

→ D. Zissu,
Département Polluants et santé,
Centre de Lorraine, INRS, Nancy

IN VITRO TEST METHODS FOR DERMAL TOXICITY RISK ASSESSMENT

Occupational contact dermatitis accounts for approx. 5% (France, 2001) of all the pathologies in the industrial workplace, as skin contact is a relatively common occurrence. Specific regulations relative to the production and transport of new substances placed on the market have been drawn up and issued by the European Union for the harmonisation of dangerous substance classification and labelling systems. Dermal risk assessment includes the evaluation of primary irritant dermatitis, skin sensitisation and corrosive chemicals by means of conventional tests carried out in animal, and human clinical studies. A programme to develop *in vitro* test methods has been launched by the scientific community aimed at reducing the number of animal experiments and clinical tests. Numerous scientific teams have worked to develop reliable *in vitro* test methods reproducible in different laboratories. These alternative methods employ skin cell cultures, isolated epidermal or skin models, and skin specimens from surgical operations. The main difficulty in developing such systems lies in the complexity of the mechanisms resulting from the contact between the irritant or sensitising substances and the skin. The European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) was created in 1991 under the aegis of the European Union both to promote and to co-ordinate the validation of alternative methods. In 2000, two *in vitro* corrosivity methods were validated by the ECVAM, "The Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance Test" (TER) and a method using a human epidermal model, which now form part of a European directive.

- occupational dermatitis
- corrosive chemical • irritant chemical
- sensitising chemical
- *in vitro* tests • validation

Tests *in vitro* pour l'évaluation de la tolérance cutanée aux substances chimiques

Les dermatoses professionnelles représentent de l'ordre de 5 % des pathologies professionnelles en France, en 2001 (*). En effet, le contact cutané est une des formes les plus courantes de l'exposition aux produits chimiques en milieu industriel. Les procédures concernant la production, la circulation des nouvelles substances chimiques mises sur le marché, sont soumises à une réglementation européenne pour une approche harmonisée de l'identification et la gestion des risques. L'évaluation du potentiel corrosif, irritant et/ou sensibilisant des produits chimiques et préparations est réalisée au moyen de tests conventionnels chez l'animal et d'essais cliniques chez l'homme. Un programme pour le développement de tests *in vitro* a été initié par la communauté scientifique pour réduire l'expérimentation animale et les essais cliniques chez des volontaires. De nombreuses équipes travaillent à l'élaboration de tests *in vitro*, qui doivent être fiables et reproductibles d'un laboratoire à l'autre. Ces méthodes alternatives sont construites à partir de cultures de cellules cutanées, d'épidermes et/ou de peaux reconstituées, de peaux totales provenant d'actes chirurgicaux. La difficulté majeure à l'élaboration de tels systèmes est due à la complexité des mécanismes induits en réaction, au contact d'un irritant ou d'un sensibilisant avec la peau. Le Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (CEVMA) a été créé en 1991 sous l'égide de l'Union Européenne afin de promouvoir, coordonner l'élaboration des tests *in vitro* et initier leur validation. En 2000, deux essais *in vitro* de corrosivité cutanée ont été validés et ont fait l'objet d'une directive européenne : l'essai de résistance électrique transcutanée (RET) sur peau de rat et un essai utilisant un modèle de peau humaine.

- dermatoses professionnelles • produits corrosifs • produits irritants • produits sensibilisants

La peau est l'organe du corps humain le plus étendu et son rôle majeur est de préserver l'homéostasie interne (eau, sels minéraux, température) contre les agressions des facteurs externes provoquant par exemple, une déshydratation excessive, l'entrée de l'eau, la pénétration microbienne et/ou l'irradiation aux UV. Dès que l'agression induite par l'action des facteurs environnementaux physiques, chimiques, et/ou biologiques, dépasse le seuil de tolérance et la capacité de restauration de la peau, apparaissent des pathologies [1].

Ainsi, une action mécanique traumatique peut être à l'origine d'ulcères, les radiations UV de brûlures, les organismes biologiques d'infections et les produits chimiques de dermatites et/ou de corrosion.

