



HAL
open science

Développement d'un modèle de coculture cellules dendritiques lymphocytes T pour l'évaluation du danger des substances sensibilisantes

Cécile Huppert

► **To cite this version:**

Cécile Huppert. Développement d'un modèle de coculture cellules dendritiques lymphocytes T pour l'évaluation du danger des substances sensibilisantes. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0195 . tel-02006588

HAL Id: tel-02006588

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02006588>

Submitted on 28 Oct 2019

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

École Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Cécile Huppert**

**Développement d'un modèle de coculture cellules dendritiques-
lymphocytes T pour l'évaluation du danger des substances
sensibilisantes**

Date de soutenance : 25 octobre 2018

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mme Sandra DENERY

DR, INRA, Nantes

M Laurent VERNHET

PU, INSERM UMR U1085, Rennes

Examineurs :

Mme Brigitte LEININGER-MULLER (Présidente du jury)

PU, INSERM UMR-S 954, Vandœuvre-lès-Nancy

Mme Nadia NIKOLOVA-PAVAGEAU

MD, INRS, Paris

M Marc VOCAISON

CR, INSERM UMR U 851, Lyon

M Christophe PARIS

PU PH, Université de Rennes, directeur de thèse

M Fabrice BATAIS

CR, INRS, Vandoeuvre-lès-Nancy, co-directeur de thèse

Mme Isabelle SPONNE

CR, INRS, Vandoeuvre-lès-Nancy, co-directeur de thèse

Institut National de Recherche et de Sécurité

Département Toxicologie et Biométrie

Rue du Morvan, CS 60027, 54519 Vandoeuvre-lès-Nancy

DevAH EA 3450-Développement Adaptation et Handicap.

Régulations cardio-respiratoires et de la motricité



Remerciements

Ce manuscrit est le fruit d'un long travail qui n'aurait pas abouti sans les nombreuses personnes qui ont contribué, plus ou moins directement, à son élaboration. Leur aide m'a été précieuse et je tiens ici à les remercier.

Je remercie ceux qui ont contribué à rendre ce doctorat possible : Le Pr. Christophe Paris qui a accepté d'être mon directeur de thèse, mais également le Dr. Pierre Campo, le Pr. Philippe Perrin, les Dr. Catherine Aubry et Didier Baptiste.

Je remercie également le Pr. Brigitte Leininger-Muller et le Dr. Marc Vocanson qui ont suivi l'avancement de mon travail de doctorat et qui ont su me conseiller et m'encourager. Je les remercie également, ainsi que le Dr. Nadia Nikolova-Pavageau, pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Merci au Dr. Sandra Denery et au Pr. Laurent Vernhet d'avoir accepté d'évaluer ma thèse en qualité de rapporteurs.

Un grand merci à mes co-directeurs de thèse, les Dr. Isabelle Sponne et Fabrice Battais qui m'ont encadrée depuis mon arrivée dans leur laboratoire en tant que stagiaire de M2. Je les remercie pour leur implication et leur disponibilité, leur aide et leurs conseils scientifiques et surtout leur amitié.

Merci au Dr. François Gagnaire pour son aide précieuse, ses conseils, sa rigueur et sa patience, en particulier lors de la rédaction de mon manuscrit.

Merci également à Isabelle Langonné, Samuel Muller, Julianne Mathiot et Hakima Abdessadek pour leur aide précieuse dans les manips et leur bonne humeur. Un merci particulier à Hakima qui a également été une super « colocataire de bureau ».

En parlant de bonne humeur, je remercie Marie-Christine, Elisabeth, Dominique, Francine, Fabrice, Catherine, Karine, Martine, Bénédicte, Caroline, Anaïs, Stéphane,

François, Yves, Frédéric, Sylvie, Monique, Dieynaba, Carole, Laetitia, Jean-Philippe, Ludivine, Flavien, Laurent, Elodie, Stéphane, Lyse, Jérôme, Ronan pour les moments de détente à l'occasion des repas ou d'un café en salle de pause.

Je remercie Marie-Jo Décret, Lionel Dussoul et Laurine Douteau pour leur aide, leur disponibilité et leur sympathie.

Merci à Aurélie Rémy pour ses conseils avisés en statistiques, la bête noire de beaucoup de biologistes.

Merci à Adrien Audry, pour son aide à la préparation de ma présentation, je lui souhaite une bonne continuation en tant que doctorant du laboratoire SABC !

Je tiens aussi à remercier le Pr. Saadia Kerdine-Römer de m'avoir permis de suivre son UE et également pour m'avoir accueillie au sein l'équipe 2 de l'UMR Inserm 996 afin de me faire découvrir un autre univers de travail. Je remercie également le Pr. Marc Pallardy ainsi que toute l'équipe (Chloé, Rami, Myriam, Doumet, Elodie, Benoît ...) qui m'ont accueillie chaleureusement et ont tout fait pour faciliter mon séjour à Châtenay-Malabry.

Je remercie le Dr. Marc Vocanson pour m'avoir aussi accueillie dans son laboratoire du CIRI à Lyon et Virginie Mutez pour ses précieux conseils.

Je remercie les membres de l'association A-Team of BioSE (devenue ADUL'Team) pour m'avoir permis de rencontrer des doctorants de tous horizons : Amel, Mathilde, Léo, Antoine, Yoann, Benoît, JC, Laurie, Dafné, Romain, Adeline, Arnaud, Fanny, Paul, Benjamin pour ne citer qu'eux.

Merci à mes parents, mes frères et sœur et mes neveux et nièces, nos réunions familiales ont été autant d'occasions de « sortir le nez de ma thèse ».

Merci aux amis pour leur soutien inconditionnel et souvent même inconscient, merci à Julie et Mélanie, à chacune de nos retrouvailles j'ai l'impression de poursuivre une conversation commencée il y a maintenant 17 ans ! Merci également à Jonathan, Sabine, Alice, Aussama, Magali, Mélanie, JC et Kelly, Pierrick, Fred et Matthieu.

Un grand merci au Dr. Jérémy Lagrange pour son soutien logistique, gastronomique et pour m'avoir fait bénéficier de son expérience « d'ancien doctorant ».

Enfin, je tiens à remercier également toutes celles et ceux que j'ai oublié de citer ici, j'espère qu'ils ne m'en tiendront pas rigueur et sont conscient de toute la reconnaissance que je leur porte.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|----------|
| Introduction | 1 |
| 1. L'allergie | 1 |
| 2. Les réactions d'hypersensibilité | 2 |
| 2.1. <i>Les différents types d'hypersensibilité</i> | 3 |
| 3. Les allergies professionnelles..... | 5 |
| 3.1. <i>Les allergies professionnelles respiratoires</i> | 5 |
| 3.2. <i>Les allergies professionnelles cutanées</i> | 7 |
| 4. Les substances de bas poids moléculaires ou haptènes | 9 |
| 4.1. <i>Caractéristiques physicochimiques des haptènes</i> | 11 |
| 4.1.1. Les liaisons de coordination | 12 |
| 4.1.2. Les liaisons covalentes | 13 |
| 4.2. <i>Les pro-haptènes</i> | 15 |
| 4.3. <i>Les pré-haptènes</i> | 17 |
| 5. Les différents acteurs impliqués dans les réactions allergiques aux substances chimiques | 19 |
| 5.1. <i>Les cellules épithéliales</i> | 19 |
| 5.1.1. Les cellules épithéliales de la peau..... | 19 |
| 5.1.2. Les cellules épithéliales des voies respiratoires | 22 |
| 5.2. <i>Les cellules présentatrices d'antigène</i> | 24 |
| 5.2.1. Les cellules dendritiques | 25 |
| 5.2.2. Ontogenèse des cellules dendritiques | 26 |
| 5.2.2.1. Ontogenèse des cellules dendritiques chez l'Homme | 28 |
| 5.2.2.2. Ontogenèse des cellules dendritiques chez la souris | 30 |
| 5.2.3. Les sous-populations de cellules dendritiques | 33 |
| 5.2.3.1. Les cellules dendritiques conventionnelles | 33 |
| 5.2.3.2. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes..... | 39 |
| 5.2.4. Recrutement des cellules dendritiques | 44 |
| 5.2.5. Reconnaissance des signaux de danger | 47 |
| 5.2.5.1. Les récepteurs Toll-like | 49 |
| 5.2.5.2. Les récepteurs NLR | 53 |
| 5.2.5.3. Les récepteurs de la famille des lectines de type C | 55 |
| 5.2.5.4. Activation par les espèces réactives de l'oxygène | 56 |
| 5.2.6. Capture des antigènes..... | 58 |
| 5.2.7. Présentation de l'antigène par les DC | 59 |
| 5.2.7.1. La voie endogène : présentation par les molécules du CMH I..... | 60 |
| 5.2.7.2. La voie exogène : présentation par les molécules du CMH II | 62 |
| 5.2.7.3. La présentation croisée | 65 |
| 5.2.8. Maturation et migration des cellules dendritiques | 66 |
| 5.2.9. Activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques matures | 72 |

| | |
|---|------------|
| 5.2.1. La polarisation de la réponse immunitaire | 78 |
| 6. Les lymphocytes T | 80 |
| 6.1. Les lymphocytes T CD4 ⁺ | 80 |
| 6.1.1. Les lymphocytes Th1 | 81 |
| 6.1.2. Les lymphocytes Th2 | 82 |
| 6.1.3. Les lymphocytes Th17 | 83 |
| 6.1.4. Les lymphocytes Th9 | 85 |
| 6.1.5. Les lymphocytes Th22 | 85 |
| 6.1.6. Les Lymphocytes T folliculaires « helpers » | 86 |
| 6.1.7. Les Lymphocytes T régulateurs | 87 |
| 6.2. Les lymphocytes T CD8 ⁺ | 90 |
| 6.3. Les lymphocytes T mémoires | 94 |
| 7. Les mécanismes de l'allergie aux substances chimiques | 95 |
| 7.1. Phase de sensibilisation | 98 |
| 7.2. Activation et maturation des cellules dendritiques par les haptènes | 100 |
| 7.3. Génération des lymphocytes T spécifiques des haptènes | 106 |
| 7.4. La phase de déclenchement | 108 |
| 8. Les méthodes de détection des sensibilisants potentiels | 109 |
| 8.1. Les méthodes <i>in vivo</i> | 112 |
| 8.2. Les méthodes <i>in silico</i> | 115 |
| 8.3. Les méthodes <i>in chemico</i> | 118 |
| 8.4. Les méthodes <i>in vitro</i> | 121 |
| Objectifs..... | 127 |
| Matériel et méthodes | 127 |
| 1. Animaux | 127 |
| 2. Produits chimiques | 128 |
| 3. Mise en place de la coculture cellules dendritiques-lymphocytes T..... | 129 |
| 3.1. Différenciation des cellules dendritiques issues de moelle osseuse | 130 |
| 3.2. Exposition des BMDC aux produits de référence testés | 131 |
| 3.3. Sélection des populations de LT par séparation magnétique | 131 |
| 3.4. Marquage des lymphocytes T au Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) | 138 |
| 3.5. Coculture des cellules dendritiques avec les lymphocytes T | 139 |
| 4. Phénotypage cellulaire par cytométrie en flux | 140 |
| 5. Dosage des cytokines dans le surnageant : | 144 |
| 6. Extraction d'ARN et PCR quantitative | 146 |
| 6.1. Extraction des acides ribonucléiques (ARN) totaux..... | 146 |
| 6.2. Transcription inverse des ARNm en ADNc..... | 146 |
| 6.3. Amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel..... | 147 |

