water partition coefficient (log *P*), water solubility, vapor pressure, melting point, boiling point, and molecular weight) were collected where available. If experimental values were not available, these properties were predicted using validated prediction models (Jaworska et al. 2011, 2013; Patlewicz et al. 2014; Strickland et al. 2016, 2017; Zang et al. 2017a).

Predictive performance assessment

There were twelve strategies submitted to the OECD as case studies for predicting skin sensitization potential that relied on DAs using different combinations of these *in vitro/in chemico/in silico* data. Six of the DAs, two of which yielded two models each, were selected based on the above criteria, reproduced and assessed for predictive performance (indicated in Table 1, far right column). The predictive performance of these six DAs, covering eight models, was assessed across all 128 substances against LLNA and human endpoints. The DAs were first evaluated for their ability to discriminate between sensitizers and non-sensitizers, and then for their ability to characterize skin sensitization potency if that ability was included in the stated purpose of the approach (as indicated in Table 1). Due to differing degrees of overlap between the training set for each DA and the 128-substance set, the DAs were also individually evaluated on the substances that were not part of their respective training sets, as well as on a common test set.

The potency cutoffs for the LLNA data were based on recommendations developed by the European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC) (Loveless et al. 2010). In this classification scheme, sensitizers with summary LLNA EC3 less than 0.1 were classified as extreme, sensitizers with EC3 between 0.1 and 1 classified as strong, sensitizers with EC3 between 1 and 10 classified as moderate, and sensitizers with EC3 greater than 10 classified as weak. The five potency classes were also combined into three classes (strong = extreme + strong; weak = moderate + weak; and non-sensitizing) to facilitate evaluation of the DAs providing corresponding three-class predictions. The human potency classifications were assigned according to

Table 1. Twelve defined and/or integrated approaches to testing and assessment for assessing skin sensitization potential.

OECD case study title (submitter)	Purpose	Data inputs	Reference	Quantitative evaluation?
An AOP-based "2 out of 3" Integrated Testing Strategy Approach to Skin Hazard Identification (BASF)	Hazard ID	DPRA, h-CLAT, KeratinoSens TM , U-SENS TM	Urbisch et al. (2015)	Yes
Sequential Testing Strategy (STS) for Hazard Identification of Skin Sensitisers (RIVM)	Hazard ID	DPRA, h-CLAT, KeratinoSens TM , HaCaT gene signature, MultiCASE, CAESAR, DEREK, OECD QSAR toolbox	van der Veen et al. (2014)	No
A non-testing pipeline approach for skin sensitisation (DuPont/G. Patlewicz)	Hazard ID	Existing data, protein binding profile, physicochemical properties, TIMES-SS, expert judgment	Patlewicz et al. (2014)	No
Stacking Meta-model for Skin Sensitisation Hazard Identification (L'Oréal)	Hazard ID	DPRA, KeratinoSens TM , U-SENS TM , TIMES-SS, ToxTree, volatility, pH	Del Bufalo et al. (2018)	No
Integrated decision strategy for skin sensitisation hazard (ICCVAM)	Hazard ID	DPRA, h-CLAT, KeratinoSens TM , OECD QSAR Toolbox, physicochemical properties	Strickland et al. (2016)	Yes
Consensus of Classification Trees for Skin Sensitisation Hazard Prediction (EC-JRC)	Hazard ID	TIMES-SS, DRAGON descriptors	Asturiol et al. (2016)	No
Sensitizer Potency Prediction Based on Key Event 1 + 2: Combination of Kinetic Peptide Reactivity Data and KeratinoSens [®] Data (Givaudan)	Potency (continuous)	Cor1C420 (kinetic peptide reactivity), KeratinoSens TM , TIMES-SS	Natsch et al. (2015)	No
The Artificial Neural Network Model for Predicting LLNA EC3 (Shiseido)	Potency class/EC3	DPRA, h-CLAT, ARE (or KeratinoSens TM)	Hirota et al. (2015)	Yes
Bayesian Network DIP (BN-ITS-3) for Hazard and Potency Identification of Skin Sensitizers (P&G)	Potency class	DPRA, h-CLAT, KeratinoSens TM , TIMES-SS, bioavailability (solubility at pH 7, log <i>D</i> at pH 7, plasma protein binding, fraction ionized)	Jaworska et al. (2015)	Yes
Sequential Testing Strategy (STS) for Sensitising Potency Classification Based on <i>In Chemico</i> and <i>In Vitro</i> Data (Kao)	Potency class	DPRA, h-CLAT	Takenouchi et al. (2015)	Yes
ITS for Sensitising Potency Classification Based on <i>In Silico</i> , <i>In Chemico</i> , and <i>In Vitro</i> Data (Kao)	Potency class	DPRA, h-CLAT, DEREK	Takenouchi et al. (2015)	Yes
Data Interpretation Procedure for Skin Allergy Risk Assessment (SARA) (Unilever)	Sensitization probability	Bioavailability, skin protein kinetics, ordinary differential equation model	MacKay et al. (2013)	No

(Basketter et al. 2014; Api et al. 2017), where category 1 was categorized as extreme, 2 was strong, 3 was moderate, 4 was weak, and 5 and 6 were grouped together as negative. Similar to the approach taken for the LLNA, the five human potency classes were combined into three classes (strong = extreme + strong; weak = moderate + weak; and non-sensitizing) to facilitate evaluation of the DAs providing corresponding three-class predictions. For hazard identification, these human categories were dichotomized by considering categories 1–4 as sensitizer and categories 5 and 6 as non-sensitizers. The hazard analyzes were also repeated with categories 1–5 designated as sensitizers (4 and 5 grouped together as weak) and category 6 designated as non-sensitizer.

Five of the six DAs chosen for predictive performance assessment (Table 1) were reproduced in an open-source manner by writing R code to apply each prediction method as described in the respective publications (and summarized in the results section). The following R packages were used for analysis and visualization: *e1071*, *RSNNS*, *gdata*, *caret*, and *ggplot2*.

The artificial neural network (ANN) models proposed by Shiseido were originally built using commercial software QwikNet v2.23 (Hirota et al. 2015). The open-source R code written to replace the commercial software QwikNet was able to reproduce the published results from both ANN models, with an R^2 of 0.62 and root-mean-squared error of 0.64 [matching Figure 2A from Hirota et al. (2015)] and an R^2 of

0.72 and root-mean-squared error of 0.64 [matching Figure 5A from Hirota et al. (2015)] between predicted and observed EC3 values. The inputs and output were log transformed and the ANN models had two hidden layers with five and two nodes respectively; logistic activation functions were used for the hidden and output layers; 10 000 iterations were used for training, and learning rate; scaling functions, and momentum parameters were inferred from (Hirota et al. 2015) and communication with model developers.

Due to its dependence on commercial BayesianLab software and a post-processing probability distribution correction, the Bayesian ITS-3 network was implemented in BayesianLab as in (Jaworska et al. 2015) and was applied here after generating the necessary input features. Predictions for substances that had been published previously in Jaworska et al. (2015) were rerun for the current evaluation, as some input parameters had changed slightly due to software updates or variability in assay results. The code reproducing each DA (with the exception of the Bayesian ITS-3), the input data files, the resulting output predictions, and code to run detailed performance statistics are available in the Supplemental Materials.

Results

Qualitative evaluation

The results of the qualitative evaluation of the DAs/IATA are summarized below, particularly with respect to complexity,

Table 2. Qualitative evaluation categories and criteria.

Evaluation category	Evaluation criteria
Characteristics	Principle Prediction (i.e. hazard versus potency [categories or continuous]) Publication Information sources
Input data	Test method (<i>in vitro</i> and <i>in chemico</i>) - read-out used - validation status - reproducibility - issues (e.g. IP, availability) <i>In silico</i> /expert system data/physicochemical properties - read-out used - availability - reliability - issues (e.g. IP, availability) Expert knowledge - input used - availability Principle Prediction (i.e. hazard vs. potency [categories or continuous]) Publication Information sources
Prediction algorithm	Type Availability Transparency Requirements for implementation (specific software) Self-learning Complexity Sequential information generation All inputs required? Predictivity: Sample size (total and for categories) Predictivity: Parameters (sensitivity, specificity, concordance)
Mechanistic relevance	OECD AOP key events covered Sequence of OECD AOP events considered Justification/discussion of the mechanistic relevance
Applicability domain	Chemical spectrum tested Limitations (solubility, surfactants, ...) Potential limitations for cosmetic ingredients (e.g. natural extracts cannot be processed by <i>in silico</i> approaches)
Practical aspects	Costs Can be conducted by CRO? Time required (per substance)

AOP coverage, limitations, and selection for quantitative evaluation. Detailed information for all criteria listed in Table 2 is provided in Supplementary Table S1.

BASF “2 out of 3”

The DA BASF “2 out of 3” was first described in Bauch et al. (2012) and subsequently applied to a larger dataset by Urbisch et al. (2015). The approach predicts skin sensitization hazard by sequential testing in up to three internationally accepted non-animal methods with OECD TGs (DPRA, KeratinoSensTM or LuSens, and h-CLAT or U-SENSTM) in an undefined order. Applying the standard prediction models of the individual methods, a substance is considered a skin sensitizer if at least two methods predict the substance to be a sensitizer, and vice versa. In this way, at least two AOP key events are addressed via a simple consensus approach/decision tree. So far, mainly industrial chemicals and cosmetic

ingredients have been tested with this approach. The limitations of this approach are specific to the individual test methods, such as reduced applicability to poorly water-soluble substances. Costs are correlated to the number of *in vitro* assays required. All of the test methods used in the approach are currently available through CROs and can be performed without licensing fees. This approach was selected for quantitative performance assessment based on the availability of the input features.