Une substance corrosive provoque une nécrose de la peau qui laisse une cicatrice tandis qu'une substance irritante n'induit qu'une réaction inflammatoire réversible. Dans les deux cas, on peut observer un érythème dû à une congestion vasculaire et un œdème caractérisé par un épanchement de quantités plus ou moins importantes de liquide dans les espaces intercellulaires de l'épiderme, du derme et/ou des tissus sous-jacents.

(* En se référant aux statistiques de la Caisse nationale de l'Assurance-maladie des travailleurs salariés. Cf. : statistiques technologiques des accidents du travail et des maladies professionnelles (année 2001). Remarques. Paris, CNAM, 2003. Des études un peu moins récentes indiquaient des pourcentages plus importants : environ 20 %, d'après J.N. Lawrence [2], et de 20 à 35 %, en Europe et aux États-Unis, d'après R.J.G. Rycroft et coll. - Text book of contact dermatitis. Springer-Verlag, 1995. (ndlr).

L'allergie cutanée à une substance est un état d'hypersensibilité de la peau, réponse immunitaire à un antigène (substance étrangère à l'organisme) qui apparaît de façon excessive ou inappropriée, et se manifeste aussi sous la forme d'un érythème et d'un œdème [1].

Dans le secteur industriel, une des formes les plus courantes de l'exposition aux produits chimiques est le contact cutané et, si les produits sont irritants corrosifs et/ou sensibilisants, cette exposition peut conduire à une dermatite, un eczéma ou à des lésions plus importantes, regroupées sous le terme de dermatoses professionnelles. Celles-ci constituent un problème important qui pèse lourdement sur les dépenses de santé, car elles représentent plus de 20 % de toutes les pathologies professionnelles [2] (*).

Par conséquent, l'évaluation du potentiel irritant, corrosif et/ou sensibilisant à des substances chimiques existantes ou nouvellement mises sur le marché représente un souci majeur relatif à la prévention des maladies professionnelles et fait l'objet d'une réglementation destinée à établir une classification et un étiquetage des substances dangereuses [3].

Les substances ou préparations classées « corrosives » sont étiquetées soit R 35 (provoquent de graves brûlures), soit R 34 (provoquent des brûlures). Les substances « irritantes pour la peau » sont classées R 38 et les substances « pouvant entraîner une sensibilisation par contact avec la peau » sont classées R 43 (1).

L'évaluation de la tolérance cutanée aux produits chimiques se fait au moyen de tests diversifiés, réalisés en routine pour la majorité d'entre eux :

■ Les tests chez l'animal tel le test de Draize [4] pour l'étude de l'irritation cutanée primaire, les tests de Magnusson & Kligman [5] et Buèhler [6] pour l'étude de la sensibilisation cutanée de contact, et pour lesquels se pose la question de leur pertinence par rapport à l'évaluation du risque chez l'homme.

■ Les techniques non invasives mesurant les modifications inflammatoires, avec pour inconvénient leur faible reproductibilité d'un laboratoire à un autre [2], due essentiellement au caractère subjectif des mesures.

(* En France, 5 % environ des maladies professionnelles constatées en 2001. Voir note (*) p. précédente.

■ Les études cliniques chez l'homme, limitées pour des considérations éthiques et financières [2].

La politique communautaire concernant les substances chimiques est sous la responsabilité de la Commission de l'Union européenne, dont les propositions sont exposées dans le Livre blanc intitulé « Stratégie pour la future politique dans le domaine des substances chimiques » [7]. La protection de la santé humaine et de l'environnement, ainsi que la promotion de l'expérimentation non animale, ont une place importante parmi ces propositions. La mise au point de méthodes de substitution répond à l'attachement de cette Commission au respect de la législation relative à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou scientifiques [7] et a pour but de limiter le plus possible l'expérimentation animale. Une des principales tâches du Centre européen pour la validation des méthodes alternatives à l'expérimentation animale (CEVMA) du centre commun de recherche de la Commission est de valider des méthodes de substitution permettant de réduire, de mieux cibler ou de remplacer les expériences sur les animaux. Quand de telles méthodes ont été mises au point et ont fait l'objet de comparaisons interlaboratoires, après validation, elles sont proposées à la Commission, afin de les intégrer dans la législation communautaire. Elle sont également proposées à l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), pour être publiées sous la forme de directives reconnues au niveau international.

