

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

Étude expérimentale du pouvoir sensibilisant d'un échantillonnage de polyaziridines

EXPERIMENTAL STUDY TO ASSESS THE SENSITIZING CAPACITY OF POLYFUNCTIONAL AZIRIDINES (PFA)

PFA are polymers of aromatic compounds with a function of cross-linker and/or hardener. They are added to paints, lacquers, varnishes and other aqueous coating material that are acrylic-based solutions or polyurethane-based substances. They are increasingly used in the industry as they react at low temperatures and allow substitution of organic solvent inducing systemic toxicity, by aqueous solvents. Reports on occupational allergic contact dermatitis describe cases of allergic contact dermatitis and/or urticaria and/or respiratory diseases.

Thus, PFA are really an important class of occupational allergens frequently used.

The results show that all the studied PFA induced an allergic contact dermatitis known as delayed hypersensitivity reaction. Grading of skin sensitization varied from moderate to very strong.

- cross-linker ● hardener
- polyfunctional aziridine
- skin sensitization
- Magnusson & Kligman test
- experimental study
- guinea pig

Les aziridines polyfonctionnelles (APF) sont des polymères de composés aromatiques ayant le rôle de liants ou de durcisseurs ajoutés à des peintures concentrées, des laques, des vernis et autres revêtements protecteurs à base de solutions acryliques ou de polyuréthanes en phase aqueuse. Leur utilisation dans l'industrie est en pleine expansion car elles agissent à basse température et remplacent avantageusement les solvants organiques nuisibles pour la santé par une phase aqueuse. Les cas d'allergie à ces substances sont décrits comme étant de l'eczéma de contact ou de l'urticaire, accompagnés ou non de troubles respiratoires. Ainsi, les APF occupent actuellement une place importante parmi les allergènes professionnels, en raison d'un usage industriel fréquent de ces produits. L'objectif de cette étude expérimentale était d'évaluer le pouvoir sensibilisant de ces composés au moyen du test conventionnel de Magnusson & Kligman chez le cobaye. Les résultats mettent en évidence un effet sensibilisant dont l'intensité varie de moyen à très fort chez les six échantillons étudiés.

- durcisseur ● liant ● aziridine polyfonctionnelle ● sensibilisation cutanée
- test de Magnusson et Kligman ● expérimentation animale ● cobaye

Les aziridines polyfonctionnelles (APF), citées aussi sous le nom de polyaziridines, sont des liants ou des durcisseurs ajoutés à des peintures concentrées, des encres, des laques, des vernis et autres revêtements protecteurs à base de solutions acryliques ou de polyuréthanes en phase aqueuse, immédiatement avant leur utilisation et ayant l'avantage d'agir à basse température. Ce sont des copolymères obtenus par réaction d'aziridines (composés aromatiques à un seul atome d'azote) : propylèneimine et/ou éthylèneimine, avec des triacrylates : triacrylate triméthylolpropane (TMPA) ou triacrylate pentaérythritol (PETA), en présence d'une alcanolamine, généralement la N,N-diméthyléthanolamine (DMAE) pour ajuster le pH. Dans les préparations industrielles d'APF, il ne persiste généralement plus d'éthylèneimine, de propylèneimine, de DMAE et/ou d'acrylates, ou seulement à l'état de traces.

Les premiers cas d'allergie aux APF ont été rapportés par Dalquist et collaborateurs en 1983 [1] ; il s'agit de quatre

cas d'eczéma de contact des mains, survenus chez des applicateurs d'un vernis pour sol constitué d'une dispersion aqueuse de polyuréthane avec une APF comme durcisseur. Depuis cette date, d'autres cas ont été décrits chez des peintres utilisant des peintures acryliques ou des vernis durcis par une APF [2-7], chez des imprimeurs utilisant des encres durcies par une APF [8-10]. Cette allergie prend la forme d'un eczéma de contact confirmé par des tests épicutanés et/ou d'une urticaire des mains et du visage [10], avec quelquefois des manifestations d'asthme et/ou de rhinite [11-13]. Les APF remplacent avantageusement les solvants organiques, aussi leur utilisation dans l'industrie est en pleine expansion, avec pour conséquence l'apparition d'une nouvelle classe d'allergènes professionnels [14-15].