| | |
|---|------------|
| 6.4. Analyse du niveau d'expression des gènes | 149 |
| 7. Traitement statistique : | 150 |
| Résultats | 151 |
| 1. Partie I : Un modèle cellulaire basé sur des cellules dendritiques issues de cellules de moelle osseuse de souris pour l'évaluation du pouvoir sensibilisants des produits chimiques. | 151 |
| 1.1. Résumé de l'article "In vitro detection of chemical allergens: an optimized assay using mouse bone marrow-derived dendritic cells", annexe 1 | 152 |
| 1.2. Implication de la voie Nrf2 dans les DC issues de souris BALB/c..... | 154 |
| 2. Partie II : Mise au point d'un modèle de coculture avec le produit de référence hexachloroplatinate d'ammonium (AHCP) | 161 |
| 2.1. Sélection de l'organe d'origine des LT et du ratio BMDC/LT..... | 162 |
| 2.2. Sélection de marqueurs d'activation pertinents | 163 |
| 2.3. Sélection du ratio BMDC/LT..... | 167 |
| 2.4. Essais de différentes durées d'exposition et de coculture..... | 169 |
| 2.5. Influence de la concentration d'AHCP sur l'activation des LT. | 172 |
| 2.6. Implication des différentes populations de LT dans la réponse aux BMDC pré-exposées à l'AHCP et au LPS..... | 174 |
| 2.7. Essai de restimulation homologue..... | 177 |
| 2.8. Bilan des expérimentations de mise au point du modèle de coculture..... | 178 |
| 3. Partie III : Évaluation du modèle développé à l'aide d'autres produits chimiques de référence, sensibilisants et non sensibilisants | 180 |
| 3.1. Essai des différents produits sur le modèle de coculture | 180 |
| 3.2. Activation des LT de souris C57/BL6J dans les conditions de coculture précédemment définies..... | 188 |
| Discussion | 191 |
| Références | 208 |
| Annexe 1 : Article "In vitro detection of chemical allergens: an optimized assay using mouse bone marrow-derived dendritic cells" | 226 |
| Annexe 2 : Article "Activation of T cells by dendritic cells exposed to a reference sensitizer: Towards a promising model to assess the allergenic potential of chemicals" | 227 |

Liste des Figures et Tableaux

Listes des figures :

| | |
|---|----|
| Figure 1. Population affectée par des pathologies allergiques respiratoires. | 2 |
| Figure 2. Exemple des différents types d'haptènes. | 10 |
| Figure 3. Principaux résidus nucléophiles présents dans les protéines. | 13 |
| Figure 4. Formation de liaisons covalentes par réaction électrophile – nucléophile(a) et radicalaire (b). | 14 |
| Figure 5. Processus de détoxification. | 16 |
| Figure 6. Transformation enzymatique de l'alcool cinnamique en aldéhyde cinnamique puis en acide cinnamique. | 17 |
| Figure 7. Oxydation de la para-phénylènediamine en benzoquinone diimine, puis hydrolyse de cette dernière en benzoquinone. | 18 |
| Figure 8. Structure anatomique de la peau et représentation des cellules impliquées dans l'immunité cutanée. | 21 |
| Figure 9. Les kératinocytes, capteurs de danger. | 21 |
| Figure 10. Interaction entre les cellules épithéliales, les cellules dendritiques et les allergènes à l'interface de la muqueuse bronchique. | 24 |
| Figure 11. Image d'une cellule dendritique dérivée de la moelle osseuse obtenue par microscopie électronique à balayage. | 26 |
| Figure 12. La reconnaissance et la capture de l'antigène. | 27 |
| Figure 13. Ontogenèse des cellules dendritiques humaines. | 28 |
| Figure 14. Synthèse de l'origine des cellules dendritiques murines et humaines. | 32 |
| Figure 15. Classification des cellules dendritiques conventionnelles murines et humaines. | 39 |
| Figure 16. Classification des cellules dendritiques murines et humaines. | 43 |
| Figure 17. Rôle des chimiokines dans le recrutement des cellules dendritiques sur le site de l'inflammation. | 46 |
| Figure 18. Expression des récepteurs de signaux de danger par les cellules dendritiques. | 49 |
| Figure 19. Les différents récepteurs Toll-like exprimés à la surface des cellules dendritiques humaines. | 50 |
| Figure 20. Activation cellulaire par les haptènes et le nickel. | 57 |
| Figure 21. Voies d'internalisation de l'antigène et association aux molécules du CMH II. | 58 |
| Figure 22. Complexité de la voie de présentation des antigènes par le CMH I. | 62 |
| Figure 23. Voie de présentation des antigènes par le CMH II. | 64 |
| Figure 24. Présentation directe ou croisée des antigènes via les molécules du CMH I et II. | 65 |
| Figure 25. Modifications phénotypiques et fonctionnelles au cours de la maturation des cellules dendritiques. | 68 |
| Figure 26. Organisation de la synapse immunologique entre les LT et les DC. | 73 |
| Figure 27. Principales molécules costimulatrices et coinhibitrices lors du priming des LT naïfs par les DC matures. | 78 |
| Figure 28. Les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4. | 82 |

| | |
|--|-----|
| Figure 29. La réponse primaire adaptative conduit à l'édification de la mémoire immunologique..... | 91 |
| Figure 30. Mécanismes cellulaires de la dermatite de contact allergique. | 97 |
| Figure 31. Représentation des hypothèses d'interactions haptènes /LT..... | 99 |
| Figure 32. Modèle des voies d'activation du système immunitaire inné des DC..... | 103 |
| Figure 33. Expansion et différenciation des LT CD8+ en LT effecteurs et mémoires après l'interaction avec des DC activées par un antigène..... | 107 |
| Figure 34. Schéma de l'AOP établie dans la cadre de la sensibilisation cutanée..... | 111 |
| Figure 35. Protocole expérimental du LLNA..... | 114 |
| Figure 36. Arbre décisionnel de classification des allergènes selon la méthode du DPRA..... | 120 |
| Figure 37. Résumé du déroulement des différents tests de substitution disponibles pour l'évaluation du potentiel sensibilisant de substances chimiques..... | 124 |
| Figure 38 . Protocole de coculture cellules dendritiques-lymphocytes T..... | 127 |
| Figure 39. Principe de l'enrichissement cellulaire magnétique (Miltenyi biotec)..... | 132 |
| Figure 40. Marquage cellulaire au CFSE..... | 138 |
| Figure 41. Procédure de fenêtrage suivie pour l'analyse des résultats de cytométrie en flux..... | 143 |
| Figure 42. Principe de la technique des CBA..... | 144 |
| Figure 43. Expression relative de gènes sous le contrôle de Nrf2 après une exposition de 2 h et 6 h des cellules dendritiques (DC) de souris BALB/c à différentes concentrations de sodium dodécyl sulfate (SDS) (50, 100 et 200 mM)..... | 157 |
| Figure 44. Expression relative de gènes sous le contrôle de Nrf2 après une exposition de 2 h et 6 h des cellules dendritiques (DC) de souris BALB/c à différentes concentrations d'hexachloroplatinate d'ammonium (12,5 ; 25 ; 50 ; 100 µM)..... | 158 |
| Figure 45. Expression relative de gènes sous le contrôle de Nrf2 après une exposition de 2 h et 6 h des cellules dendritiques (DC) de souris BALB/c à différentes concentrations de dinitrofluorobenzène (3 ; 5 et 10 µM)..... | 159 |
| Figure 46. Expression relative de gènes sous le contrôle de Nrf2 après une exposition de 6 h des cellules dendritiques (DC) de souris BALB/c à 300 µM de para-tolylisocyanate (TMI)..... | 160 |
| Figure 47. Caractérisation de l'activation des LT après 72 h de coculture avec les BMDC..... | 164 |
| Figure 48. Influence des ratios BMDC/LT sur l'expression du marqueur d'activation membranaire CD124 dans les LT CD4 ⁺ et CD8 ⁺ | 168 |
| Figure 49. Influence de la durée d'exposition des BMDC à l'AHCP sur l'expression des marqueurs membranaires des LT CD25, CD44, CD69 et CD124..... | 169 |
| Figure 50. Expression du marqueur CD124 (A) et prolifération (B) des LT CD4 ⁺ et CD8 ⁺ en fonction de la durée de coculture..... | 171 |
| Figure 51. Influence de la concentration en hexachloroplatinate d'ammonium (AHCP) sur l'activation des lymphocytes T (LT)..... | 173 |
| Figure 52. Prolifération des populations de LT CD62L ⁺ et CD62L ⁻ | 174 |
| Figure 53. Activation des LT après une ou deux stimulations par des BMDC pré-exposées à l'AHCP..... | 177 |
| Figure 54. Activation des cellules CD4 ⁺ CD44 ⁻ en coculture avec des BMDC pré-exposées au TMI..... | 187 |

Liste des Tableaux :

| | |
|--|-----|
| Tableau 1. Les quatre types de réactions d'hypersensibilité. | 4 |
| Tableau 2. Exemples de différentes réactivités observées chez les haptènes. | 11 |
| Tableau 3. Spécialisation des différentes cellules présentatrices d'antigènes (CPA). | 25 |
| Tableau 4. Phénotype des cellules de Langerhans et des cellules dendritiques dermales murines et humaines. . | 35 |
| Tableau 5. Expression des récepteurs Toll-like (TLR) dans les sous-populations de cellules dendritiques chez l'Homme et la souris. | 52 |
| Tableau 6. Produits de référence testés. | 129 |
| Tableau 7. Réactifs utilisés dans les différentes cultures cellulaires | 130 |
| Tableau 8. Composition du cocktail d'anticorps du tri "Pan T cell Isolation kit II, mouse". | 133 |
| Tableau 9. Composition des cocktails d'anticorps des kits de tri cellulaire "Naive CD4 ⁺ T cell Isolation Kit, mouse" et "Naive CD8a ⁺ T cell Isolation Kit, mouse ». | 136 |
| Tableau 10. Anticorps utilisés lors du marquage des DC. | 140 |
| Tableau 11. Anticorps utilisés pour le phénotypage des cocultures. | 141 |
| Tableau 12. Séquences des amorces utilisées pour l'analyse de l'expression génique. | 148 |
| Tableau 13. Comptages cellulaires effectués sur les broyats de rate et ganglions auriculaires de souris, n=2. . | 162 |
| Tableau 14. Rapports traités/témoins des pourcentages de cellules positives pour les marqueurs membranaires d'activation | 166 |
| Tableau 15. Nombre de BMDC et LT déposés dans chaque puits pour obtenir les différents ratios étudiés. | 167 |
| Tableau 16. Viabilité des LT exprimée en pourcentages de cellules vivantes en fonction de la durée de la coculture. | 170 |
| Tableau 17. Activation de différentes sous-populations de LT par les BMDC pré-exposées à l'AHCP et au LPS. | 176 |
| Tableau 18. Produits de référence testés sur le modèle de coculture BMDC-LT. | 180 |
| Tableau 19. Activation des LT CD8 ⁺ mis en coculture avec des BMDC pré-exposées à des sensibilisants cutanés et respiratoires et un non sensibilisant. | 182 |
| Tableau 20. Bilan de l'activation des LT de souris BALB/c mis en coculture avec des BMDC pré-exposées à des produits sensibilisants, non sensibilisants et irritants. | 184 |
| Tableau 21. Bilan de l'activation des LT de souris C57/BL6J mis en coculture avec des BMDC pré-exposées à des produits sensibilisants, non sensibilisants et irritants. | 189 |
| Tableau 22. Performances du modèle BMDC et des tests in vitro et in chemico édités par l'OCDE pour l'évaluation du potentiel sensibilisant de substances chimiques. | 193 |