L'objectif de ce travail est de décrire l'état d'avancement de la réalisation et la validation des tests de substitution à l'expérimentation animale dans le domaine de la tolérance cutanée aux substances chimiques, ainsi que les difficultés rencontrées au cours de ce processus d'élaboration.

Tests validés pour l'étude des produits corrosifs

En 2000, la Commission de l'Union européenne a fait paraître au *Journal Officiel des Communautés européennes* une nouvelle directive concernant le rapprochement des dispositions législatives et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances

dangereuses [8], par laquelle elle entend introduire à l'annexe V de la directive 67/548/CEE [3], des méthodes d'essais de remplacement qui ne nécessitent pas d'utiliser un animal pour tester la tolérance cutanée aux substances chimiques.

Les méthodes d'essais de remplacement concernent deux tests *in vitro* de corrosivité cutanée : l'essai de Résistance électrique transcutanée (RET) sur peau de rat et un essai utilisant un modèle de peau humaine [8]. L'étude de validation du CEVMA a montré que les deux essais permettent de faire la distinction de manière fiable entre substances corrosives et non corrosives pour la peau.

En outre, le protocole d'essai basé sur un modèle de peau humaine a permis de faire une distinction correcte entre les différents degrés de corrosivité (effet corrosif sévère pour la peau, R 35, et effet corrosif pour la peau, R 34) [8].

Les avant-projets [9, 10] concernant ces deux tests ont été proposés comme méthodes d'essai aux experts de l'OCDE et ont été adoptés par la Commission d'évaluation de l'écotoxicité des substances chimiques du 11 juillet 2002 comme directives d'essai.

Essai RET sur peau de rat

Le principe est que les matières corrosives sont identifiées par leur capacité à provoquer la perte de l'intégrité du *stratum corneum* normal et de la fonction barrière, cette perte étant mesurée comme une diminution de la résistance électrique transcutanée de base, jusqu'à un niveau situé en dessous d'une valeur seuil.

Les produits à tester sont appliqués au contact de la surface interne de disques d'épiderme standardisés, obtenus à partir de la peau dorsale de jeunes rats, sacrifiés par l'injection d'un anesthésique à la dose létale. Après exposition, des mesures de la résistance électrique transcutanée sont effectuées et comparées à celles obtenues chez des témoins positifs ayant reçu respectivement de l'acide chlorhydrique et de l'eau [8, 9, 11].

(1) Cf. le document : *Guide de classification et d'étiquetage. Méthodes d'essais*. Paris, INRS, 1998, ND 1961, 30 p.

(2) Le Département Polluants et santé de l'INRS a participé au circuit d'essais interlaboratoires pour la validation de ce test.

Essai sur modèle de peau humaine

L'Episkin® (2)

C'est un modèle de peau humaine reconstituée à trois dimensions, qui comprend une matrice formée de trois types de collagène humain constituant le derme, sur lequel se développe un épiderme différencié, stratifié, provenant de kératinocytes humains [8, 10, 11]. Les produits à tester sont déposés directement au contact du *stratum corneum*.

On évalue ensuite la viabilité cellulaire par la mesure de l'activité mitochondriale comparativement à celle de cellules témoins non exposées au produit testé, en fonction de la durée d'application du produit. Ce modèle a été validé à partir de l'étude de 60 produits et/ou préparations chimiques, et possède une précision de 83 % (50/60 produits), une sensibilité de 82 % (23/28 produits) et une spécificité de 84 % (27/32 produits).