RIVM STS

The sequential testing strategy proposed by the RIVM (van der Veen et al. 2014) predicts human skin sensitization hazard using a tiered combination of *in silico* and *in vitro* methods. First, the test substance is evaluated using a battery of four QSAR models (MultiCASE, CAESAR, DEREK, and OECD QSAR Toolbox), which are combined to derive a sensitizer probability prediction (addressing KE 4, as the individual QSAR methods predict LLNA hazard). Depending on the probability from the consensus QSAR model, either the DPRA is performed (completing Tier 1) or the substance is tested in a Tier 2 test method (KeratinoSensTM, if Tier 1 indicates “sensitizer”, or HaCaT gene signature if Tier 1 indicates “non-sensitizer”). If the Tier 1 and 2 results are concordant, the test substance is classified accordingly. If the Tier 1 and 2 results are discordant, the h-CLAT is performed and the test substance is classified according to the standard h-CLAT prediction model. If all *in vitro* test methods are conducted, the RIVM STS covers all key events in the skin sensitization AOP. The approach can be readily applied if the user has access to all four QSAR models, and costs increase accordingly based on the *in vitro* methods that need to be run. The applicability domain of this approach is limited by the respective applicability domains of the *in vitro* methods required. This approach was not selected for quantitative performance assessment due to lack of HaCaT gene signature data.

DuPont IATA-SS

The “DuPont IATA-SS” approach is an example of a comprehensive IATA (requiring an expert judgment step), rather than a DA with a fixed data interpretation procedure. In this IATA, described in detail in (Patlewicz et al. 2014), a variety of data are considered using an ordered decision and integration process in a weight-of-evidence approach to predict skin sensitization potential. Expert knowledge is required to integrate existing *in vivo* and non-animal experimental data, information on protein binding profiles, existing mutagenicity and genotoxicity data, existing skin corrosion and irritation data, information on possible metabolites and some physicochemical properties. If data are insufficient to support a prediction of skin sensitization potential, additional non-animal and possible *in vivo* testing is conducted. Being an IATA, the approach is highly complex, requiring detailed understanding of the many various inputs and outsourcing to a CRO seems unlikely. This approach was not selected for quantitative performance assessment primarily due to reliance on expert judgment.

L'Oreal Stacking Meta-model

The L'Oreal "Stacking Meta-model" (Gomes et al. 2014; Del Bufalo et al. 2018) combines multiple *in vitro* and *in silico* parameters covering key events 1 to 3 of the skin sensitization AOP and gives a probability-based sensitizer hazard prediction. Specifically, this approach integrates *in silico* predictions from TIMES-SS and Toxtree; *in vitro* predictions from DPRA, KeratinoSensTM, and U-SENSTM; and physicochemical properties of the test substance (such as pH and volatility); using five different statistical methods (Boosting, Naïve Bayes, SVM, Sparse PLS-DA, and Expert Scoring) to create a stacking model (Gomes et al. 2014) that provides a probability of the test substance being a sensitizer or non-sensitizer based on defined thresholds. The Stacking Meta-model can tolerate missing individual data sources and can be run, for example, on substances with no defined structure lacking *in silico* predictions or on pigments that give inconclusive outcomes in *in chemico* or *in vitro* assays. The applicability domain of the Stacking Meta-model includes several classes of cosmetic chemicals and non-cosmetic organic substances that include pre- or pro-haptens. The approach can be applied to multi-constituent substances, substances of unknown or variable composition, complex reaction products, biological materials, or mixtures. Costs are driven by the necessity to run three *in chemico/in vitro* test methods, all of which should be available through CROs. This approach was not selected for quantitative performance assessment due to lack of data for several input features at the time of this study.

ICCVAM SVM

The ICCVAM skin sensitization working group has published several open-source models to predict skin sensitization hazard and potency based on evaluating multiple machine learning approaches and feature combinations (Strickland et al. 2016, 2017; Zang et al. 2017b). The ICCVAM SVM model to predict LLNA hazard is based on h-CLAT results, OECD Toolbox (version 3.2) predictions of hazard, and six physicochemical properties. The model to predict human hazard is based on KeratinoSensTM, h-CLAT, DPRA, log *P*, and OECD Toolbox predictions. These cover one or more of the AOP key events depending on the model. Based on the inclusion of physicochemical properties and structure-based predictions, these models are limited to substances with defined structures and those that are compatible with the *in vitro* test methods. Costs vary depending on the choice of model and associated number of *in vitro* tests; all can easily be performed by a CRO. This approach was selected for quantitative performance assessment based on the availability of the input features.

JRC CCT

The DA proposed by the Joint Research Center (JRC) of the European Commission is a classification trees consensus (CCT) model that predicts skin sensitization hazard based on structural features or protein reactivity descriptors (Asturiol et al. 2016). The underlying database for the JRC CCT approach consists of 269 organic substances with *in vitro* and *in*

chemico assay data and approximately 4500 descriptors generated with seven freely available or commercial software packages. Classification trees used in the approach were built by machine learning using 80% of the substances as a training set, resulting in a consensus model of two classification trees using descriptors from the TIMES-SS and Dragon software packages. This model should be understood primarily as a correlative approach, as the mechanistic relevance of the descriptors for skin sensitization is unclear. The approach is limited to organic substances with a well-defined identity, so that they can be processed in both TIMES-SS and Dragon. The costs are those of the two commercial software packages. This approach was not selected for quantitative performance assessment due to the lack of availability of proprietary structural descriptors for this substance set.

Givaudan ITS

The "Givaudan ITS" as described by Natsch et al. (2015) is an integrated testing strategy that predicts continuously scaled human and LLNA potency by multivariate regression. Various key events of the skin sensitization AOP are addressed using the following features: the KeratinoSensTM assay, information on adduct formation and peptide reactivity rate constants from the non-validated Cor1C420-assay, mechanistic alerts for reactivity of the test substance and key theoretical metabolites, log *P*, and vapor pressure calculated using TIMES-SS. Global regression models and models for specific domains, e.g. epoxides and aldehydes, are available. The approach cannot be used for substances with log *P* greater than 5, substances without defined structures, or substances that are insoluble in standard solvents. Costs are driven by the *in vitro* tests and requirement for commercial software; the Cor1C420-assay is not currently available through a CRO. This approach was not selected for quantitative performance assessment due to absence of Cor1C420-assay data for this substance set.

Shiseido ANN-EC3

The "ANN-EC3" model developed by Shiseido (Hirota et al. 2015) is a non-linear statistical model that combines multiple *in vitro* and *in silico* parameters covering Key Events 1–3 of the skin sensitization AOP. The model predicts the LLNA EC3 value using three *in vitro* methods (SH protein reactivity test, Antioxidant response element (ARE) test, and h-CLAT). Information sources can be interchangeable; for example, DPRA and KeratinoSensTM can be used as replacements for the SH test and ARE assay, respectively, as they are mechanistically and technologically equivalent. Multiple ANN models were built, with physicochemical properties of the test substance and QSAR predictions added as additional descriptors. The ANN models consist of an input layer (descriptors from *in vitro* or *in silico* results), a hidden layer, and an output layer (EC3 predictions), where predictive performance was evaluated via a 10-fold cross-validation procedure (Hirota et al. 2015). Costs and limitations are specific to the *in vitro* methods, e.g. poorly water soluble substances are outside of the applicability domain. This approach was selected for

quantitative performance assessment based on the availability of the input features.

Procter & Gamble BN-ITS 3

The Bayesian network integrated testing strategy (BN ITS-3) published by Procter & Gamble (P&G) in Jaworska et al. (2015) is the latest iteration in a series of decision support systems (Jaworska et al. 2011, 2013) intended to provide quantitative weight of evidence for potency categorization. The BN ITS-3 structure uses the quantitative data (rather than binary outcomes) from the three assays, DPRA, KeratinoSensTM, and h-CLAT that represent Key Events 1–3 of the skin sensitization AOP. The model also includes structure-based predictions from TIMES-SS, and a bioavailability calculation that relies on physicochemical properties calculated at pH=7 (water solubility, log *D*, fraction ionized, and plasma protein binding; calculated using ACD labs software). The relevant in-domain evidence is integrated using a multistep process, and a skin sensitization potency prediction is provided as a probability distribution over four potency classes. The prediction is post-processed to correct for Michael acceptor chemistry and subsequently converted to Bayes factors, where the highest Bayes factor across potency classes drives the prediction, and a lower Bayes factor indicates stronger uncertainty. Costs for the approach are based on the necessity of running three *in vitro* assays and obtaining commercial software licenses. The BN ITS-3 can also be used with limited missing data to suggest which experiment should be conducted next to achieve maximum information and minimize cost or time investment. This approach was selected for quantitative performance assessment based on the availability of the input features and the willingness of P&G to run the proprietary BN ITS-3 model.

Kao STS

The sequential testing strategy (STS) developed by Kao (Nukada et al. 2013; Takenouchi et al. 2015) is a straightforward decision tree based on DPRA and h-CLAT data (addressing Key Events 1 and 3 of the AOP). The approach predicts three LLNA potency classes: strong, weak, and non-sensitizing. First, the h-CLAT is conducted; if the response is positive, the test substance is classified as “strong” or “weak” based on the lowest concentration that led to a positive response and no further testing is needed. If a negative h-CLAT result is obtained, the DPRA is conducted. The substance is classified as “weak” if the DPRA is positive (according to the standard prediction model), and “non-sensitizing” if the DPRA is negative. The limitations of this approach are specific to the individual test methods, such as reduced predictivity for poorly water-soluble substances. Costs are driven by the two test methods, both of which should be available through CROs. This approach was selected for quantitative performance assessment based on the availability of the input features.