Liste des Abréviations

A

AAT : Asthme Aggravé au Travail
ADCC : cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
Ag : antigène
AHCP : hexachloroplatinate d'ammonium IV
AOP *Adverse Outcome Pathway*
AP : Asthme Professionnel
ARE : *Antioxidant Response Elements*
ART : Asthme en Relation avec le Travail
ASC : *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain*

B

BB : Base de Bandrowski
BC : Chlorure de Benzalkonium
BDCA : *Blood Dendritic Cell Antigen*
BMDC : cellules dendritiques dérivées de cellules de moelle osseuse
BPM : Bas Poids Moléculaire
Bzc : benzocaïne

C

CAT : catalase
cDC : cellules dendritiques conventionnelles
CFSE : Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
Cinn : cinnamaldéhyde
CoCl₂ : chlorure de cobalt
CLA : Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen
CLIP : *CLass II associated Invariant chain Peptide*
CLP : *Common Lymphoid Progenitor*
CLP : réglementation pour la classification, l'étiquetage et l'emballage des produits chimiques
CLR : *C-type Lectin Receptor*
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMHp : complexe CMH-Peptide
CMKLR1 : *Chemokine-Like Receptor-1*
CMP : *Common Myeloïd Progenitor*
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes
Cox2 : Cyclo-oxygénase 2
cSMAC : *Central Supramolecular Activation Cluster*
CTLA-4 : *Cytotoxic T Lymphocyte Associated protein 4*

D

DAC : Dermatite Allergique de Contact
DAMPs : *Danger-Associated Molecular Patterns*
DC : Cellules Dendritiques
DCAL-1 : *Dendritic-Cell-Associated Lectin-1*
DC-SIGN : *Denritic Cell Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin*
dDC : Cellules Dendritiques Dermales
DEREK : *Deduction and Estimation of Risk from Existing Knowledge*
DIC : Dermatite d'Irritation de Contact
DNCB : dinitrochlorobenzène
DNFB : dinitrofluorobenzène
DPRA : *Direct Peptid Reactivity Assay*

E

ECETOC : *European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals*
ECVAM : *European Centre for the Validation of Alternative Methods*
EpCAM : *Epithelial-Cell Adhesion Molecule*
EpRE : *Electrophile Responsive Element*

ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinase*
Eug : eugénol

F

FXIIIa : sous-unité A du facteur XIII de la coagulation
Flt3L : Fms-related tyrosine kinase-3 ligand

G

GARD : *Genomic Allergen Rapid Detection test*
GCL : Glutamate-Cystéine Ligase
GITR : *Gluccorticoidinduced Tumor necrosis factor family Related gene*
GM-CSF : *Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factors*
Glut : glutaraldéhyde
GPx : Glutathion Peroxidase
GST : Glutathion S-Transférase

H

HA : Acide Hyaluronique
h-CLAT : *Human Cell Line Activation Test*
HLA : *Human Leucocyte Antigen*
HMGB1 : *High Mobility Group Box 1 protein*
HMOX : Hème Oxygenase-1
HPM : Haut Poids Moléculaire
HSP : *Heat Shock Protein*
HSRC : hypersensibilité retardée de contact chez les rongeurs

I

IATA : *Integrated Approaches to Testing and Assessment*
ICAM-1 : *Intracellular Adhesion Molecule 1*
ICCVAM : *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*
iDC : Cellules Dendritiques Immatures
IFN- γ : Interféron- γ
Ig : Immunoglobuline
IgE : Immunoglobuline de type E
IgG : Immunoglobuline de type G
IgM : Immunoglobuline de type M
IKDC : *Interferon-producing Killer Dendritic Cells*
IL : interleukine
iNOS : *inducible Nitric-Oxide Synthase*
IP-10 : *interferon γ -induced protein 10 kDa*
IRFs : *Interferon Regulatory Factors*
Isoprop : isopropanol
ITIM : *immunoreceptor tyrosine inhibitory motif*
ITSIM : *Immunoreceptor Swich Motif*

J

JNK : *c-Jun N-terminal Kinases*

K

KC : kératinocyte
Keap1 : *Kelch-like ECH-Associated Protein 1*

L

LAG-3 : *Lymphocyte Activation Gene-3*
LB : Lymphocyte B
LC : Cellule de Langerhan
LcK : *Lymphocyte specific protein tyrosine Kinase*
LFA-1 : *lymphocytes function associated antigen 1*
LFA-3 : *lymphocytes function associated antigen 3*
LLNA : *Local Lymph Node Assay*
LPS : Lipopolysaccharide
LRR : *Leucine-Rich Repeat*
LT : Lymphocyte T
LTreg : Lymphocyte T régulateur

Ly6C : *Lymphocyte antigen 6C*

M

MAPK : *Mitogen Activated Protein Kinase*
MCL : *Macrophage C-type Lectin*
MDI : diisocyanate de diphénylméthane
MIIC : *MHC class II Compartment*
MINCLE : *Macrophage Inducible Ca²⁺-dependent Lectin*
MIP-3 α : *Macrophage Inflammatory Protein-3 α*
MMP : *Metalloprotéinase*
moDC : *Cellule Dendritique dérivée de Monocyte*
MUSST : *Myeloid U-937 Skin Sensitization Test*
mTGF- β : *Membrane-tethered Transforming Growth Factor*
MyD88 : *Myeloid Differentiation antigen 88*

N

NF-E2 : *Nuclear Factor Erythroid 2*
NF- κ B : *Nuclear Factor- κ B*
NiSO₄ : sulfate de nickel
NK : *Natural Killer*
NLR : *Nod-Like Receptor*
NO : monoxyde d'azote
NOD : *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein*
NQO1 : *NAD(P)H Quinone Oxidoréductase-1*
Nrf2 : *Nuclear Factor erythroid-2-related factor 2*
Nu : acide aminé Nucléophile

O

OCDE : *Organisation de Coopération et de Développement Économique*
OMS : *Organisation Mondiale de la Santé*

P

PA : *Anhydride Phtalique*
pABA : *Acide Para-Aminobenzoïque*
PAMPs : *Pathogen-Associated Molecular Patterns*
PAR : *Protease-Activated Receptor*
PD-1 : *Programmed cell Death 1*
pDC : *Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes*
PE : *phycoérythrine*
P-I : *Pharmacological Interaction of drugs with immune receptors*
pPD : *para-phénylènediamine*
PPRA : *Peroxydase Peptide Reactivity Assay*
PDL-1 : *Programmed cell Death Ligand 1*
PRR : *Pattern-Recognition Receptors*
pSMAC : *Peripheral Supramolecular Activation Cluster*

Q

QSARs : *Quantitative Structure–Activity Relationship*

R

RA : *Acide Rétinoïque*
RAI : *Relative Alkylation Index*
RANTES : *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*
RE : *Réticulum Endoplasmique*
REACH : *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*
RLR : *Retinoic acid-inductible gene-1 Like Receptor*
RNS : *Reactive Nitrogen Species*
ROR α / γ T : *RAR-related Orphan Receptor α or γ T*
ROS : *Reactive Oxygen Species*

S

SARs : *Structure–Activity Relationships*
SHP-1 : *Src Homology domain-containing Phosphatase*

Siglec : *Sialic-acid-binding Immunoglobulin-like Lectin*
SDS : dodécyl sulfate de sodium
SOD : Superoxide Dismutase
STAT4 : *Signal Transducer and Activator of Transcription-4*

T

TAP : *Transporter associated with Antigen Processing*
Tbet : *T-box Transcription*
TCM : *Central Memory T cell*
TCR : Récepteur des Cellules T
tDC : Cellule Dendritiques Tolérogène
TEM : *Effector Memory T cell*
T_{FH} : *T Follicular Helper*
TGF : *Transforming Growth Factor*
TLR : *Toll-Like Receptor*
TDI : Diisocyanate de Toluène
TIMES-SS : *Tissue Metabolism Simulator for Skin Sensitization*
TMA : Anhydride Trimellitique
TMI : *para-Tolyl Isocyanate*
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor- α*
TOPKAT : *Toxicity Prediction by Komputer Assisted Technology*
TRIF : *Toll-IL-1R domain containing adapter Inducing interferon- β*
TRM : *Resident Memory T cell*
Trx1 : thioredoxine 1
TSLP : *Thymic Stromal Lymphopoietin*

U

UV : Ultra-Violet

Z

ZnSO₄ : sulfate de zinc

Avant-Propos

Avant-Propos

Les allergies professionnelles sont des manifestations cliniques dues à une réponse immune non contrôlée provoquée par l'exposition à des substances sensibilisantes en milieu de travail. Elles comptent parmi les maladies professionnelles les plus fréquentes, car nombre de substances sont présentes en milieu de travail. Souvent sous-estimées, ces pathologies peuvent pourtant devenir très invalidantes et conduire à des réorientations professionnelles. Les manifestations les plus courantes sont cutanées (dont la plus fréquente est la dermatite de contact allergique) ou respiratoires (dont les plus fréquentes sont la rhinite et l'asthme). Les traitements médicaux (par antihistaminique et par corticoïdes) aident temporairement mais ne sont pas une stratégie à moyen terme : des mesures techniques de prévention doivent s'imposer. Il est ainsi très important, dans un souci de prévention, de pouvoir évaluer le pouvoir sensibilisant d'une substance. Cette évaluation est réalisée dans le cadre de la réglementation européenne (règlement CE n°1907/2006 du 18/12/06) concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques. Ce règlement stipule, entre autres, dans l'annexe VI, que lors d'un enregistrement, le déclarant collecte toutes les informations disponibles et pertinentes sur la substance. Parmi les données de toxicologie à fournir dans le dossier d'enregistrement figurent les données sur le pouvoir sensibilisant des produits chimiques.

Cette identification des agents potentiellement sensibilisants permet de mettre en œuvre des mesures de substitution des produits incriminés quand cela est possible et de fournir une information aux personnes utilisant ces agents chimiques à l'aide d'un étiquetage adéquat (règlement CLP relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage (CLP) [(CE) n° 1272/2008]).