L'objectif de cette étude était l'évaluation du caractère sensibilisant de quelques produits industriels à base d'APF, le plus purs possible, au moyen du test conventionnel de Magnusson &

Kligman chez le cobaye [16], recommandé par la directive européenne pour l'identification et l'étiquetage des substances dangereuses [17].

Matériel et méthode

Cette étude a pu être réalisée grâce au concours des fabricants qui nous ont fourni six échantillons dont la pureté a été contrôlée par le département Métrologie des polluants à l'INRS.

Produits étudiés

- Echantillon n° 1 :
Polyaziridine, n° CAS 64265-57-2, polymère de propylèneimine, pureté 99 %, et propylèneimine résiduelle < 0,05 % ;
- Echantillon n° 2 :
Polyaziridine, n° CAS 64265-57-2, polymère de propylèneimine, pureté > 99 %, propylèneimine résiduelle < 0,01 %, et 2-Diméthylamino-éthanol = 0,3 % ;
- Echantillon n° 3 :
Polyaziridine, n° CAS 64265-57-2, polymère de propylèneimine, pureté 99 % et propylèneimine résiduelle < 0,1 % ;
- Echantillon n° 4 :
Polyaziridine, n° CAS 64265-57-2, polymère de propylèneimine, pureté 96 %, sans mention des traces de produits résiduels ;
- Echantillon n° 5 :
Polymère de l'éthylèneimine, n° CAS 52234-82-9, pureté 99 %, sans mention des traces de produits résiduels ;
- Echantillon n° 6 :
Polymère de l'éthylèneimine, n° CAS 57116-45-7, pureté > 99 %, sans mention des traces de produits résiduels.

La réalisation du test a nécessité l'utilisation d'adjuvant de Freund complet (Sigma, USA) n° CAS 9007-81-2, de solvants : le propylène glycol (Fluka, > 99,5 %), n° CAS 57-55-6 et de l'eau stérile (Braun, France).

L'alphahexylcinnamaldéhyde (HCA), (Sigma, USA), n° CAS 101-86-0, a été choisi comme substance de référence pour le test, selon les recommandations de la directive européenne pour l'identification et l'étiquetage des substances dangereuses [17].

Animaux

Le test de sensibilisation cutanée de type retardé a été effectué chez des cobayes

albinos de sexe femelle appartenant à la souche Dunkin Hartley, provenant de l'élevage Charles River et pesant 350 g à leur arrivée. Ils ont été maintenus en observation à l'animalerie pendant une semaine avant le début de l'expérimentation ; une pesée hebdomadaire ainsi qu'un examen macroscopique ont contribué à la surveillance de leur état général tout au long de l'expérimentation. Les animaux ont été mis en stabulation séparément, dans des cages en polypropylène transparent, et identifiés au moyen d'une bague à l'oreille, avec à leur disposition des granules stérilisés (UAR 114) et des biberons d'eau filtrée ad libitum. Le local était maintenu à 20° ± 1°C avec une humidité relative de 50 ± 5 %, une ventilation de 15 cycles/h et un cycle de lumière – obscurité de 12 heures.

Test de Magnusson & Kligman maximalisé

Ce test comporte une phase d'induction de la sensibilisation et une phase de déclenchement effectuées chez 30 cobayes dont 10 animaux témoins mis au contact de la substance étudiée uniquement au cours de la phase du déclenchement.

Pour chaque substance étudiée, les concentrations utilisées lors de l'induction et du déclenchement ont été déterminées au cours d'une étude préliminaire (3 cobayes par produit au minimum) afin de déterminer les plus petites concentrations produisant une faible irritation pour l'induction et les concentrations maximales non irritantes pour le déclenchement (*tableau I*).

Induction

Au jour 1, trois paires d'injections intradermiques de 0,1 ml ont été effectuées au niveau du scapulum tondu :

(a) 2 injections de la substance étudiée à une concentration non nécrosante dans le solvant choisi,

(b) 2 injections d'une suspension d'adjuvant de Freund complet dilué à 50 % dans de l'eau physiologique,

(c) 2 injections de la substance diluée pour moitié dans de l'eau physiologique par rapport à la concentration (a), en suspension dans de l'adjuvant complet.

Au jour 8, le produit étudié a été appliqué de façon occlusive, à une concentration légèrement irritante, dans la zone des injections, pendant 48 h.

Le groupe des cobayes témoins a été traité avec le véhicule seul et l'adjuvant de Freund complet dans les mêmes conditions que les autres cobayes.