L'EpiDerm®

C'est un modèle très voisin du précédent, qui diffère seulement par des modalités opératoires [10]. Un produit est classé comme corrosif s'il induit une diminution de la viabilité cellulaire relative égale ou supérieure à 50 % après 3 minutes d'application, ou une diminution égale ou supérieure à 85 % pour une durée de 60 minutes d'exposition.

La validation du test a été réalisée à partir de résultats provenant de l'étude de 24 produits ou préparations chimiques avec une précision de 92 % (22/24 produits), une sensibilité de 92 % (11/12 produits) et une spécificité de 83 % (10/12 produits). A l'inverse d'Episkin®, EpiDerm® ne permet pas de faire la distinction entre les classes et les subdivisions du pouvoir corrosif R 35 et R 34, chez des produits étiquetés au préalable comme substances corrosives à partir de tests pratiqués *in vivo*.

Méthodes en cours de développement

Méthodes physico-chimiques

Ces méthodes permettent de faire essentiellement un tri sélectif entre produits chimiques corrosifs et irritants, avant

de réaliser des tests *in vivo* chez l'homme et/ou l'animal. Elles sont caractérisées par un faible taux de faux négatifs et fournissent des informations complémentaires à l'étude des mécanismes de l'irritation. Cependant, elles ne peuvent en aucun cas fournir un modèle intégrant la complexité des réactions à une inflammation cutanée locale.

Parmi ces méthodes, il faut citer les modèles à base de macromolécules d'origine biologique incluant une membrane composée de kératine et de collagène, perméable aux produits à tester, contenant un colorant, et une matrice transparente formée de filaments protéiques noyés dans du collagène. Sous l'action d'une substance irritante, il y a libération de colorant, les filaments protéiques s'hydratent et/ou changent de structure provoquant une opacité de la matrice, dont on mesure la densité optique en référence à des solutions étalons [12].

Les cultures cellulaires

Étude de l'irritation

Des lignées cellulaires de la peau sont mises en culture [2] : kératinocytes, cellules de Langerhans, mastocytes, macrophages, leucocytes polymorphonucléaires conservant des propriétés fonctionnelles comme la kératinisation ou la dégranulation en réponse à un irritant. En général, ces lignées cellulaires ont pour origine des prélèvements de peau provenant de la chirurgie esthétique par exemple. Les cultures les plus fréquentes sont réalisées avec des kératinocytes (90 % des cellules épidermiques) car les cellules de Langerhans, disponibles en nombre limité (1 à 3 % des cellules épidermiques), ont une durée de vie limitée en culture.

Le kératinocyte a un rôle de cellule cible pour l'application topique des produits chimiques et fournit aussi la majorité des médiateurs associés à une réaction inflammatoire locale, aussi bien dans le cas d'une irritation primaire que d'une sensibilisation. Des cultures conventionnelles de kératinocytes provenant de l'épiderme humain sont réalisées en immergeant ces cellules dans une solution aqueuse tamponnée à une température de 37 °C. Ce modèle permet ainsi de tester des produits chimiques sans problème de solubilité, volatilité ou osmolarité. Des techniques récentes favorisent la culture de cellules épidermiques humaines en couches stratifiées avec une exposition à l'air libre.

L'évaluation du potentiel irritant des substances étudiées est réalisée après application topique des produits à la surface de la culture, en mesurant la toxicité cellulaire et les médiateurs de l'inflammation (cytokines, métabolites de l'acide arachidonique : substances endogènes libérées dans le milieu de culture). La toxicité cellulaire peut être évaluée grâce à la propriété de la cellule vivante à capturer certains colorants (rouge neutre), et les libérer dans le milieu de culture en fonction du degré d'intégrité de la membrane cellulaire. Ce type de modèle est peu exploitable car l'absence de la barrière sélective constituée par le *stratum corneum*, rend difficile la comparaison des résultats obtenus à ceux de l'irritation cutanée observés *in vivo*, sauf dans le cas d'une peau abîmée et/ou abrasée, où la fonction barrière est altérée ou absente. Cependant, l'étude des cultures de kératinocytes qui possèdent des récepteurs cellulaires spécifiques en surface, permettant aux cytokines d'intervenir sur l'homéostasie de ces cellules (prolifération et différenciation), devrait améliorer la connaissance de la structure et la fonction des cytokines spécifiques intervenant sur les kératinocytes et autres cellules épidermiques, après exposition à des irritants.