Il existe plusieurs méthodes expérimentales permettant d'identifier les substances sensibilisantes. Les tests réalisés sur l'animal tendent à être supplantés par les méthodes *in silico*, *in chemico* et *in vitro*. Les méthodes de substitution destinées à

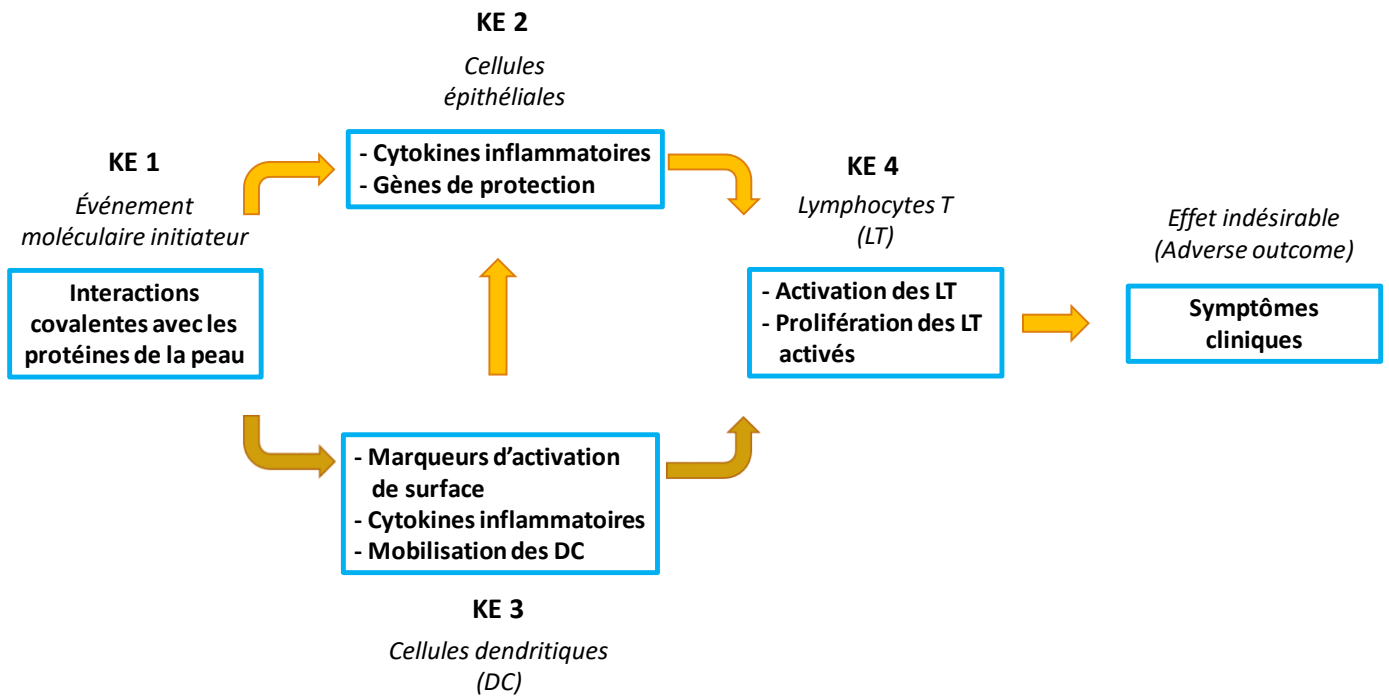
évaluer le potentiel sensibilisant des produits chimiques de bas poids moléculaire reproduisent l'un ou l'autre des événements clés rencontrés dans la voie toxique qui conduit à la réaction finale de l'allergie. Cette voie, représentée dans une AOP (*Adverse Outcome Pathway*) avalisée par l'OCDE, décrit les différentes étapes allant du contact des cellules épithéliales avec l'agent sensibilisant à la réaction finale de l'allergie (**Figure A**). Ces événements clés comprennent l'événement moléculaire initiateur lors de la formation d'une liaison covalente entre des substances chimiques électrophiles et les centres nucléophiles des protéines de la peau. Le deuxième événement clé se déroule dans les kératinocytes et comprend des réponses inflammatoires et des modifications d'expression génique. Le troisième événement clé est représenté par l'activation des cellules dendritiques, évaluée par l'étude de l'expression de marqueurs de surface spécifiques de la cellule et par l'étude de la production de chimiokines et de cytokines. Le quatrième événement clé est représenté par la prolifération des lymphocytes T, évaluée indirectement par le LLNA chez la souris (*in vivo*).

Les tests *in vitro* actuellement validés et réglementaires ne reproduisent que les deuxième ou troisième événements clés cités précédemment. Aucun ne reproduit l'activation des lymphocytes T par des cellules dendritiques activées par des sensibilisants.

L'objectif de ce travail est de :

- Développer un modèle de coculture de cellules dendritiques issues de moelle osseuse de souris et de lymphocytes T permettant d'évaluer l'activation des cellules T par des cellules dendritiques pré-exposées à un agent sensibilisant reconnu.

- Évaluer les performances du modèle en termes de sensibilité, spécificité et exactitude, en élargissant la gamme des produits de référence testés (sensibilisants cutanés, sensibilisants respiratoires, irritants, non sensibilisants-non irritants). Au cours de cette phase, nous avons aussi cherché à voir si un profil particulier se dégageait dans la réponse des lymphocytes T en fonction de la nature des sensibilisants utilisés (sensibilisants cutanés *versus* sensibilisants respiratoires, sensibilisants forts *versus* sensibilisants faibles).



KE : Key Event (événement clé)

Figure A : Schématisation de l'AOP (Adverse Outcome Pathway) de la sensibilisation.

INTRODUCTION

Introduction

1. L'allergie

Les maladies allergiques sont classées au quatrième rang mondial des maladies chroniques selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (WHO, 2017). En 2050, 50 % de la population mondiale pourrait être affectée par au moins une maladie allergique. La prévalence des maladies allergiques a considérablement augmenté dans les pays industrialisés au cours des 30 dernières années (Asher and Weiland, 1998; Peiser *et al.*, 2012; 2016). Actuellement, on estime qu'au moins 30 % de la population mondiale souffrent d'allergie (Oria and Stallings, 2016), quelles que soient les tranches d'âge. Cette proportion est certainement sous-estimée si l'on prend en compte tous les types de manifestations allergiques, sachant de plus que certains patients n'auront jamais recours à un diagnostic ou à un suivi médical. Si les allergies sont particulièrement fréquentes chez les enfants et les jeunes adultes, tout individu peut en souffrir, avec des variations selon les pays et l'âge. Aujourd'hui, la prévalence de la dermatite atopique est évaluée à 15-20 %, celle de l'asthme à 7-15 %, celle de la rhinite et de la conjonctivite allergique autour de 15-20 % (**Figure 1**) (Leynaert *et al.*, 2000; Oria and Stallings, 2016; Pols *et al.*, 2016). La prévalence des allergies alimentaires oscillerait entre 2 % chez l'adulte et 5 % chez les enfants. Elles constituent pour le patient un handicap souvent important et posent un véritable problème de santé publique en terme de qualité de vie, de coût médicamenteux, voire de mortalité (Peiser *et al.*, 2012).

Les maladies allergiques se définissent par des manifestations cliniques déclenchées par un mécanisme immunologique excessif et inadapté, spécifique de l'agent de provocation : l'allergène. La prévalence des maladies allergiques a considérablement augmenté au sein de la population ces dernières décennies. Elle atteint des niveaux

record dans les pays occidentaux, où l'on estime qu'environ une personne sur quatre présente des symptômes cliniques d'allergie.

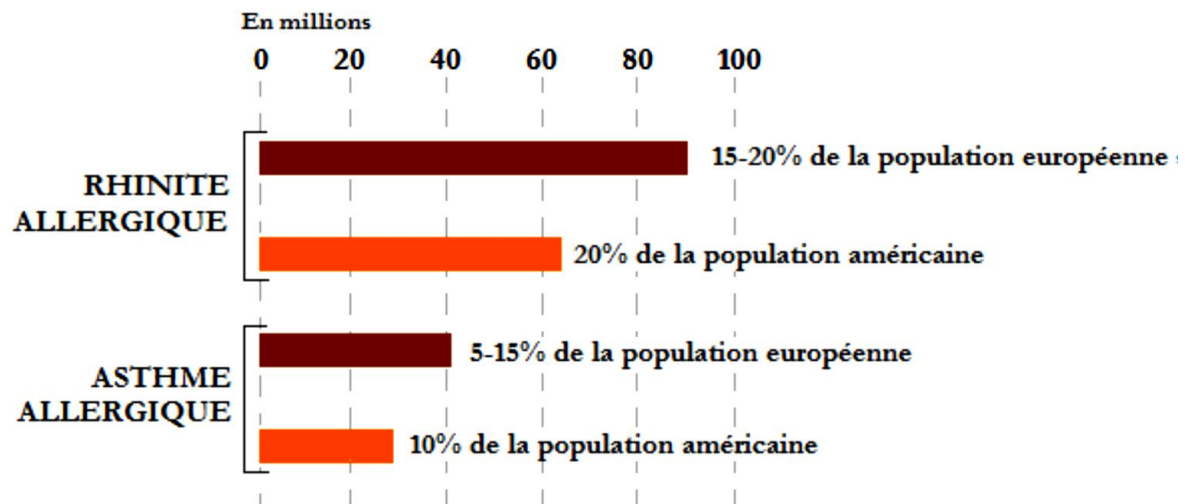


Figure 1. Population affectée par des pathologies allergiques respiratoires.

(D'après (Leynaert et al., 2000))

Les symptômes des maladies allergiques peuvent être très divers selon le mécanisme impliqué. Les signes cliniques les plus fréquemment rencontrés sont respiratoires (rhinites allergiques, asthme), cutanés (dermatite atopique, urticaire) ou systémiques (anaphylaxies), pouvant se déclarer seuls ou combinés.

2. Les réactions d'hypersensibilité

Les réactions immunitaires nous protègent contre les agressions aussi bien bactériennes que virales, parasitaires ou mycosiques. Mais il arrive que ces réactions soient inappropriées et délétères pour l'organisme, c'est ce que l'on appelle communément hypersensibilité ou allergie. L'allergie est une hypersensibilité liée à une reconnaissance par le système immunitaire, contrairement à l'intolérance qui est une hypersensibilité non allergique.

2.1. Les différents types d'hypersensibilité

En fonction des cellules et des médiateurs impliqués, les hypersensibilités peuvent être classées en quatre types suivant la classification de Gell et Coombs de 1963 (**Tableau 1**) (Rajan, 2003) :

- L'hypersensibilité de type I ou immédiate est caractérisée par le déclenchement d'une réponse humorale à immunoglobulines (Ig) de type E (IgE) lors de l'exposition répétée à un allergène. Les signes cliniques incluent la rhinite allergique, l'asthme, la dermatite atopique, l'urticaire ou des réactions anaphylactiques systémiques potentiellement mortelles.

- L'hypersensibilité de type II est une hypersensibilité induite par les IgM et essentiellement les IgG. La destruction cellulaire peut se produire par fixation des anticorps aux antigènes présents à la surface des cellules et activation du système du complément ou par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Les manifestations cliniques comprennent les réactions transfusionnelles, l'anémie hémolytique fœtale ou médicamenteuse.

- L'hypersensibilité de type III est dépendante de complexes immuns. Ceux-ci activent les molécules effectrices immunitaires du système du complément, provoquant une infiltration des neutrophiles et la dégranulation des mastocytes. Cliniquement, ce type d'hypersensibilité est observée dans la réaction d'Arthus, la maladie sérique, la polyarthrite rhumatoïde ou encore le lupus érythémateux disséminé.