Déclenchement

Au jour 22, après une semaine de repos, 0,5 ml de la substance étudiée a été appliquée, à la concentration maximale non irritante, sous patch occlusif, au niveau de la peau nue d'un flanc, pendant 24 h chez tous les cobayes.

Les réactions locales d'érythème ont été évaluées selon une échelle numérique à 4 degrés, 24 h et 48 h après l'enlèvement des patchs occlusifs. Dans le cas de réactions douteuses, des prélèvements histologiques ont été effectués au site du déclenchement 72 h après l'application du produit. Le potentiel de sensibilisation du produit testé est classé d'après la fréquence des réponses positives des animaux et non d'après l'intensité des réactions selon la classification suivante :

- De 0 à 8 % - Classe I - Très faible
- De 9 à 28 % - Classe II - Faible
- De 29 à 64 % - Classe III - Moyen

TABLEAU I

SUBSTANCES TESTÉES ET CONCENTRATIONS

SUBSTANCES TESTED AND CONCENTRATIONS

Substances Concentrations % (p/v)	Induction Concentrations % (p/v)	Déclenchement
HCA	0,3 et 50 (propylène glycol)	15 (propylène glycol)
Échantillon n° 1	1 et 3 (eau)	0,5 (eau)
Échantillon n° 2	1 et 3 (eau)	0,5 (eau)
Échantillon n° 3	0,5 et 3 (propylène glycol)	0,5 (propylène glycol)
Échantillon n° 4	0,3 et 1 (eau)	1 (eau)
Échantillon n° 5	1 et 0,1 (eau)	0,5 (eau)
Échantillon n° 6	0,5 et 0,1 (eau)	0,5 (eau)

- De 65 à 80 % - Classe IV - Fort
- De 81 à 100 % - Classe V - Très fort

La sensibilité et la fiabilité du test ont été assurées à titre comparatif avec une substance de référence : l'alphahexylcinnamaldéhyde (HCA) induisant un effet sensibilisant cutané retardé de type modéré.

N.B. Au cours de la phase d'induction par injections intradermiques des échantillons n° 5 et n° 6, sept cobayes sont morts dans chaque série, une demi-heure après le traitement (cause non déterminée). La suite de l'expérimentation a été poursuivie chez les cobayes dont l'état général était satisfaisant.

Résultats

Les résultats obtenus à l'aide du test de Magnusson & Kligman (*tableau II*) montrent que la substance de référence (HCA) induit une sensibilisation de classe III, comme il est décrit dans la littérature. L'intensité du pouvoir sensibilisant des échantillons d'APF varie de moyen à très fort et tous les cobayes témoins ayant subi un déclenchement avec la substance de référence (HCA) et/ou les échantillons ont montré une réaction négative (les cotations variant entre 0 et 1), confirmée par une étude histologique de la peau au site du déclenchement à 72 h après l'application du produit.

TABLEAU II

POUVOIR SENSIBILISANT DES DIFFÉRENTS ÉCHANTILLONS

SENSITISING CAPACITY OF THE DIFFERENT SAMPLES

Substances	Pourcentage de cobayes sensibilisés	Classes de sensibilisation
HCA	6/19 (31 %)	III (Moyen)
n° 1	13/20 (65 %)	IV (Fort)
n° 2	18/20 (90 %)	V (Très fort)
n° 3	12/19 (63 %)	III (Moyen)
n° 4	7/20 (35 %)	III (Moyen)
n° 5	6/13 (50 %)	III (Moyen)
n° 6	6/13 (50 %)	III (Moyen)

Discussion et conclusion

Il n'existe pas d'études expérimentales publiées concernant les APF auxquelles comparer les résultats de ce travail. De plus, il aurait été intéressant de comparer le pouvoir sensibilisant des APF à celui des aziridines primaires correspondantes : éthylèneimine et propylèneimine qui ne sont plus actuellement en vente libre sur catalogue, car ce sont des produits très inflammables et explosifs.