Kao ITS

The integrated testing strategy (ITS) developed by Kao (Nukada et al. 2013; Takenouchi et al. 2015) is a scoring-

based decision tree that uses data from the DPRA and h-CLAT assays and a skin sensitization hazard prediction generated by the Derek Nexus software package, and covers Key Events 1 and 3 of the AOP. Similar to the Kao STS, the Kao ITS predicts three LLNA potency classes: strong, weak, and non-sensitizing. The two *in vitro* tests produce scores of 0–3, based on the strength of the observed responses, and the DEREK Nexus alert is either 0 (no alert) or 1 (alert). The sum of the scores yields the predicted LLNA category (0–1: non-sensitizer; 2–6: weak; 7: strong). The limitations of this approach are specific to the individual test methods, and costs are based on accessing the commercial software DEREK and running the two test methods, both of which should be available through CROs. This approach was selected for quantitative performance assessment based on the availability of the input features.

Unilever SARA

The SARA model developed by Unilever uses ordinary differential equations to provide a qualitative (mechanistic) and quantitative explanation of the induction of the naïve CD8⁺ T cell response. The SARA model evaluates Key Events 1, 3, and 4 of the skin sensitization AOP and also assesses diffusion and partitioning of sensitizing chemicals within human skin (MacKay et al. 2013; Maxwell et al. 2014). The model generates a prediction of skin sensitization potential using chemical-specific input parameters from a modification of an accepted test method for skin penetration (OECD 2014b) that generates data on skin bioavailability kinetics and protein haptentation (Davies et al. 2011). Uncertainty analysis of the SARA model has enabled parameter uncertainty to be directly visualized, and additional risk assessment case studies are ongoing to further evaluate the predictive capacity of the approach. Costs are based on the required assays, which have potentially limited CRO availability. This approach was not selected for quantitative performance assessment due to lack of data for several input features and the complexity of the approach.

Summary of qualitative evaluation

The qualitative evaluation of the 12 case studies submitted to OECD resulted in the selection of six DAs for quantitative performance assessment (Table 1, far right column). The six approaches constituted eight models, as the evaluation included two versions of the ICCVAM SVM approach (one predicting the LLNA and one predicting human hazard) and two versions of the Shiseido ANN approach (differing in input parameters used). Key to the selection of the six approaches were the ready availability of input data for these approaches, either through curation or generation by the CE STTF. In general, the six approaches selected for quantitative performance assessment relied upon the three *in vitro* methods with OECD guidelines (DPRA, KeratinoSensTM, and h-CLAT), did not require expert judgment, and had data interpretation procedures that could be reproduced using open-source code. The exception to this was the Bayesian ITS-3, for which generation of the probabilities and Bayes factor

calculations were reproduced by P&G using the commercially available BayesiaLab software package. Data analysis and statistical evaluation for all approaches was conducted by NICEATM to ensure consistency.

LLNA and human reference data

The LLNA and human data used for the quantitative performance assessment are described in detail elsewhere (Hoffmann et al. 2018). Briefly, NICEATM collected data from literature sources for 128 substances having high-quality human studies and one or more high-quality LLNA studies. There were multiple LLNA study results for approximately half the substances, providing an indication of reproducibility, similar to Dumont et al. (2016), Hoffmann (2015), Roberts et al. (2016) and others, and necessitating the calculation of a modified median that required sufficiently high testing concentrations for negative results (Hoffmann et al. 2018). Using this highly curated dataset, the ability of the LLNA to accurately predict human test results was 74% for hazard prediction (sensitizer versus non-sensitizer), 59% for potency prediction using three classes (strong, weak, and non-sensitizer) and 45% for potency prediction using five classes (extreme, strong, moderate, weak, and non-sensitizer). These numbers provided the

baseline for comparison when assessing the predictive performance of the DAs.

Quantitative performance assessments

Following the qualitative evaluation of the DAs shown in Table 1, the predictive performance of each of the six methods, encompassing eight models, was quantitatively assessed against the maximum subset of substances (out of 128) that had a complete data matrix of input features. Depending on the DA, this ranged from 120 to 127 substances (indicated in Supplementary Table S2). The overall statistics in terms of accuracy (number of correctly classified substances over total number of substances assessed), false negatives (FN), and false positives (FP), sensitivity, specificity, and balanced accuracy are reported for each DA compared both to LLNA and human reference data. For potency categorization, the numbers of under- and over-predicted substances are also reported. The quantitative performance results for LLNA and human endpoints are shown in Tables 3 and 4 (human and LLNA hazard, respectively) and Tables 5 and 6 (human and LLNA potency, respectively) for every substance eligible for evaluation by each DA. In Tables 3 and 5, the LLNA performance against the human endpoint is shown in bold. The predictive performance of each DA was also assessed uniquely

Table 3. Defined Approach (DA) performance in predicting human hazard (sensitizer/non-sensitizer).

Predicting Human Hazard									
Defined Approach:	BASF 2/3 (DKH)	Kao STS	Kao ITS	ICCVAM SVM (Human)	Shiseido ANN (D_hC)	Shiseido ANN (D_hC_KS)	P&G BN ITS-3	LLNA	
<i>N</i>	127	126	120	120	126	126	119	128	
Accuracy (%)*	77.2	80.2	85.0	81.7	78.6	78.6	75.6	74.2	
Sensitivity (%)	79.3	97.7	93.8	86.4	95.4	100	81.3	85.2	
Specificity (%)	72.5	41.0	66.7	71.8	41.0	30.8	64.1	50.0	
BA (%)	75.9	69.4	80.3	79.1	68.2	65.4	72.7	67.6	

*Performance is shown against the maximum subset (*N*) out of 128 substances with all necessary DA features.

BA: balanced accuracy; STS: sequential testing strategy; ITS: integrated testing strategy; SVM: support vector machine; ANN: artificial neural network; BN: Bayesian network; DKH and D_hC_KS: DPRA/h-CLAT/KeratinoSensTM; D_hC: DPRA/h-CLAT.

Table 4. Defined approach (DA) performance in predicting LLNA hazard (sensitizer/non-sensitizer).

Predicting LLNA Hazard								
Defined Approach:	BASF 2/3 (DKH)	Kao STS	Kao ITS	ICCVAM SVM (LLNA)	Shiseido ANN (D_hC)	Shiseido ANN (D_hC_KS)	P&G BN ITS-3	LLNA
<i>N</i>	127	126	120	120	126	126	119	128
Accuracy (%)*	70.1	77.8	79.2	88.3	76.2	81.0	83.2	83.2
Sensitivity (%)	72.3	92.6	85.6	93.3	90.4	97.9	83.2	83.2
Specificity (%)	63.6	34.4	60.0	73.3	34.4	31.3	83.3	83.3
BA (%)	68.0	63.5	72.8	83.3	62.4	64.6	83.3	83.3

*Performance is shown against the maximum subset (*N*) out of 128 substances with all necessary DA features.

LLNA: local lymph node assay; BA: balanced accuracy; STS: sequential testing strategy; ITS: integrated testing strategy; SVM: support vector machine; ANN: artificial neural network; BN: Bayesian network; DKH and D_hC_KS: DPRA/h-CLAT/KeratinoSensTM; D_hC: DPRA/h-CLAT.

Table 5. Defined Approach (DA) performance in predicting human sensitizing potency.

Predicting Human Potency (Strong, Weak, Non-sensitizers)							
Defined approach:	Kao STS	Kao ITS	Shiseido ANN (D_hC)	Shiseido ANN (D_hC_KS)	P&G BN ITS-3	LLNA	
<i>N</i>	126	120	126	126	115	128	
Accuracy (%)*	63.5	69.2	61.1	62.7	54.8	59.4	
Over-predicted (%)	22.2	13.3	22.2	25.4	20.0	19.5	
Under-predicted (%)	14.3	17.5	16.7	11.9	25.2	21.1	

*Performance was assessed for prediction of three potency classes as described in the main text, and is shown against the maximum subset (*N*) out of 128 substances with all necessary DA features. With the exception of the P&G BN ITS-3, all misclassifications varied by one class only (i.e. no non-sensitizers were predicted as strong sensitizers or vice versa).

STS: sequential testing strategy; ITS: integrated testing strategy; SVM: support vector machine; ANN: artificial neural network; BN: Bayesian network; DKH and D_hC_KS: DPRA/h-CLAT/KeratinoSensTM; D_hC: DPRA/h-CLAT.

Table 6. Defined Approach (DA) performance in predicting LLNA sensitizing potency.

Predicting LLNA Potency (Strong, Weak, Non-sensitizers)					
Defined Approach:	Kao STS	Kao ITS	Shiseido ANN (D_hC)	Shiseido ANN (D_hC_KS)	P&G BN ITS-3
<i>N</i>	126	120	126	126	115
Accuracy (%)*	67.5	66.7	65.1	69.8	67.8
Over-predicted (%)	21.4	14.2	21.4	23.0	12.2
Under-predicted (%)	11.1	19.2	13.5	7.1	20.0

*Performance was assessed for prediction of three potency classes as described in the main text, and is shown against the maximum subset (*N*) out of 128 substances with all necessary DA features. With the exception of the P&G BN ITS-3, all DA human potency predictions were off by one class only (i.e. no non-sensitizers predicted as strong or vice versa).