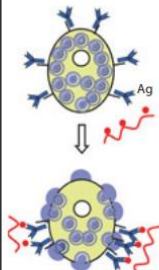
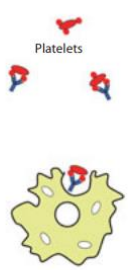
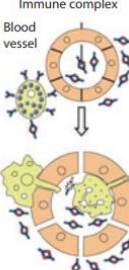
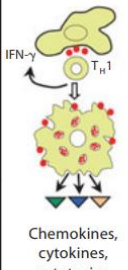
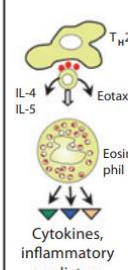
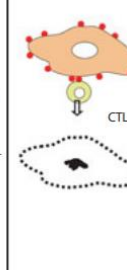
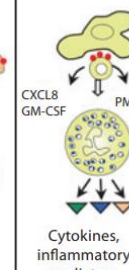
- L'hypersensibilité de type IV, aussi dite retardée ou cellulaire, est dépendante des lymphocytes T. Elle peut être répartie en 3 groupes. Dans le premier groupe, les lésions tissulaires sont liées à l'activation des macrophages par les cellules Th1 et à la réaction inflammatoire qui s'ensuit. Dans le deuxième, elles sont dues à une réaction inflammatoire dépendant des cellules Th2 dans laquelle les éosinophiles jouent un rôle prédominant. Dans le troisième groupe, les lésions sont causées directement par les

cellules T cytotoxiques. Les manifestations cliniques sont les dermatites de contact, asthmes ou rhinites chroniques ou des lésions tuberculeuses.

Cependant, il est important de noter que, suite aux recherches récentes et à une meilleure compréhension des mécanismes immunologiques, les frontières entre les quatre catégories d'hypersensibilité s'estompent.

Tableau 1. Les quatre types de réactions d'hypersensibilité.

D'après (Hausmann et al., 2012)

| Antibody (I–III) and T cell-orchestrated hypersensitivity reactions (IVa–d) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|--|---|---|
| | Type I | Type II | Type III | Type IVa | Type IVb | Type IVc | Type IVd |
| Immune reactant | IgE | IgG | IgG | IFN γ , TNF α (T $_H$ 1 cells) | IL-5, IL-4/IL-13 (T $_H$ 2 cells) | Perforin/granzymeB (CTL) | CXCL-8, IL-17 GM-CSF (T cells) |
| Antigen | Soluble antigen | Cell- or matrix-associated antigen | Soluble antigen | Antigen presented by cells or direct T cell stimulation | Antigen presented by cells or direct T cell stimulation | Cell-associated antigen or direct T cell stimulation | Soluble antigen presented by cells or direct T cell stimulation |
| Effector | Mast cell activation | FcR+ cells (phagocytes, NK cells) | FcR+ cells complement | Macrophage activation | Eosinophils | T cells | Neutrophils |
| |  |  |  |  |  |  |  |
| Example of hypersensitivity reaction | Allergic rhinitis, asthma, systemic anaphylaxis | Hemolytic anemia, thrombocytopenia (e.g. penicillin) | Serum sickness, Arthus reaction | Tuberculin reaction, contact dermatitis (with IVc) | Chronic asthma, chronic allergic rhinitis Maculopapular exanthema with eosinophilia | Contact dermatitis Maculopapular and bullous exanthema hepatitis | AGEP Behçet disease |

Les hypersensibilités de type I et IV sont fréquentes, celles de type II et III bien plus rares.

La classification de Gell et Coombs a été revisitée en 2001 par Johansson *et al.*, et deux années plus tard, par Rajan (Johansson *et al.*, 2001; Rajan, 2003). Il a ainsi été proposé l'introduction d'une cinquième classe d'hypersensibilité dans laquelle le système immunitaire inné serait également impliqué.

3. Les allergies professionnelles

Les maladies allergiques peuvent avoir pour origine le milieu professionnel. En effet, les allergies comptent parmi les maladies professionnelles les plus fréquentes. Les allergies professionnelles sont des manifestations cliniques dues à une réponse immune non contrôlée, provoquée par l'exposition à des substances sensibilisantes en milieu de travail. Les manifestations les plus courantes sont respiratoires (rhinite, asthme, pneumopathie d'hypersensibilité) ou cutanée (dont la plus fréquente est la dermatite allergique de contact).

3.1. Les allergies professionnelles respiratoires

L'asthme est une maladie fréquente en France avec une prévalence dans la population générale estimée entre 5 et 10 %. Les données épidémiologiques démontrent l'importance des facteurs professionnels dans l'asthme. L'analyse des informations disponibles suggère, en effet, qu'environ 15 % des asthmes de l'adulte sont liés à l'environnement professionnel (Bessot *et al.*, 2012; Demange, 2013). Cependant, ce dernier peut intervenir de différentes façons dans la maladie asthmatique et mener à diverses formes d'asthme lié au travail (Malo and Vandenplas, 2011; Bessot *et al.*, 2012). On distingue d'une part, l'asthme causé par l'environnement professionnel (Asthme Professionnel (AP)) et, d'autre part, l'asthme aggravé (ou exacerbé) au travail (AAT) mais dont la cause première n'est pas le milieu professionnel. On regroupe AP et AAT sous le terme d'asthme en relation avec le travail (ART). De nombreuses substances présentes dans l'environnement professionnel peuvent induire un asthme par des mécanismes de sensibilisation d'ordre immunoallergique. Actuellement, plus de 400 substances industrielles pourraient être à l'origine d'ART (Finger *et al.*, 2012). Les molécules les plus fréquemment incriminées sont la farine et les additifs (20,3 % des cas), les résines polyuréthanes (14,1 %), le latex (7,2 %), les persulfates alcalins (5,8

%) et les poussières de bois (3,7 %). Les boulangers, les coiffeurs, les travailleurs du bois ou les professionnels de santé font partie des professions les plus atteintes en France (Paris *et al.*, 2012).

Les différents allergènes responsables d'ART peuvent être classés en substances de haut poids moléculaires (HPM) ou de bas poids moléculaires (BPM).

Les substances HPM sont principalement des glycoprotéines d'origines animale ou végétale. Les substances BPM sont représentées par des substances chimiques réactives (isocyanates, anhydrides d'acides, acrylates, persulfates), des métaux (cobalt, chrome, nickel, platine) et des poussières de bois. Les substances HPM et certains agents de BPM (sels de platine, anhydrides d'acides, certains colorants réactifs) induisent le développement d'un asthme par un mécanisme d'hypersensibilité immédiate de type I médiée par des IgE spécifiques. Pour la plupart des agents BPM, les mécanismes immunologiques impliqués dans l'ART ne sont pas encore clairement identifiés. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés uniquement aux substances BPM.

Par analogie avec l'asthme, on distingue également au sein des rhinites en relation avec le travail, les rhinites professionnelles et les rhinites aggravées au travail. Les rhinites professionnelles sont de 2 à 3 fois plus fréquentes que l'AP. Les travailleurs présentant une rhinite professionnelle ont un risque accru de développer un AP (Moscatto *et al.*, 2009). Cliniquement, elle se manifeste par un prurit nasal, des éternuements, une rhinorrhée et une obstruction nasale et s'accompagne souvent d'une conjonctivite. Les fosses nasales étant le premier filtre de l'appareil respiratoire aux aérocontaminants, la rhinite constitue la première manifestation d'une maladie respiratoire qui peut conduire à l'apparition d'un asthme.

3.2. Les allergies professionnelles cutanées

La dermatite d'irritation de contact (DIC) et la dermatite allergique de contact (DAC) sont les dermatoses professionnelles les plus fréquentes (70 à 90 % des déclarations). Les secteurs d'activité les plus concernés sont la coiffure et l'esthétique, l'agroalimentaire, la construction, le nettoyage, la mécanique, la métallurgie, le secteur de la santé, l'industrie chimique, l'électronique et l'agriculture (Crepy, 2013). D'après les données du RNV3P (Réseau National de Vigilance et de Prévention des Pathologies Professionnelles) de 2001 à 2009, les nuisances les plus souvent incriminées dans les dermatites allergiques de contact sont, par ordre de fréquence décroissante, les métaux, les biocides, les produits de coiffure, les résines et colles, les additifs du caoutchouc, les cosmétiques, les huiles et graisses, les produits de nettoyage et le béton (RNV3P, 2011).

Dans la suite de cette revue de la littérature, nous allons nous intéresser uniquement à la DAC en rapport avec ce travail de thèse.

Les métaux tels que le nickel et le chrome, les additifs pour caoutchouc tels que les carbamates et les mercaptobenzothiazoles retrouvés dans les gants ou les chaussures ; les conservateurs ou autres additifs tels que le quaternium-15 et l'imidiazolidinyle urée retrouvés dans les produits cosmétiques, les colorants et les médicaments tels que la néomycine et l'hydrocortisone, peuvent provoquer des DAC (Crepy, 2013). Celle-ci peut être induite par différentes voies d'exposition soit par un contact direct soit par un contact manuporté ou aéroporté. Le contact direct de l'allergène avec la peau induisant une DAC se manifeste par une réaction inflammatoire eczémateuse. Cette dernière a lieu à l'endroit où l'agent allergisant est déposé (Vigan, 2009). Lorsque celui-ci est déposé via les mains sur le visage, il s'agit d'un transfert manuporté. Lorsqu'il est en suspension dans l'air, il s'agit d'un transfert aéroporté (Goossens and Lepoittevin, 2003; Vigan, 2009). La DAC est alors déclenchée sur les zones exposées, principalement le visage, les paupières, le décolleté, les bras et les jambes.

La DAC survient après contact répété de la peau avec des substances BPM qui nécessitent de se lier à des protéines épidermiques pour devenir immunogènes (Esser and Martin, 2017). Elle correspond à une réponse immunitaire retardée d'hypersensibilité de type IV. Le développement de la DAC passe par deux phases : une phase de sensibilisation lors du premier contact (pour une substance sensibilisante forte) ou le plus souvent après des contacts répétés de la substance avec la peau et une phase de déclenchement lors d'un nouveau contact avec la même substance conduisant à l'apparition d'une DAC en 24 à 72 heures.

Les mécanismes physiopathologiques de ces deux phases immunologiques seront développés ultérieurement dans cette introduction.

Les autres pathologies allergiques professionnelles de contact telles que l'urticaire allergique ou la dermatite de contact aux protéines ne sont pas développées dans cette introduction car elles sont dues majoritairement à des substances HPM qui ne font pas l'objet de ce travail de thèse. Néanmoins, quelques rares cas d'urticaire allergique professionnels peuvent être imputés à des substances BPM (persulfates d'ammonium dans la coiffure, antibiotiques chez les infirmières et les personnels de laboratoires pharmaceutiques, anhydrides d'acides dans l'industrie des matières plastiques...) (Nikolova-Pavageau, 2013).

Dans les paragraphes suivants de cette introduction, nous allons aborder les différentes catégories de substances BPM et leurs caractéristiques, puis nous aborderons dans une seconde partie les différents acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans les réactions allergiques.

4. Les substances de bas poids moléculaires ou haptènes

À ce jour, plus de 4000 substances chimiques ont été identifiées comme responsables de maladies allergiques (Martin, 2015b; Esser and Martin, 2017). Les allergènes de bas poids moléculaires (< 500 Da) sont des substances xénobiotiques ayant des propriétés physico-chimiques leur permettant de franchir les barrières épithéliales de la peau ou du système respiratoire. Ces substances appelées également haptènes sont reconnues par le système immunitaire, mais ne sont pas immunogènes (incapables d'induire une réponse du système immunitaire). Le concept d'haptène a été introduit en 1935 par Landsteiner et Jacobs (Landsteiner and Jacobs, 1935). Étant trop petits pour être immunogènes, les haptènes doivent se lier à des protéines porteuses, appelées « carrier » pour former un complexe stable haptène-protéine reconnaissable par le système immunitaire adaptatif.