Les résultats de cette étude montrent que tous les échantillons d'APF étudiés ont un pouvoir sensibilisant dont l'intensité varie de moyen à très fort chez le cobaye. Ce travail met en évidence la potentialité des APF à induire une sensibilisation cutanée chez les personnes exposées en milieu professionnel. De plus, ces résultats sont en concordance avec les cas cliniques de dermatites observés après exposition aux APF en milieu industriel et décrits dans la littérature scientifique [1-15]. En conclusion, les produits à base d'APF susceptibles d'induire une sensibilisation par contact cutané doivent être manipulés avec un maximum de précautions, telles que le port d'un équipement de protection adapté, pour éviter tout contact de produit avec la peau et en respectant les concentrations recommandées par le fabricant.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DAHLQUIST I., FREGERT S., TRULSON L. – Contact allergy to trimethylolpropanetriacrylate (TMPA) in an aziridine plastic hardener. *Contact Dermatitis*, 1983, 9, pp. 122-124.
- [2] COFIELD B.G., STORRS F.J., STRAWN C.B. – Contact allergy to aziridine paint hardener. *Archives of Dermatology*, 1985, 121, pp. 373-376.
- [3] KANERVA L., TARVAINEN K., PINOLA A., FÖRSTROM L. – A single accidental exposure may result in a chemical burn, primary sensitization and allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 1994, 31, pp. 229-235.
- [4] MATTORANO D., TROUT D. – Health Hazard Evaluation Report HETA 96-0266-2702, Cooper Engineered Products, Bowling Green, Ohio. *Government Reports Announcements & Index (GRA&I)*, 1999, Issue 19.
- [5] MICHEL Y., PARIS C.H., GUELFY B., CAILLARDD J.F. – Allergie immédiate et retardée aux aziridines polyfonctionnelles. *Lettre du Gerda*, 1994, 11, pp. 4-5.
- [6] TORRALBA M.C.; TASHJIAN D.N., MAIBACH H.I. – Occupational contact dermatitis caused by polyfunctional aziridine crosslinker : duct tubing for air conditioning. *Contact Dermatitis*, 1999, 41, pp. 163.
- [7] TUMERELLE E. – Allergies professionnelles liées aux aziridines polyfonctionnelles. *Archives des maladies professionnelles*, 1999, 60, pp. 36-41.
- [8] GARABRANT D.H. – Dermatitis from aziridine hardener in printing ink. *Contact Dermatitis*, 1985, 12, pp. 209-212.
- [9] IBBOTSON S.H., LAWRENCE C.M. – Allergic contact dermatitis from aziridine crosslinker CX 100. *Contact Dermatitis*, 1994, 30, pp. 306-307.
- [10] KANERVA L., ESTLANDER T., JOLANKI R., TARVAINEN K. – Occupational allergic contact dermatitis and contact urticaria caused by polyfunctional hardener. *Contact Dermatitis*, 1995, 33, pp. 304-309.
- [11] ESTLANDER T., KANERVA L., TALOLA P., JOLANKI R., SOINI M. – Aziridine hardener – a new sensitizer in the dyeing of leather. *Contact Dermatitis*, 2001, 44, pp. 107-109.
- [12] KANERVA L., KESKINEN H., AUTIO P., ESTLANDER T., TUPPURAINEN M., JOLANKI R. – Occupational respiratory and skin sensitization caused by polyfunctional aziridine hardener. *Clinical and Experimental Allergy*, 1995, 25, pp. 432-439.
- [13] LEFFLER T., MILTON D.K. – Occupational asthma and contact dermatitis in a spray painter after introduction of an aziridine cross-linker. *Environmental Health Perspectives*, 1999, 107, pp. 599-601.
- [14] HANSSON C., EZZELARAB M., STERNER O. – Isolation and structural determination of two new haptens in an aziridine hardener. *American Journal of Contact Dermatitis*, 1994, 5, pp. 216-220.
- [15] KAUPPINEN T., NUUTINEN J., TOIKKANEN J., VASAMA M., SAVELA A., JOLANKI R., KESKINEN H. – New and increasing occupational diseases in Finland with special emphasis on infectious diseases. *Proceedings of the International Symposium on New Epidemics in Occupational Health*, 1994, May 16-19, Helsinki, Finland.
- [16] MAGNUSSON B., KLIGMAN A.M. – The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximisation test. *Journal of Investigative Dermatology*, 1969, 52, pp. 268-276.
- [17] Annexe de la Directive 92/69 : CEE de la commission du 31 juillet 1992, portant dix-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, à l'emballage et à l'étiquetage des substances dangereuses. Méthode B.4. Toxicité aiguë. *Journal officiel des Communautés européennes*, L 383 A, 29 décembre 1992, pp. 131-136.