Étude de la sensibilisation

En milieu professionnel, la sensibilisation est souvent due à de petites molécules qui, en réagissant avec une protéine endogène, deviennent des antigènes. Au cours de la phase d'induction, l'antigène active les cellules de Langerhans de l'épiderme.

Le mécanisme de la sensibilisation se déroule en deux temps :

■ Une première phase où le produit forme, en se complexant avec un peptide ou une protéine, l'antigène qui active les cellules de Langerhans dans l'épiderme. Celles-ci migrent par les voies lymphatiques jusqu'au ganglion lymphatique de proximité. Les lymphocytes T sont mis au contact de l'allergène, le mémorisent et se dispersent dans le sang périphérique.

■ Au cours de la seconde phase, les lymphocytes T, au contact de l'allergène pour une seconde fois, produisent des cytokines inflammatoires variées qui constituent la réponse inflammatoire [2].

Les cultures de kératinocytes ne permettent pas la distinction entre irritants et sensibilisants ; aussi est-il plus intéressant de mettre en culture les cellules de

Langerhans, qui sont les premières cellules mises au contact de l'antigène dans la peau, et ont ainsi un rôle primordial dans le développement de la sensibilisation. Des techniques récentes permettent d'obtenir des populations de cellules purifiées à partir de sources animales ou humaines, mais l'inconvénient majeur de ces cellules est leur rareté (1 à 3 % des cellules épidermiques) et leur incapacité à constituer des lignées cellulaires. Il est possible de résoudre le problème en mettant en culture les cellules dendritiques provenant du sang périphérique, qui ont la propriété d'induire des réponses immunologiques de la même façon que les cellules de Langerhans [2]. Seules les substances sensibilisantes mises au contact de ces cultures, à des concentrations subtoxiques, sont capables d'induire des cytokines spécifiques, permettant de faire la distinction entre produits irritants et produits sensibilisants.

Néanmoins, les limites de ces cultures cellulaires tiennent à l'existence d'une variation des réponses pour un même produit, en fonction des donneurs de cellules sanguines dendritiques. Les cocultures contenant à la fois les cellules de Langerhans et/ou les cellules dendritiques du sang périphérique et des lymphocytes T, ainsi que l'haptène conjugué, devraient permettre une meilleure approche du mécanisme de la sensibilisation et fournir un test prédictif avec les réserves suivantes : le faible nombre de cellules de Langerhans disponibles et la variabilité des réponses pour un même produit selon les donneurs [2].

L'application de techniques de biologie moléculaire [13] devrait donner une nouvelle orientation à ces méthodes *in vitro* en permettant d'identifier les gènes susceptibles de contrôler sélectivement les allergènes de contact. Ce sont par exemple les biopuces ou puces à ADN qui reposent sur une technologie pluridisciplinaire intégrant la microélectronique, la chimie des acides nucléiques, l'analyse d'image. Le principe de ces puces repose sur le phénomène de l'hybridation, c'est-à-dire l'appariement par complémentarité des bases de deux séquences d'ADN. Grâce aux techniques de miniaturisation, les puces à ADN permettent l'hybridation simultanée d'un nombre de sondes considérables, sur des supports percés de puits, en verre, en polymères, en silicium.

A titre d'exemple, ces puces à ADN sont utilisées pour caractériser des modifications de l'expression des gènes induites après traitement des cellules dendritiques

provenant du sang humain avec des produits sensibilisants et des produits non sensibilisants.

Des résultats préliminaires ont montré que la régulation des taux de chémokines était en relation avec le potentiel sensibilisant cutané des produits. Ces travaux se poursuivent pour mettre en évidence de nouveaux gènes susceptibles d'être impliqués dans l'induction de l'activation des cellules dendritiques [12], afin de constituer à terme un outil biologique utile et significatif.