LLNA: local lymph node assay; STS: sequential testing strategy; ITS: integrated testing strategy; SVM: support vector machine; ANN: artificial neural network; BN: Bayesian network; DKH and D_hC_KS: DPRA/h-CLAT/KeratinoSensTM; D_hC: DPRA/h-CLAT.

against each non-overlapping test set (ranging from 36 to 66 substances, depending on the DA), and is reported in the following sections. The detailed predictions on a substance-by-substance basis are provided in [Supplementary Table S2](#), including indications of missing data and overlap with training sets where applicable, and detailed statistics (e.g. 95% confidence intervals, no-information rates, *p* values) can be obtained by running the code provided in the [Supplementary Materials](#).

BASF “2 out of 3”

The straightforward consensus approach proposed by BASF (Urbisch et al. 2015) relies on a majority rule from a set of three assays combining the DPRA, KeratinoSensTM, and the h-CLAT (referred to as “2/3 DKH”). Another consensus approach substituted the U-SENSTM for the h-CLAT, but there were too few substances with U-SENSTM data in this dataset to allow for a similar evaluation of that approach. When compared to the human data, the BASF 2/3 DKH yielded 77.2% accuracy for the binary hazard prediction (18 FN, 11 FP, *n* = 127). When compared to the LLNA, the BASF 2/3 DKH was 70.1% accurate in predicting hazard (26 FN, 12 FP, *n* = 127). This approach did not use any algorithm to optimize the decision rule to reference data, so there was no training set; however, there was a 91 substance overlap with the published dataset (Urbisch et al. 2015). The performance against only the non-overlapping set of 36 substances was 66.7% in predicting human hazard (7 FN, 5 FP, *n* = 36) and 58.3% in predicting LLNA hazard (7 FN, 8 FP, *n* = 36).

Kao STS

The Kao STS DA is a sequential decision tree relying solely upon the DPRA and h-CLAT assays to provide both hazard and potency (three class) predictions. The approach predicted human hazard with accuracy of 80.2% (2 FN, 23 FP, *n* = 126). The three-class potency prediction was 63.5% accurate, with 18 substances under-predicted and 28 over-predicted. The Kao STS predicted LLNA hazard outcomes with 77.8% accuracy (7 FN, 21 FP, *n* = 126), and classified substances as LLNA strong, weak, and non-sensitizers with 67.5% accuracy, with 14 substances under-predicted and 27 substances over-predicted. This DA also did not use a training set in the machine learning context, but its decision rules were optimized based on a set of published data covering 101 substances (Nukada et al. 2013), and later applied to an additional set of 38

substances (Takenouchi et al. 2015). The combined Kao STS dataset of 139 substances had an overlap of 74 substances with the set used here. When considering the non-overlapping set of 52 substances, the approach predicted human hazard with an accuracy of 65.4% (0 FN, 18 FP, *n* = 52), and human potency with an accuracy of 53.9% for three classes, with five substances under-predicted and 19 over-predicted. The approach predicted LLNA hazard of the non-overlapping substance set with 67.3% accuracy (1 FN, 16 FP, *n* = 52) and predicted LLNA potency with 61.5% accuracy, with three under-predicted and 17 over-predicted.

Kao ITS

The Kao ITS is a test battery-based DA that relies upon the quantitative results from the DPRA and the h-CLAT as well as *in silico* hazard predictions from the structure-based DEREK software. Therefore, natural extracts without defined structure (Jasmine grandiflorum, Jasmine sambac, Oakmoss, Treemoss, Tea leaf, and Ylang ylang) were omitted from the assessment of this DA due to inability to generate DEREK predictions for these substances. Two versions of the Kao ITS were evaluated; the results presented here are from the most recent version which includes the consideration that under the condition that the lysine peptide co-elutes with the test substance, one should only consider cysteine peptide depletion (Hirota et al. 2015). The prediction results from the previous ITS (Nukada et al. 2013) differ for only a few substances, and can be found in [Supplementary Table S2](#).

The Kao ITS predicted human skin sensitization hazard with 85% accuracy (5 FN, 13 FP, *n* = 120), and the 3-classes potency prediction was 69.2% accurate, with 21 substances under-predicted and 16 over-predicted. The approach predicted LLNA hazard outcomes with 79.2% accuracy (13 FN, 12 FP, *n* = 120) and predicted three-class LLNA potency outcomes with 66.7% accuracy, with 23 substances under-predicted and 17 substances over-predicted. This DA did not have a training set, rather an optimization set (Takenouchi et al. 2015), although DEREK had a training set. The accuracies against only the 46 non-overlapping substances for human hazard were 69.6% (3 FN, 11 FP, *n* = 46) and for human potency 63%, with six substances under-predicted and 11 over-predicted. The approach predicted LLNA hazard outcome for the non-overlapping set with 63% accuracy (7 FN, 10 FP, *n* = 46) and LLNA potency outcomes with 58.7% accuracy, with nine substances under-predicted and 10 over-predicted.

ICCVAM SVM

We evaluated two ICCVAM SVM models to predict skin sensitization hazard, one that was trained on human data (Strickland et al. 2017) and another that was trained on LLNA data (Strickland et al. 2016).

The human SVM model uses a prediction of skin sensitization hazard generated by OECD Toolbox, log P , the binary results from the KeratinoSensTM and the h-CLAT, and the quantitative result (average of lysine and cysteine depletion) from the DPRA. The model resulted in 81.7% accuracy for human hazard prediction (11 FN, 11 FP, $n = 120$). This DA was trained using a machine learning algorithm on a set that had a 54-substance overlap with the current evaluation set. The performance against the external test set was 71.2% (8 FN, 11 FP, $n = 66$) in predicting human hazard.

The LLNA SVM model uses the binary (positive/negative) result from the h-CLAT, the OECD Toolbox hazard prediction, and six physicochemical properties as inputs (Strickland et al. 2016; Zang et al. 2017a). There were 120 substances those had all the necessary input features to run the SVM model. The model was 88.3% accurate for LLNA hazard prediction (6 FN, 8 FP, $n = 120$). This DA was based on a machine learning algorithm, and used a training set that had 57 substances in common with set used here. The performance was slightly less accurate for the external test set, providing 79.4% accuracy for LLNA hazard prediction (5 FN, 8 FP, $n = 63$).

Shiseido ANN

Two of the four ANN models described in Hirota et al. (2015) were evaluated here, chosen based on availability of the input data and published performance of the models. The first model (ANN_D_hC) used quantitative values from the DPRA (average of lysine and cysteine depletion) and the h-CLAT (minimum of CD86 EC150, CD54 EC200, and CV75) to predict the EC3 value that would be produced in the LLNA. The second model (ANN_D_hC_KS) used the same structure with an additional maximum response input from an in-house ARE assay that was mechanistically and functionally similar to the KeratinoSensTM assay. For this analysis, the I_{\max} value from the KeratinoSensTM was used as the third input. In both cases, the substance was predicted as negative if all the inputs were negative; therefore the ANN models only produced quantitative LLNA EC3 predictions for substances that were positive in at least one of the input assays.

There were 126 substances in the current database that had the necessary inputs to run the ANN models. The ANN_D_hC model was 78.6% predictive of human hazard (4 FN, 23 FP, $n = 126$), and 61.1% predictive for three potency classes, with 21 substances under-predicted and 28 over-predicted. The ANN_D_hC model was 76.2% predictive for LLNA hazard overall (9 FN, 21 FP, $n = 126$), and 65.1% predictive for 3 potency classes, with 17 substances under-predicted and 27 over-predicted. The ANN_D_hC model training set had a 74-substance overlap with the current set, leaving 52 substances to serve as an external test set. For human hazard, the test set accuracy was 63.5% (1 FN, 18 FP, $n = 52$) and 51.9% for the three potency classes, with six substances under-predicted and 19 over-predicted. The model was 65.4%

accurate in predicting LLNA sensitization hazard against only that test set (2 FN, 16 FP, $n = 52$) and 59.6% accurate when predicting the three potency classes, with four substances under-predicted and 17 over-predicted. The ANN_D_hC_KS model was 78.6% predictive for human hazard overall (0 FN, 27 FP, $n = 126$), and 62.7% predictive for three potency classes, with 15 substances under-predicted and 32 over-predicted. The ANN_D_hC_KS model was 81% predictive for LLNA hazard overall (2 FN, 22 FP, $n = 126$), and 69.8% predictive for three potency classes, with nine substances under-predicted and 29 over-predicted. The ANN_D_hC_KS model training set had a 44-substance overlap with the current set, resulting in an 82-substance test set. For human hazard, the test set accuracy was 73.2% (0 FN, 22 FP, $n = 82$) and 56.1% for the three potency classes, with 11 substances under-predicted and 25 over-predicted. The ANN_D_hC_KS model was 78.1% accurate in predicting test set LLNA sensitization hazard (0 FN, 18 FP, $n = 82$) and 65.1% accurate when predicting the three LLNA potency classes, with five substances under-predicted and 23 over-predicted.