La formation du complexe haptène-protéine ne peut s'effectuer que si l'haptène possède une ou plusieurs fonctions réactives lui permettant de modifier chimiquement les protéines. Il existe cependant des molécules allergisantes ne possédant aucune fonction chimiquement réactive pouvant expliquer la formation de cet antigène. Ces composés, précurseurs d'haptènes, peuvent être classés en deux catégories : les pré-haptènes, s'oxydant à l'air pour former un vrai haptène, et les pro-haptènes, nécessitant une étape de métabolisation pour mener à la formation d'un haptène réactif (Kaplan *et al.*, 2012; Karlberg *et al.*, 2013). Les trois types d'haptènes sont présentés ci-dessous (**Figure 2**).

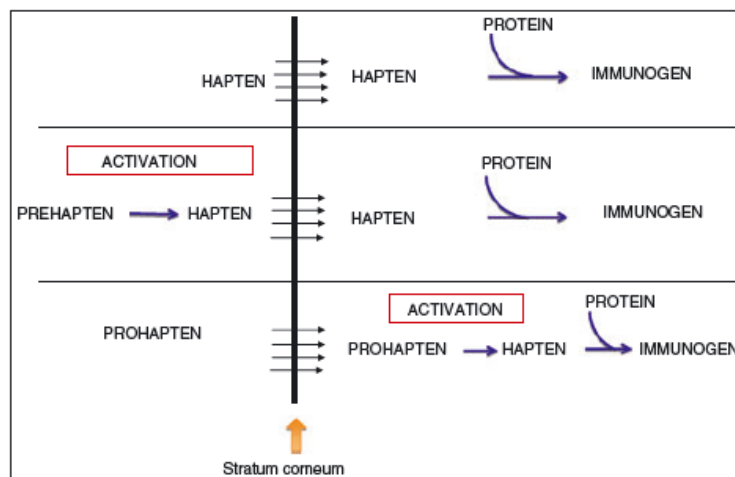
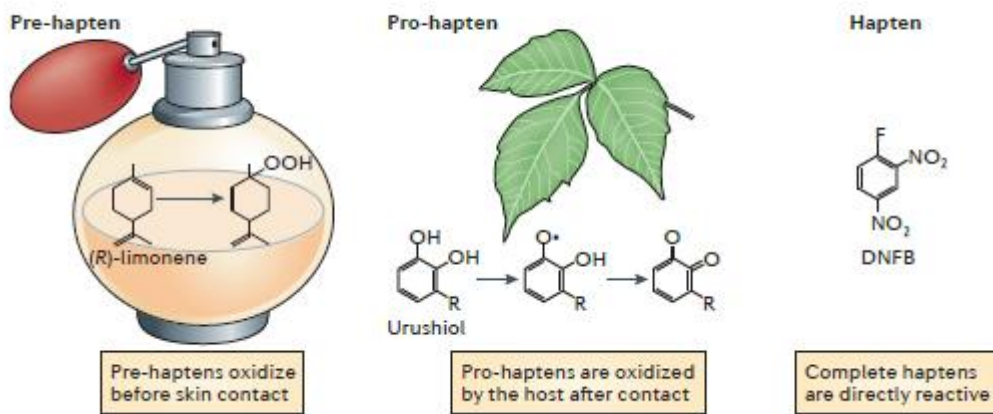


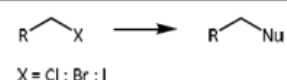
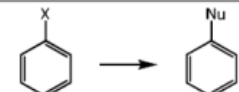
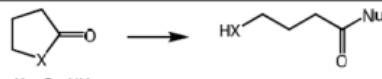
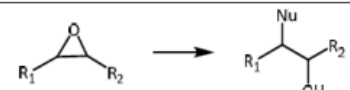
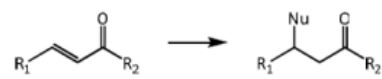


Figure 2. Exemple des différents types d’haptènes.

(d’après (Kaplan et al., 2012; Karlberg et al., 2013))

Le tableau suivant montre les fonctions chimiques réactives et les mécanismes de réaction avec les acides aminés nucléophiles les plus souvent observés pour les haptènes (**Tableau 2**).

Tableau 2. Exemples de différentes réactivités observées chez les haptènes.*(Nu : acide aminé nucléophile)*

| Classe | Sites réactifs | Mécanisme de réaction/d'activation | Exemples |
|----------|--|-------------------------------------|--|
| Haptènes | Carbonyle | Addition nucléophile |  |
| | Carboxyle | Addition élimination | $R_2 = OR_3; NHR_3$  |
| | Dérivé halogéné | Substitution nucléophile |  $X = Cl; Br; I$ |
| | Dérivé halogéné aromatique | Substitution nucléophile aromatique | $X = Cl; Br; I$  |
| | Lactone-lactame | Addition élimination |  $X = O; NH$ |
| | Époxydes | Substitution nucléophile |  |
| | Carbonyles α - β -insaturés | Addition nucléophile |  |

Les acides aminés les plus souvent cités comme réactifs sont : la cystéine, la lysine, l'histidine, la tyrosine, la méthionine et le tryptophane. La réaction de l'haptène avec les acides aminés conduit généralement à la formation de liaisons covalentes (Roberts and Williams, 1982). Dans le cas de certains composés (nickel par exemple), on observe des liaisons de coordination entre le métal et les acides aminés (Lepoittevin, 2011).

4.1. Caractéristiques physicochimiques des haptènes

La grande majorité des haptènes sont des molécules électrophiles qui interagissent avec les résidus nucléophiles des protéines des cellules épithéliales. Si bien que les termes : haptènes et pro-haptènes pourraient être remplacés par les termes : électrophiles et pro-électrophiles. Cette nouvelle classification des molécules sensibilisantes prendrait en compte leur mode d'action expliquant le mécanisme de la

sensibilisation (Aptula *et al.*, 2007). Le fait qu'un haptène puisse conduire un individu à développer ou non une allergie dépend de sa capacité à diffuser à travers les barrières épithéliales, mais aussi et avant tout, de sa capacité à interagir avec les protéines endogènes induisant ainsi d'importantes modifications de leurs structures tridimensionnelles. Les haptènes peuvent être classés en deux catégories selon le type de liaisons formées avec les protéines : d'un côté les haptènes se lient aux protéines par des liaisons de coordination, de l'autre, ceux pouvant former des liaisons covalentes (Lepoittevin, 2006; Aptula *et al.*, 2007).

4.1.1. Les liaisons de coordination

Les liaisons de coordination se produisent généralement avec les métaux. Le nickel (Ni), le platine (Pt), le chrome (Cr), le béryllium (Be) ou le cobalt (Co) réagissent avec les protéines par des liaisons de faible affinité et réversibles avec 4 ou 6 électrons donneurs. Ces liaisons mettent en jeu des énergies de l'ordre de 50 kJ par mole. Les complexes de coordination formés entre ces métaux et les protéines sont suffisamment stables pour être reconnus par le système immunitaire (Thierse *et al.*, 2005). Il a été montré par ailleurs, que le Ni pouvait se lier directement aux peptides du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II des cellules dendritiques (DC) permettant ainsi une différenciation des lymphocytes T (LT) spécifiques du Ni, mais également que le Ni pouvait lier le CMH et la tyrosine 29 de la chaîne α du récepteur des LT (TCR : *T Cell Receptor*), formant ainsi un pont entre les deux cellules (Van Den Broeke *et al.*, 1999; Gamedinger *et al.*, 2003).

4.1.2. Les liaisons covalentes

Les liaisons covalentes sont des liaisons très stables, mettant en jeu des énergies supérieures à 200 kJ par mole. D'une manière générale, elles se forment entre les fonctions chimiques électrophiles de l'haptène et des résidus nucléophiles des protéines épidermiques par le biais d'un mécanisme classique à deux électrons (Lepoittevin, 2011; Gerberick, 2016). Les acides aminés les plus fréquemment impliqués dans la formation de complexes antigéniques sont les acides aminés qui portent au sein de leur chaîne latérale un ou plusieurs hétéroatomes riches en électrons (**Figure 3**) (Lepoittevin, 2011; Fujita *et al.*, 2014). La lysine et la cystéine sont les deux acides aminés les plus souvent cités comme cibles des électrophiles mais d'autres acides aminés contenant des hétéroatomes nucléophiles sont susceptibles de réagir avec les haptènes (Gerberick, 2016). Enfin, des liaisons covalentes entre l'haptène et les acides aminés peuvent aussi se former par un mécanisme de type radicalaire (**Figure 4**). Les liaisons covalentes étant difficilement réversibles, elles confèrent au complexe haptène-protéine formé une meilleure stabilité. Cette stabilité du complexe antigénique favorisera une réponse du système immunitaire conduisant à une sensibilisation.

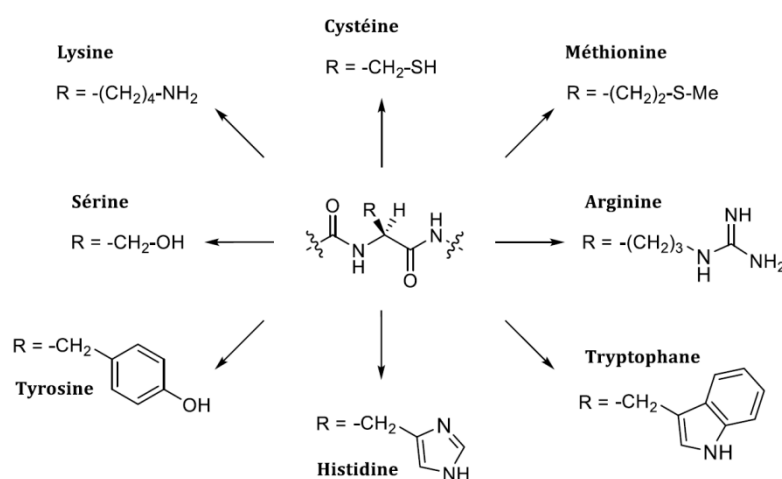


Figure 3. Principaux résidus nucléophiles présents dans les protéines.

(d'après (Lepoittevin, 2011))

Une conséquence de la grande diversité des interactions haptènes-protéines est l'existence d'une sélectivité de l'haptène pour certains acides aminés. Les modifications créées sur les protéines ne sont pas toutes antigéniques ; le potentiel sensibilisant d'une substance est plus lié à la modification de certains résidus plutôt qu'au nombre total de modifications. Le site de conjugaison de l'haptène est en effet directement impliqué dans la sélection de la séquence des fragments peptidiques qui seront présentés par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) aux LT naïfs et donc dans la sélection des récepteurs lymphocytaires. Il a également été suggéré que la densité d'épitopes formés lors de l'étape d'hapténation pourrait être liée à l'orientation Th1/Th2, une forte densité d'épitopes privilégiant une orientation Th1 alors qu'une faible densité pourrait favoriser une orientation Th2 (Hosken *et al.*, 1995). Plus récemment, l'influence de la réactivité de l'haptène vis-à-vis de la cystéine ou de la lysine dans l'orientation de la réponse allergique Th1/Th2 a été soulignée. En observant la réactivité de nombreux sensibilisants vis-à-vis de peptides comportant soit un résidu cystéine, soit un résidu lysine, il a été mis en évidence que les sensibilisants strictement de contact réagissaient peu avec la lysine alors que les sensibilisants respiratoires réagissaient peu avec la cystéine (Lepoittevin, 2011; Lalko *et al.*, 2013; Gerberick, 2016).