Les équivalents d'épiderme et/ou de peau totale

Ces équivalents ont été produits à l'origine pour un usage thérapeutique chez les grands brûlés. Ils sont formés de cultures de cellules épidermiques et aussi de greffons sur des substituts de derme [14]. Les équivalents d'épiderme sont constitués de cellules épidermiques en culture sur des filtres inertes et exposés à l'air libre tandis que les équivalents de peau totale sont formés de cellules épidermiques exposées à l'air libre, en culture sur différents types de substrat [14] :

- derme humain obtenu à partir de peau privée de son épiderme, avec ou sans fibroblastes ;
- substituts de derme à base de collagène ou de filets à maille de nylon contenant des fibroblastes ;
- matrices dermiques obtenues par copolymérisation de macromolécules extraites du tissu conjonctif.

Ces modèles conservent les caractéristiques spécifiques de la perméabilité de la peau intacte, mais étant avasculaires, ils ne peuvent refléter que certains aspects du processus inflammatoire. Dans l'état actuel des connaissances, ces modèles ont permis uniquement la réalisation et la validation de deux tests permettant de distinguer les produits corrosifs des produits non corrosifs [11], et non la mise en évidence des potentiels irritant et/ou sensibilisant.

L'absence de cellules immunitaires, dont le rôle est primordial pour l'induction de la sensibilisation, est un inconvénient majeur à ces modèles. Il est nécessaire aussi de les améliorer de façon à leur conférer une perméabilité proche de la perméabilité de la peau *in situ*, afin de pouvoir tester une plus grande diversité d'irritants de structures et de familles différentes.

Actuellement, les objectifs sont l'évaluation de la relation effet irritant/concentra-

tion d'un produit sur le *stratum corneum* en conservant les cellules épidermiques en vie, et de la réponse à une exposition répétée à de faibles concentrations [14].

Cultures de peau humaine

Les échantillons de peau humaine proviennent d'exérèses, principalement en chirurgie esthétique, et sont mis en culture dans les mêmes conditions que les équivalents d'épiderme et/ou de peau [14]. Ces modèles, comme les précédents, permettent l'application topique des produits chimiques à tester, mais ont l'avantage de posséder en plus des cellules de Langerhans, d'autres types cellulaires tels que les mélanocytes et les cellules endothéliales. Des recherches se sont orientées particulièrement pour étudier les modifications de la distribution de la population de cellules de Langerhans, après application épicutanée de produits chimiques à des concentrations non toxiques.

L'observation de coupes de peau a permis de constater qu'après 24 h de contact, seuls les allergènes (et non les irritants) provoquent une diminution du nombre de cellules de Langerhans, proportionnelle à la concentration du produit dans l'épiderme, ainsi qu'une accumulation des cellules restantes à la jonction épiderme-derme. Cependant, il faut émettre une réserve à ces résultats, en tenant compte du fait que les cellules de Langerhans migrent spontanément hors de la peau après 1 à 3 jours de mise en culture.

D'autres études se sont intéressées aux médiateurs libérés par les cellules de Langerhans après traitement chimique. Elles ont montré une variation de la nature des cytokines sécrétées par les cellules de Langerhans qui migrent à la jonction épiderme-derme après une exposition pendant 24 h à des allergènes de contact. Ces modèles sont très prometteurs pour mieux aborder la complexité des mécanismes présidant à la réaction inflammatoire car ils conservent à la fois la structure de la peau et la population de cellules résidentes.

Les limites à cette méthode alternative sont les suivantes : les cultures de peau *in vitro* ont une durée de vie très limitée car les cellules en culture migrent et se développent en dehors de la peau ; la disponibilité en tissu frais est limitée et les variabilités individuelles d'un spécimen de peau à un autre peuvent modifier l'interprétation des résultats [14].