P&G BN ITS-3

There were 120 substances with the necessary inputs for the BN ITS-3 model to calculate Bayes factors corresponding to probabilistic predictions for four potency classes (non-sensitizer and weak, moderate, and strong sensitizers). Of the 120 substances run through the model, 23 substances had Bayes factors less than 3, indicating a low prediction reliability; these substances were nonetheless included in the comparison. In five cases, two potency classes had an almost identical Bayes factors; in one case the prediction was borderline non-sensitizer versus weak, in four other cases it was borderline within sensitizer categories (e.g. weak/moderate). For the purpose of the hazard evaluation, the one substance that was borderline non-sensitizer versus weak sensitizer was not included in the statistical analysis. For the potency evaluation all five borderline cases were removed. Thus, the ITS-3 model yielded 119 substances with hazard predictions and 115 substances with potency predictions that could be compared to the LLNA and human data. For potency prediction comparisons, moderate and weak were combined into one category labeled "weak".

The BN ITS-3 model predicted human skin sensitization hazard with 75.6% accuracy (15 FN, 14 FP, $n = 119$), and 54.8% predictive for three potency classes, with 29 substances under-predicted and 23 over-predicted. The BN ITS-3 model predicted LLNA hazard outcomes with 83.2% accuracy (15 FN, 5 FP, $n = 119$), and 67.8% accuracy for three potency classes, with 23 substances under-predicted and 14 over-predicted. The BN ITS-3 model training set had a 66-substance overlap with the current set, leaving 54 substances with data to serve as an external test set. The model was 66.7% accurate in predicting human sensitization hazard against only that test set (9 FN, 9 FP) and 52.8% accurate when predicting the three potency classes, with 12 substances under-predicted and 13 over-predicted. For LLNA hazard, the test set accuracy was 75.9% (9 FN, 4 FP, $n = 54$) and 66% for the

three potency classes, with 11 substances under-predicted and seven over-predicted.

Common test set

The eight models from the six DAs had varying degrees of substance overlap between the 128-substance dataset used for the current analysis and their respective optimization or training sets. There were 28 substances (3 strong human sensitizers, 15 weak, and 10 non-sensitizers) that were common to the non-overlapping external test sets of all the DAs. Should the reader wish to compare DAs in a pairwise or subset fashion with a larger number of substances, all the necessary information is provided in [Supplementary Table S2](#). The performance of each of the *in vitro* assays and the DAs, in terms of sensitivity, specificity, balanced accuracy, and accuracy, against the 28-substance common test set, for both LLNA and human data, is shown in [Supplementary Table S3](#). The LLNA predictive performance against the human endpoint for these 28 substances was quite low, at 50% accuracy for hazard prediction. The performance was uniformly higher (61–75%) across all the DAs when predicting human hazard. The performance ranged from 50% to 79% when comparing the DAs to the LLNA endpoint. Several of the DAs (e.g. Kao STS and Shiseido ANN models) were skewed toward sensitivity. Similar to the performance against the entire 128-substance dataset and their respective external test sets, all the DAs demonstrated superior performance to the LLNA in predicting the human endpoint for the common test set.

Concordance across substances

Out of the 128-substance dataset, 127 substances could be run in at least one of the DAs (2-Hexylidene cyclopentanone did not have data for DPRA or h-CLAT). Out of the 127 substances, there were 50 human skin sensitizers that were correctly predicted by all the DAs, all of which were also positive in the LLNA, and nine non-sensitizers that were also correctly predicted as negative by all the DAs and the LLNA. The remaining 68 substances had some degree of discordance when compared across all the DAs, as shown in [Figure 1](#). The dendrogram on the left shows clusters of substances (by complete linkage method) that exhibit varying patterns across the DA predictions when compared to LLNA and human hazard data. [Supplementary Figures S1 and S2](#) show similar heatmaps for all substances, for hazard and potency respectively. Patterns in DA predictivity across physicochemical properties, mechanistic reaction domains, and ability to predict pre- and pro-haptens were examined (comparisons given in [Supplementary Table S4](#)). Similar to the results for the individual test methods presented in (Hoffmann et al. 2018), few significant differences from overall predictive performance across the substance set were observed. As was observed with the DPRA alone, the substances reacting by acyl transfer, which are all human sensitizers, were uniformly predicted as positive across the DAs, with the exceptions of Benzoyl peroxide (FN in the BASF 2 out of 3) and Penicillin G (FN in the ICCVAM_SVM_Human model). Of the 22 human

sensitizing pre- and pro-haptens, all were predicted correctly by the majority (five or more) of the DAs, and 17 (77%) were predicted correctly by every DA. Limonene was designated as a pre-hapten by (Patlewicz et al. 2016), and was predicted as a sensitizer by five DAs, but was categorized as a human non-sensitizer based on Basketter et al. (2014).

Discussion

Given the marketing ban on cosmetics ingredients tested on animals that has been implemented or is pending in many parts of the world, there is a critical need to identify and validate non-animal testing strategies for skin sensitization hazard and potency. Validated alternative testing strategies will enable rapid, effective risk assessment of cosmetics products and other types of substances. The field of skin sensitization is ahead of other areas of toxicology in this regard because the biological steps comprising the adverse outcome pathway for skin sensitization are relatively well understood, and corresponding test methods have been developed to address these key cellular and molecular events. In addition, the existence of reliable human data, i.e. clinical reports from occupational exposures and standardized data collection from human patch tests, is a rare asset that facilitates development and assessment of new methods for this endpoint.

Evaluating non-animal testing strategies that combine these novel approaches requires an appropriate basis for comparison. The regulatory “reference standard” animal model, the LLNA, provides a benchmark, both in terms of predictive performance against the human response and reliability/reproducibility of the animal test. When compared to the human data for 128 substances used in this analysis, the LLNA was 74% predictive for the binary hazard endpoint, 59% predictive for three potency classes, and 45% predictive for five potency classes. Other studies have shown similar results, such as the 1999 ICCVAM evaluation of the LLNA, where accuracy with respect to human hazard classification was 72% ($n=57$) or more recently as high as 82% ($n=111$) (Urbisch et al. 2015). For three potency categories (strong, weak, and non-sensitizers), ICCVAM (2010) found the accuracy of the LLNA to be 61% ($n=56$). Certain regulatory agencies, such as the U.S. Food and Drug Administration, still accept guinea pig data; the accuracy of this animal test in predicting human outcomes is similar to the LLNA, with 72% accuracy in hazard classification ($n=57$) and 59% accuracy in potency classification ($n=56$). The baseline reproducibility of the LLNA provides another metric for comparison. The concordance between individual LLNA tests for a given substance tested multiple times and the summary statistic for that substance ranges from 63% to 73% (depending on the summary statistic used). In contrast, the inter-laboratory reproducibilities of the OECD-validated *in vitro* tests are all greater than 80% (OECD 2015a, 2015b, 2017).

In the current study, multiple DAs and IATA submitted to the OECD as case studies for predicting skin sensitization hazard or potency were first evaluated in a qualitative manner, i.e. by characterizing the input requirements, feasibility of application by naïve users, transparency, etc. Those that could be reproduced using open-source software (or in the