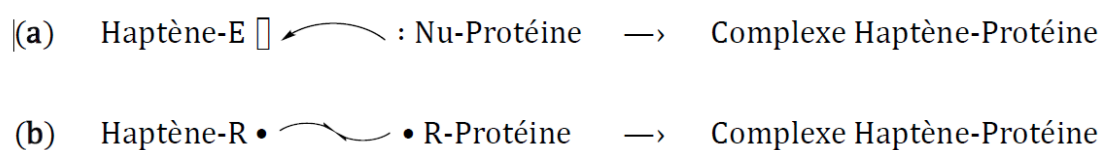


Figure 4. Formation de liaisons covalentes par réaction électrophile – nucléophile(a) et radicalaire (b).

(d'après (Aptula *et al.*, 2007; Lepoittevin, 2011))

Certaines molécules ne possèdent pas la réactivité chimique des haptènes leur permettant de former des adduits, mais vont acquérir cette réactivité après activation. Selon le mécanisme mis en œuvre, ces composés sont appelés pro-haptènes si

l'activation est réalisée par des enzymes et pré-haptènes si l'activation est réalisée par un mécanisme non enzymatique.

4.2. Les pro-haptènes

Les molécules xénobiotiques ayant franchi les barrières épithéliales risquent de s'accumuler dans l'organisme. Des processus métaboliques ayant pour rôle d'éliminer ces xénobiotiques de l'organisme sont présents dans de nombreux organes et particulièrement bien développés dans la peau. Ces systèmes enzymatiques de détoxification transforment les molécules au départ lipophiles en molécules hydrosolubles facilement excrétables. Ces molécules au départ non sensibilisantes peuvent dans certains cas, être converties en intermédiaires hautement électrophiles, réactifs vis-à-vis des protéines.

Ces transformations enzymatiques réalisées en une ou plusieurs étapes sont classées généralement en deux catégories : les transformations métaboliques de phase I et celles de phase II (**Figure 5**).

Les enzymes de phase I initient la « fonctionnalisation » des xénobiotiques ; c'est-à-dire introduisent un groupe fonctionnel (-OH, -SH, -NH₂, -COOH etc.) dans la molécule. Cette étape de bioactivation est réalisée par des enzymes exprimées, notamment par les cellules épithéliales et des CPA. Peuvent être citées, entre autres les mono-oxygénases à cytochromes P450, les flavines mono-oxygénases, les alcools et aldéhydes déshydrogénases, les monoamines oxydases, les peroxydases, les estérases et les azo-réductases (Karlberg *et al.*, 2013; Lalko *et al.*, 2013; Urbisch *et al.*, 2016).

Les enzymes de phase II catalysent les réactions de conjugaisons avec des composés généralement hautement hydrophiles. Elles sont représentées, entre autres, par les

N-acétyltransférases, les glutathion-S-transférases, les UDP-glucuronyl transférases et les sulfotransférases (Karlberg *et al.*, 2013; Urbisch *et al.*, 2016).

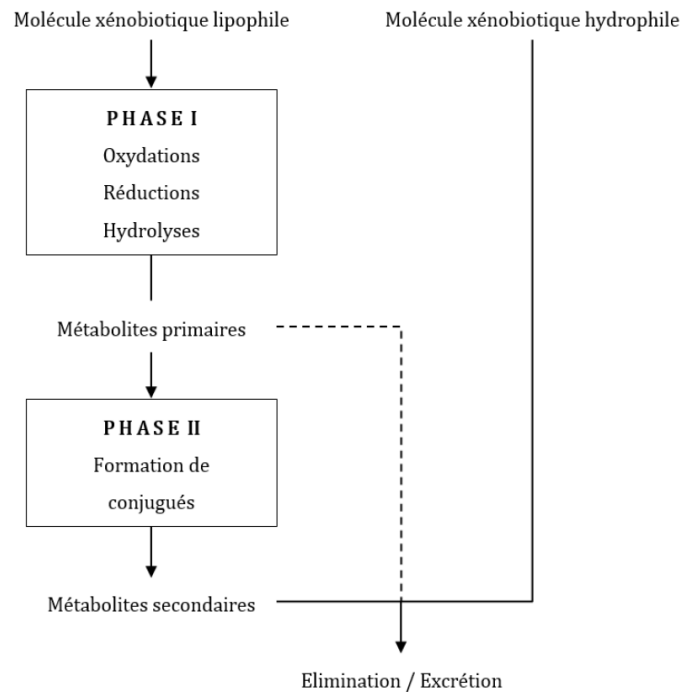


Figure 5. Processus de détoxification.

Ces mécanismes de détoxification des xénobiotiques permettent l'élimination d'un grand nombre de molécules de l'organisme, limitant ainsi le développement d'allergies (Lepoittevin, 2011). Néanmoins, quand la dose et/ou le temps d'exposition d'une substance, ou lorsque le processus métabolique génère des composés électrophiles hautement réactifs, l'activation du système immunitaire est possible.

Les pro-haptènes jouent un rôle important dans les allergies aux substances de faibles poids moléculaires. En effet, plus d'un tiers des sensibilisants cutanés connus sont des pro-haptènes (Lepoittevin, 2011). L'alcool cinnamique est un exemple de pro-haptène d'origine naturelle présent dans le baume du Pérou et les feuilles de cannelle. Il est utilisé en parfumerie et fait partie du "Fragrance Mix 1" qui réunit les 8 sensibilisants les plus couramment rencontrés dans les parfums (Johansen and Menne, 1995).

L'alcool cinnamique, *in vivo*, est oxydé par une alcool déshydrogénase en aldéhyde cinnamique ou cinnamaldéhyde, composé très réactif vis-à-vis des résidus nucléophiles (**Figure 6**) (Smith *et al.*, 2000).

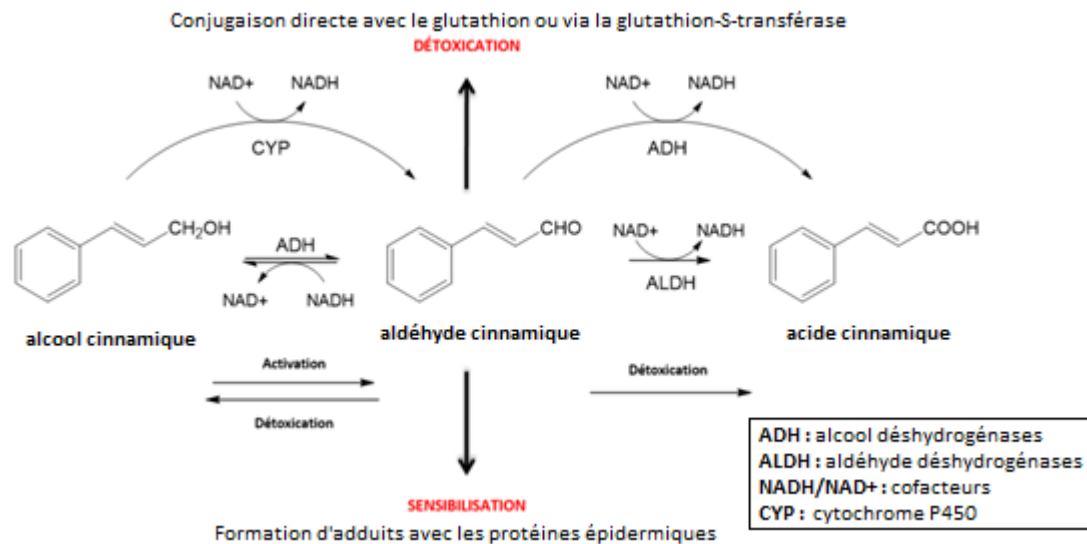


Figure 6. Transformation enzymatique de l'alcool cinnamique en aldéhyde cinnamique puis en acide cinnamique.

(d'après (Smith *et al.*, 2000))

4.3. Les pré-haptènes

Introduit en 2006 par Lepoittevin (Lepoittevin, 2006), le terme de pré-haptène définit des substances inertes qui deviennent des allergènes après exposition à leur environnement. Les modifications et transformations opérées sur les pré-haptènes sont réalisées par voie non métabolique sous l'action de facteurs externes (chaleur, lumière, oxygène, etc.) et conduisent à la formation d'espèces réactives qui peuvent potentiellement se fixer aux protéines. Dans la majorité des cas, l'activation des pré-haptènes est réalisée par oxydation lente (ou auto-oxydation) via une exposition prolongée à l'air ambiant (Karlberg *et al.*, 2013).

Des études ont recherché l'influence de l'auto-oxydation sur le potentiel allergisant de certains terpènes utilisés dans les fragrances et ont mis en évidence des positions allyles oxydables capables de générer des hydroperoxydes sous l'effet de l'air. Ces

hydroperoxydes peuvent être de nouveau oxydés pour former des produits d'oxydation secondaires générant *in fine* des composés polymères. Les hydroperoxydes générés peuvent former des antigènes spécifiques et agir comme allergisants cutanés (Lepoittevin, 2006, 2011; Karlberg *et al.*, 2013). Les produits d'oxydation secondaires tels que les aldéhydes et les époxydes peuvent aussi être allergisants, augmentant ainsi le potentiel sensibilisant des mélanges d'auto-oxydation.

La *para*-phénylènediamine (pPD) est l'un des constituants majeurs des teintures capillaires permanentes. Elle est additionnée de manière illicite au henné dans le but d'assombrir et de noircir la couleur des tatouages temporaires. La pPD est capable d'être oxydée par le dioxygène pour conduire à la formation d'une benzoquinone diimine ou d'une benzoquinone (après hydrolyse), toutes deux très réactives (**Figure 7**) (Lepoittevin, 2011; Patlewicz *et al.*, 2016).

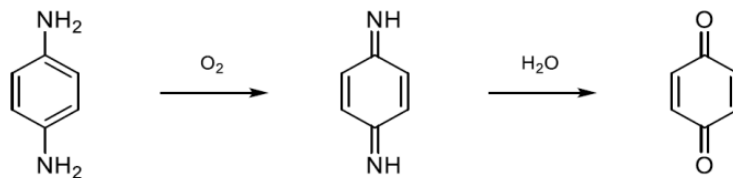


Figure 7. Oxydation de la *para*-phénylènediamine en benzoquinone diimine, puis hydrolyse de cette dernière en benzoquinone.

Ces substances chimiques (haptènes, pré-/pro-haptènes), outre leurs propriétés sensibilisantes, peuvent parfois posséder des propriétés irritantes. Elles activent ainsi à la fois l'immunité innée et adaptative, à la différence des molécules seulement irritantes qui activent uniquement l'immunité innée, ou des antigènes protéiques qui induisent une réponse immunitaire en présence de signaux adjuvants extérieurs. L'activation de l'immunité innée par les haptènes est liée à leurs caractères pro-inflammatoire et toxique, et joue un rôle clé dans la sensibilisation des individus aux haptènes. En effet, cette phase d'activation de l'immunité innée est nécessaire pour

l'activation et la migration des cellules dendritiques (DC) transportant l'allergène vers les ganglions, où l'haptène sera présenté aux lymphocytes T (Vocanson, 2014). Pour ce faire, le système immunitaire emploie un certain nombre d'acteurs cellulaires ou moléculaires responsables de ces réponses immunitaires.