Échantillons de peau prélevés sur des cadavres

Des échantillons de peau humaine ou animale prélevés sur des cadavres permettent l'évaluation de l'action physico-chimique de substances corrosives et/ou irritantes grâce à la conservation de l'intégrité du *stratum corneum*, barrière naturelle sélective à la pénétration des substances. Des essais fructueux, comportant très peu de faux négatifs, ont été réalisés avec des surfactants et des acides gras sur de la peau de rat, mais avec un nombre de produits chimiques testés encore insuffisant pour pouvoir tirer des conclusions [2].

CONCLUSION

La création du CEVMA en 1991, a marqué un progrès significatif dans l'engagement de l'Union européenne au développement méthodique et harmonisé de méthodes alternatives à l'expérimentation animale, ainsi qu'à leur validation et leur acceptation. Ainsi, dès à présent, deux méthodes de substitution à l'expérimentation animale sont disponibles pour l'étude du pouvoir corrosif des substances chimiques, validées et reconnues par l'Union européenne et l'OCDE. Par contre, la réalisation de tests alternatifs pour l'étude des pouvoirs irritant et/ou sensibilisant des substances chimiques est beaucoup plus difficile, car la réaction de la peau à un irritant et/ou un sensibilisant fait appel à l'in-

teraction de nombreux médiateurs inflammatoires, qu'il n'est pas aisé de reproduire *in vitro*. De nombreuses équipes multidisciplinaires devront encore conjuguer

leurs efforts pour aboutir à l'établissement de tests alternatifs fiables, et reproductibles d'un laboratoire à l'autre. ■

BIBLIOGRAPHIE

1. **ELSNER P.** - Handbook of contact dermatitis. Londres, Martin Dunitz, 2000, pp. 1-4.
2. **LAWRENCE J.N.** - Application of in vitro human skin models to dermal irritancy: a brief overview and future prospects. *Toxicology in Vitro*, 1997, 11, pp. 305-312.
3. Directive de la Commission du 27 juin 1967, du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses. Annexe V, Partie B. Méthodes pour la détermination de la toxicité. *Journal Officiel des Communautés Européennes*, N° 196 du 16 août 1967.
4. **DRAIZE J.H., WOODARD G., CALVERY H.O.** - Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1944, 82, pp. 337-338.
5. **MAGNUSON B., KLIGMAN A.M.** - The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximisation test. *Journal of Investigative Dermatology*, 1969, 52, pp. 268.
6. **BUEHLER E.V.** - Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Archiv of Dermatology*, 1965, 91, pp. 171.
7. Livre Blanc : Stratégie pour la future politique dans le domaine des substances chimiques. Bruxelles, Commission des Communautés Européennes, 2001, pp. 1-37.
8. Directive 2000/33/CE de la Commission du 25 avril 2000 portant vingt-septième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses. *Journal Officiel des Communautés Européennes*, n° L 136 du 8 juin 2000, pp. 0090-0107
9. In vitro corrosion : Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER) - OECD Guideline for the testing of chemicals. Draft proposal for a new guideline 430. Paris, OCDE, 27 mars 2002, pp. 1-12.
10. In vitro corrosion : Human Skin Model Test. OECD Guideline for the testing of chemicals. Draft proposal for a new guideline 431. Paris, OCDE, 27 mars 2002, pp. 1-9.
11. Episkin™, Epiderm™, and Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER). In vitro tests methods for assessing the dermal corrosivity potential of chemicals. ICCVAM Background Review Document, 2001.
12. **GORDON V.C., HARVELL J., BASON M., MAIBACH H.** - In vitro methods to predict dermal toxicity. In : GAD S.C. (ed) - *In vitro toxicology*. New York, Raven Press, 1994, pp. 47-57.
13. **KIMBER I., PICHOWSKI J.S., BETTS C.J., CUMBERBATCH M., BASKETTER D.A., DEARMAN R.J.** - Alternative approaches to the identification and characterization of chemical allergens. *Toxicology in Vitro*, 2001, 15, pp. 307-312.
14. **RYAN C.A., HULETTE B.C., GERBEPICK G.F.** - Approaches for the development of cell-based in vitro methods for contact sensitization. *Toxicology in Vitro*, 2001, 15, pp. 43-55.