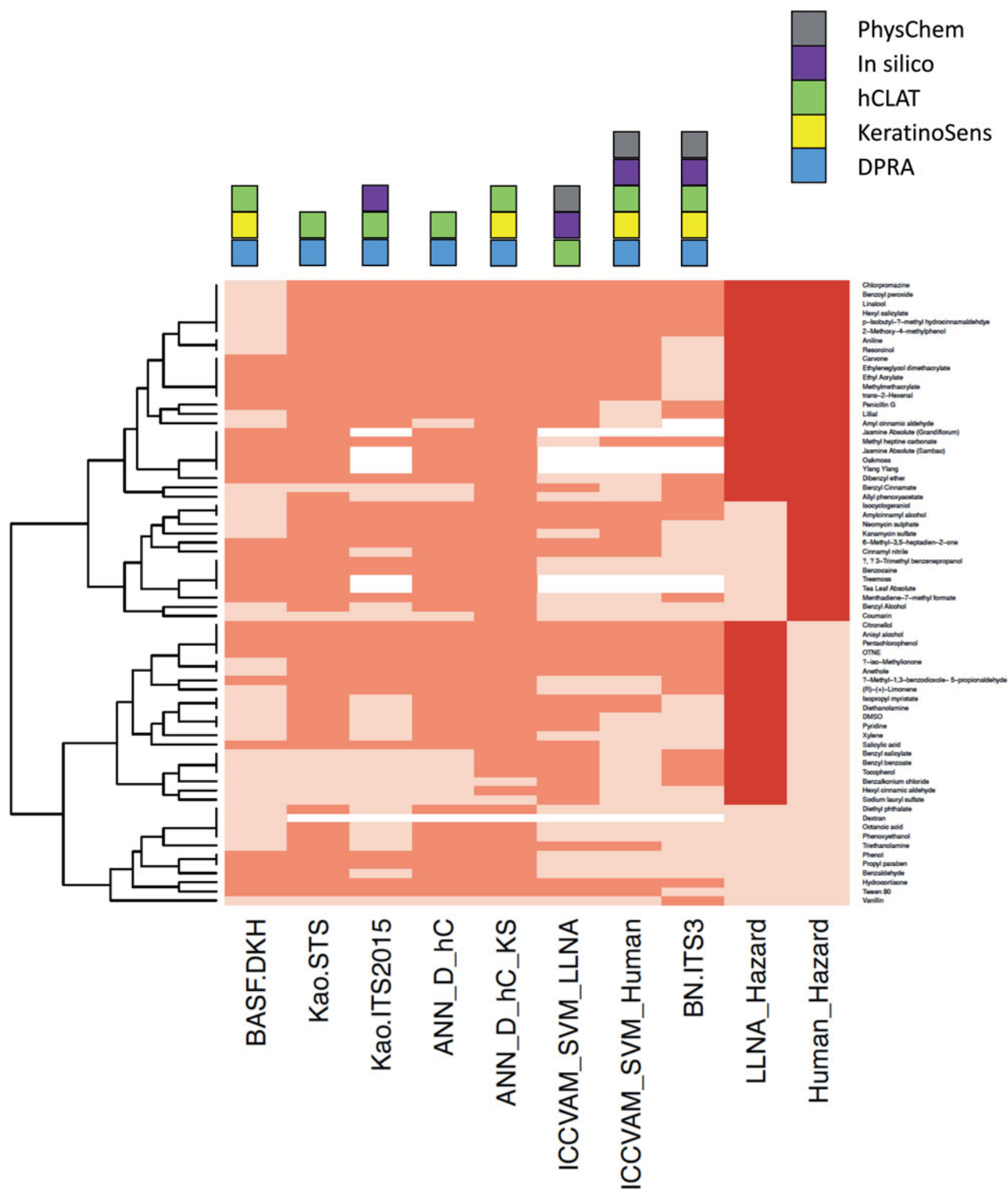


Figure 1. The heatmap shows defined approach (DA) predictions and LLNA/Human hazard data for the 68 substances with some degree of discordance across the results. Orange or red indicates sensitizer based on DA predictions or *in vivo* data, respectively, and tan cells are non-sensitizer predictions/data. White indicates that not all required features were present to run the model for the DA. The dendrogram on the left shows clusters of substances (complete linkage method) and the color coding above the plot indicates which features were used by each model. Abbreviations for each DA name are defined in the text.

case of the Bayesian ITS-3, software provided by CE STTF members) were quantitatively evaluated against a large set of substances having both LLNA and human data available, including many cosmetics ingredients. For this entire substance set, the accuracy of the eight models, derived from six DAs, in predicting the LLNA skin sensitization hazard endpoint ranged from 70% to 88%. The five potency prediction

models evaluated here showed 65–70% predictive performance in discriminating strong, weak, and non-sensitizers based on the LLNA endpoint. As indicated previously, when examining multiple LLNA tests for the same substance there is a fairly low concordance between the potency categories that would be assigned if one relied exclusively on an individual LLNA result versus the weight-of-evidence provided by

multiple tests, regardless of the summary metric used for the EC3 (e.g. median, mean, etc.). For hazard identification, the LLNA displays 78% concordance with itself, while potency categorization is 63–73% depending on the summary metric (Hoffmann et al. 2018). This reflects the variability in the animal data and provides an indication of the uncertainty that exists when comparing DA predictions to the LLNA endpoint, especially in the case of substances that only have one LLNA study. Further, as the goal is ultimately to predict skin sensitization in humans, comparing the DA outcomes to the animal results obscures the true accuracies of the models, which may be, and in many cases are, superior to the animal data in predicting the human endpoint.

In fact, all the non-animal DAs evaluated here performed as well as or better than the LLNA in predicting human skin sensitization endpoints for both hazard and potency. The performance of the DAs evaluated here in predicting human skin sensitization hazard endpoint ranged from 76% to 85% (compared to the LLNA, which was 74% accurate). The DAs that predicted three potency classes showed 55–69% predictive performance in discriminating strong, weak, and non-sensitizers based on the human categories outlined in Basketter et al. (2014), (compared to 59% for the LLNA). No strong human sensitizers were falsely predicted as non-sensitizers by any of the DAs, except for the BN ITS-3 predictions for trans-2-hexenal and 6-methyl-3,5-heptadien-2-one. Certain DAs maximize sensitivity at the expense of specificity (e.g. Kao STS and both Shiseido ANN models). The highest balanced accuracy (80%) against the human hazard endpoint was produced by the Kao ITS model, which depends on DPRA, h-CLAT, and DEREK predictions. However, as shown in Figure 1, the DAs that include *in silico* predictions cannot be applied to natural products without defined structures, such as Treemoss, Jasmine, and Ylang ylang. Certain compounds were consistently mispredicted as sensitizers across all the DAs, including those that were also false positives in the LLNA (Anisyl alcohol, Citronellol, Pentachlorophenol, and OTNE), and Hydrocortisone, which was negative in the LLNA. None of the human sensitizers were missed by every DA, but Coumarin was a false negative in all DAs except the ANN_D_hC_KS. Moreover, three other substances (Allyl phenoxyacetate, Benzyl alcohol, and Benzyl Cinnamate) were correctly identified as sensitizers by only three out of the eight models.

Each of the data interpretation procedures used by the DAs has a unique set of advantages and limitations. The test battery methods require very limited computational power and are transparent and mechanistically interpretable. The machine learning methods can combine features in unique ways that may increase the predictive power, with a tradeoff in loss of transparency. Interestingly, the hazard predictions for the Kao STS and the ANN_D_hC models (which both depend on DPRA and h-CLAT) are almost identical, despite having extremely different data interpretation procedures, indicating at least in this case that complex approaches may not provide added benefit over a simple decision tree. However, the more complex DAs, like the ANNs, also have the ability to provide a quantitative prediction of potency potentially to be used for skin sensitization risk assessment.

Most of the DAs also rely heavily upon one or more of three *in vitro* test methods. The prediction models for the individual test methods were optimized in different fashions, to increase accuracy or to reduce false negatives, which is demonstrated via the performance of the individual test methods and propagated to the DAs that depend on those methods and the associated prediction models. Factors affecting applicability of the individual methods (e.g. technological limitations) need to be considered in application of the DAs. There is also a need for careful tracking of software versions for all DAs that rely on *in silico* tools, in case retraining of the model is warranted.

There exist particular challenges concerning the application of the potency categorizations, for both the LLNA and the human data. The LLNA potency prediction models evaluated here were trained on the ECETOC cutoff of an EC3 of 1% for strong sensitizers, rather than the EU-CLP cutoff of 2% for Categories 1 A/1B. The database presented in the companion paper (Hoffmann et al. 2018) could be used to develop DAs that specifically target these subcategories. In the case of the human data, substances with individual case reports of sensitization have been considered here as non-sensitizers, matching the current European regulatory approach, but in certain high-exposure scenarios for cosmetics ingredients very weak potencies may play a role. Therefore, the current analysis was repeated under a reclassification where only human category 6 substances (Basketter et al. 2014) were considered negatives (category 5 were designated weak positives), and the accuracies were very similar, with a tradeoff resulting in very few false positives, but more false negatives from category 5 (see Supplementary Material for code to run performance statistics with alternate human data classification). An example from category 5 is isopropanol, a substance used in many cosmetic products. No relevant intrinsic sensitization potential has been reported [recently reviewed by Zhang et al. (2017)]. However, some positive patch test results under specific medical treatment conditions have been reported (Garcia-Gavin et al. 2011) that are not considered relevant for cosmetics. Consequently, there is an intrinsic potency to induce skin sensitization in humans, but cosmetic exposure is highly unlikely to induce skin sensitization.

The system used by Basketter et al. (2014) enables human potency categorization by a combination of direct human induction (e.g. HRIPT) and pre-clinical induction (LLNA) data with human clinical data (diagnostic patch test). Consequently, the categorization is based on the existence of intrinsic hazard potency of the substance in question (HRIPT, LLNA) and its contact allergy prevalence, particularly referring to the subset of the general population attending dermatology clinics (Thyssen et al. 2007). This is considered to permit better (expert) judgment of sensitization rates in the context of real life exposure relevant for consumers. While human potency categorization based on expert judgment is very valuable, the transparency and reproducibility of this classification system needs to be increased, and work is ongoing in this area (Api et al. 2017). Another point to consider is that many of the DAs, and indeed the individual test methods they rely upon, use prediction models that were trained on LLNA data, which may be negatively influencing their

predictive performance against human sensitization categories. As discussed in Hoffmann et al. (2018), prediction models could be developed for subsets of substances based on *a priori* information such as physicochemical properties, rather than attempting to apply global models across chemical space.

The DAs and IATA that we were not able to quantitatively evaluate here have also demonstrated strong performance in predicting skin sensitization potential, and the current work is not meant to exclude them from consideration in regulatory risk assessment. Integrated assessments will inherently incorporate all reliable and relevant information, such as physicochemical data, intended substance function (e.g. dye) or origin (e.g. natural extracts), information on suspected transformation, skin penetration information, etc. Additional considerations that could be the subject of future efforts include strategy optimization for potency predictions (to specifically identify strong sensitizers, for example), and development of testing strategy amendments for specific purposes (e.g. explicit confirmation of non-sensitization). Further characterization of variability and uncertainty in the human data and the non-animal data, as well as expansion of the human reference dataset, are also needed. These and other aspects are being addressed by the International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM) in the context of the OECD Test Guidelines Program to facilitate international regulatory harmonization (Casati et al. 2017), and also by Cosmetics Europe (Hoffmann et al. 2018). Furthermore, these results can be combined with data on other types of substances to expand and evaluate the applicability domain of the DAs. The U.S. National Toxicology Program is working with ICCVAM federal agencies to generate *in vitro* data on nominated substances and formulation products that will facilitate further evaluation of these DAs for non-cosmetics, e.g. pesticides and industrial chemicals.

In this study, we qualitatively and quantitatively evaluated several non-animal DAs for skin sensitization testing that used data from validated *in vitro* assays, non-testing resources such as *in silico* predictions and physicochemical properties, and algorithms that were in most cases reproduced using open-source code. The code provided here will enable others to apply the DAs to additional substances as new datasets are generated. All of the DAs demonstrated equivalent or superior performance to existing animal tests and were successful in predicting human skin sensitization outcomes for both hazard and potency. These DAs rely heavily upon *in vitro* assays mapped to key events in the AOP, and in some cases require input from commercial or open-source *in silico* tools. This work represents significant progress towards formalizing performance criteria that can be applied to any new non-animal testing strategy, and identifies DAs that could serve as effective replacements to the LLNA in predicting human skin sensitization hazard or indeed for risk assessment.

Acknowledgements

The authors are grateful to Eileen Phillips (Integrated Laboratory Systems, Inc.) for data curation, Cindy Ryan and Greg Dameron (P&G) for

generating all BN ITS3 data, Jason Pirone (formerly Sciome, LLC) for assistance in ANN function coding, and Catherine Sprankle (Integrated Laboratory Systems, Inc.) for editorial support. In addition, the authors gratefully acknowledge the constructive comments of the anonymous reviewers, which were very helpful in improving the manuscript.

Declaration of interest

This work has been conceived, planned and executed by Cosmetic Europe's Skin Tolerance Task Force (CE STTF) in collaboration with NIH/NIEHS/DNTP/NICEATM (Nicole Kleinstreuer, Warren Casey), supported by ILS (Dave Allen, Judy Strickland, Qingda Zang).

Cosmetics Europe is the European trade association for the cosmetics and personal care industry. The members include cosmetics and personal care manufacturers, and also associations representing our industry at national level, right across Europe (for more information see: <https://www.cosmeticseurope.eu/>). Cosmetic Europe facilitated scientific meetings of the CE STTF, coordinated the overall project management and administrative tasks relating to the completion of this work, and contributed to the writing of the manuscript. The CE STTF is composed of cosmetic company experts (see affiliations on cover page), who are not paid for their work on the task force, external consultants (Sebastian Hoffmann and Erwin van Vliet paid by Cosmetics Europe) and Cosmetics Europe staff (Bertrand Desprez and Martina Klaric employed by Cosmetics Europe).

Nicole Kleinstreuer is employed by NIH/NIEHS/DNTP/NICEATM, and conducted the analyzes presented herein, wrote the code to reproduce the defined approaches, and drafted the manuscript. Warren Casey is employed by NIH/NIEHS/DNTP/NICEATM and contributed editorial input to the manuscript. Dave Allen, Judy Strickland, and Qingda Zang are employed by ILS, and contributed editorial input to the manuscript, assistance with coding, and feature inputs to defined approaches. ILS employees were supported with federal funds from the National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health under Contract No. HHSN273201500010C in support of NICEATM.

The opinions expressed herein and the conclusions of this publication are those of the authors and do not necessarily represent the views of any government agency, Cosmetics Europe, nor those of its member companies.

None of the authors has appeared in any legal or regulatory proceedings in the last five years related to the contents of this paper.

The NIEHS and the companies of the CE STTF members have approved this work for publication.

Supplemental material

Supplemental material for this article is available online [here](#).

References

- Alepee N, Piroird C, Aujoulat M, Dreyfuss S, Hoffmann S, Hohenstein A, Meloni M, Nardelli L, Gerbeix C, Cotovio J. 2015. Prospective multi-centre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro*. 30:373–382.
- Anderson SE, Siegel PD, Meade BJ. 2011. The LLNA: a brief review of recent advances and limitations. *J Allergy (Cairo)*. 2011:424203.
- Api AM, Parakhia R, O'Brien D, Basketter DA. 2017. Fragrances categorized according to relative human skin sensitization potency. *Dermatitis*. 28:299–307.
- Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. 2006. Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol In Vitro*. 20:767–773.
- Asturiol D, Casati S, Worth A. 2016. Consensus of classification trees for skin sensitisation hazard prediction. *Toxicol In Vitro*. 36:197–209.

- Basketter DA, Alepee N, Ashikaga T, Barroso J, Gilmour N, Goebel C, Hibatallah J, Hoffmann S, Kern P, Martinozzi-Teissier S, et al. 2014. Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis*. 25:11–21.
- Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Eltze T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. 2012. Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol*. 63:489–504.
- Bell S, Phillips J, Sedykh A, Tandon A, Sprankle C, Morefield S, Shapiro A, Allen D, Shah R, Maull E, et al. 2017. An integrated chemical environment to support 21st century toxicology. *Environ Health Perspect*. 125:054401.
- Birnbaum LS. 2013. 15 years out: reinventing ICCVAM. *Environ Health Perspect*. 21:a40.
- Bruckner AL, Weston WL, Morelli JG. 2000. Does sensitization to contact allergens begin in infancy?. *Pediatrics*. 105:e3.
- Casati S, Aschberger K, Barroso J, Casey W, Delgado I, Kim TS, Kleinstreuer N, Kojima H, Lee JK, Lowit A, et al. 2017. Standardisation of defined approaches for skin sensitisation testing to support regulatory use and international adoption: position of the International Cooperation on Alternative Test Methods. *Arch Toxicol*. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2097-4>
- Daniel A, Strickland J, Allen D, Casati S, Zuang V, Barroso J, Whelan M, Regimbald-Krnel MJ, Kojima H, Nishikawa A, et al. 2018. International regulatory requirements for skin sensitization testing. *Regul Toxicol Pharmacol*.
- Davies M, Pendlington RU, Page L, Roper CS, Sanders DJ, Bourner C, Pease CK, MacKay C. 2011. Determining epidermal disposition kinetics for use in an integrated nonanimal approach to skin sensitization risk assessment. *Toxicol Sci*. 119:308–318.
- Del Bufalo A, Pauloin T, Alépée N, Clouzeau J, Detroyer A, Eilstein J, Gomes C, Nocairi H, Piroird C, Rousset F, et al. 2018. Alternative integrated testing for skin sensitisation: assuring consumer safety. *Appl In Vitro Toxicol*. <https://doi.org/10.1089/avt.2017.0023>
- Dumont C, Barroso J, Matys I, Worth A, Casati S. 2016. Analysis of the Local Lymph Node Assay (LLNA) variability for assessing the prediction of skin sensitisation potential and potency of chemicals with non-animal approaches. *Toxicol In Vitro*. 34:220–228.
- Emter R, Ellis G, Natsch A. 2010. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 245:281–290.
- EU. 2016. Commission regulation (EU) 2016/1688 of 20 September 2016 amending Annex VII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards skin sensitisation. *Off J Eur Union*. 255:1–3.
- European Union. 2003. Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. *Off J Eur Union*. 66:26–35.
- Garcia-Gavin J, Lissens R, Timmermans A, Goossens A. 2011. Allergic contact dermatitis caused by isopropyl alcohol: a missed allergen? *Contact Dermat*. 65:101–106.
- Gerberick GF, Ryan CA, Kimber I, Dearman RJ, Lea LJ, Basketter DA. 2000. Local lymph node assay: validation assessment for regulatory purposes. *Am J Contact Dermat*. 11:3–18.
- Gerberick GF, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, Lepoittevin JP. 2004. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol Sci*. 81:332–343.
- Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittevin JP. 2007. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. *Toxicol Sci*. 97:417–427.
- Gomes C, Nocairi H, Thomas M, Collin J, Saporta G. 2014. A simple and robust scoring technique for binary classification. *AIR*. 3:52–58.
- Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, et al. 2015. Evaluation of combinations of in vitro sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol*. 35:1333–1347.
- Hoffmann S. 2015. LLNA variability: an essential ingredient for a comprehensive assessment of non-animal skin sensitization test methods and strategies. *Altex*. 32:379–383.
- Hoffmann S, Kleinstreuer N, Alepee N, Allen D, Api AM, Ashikaga T, Clouet E, Cluzel M, Desprez B, Gellatly N, et al. 2018. Non-animal methods to predict skin sensitisation (I): the Cosmetics Europe database. *Crit Rev Toxicol*. <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429385>
- Jaworska J, Dancik Y, Kern P, Gerberick F, Natsch A. 2013. Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J Appl Toxicol*. 33:1353–1364.
- Jaworska J, Harol A, Kern PS, Frank Gerberick G. 2011. Integrating non-animal test information into an adaptive testing strategy – skin sensitization proof of concept case. *Altex*. 28:211–225.
- Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. 2015. Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol*. 89:2355–2383.
- Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF, Ryan CA, Dearman RJ. 2011. Chemical allergy: translating biology into hazard characterization. *Toxicol Sci*. 120:S238–S268.
- Loveless SE, Api AM, Crevel RW, Debruyne E, Gamer A, Jowsey IR, Kern P, Kimber I, Lea L, Lloyd P, et al. 2010. Potency values from the local lymph node assay: application to classification, labelling and risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*. 56:54–66.
- Luebke R. 2012. Immunotoxicant screening and prioritization in the twenty-first century. *Toxicol Pathol*. 40:294–299.
- MacKay C, Davies M, Summerfield V, Maxwell G. 2013. From pathways to people: applying the adverse outcome pathway (AOP) for skin sensitization to risk assessment. *Altex*. 30:473–486.
- Macmillan DS, Canipa SJ, Chilton ML, Williams RV, Barber CG. 2016. Predicting skin sensitisation using a decision tree integrated testing strategy with an in silico model and in chemico/in vitro assays. *Regul Toxicol Pharmacol*. 76:30–38.
- Maxwell G, MacKay C, Cubberley R, Davies M, Gellatly N, Glavin S, Gouin T, Jacquilleot S, Moore C, Pendlington R, et al. 2014. Applying the skin sensitisation adverse outcome pathway (AOP) to quantitative risk assessment. *Toxicol In Vitro*. 28:8–12.
- Mehling A, Eriksson T, Eltze T, Kolle S, Ramirez T, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. 2012. Non-animal test methods for predicting skin sensitization potentials. *Arch Toxicol*. 86:1273–1295.
- Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. 2012. *Janeway's immunobiology*. 8th ed. New York: Garland Science.
- Natsch A. 2014. Integrated approaches to safety testing: general principles and skin sensitization as a test case. In: Allen D, Waters MD, editors. *Reducing, refining and replacing the use of animals in toxicity testing*. London: Royal Society of Chemistry. p. 364–288.
- Natsch A, Emter R. 2008. Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the in vitro testing of the sensitization potential of chemicals. *Toxicol Sci*. 102:110–119.
- Natsch A, Emter R, Gfeller H, Haupt T, Ellis G. 2015. Predicting skin sensitizer potency based on in vitro data from KeratinoSens and kinetic peptide binding: global versus domain-based assessment. *Toxicol Sci*. 143:319–332.
- Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. 2012. Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol In Vitro*. 26:1150–1160.
- Nukada Y, Miyazawa M, Kazutoshi S, Sakaguchi H, Nishiyama N. 2013. Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicol In Vitro*. 27:609–618.
- OECD. 2012. OECD Series on Testing and Assessment No. 168. *The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Assessment*. Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2014a. *The OECD QSAR Toolbox*. Paris: OECD Publishing. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/theoecdqsartoolbox.htm>.

- OECD. 2014b. Test No. 428. Skin absorption: in vitro method. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2015a. Test No. 442C. *In Chemico* skin sensitization: direct peptide reactivity assay (DPRA). In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2015b. Test No. 442D. *In Vitro* Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2016a. Guidance document on the reporting of defined approaches to be used within integrated approaches to testing and assessment. Series on Testing and Assessment No. 255. Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2016b. Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches to be used within Integrated Approaches to Testing and Assessment. Series on Testing and Assessment No. 256. Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2017. Test No. 442E. *In vitro* skin sensitisation: assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitisation. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. Paris: OECD Publishing.
- Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth AP, Aschberger K. 2016. Can currently available non-animal methods detect pre and pro-haptens relevant for skin sensitization? *Regul Toxicol Pharmacol.* 82:147–155.
- Patlewicz G, Dimitrov SD, Low LK, Kern PS, Dimitrova GD, Comber MI, Aptula AO, Phillips RD, Niemela J, Madsen C, et al. 2007. TIMES-SS – a promising tool for the assessment of skin sensitization hazard. A characterization with respect to the OECD validation principles for (Q)SARs and an external evaluation for predictivity. *Regul Toxicol Pharmacol.* 48:225–239.
- Patlewicz G, Kuseva C, Kesova A, Popova I, Zhechev T, Pavlov T, Roberts DW, Mekenyan O. 2014. Towards AOP application-implementation of an integrated approach to testing and assessment (IATA) into a pipeline tool for skin sensitization. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69:529–545.
- Piroird C, Ovigne JM, Rousset F, Martinozzi-Teissier S, Gomes C, Cotovio J, Alepee N. 2015. The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol In Vitro.* 29:901–916.
- Ramirez T, Mehling A, Kolle SN, Wruck CJ, Teubner W, Eltze T, Aumann A, Urbisch D, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. 2014. LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. *Toxicol In Vitro.* 28:1482–1497.
- Reisinger K, Hoffmann S, Alepee N, Ashikaga T, Barroso J, Elcombe C, Gellatly N, Galbiati V, Gibbs S, Groux H, et al. 2015. Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol In Vitro.* 29:259–270.
- Roberts DW, Api AM, Aptula AO. 2016. Chemical applicability domain of the Local Lymph Node Assay (LLNA) for skin sensitisation potency. Part 2. The biological variability of the murine Local Lymph Node Assay (LLNA) for skin sensitisation. *Regul Toxicol Pharmacol.* 80:255–259.
- Rovida C, Alepee N, Api AM, Basketter DA, Bois FY, Caloni F, Corsini E, Daneshian M, Eskes C, Ezendam J, et al. 2015. Integrated Testing Strategies (ITS) for safety assessment. *Altex.* 32:25–40.
- Sauer UG, Hill EH, Curren RD, Raabe HA, Kolle SN, Teubner W, Mehling A, Landsiedel R. 2016. Local tolerance testing under REACH: accepted non-animal methods are not on equal footing with animal tests. *Altern Lab Anim.* 44:281–299.
- Stelling W. 2016. Safety evaluation of cosmetic ingredients regarding their skin sensitization potential. *Cosmetics.* 3:14.
- Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, et al. 2016. Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* 36:1150–1162.
- Strickland J, Zang Q, Paris M, Lehmann DM, Kleinstreuer N, Allen D, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Casey W. 2017. Multivariate models for prediction of human skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* 37:347–360.
- Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, et al. 2015. Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35:1318–1332.
- Thyssen JP, Linneberg A, Menne T, Johansen JD. 2007. The epidemiology of contact allergy in the general population—prevalence and main findings. *Contact Dermat.* 57:287–299.
- Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. 2015. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71:337–351.
- van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, Ezendam J. 2014. Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69:371–379.
- Williams WC, Copeland C, Boykin E, Quell SJ, Lehmann DM. 2015. Development and utilization of an ex vivo bromodeoxyuridine local lymph node assay protocol for assessing potential chemical sensitizers. *J Appl Toxicol.* 35:29–40.
- Zang Q, Mansouri K, Williams AJ, Judson RS, Allen DG, Casey WM, Kleinstreuer NC. 2017a. In silico prediction of physicochemical properties of environmental chemicals using molecular fingerprints and machine learning. *J Chem Inf Model.* 57:36–49.
- Zang Q, Paris M, Lehmann DM, Bell S, Kleinstreuer N, Allen D, Matheson J, Jacobs A, Casey W, Strickland J. 2017b. Prediction of skin sensitization potency using machine learning approaches. *J Appl Toxicol.* 37:792–805.
- Zhang H, Shi Y, Wang C, Zhao K, Zhang S, Wei L, Dong L, Gu W, Xu Y, Ruan H, et al. 2017. An improvement of LLNA:DA to assess the skin sensitization potential of chemicals. *J Toxicol Sci.* 42:129–136.

Titre : Intégration des modèles *in vitro* dans la stratégie d'évaluation de la sensibilisation cutanée

Mots clés : sensibilisation cutanée, stratégie de tests intégrés, voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables, THP-1, *in vitro*, Nrf2

Résumé : Depuis l'interdiction en 2013 des tests sur les animaux par le Règlement cosmétique n°1223/2009, différentes méthodes *in vitro* ont été développées. Toutefois, selon un consensus scientifique, aucune méthode ne peut couvrir à elle seule l'ensemble des événements clés (KE) définis pour la sensibilisation cutanée.

Après un état de l'art des méthodes alternatives relatives à la sensibilisation cutanée, nous avons sélectionné et comparé 3 tests pour ensuite déterminer la meilleure stratégie à suivre. Dans le but de proposer un nouveau test intégré, nous avons adressé l'ensemble des KEs au sein d'un même type cellulaire. La cellule dendritique (DC) jouant un rôle clé dans le développement de la dermatite de contact allergique (DCA), notre choix s'est porté sur la lignée humaine pro-monocytaire THP-1.

Nous avons étudié comme événements initiaux (KE1) les formes réactives à l'oxygène (FRO) et le glutathion (GSH), la voie Nrf2-Keap1 (voie centrale de détoxification) et l'expression génique pour le KE2, ainsi que les modifications phénotypiques pour le KE3.

Nous avons montré que les allergisants forts induisent une production précoce des FRO associée à une réduction du GSH. Ils activent également la voie Nrf2-Keap1 et induisent l'expression des marqueurs de surface cellulaire CD54 et CD86, ainsi qu'une production de cytokines spécifiques (IL-8, IL-18,...).

Pour conclure, ce travail a permis de proposer un test intégrant l'ensemble des mesures biologiques comme différents KE au sein d'un même type cellulaire.

Title : Integration of *in vitro* models in risk assessment of skin sensitization.

Keywords : skin sensitization, integrated testing strategy, adverse outcome pathway (AOP), THP-1, *in vitro*, Nrf2

Abstract : Since the animal testing ban in 2013 by Cosmetics Regulation n°1223/2009, various *in vitro* methods have been developed. However, according to the scientific consensus, no single method can stand alone to cover the different key events (KE) defined for skin sensitization.

After a state of the art of alternative methods relating to skin sensitization, we selected and compared 3 tests to determine the best strategy to follow. In order to propose a new integrated test, we wanted to address all KE within the same cell line. Because dendritic cell (DC) plays a key role in the development of allergic contact dermatitis (ACD), we have chosen the pro-monocytic human line THP-1.

We have studied as initial events (KE1), reactive oxygen species (ROS) and glutathione (GSH), Nrf2-Keap1 pathway (central detoxification pathway) and gene expression for KE2 as well as phenotypic modifications for KE3.

We have shown that strong allergens are correlated with early production of FRO associated with GSH reduction. They also activate the Nrf2-Keap1 pathway and induce the expression of CD54 and CD86 cell surface markers as well as production of specific cytokines (IL-8, IL-18, etc.).

To conclude, this work proposes a new assay integrating all the biological measures as different KEs within the same cell.