5. Les différents acteurs impliqués dans les réactions allergiques aux substances chimiques

5.1. Les cellules épithéliales

La première ligne de défense de notre organisme est constituée par les épithéliums de revêtement, qui forment une barrière anatomique vivante entre le milieu interne et l'environnement extérieur. Les cellules épithéliales doivent ainsi faire face à de nombreuses agressions. Ces épithéliums comprennent, entre autres, l'épiderme et les tissus qui revêtent les tractus gastro-intestinal, respiratoire et urogénital. Dans les paragraphes suivants, nous allons nous intéresser aux cellules épithéliales cutanées et respiratoires qui sont les premières cellules impliquées dans les réactions allergiques aux substances chimiques.

5.1.1. Les cellules épithéliales de la peau

Les kératinocytes (KC) représentent environ 90 % 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 (**Figure 8**). Les KC produisent de la kératine, une protéine particulièrement concentrée dans la couche cornée, lui

conférant une forte résistance. La cohésion et la souplesse de l'ensemble sont renforcées par une couche de lipides constitués de céramides, de cholestérol et d'acides gras (Nestle *et al.*, 2009; Emter *et al.*, 2010).

Les kératinocytes jouent un rôle crucial dans l'initiation et le développement des réactions inflammatoires et immunologiques cutanées (Eyerich *et al.*, 2018). Ils sécrètent de façon constitutive certaines cytokines (IL-1 α , TNF- α , IL-6, G-CSF, TGF- β). De plus, après stimulation, les KC sont capables de sécréter des cytokines inflammatoires (IL-1, TNF- α), des chimiokines (IL-8, IP-10 (*interferon γ -induced protein 10 kDa*)), des facteurs de croissance (IL-6, GM-CSF, TGF- α) et des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) (Nestle *et al.*, 2009; Kaplan *et al.*, 2012; Eyerich *et al.*, 2018). Cette sécrétion peut être induite par des stimuli externes non spécifiques tels les rayons UV et les substances chimiques, ou par des composants bactériens et viraux.

En plus de leur fonction de maintien de la barrière physique cutanée, les KC sont des acteurs importants de l'immunité innée. Ces cellules expriment des récepteurs de la famille des *Toll* : les TLR (*Toll-Like Receptors*) membranaires (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, et TLR6) ou endosomiques (TLR3, TLR7 et TLR9) (**Figure 9**). Ces TLR sont capables de reconnaître divers composés microbiens appelés PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) tels que les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycanes, la flagelline et les acides nucléiques (Nestle *et al.*, 2009; Kaplan *et al.*, 2012; Eyerich *et al.*, 2018). Une autre classe de protéines, les NLR (*Nod-Like Receptor*) codées par la famille de gènes *leucine-rich repeat-containing*, est également présente dans les kératinocytes. Ces protéines cytosoliques sont capables de reconnaître les PAMPs ainsi que les DAMPs (*Danger-Associated Molecular Patterns*) endogènes.

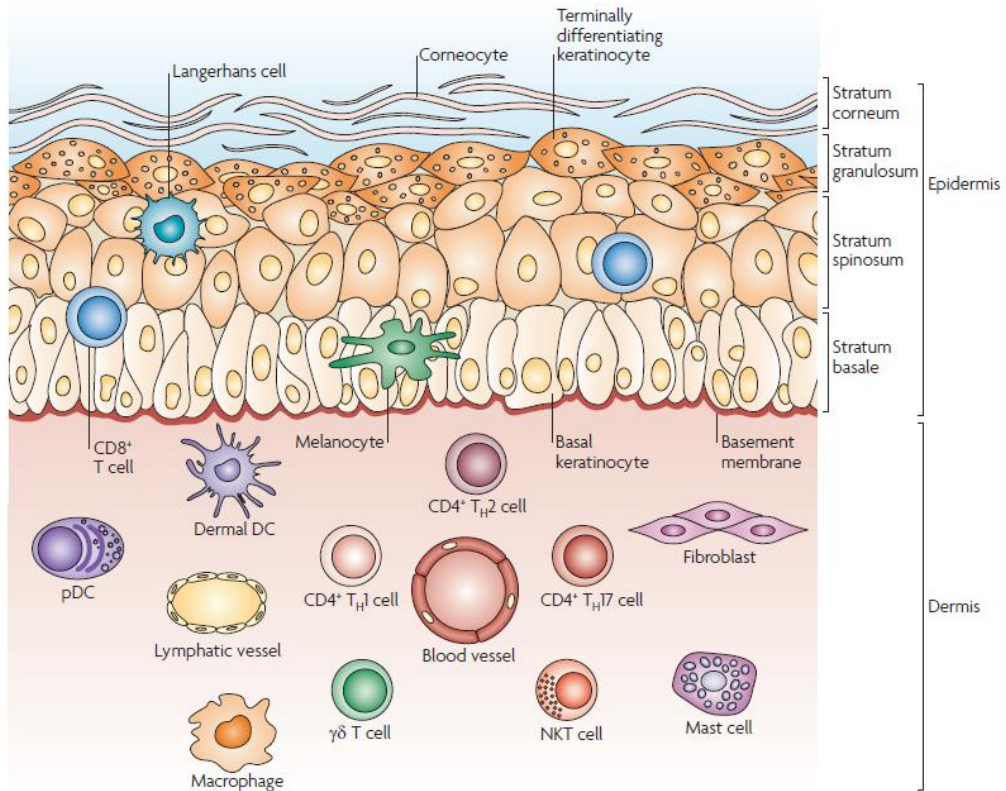


Figure 8. Structure anatomique de la peau et représentation des cellules impliquées dans l'immunité cutanée.

(d'après (Nestle et al., 2009))

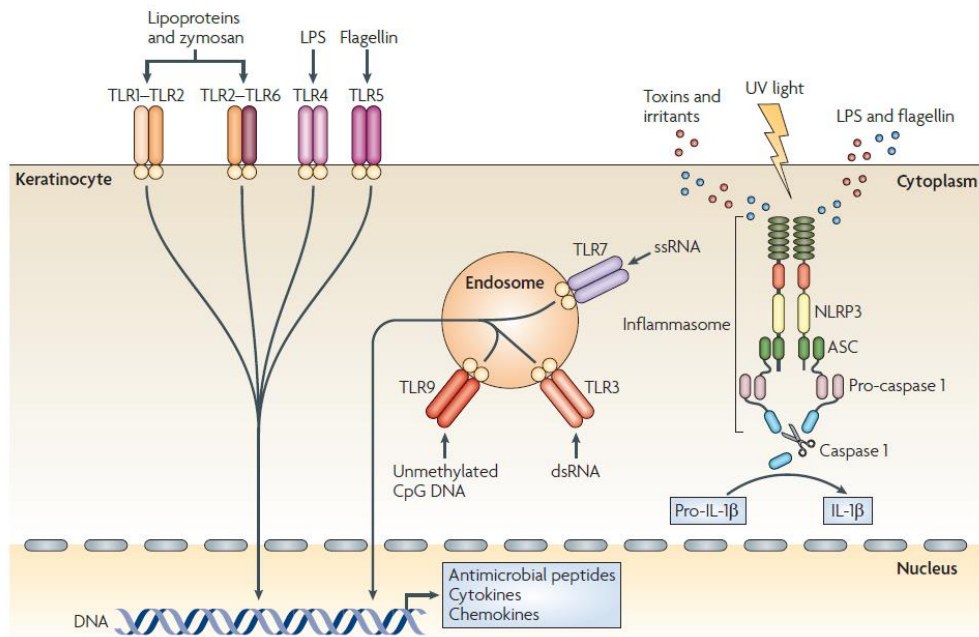


Figure 9. Le kératinocyte, capteur de danger.

(d'après (Nestle et al., 2009))

L'activation des NLR conduit à l'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires via l'inflammasome, un complexe multi-protéique composé par un des NLR, une protéine adaptatrice ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*) et la pro-caspase-1 (Awad *et al.*, 2018). L'assemblage de l'inflammasome conduit à l'activation de la caspase-1 ; cette dernière va alors cliver la pro-interleukin-1 (pro-IL-1) et la pro-IL-18 générant les formes actives de ces cytokines pro-inflammatoires (Awad *et al.*, 2018). Un paragraphe sera consacré ultérieurement aux signaux de dangers, notamment pour les DC.

Les KC expriment à leur surface plusieurs récepteurs du système immunitaire tels que: le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II (CMH-II), la molécule d'adhésion ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*, CD54) et des molécules de co-stimulation (comme CD40 ou CD80) (Esche *et al.*, 2004; Nestle *et al.*, 2009). Cependant bien que les KC présentent ces caractéristiques, leur capacité à se comporter comme des cellules présentatrices d'antigène (CPA) reste controversée. Par contre, l'expression d'ICAM-1 induite par l'interféron- γ (IFN- γ) et le TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) suggère que les KC sont plutôt impliqués dans la migration des lymphocytes T (LT) dans l'épiderme de peaux inflammatoires (Nestle *et al.*, 2009; Kaplan *et al.*, 2012).

5.1.2. Les cellules épithéliales des voies respiratoires

L'épithélium des voies respiratoires est capable de faire face aux diverses agressions quotidiennes. En cela, il constitue un système de défense inné, basé sur des propriétés physicochimiques et antimicrobiennes. Il s'agit notamment de la clairance mucociliaire et de la sécrétion de peptides antimicrobiens. Les cellules épithéliales peuvent aussi recruter des cellules phagocytaires, en premier lieu des granulocytes et

secondairement d'autres cellules de l'immunité, conduisant ainsi à une réponse inflammatoire.

Si les cellules épithéliales des voies aériennes sont connues pour jouer un rôle important dans l'immunité innée comme barrière physique, elles sont maintenant reconnues comme des cellules fondamentales dans le développement des réponses allergiques. Par leur aptitude à produire des cytokines, elles sont activement impliquées dans le développement des manifestations d'asthme d'une manière directe (Lambrecht and Hammad, 2010; Hammad and Lambrecht, 2011; Deckers *et al.*, 2017). Que ce soit lors de la phase de sensibilisation ou au cours d'une exposition ultérieure, le passage de l'agent sensibilisant à travers la barrière épithéliale est crucial. Dans des circonstances normales, l'épithélium forme une barrière très efficace, presque imperméable. Cependant, la perméabilité de l'épithélium respiratoire peut être augmentée dans certaines conditions pathologiques (irritation, inflammation), conduisant à un meilleur accès des allergènes inhalés, des polluants, et autres irritants vers les cellules basales et les tissus des voies respiratoires sous-jacents (Hammad and Lambrecht, 2011; Holgate, 2011; Deckers *et al.*, 2017).

Comme les kératinocytes, les cellules épithéliales respiratoires expriment des PRR (*Pattern-Recognition Receptors*), tel que le TLR4, et des récepteurs des cytokines produites durant l'inflammation (Deckers *et al.*, 2017). L'activation de ces récepteurs induit une augmentation de l'expression de protéines immunorégulatrices, comme l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α , le GM-CSF, l'IFN- γ , et des chimiokines afin de recruter des cellules inflammatoires. De plus, lors de la stimulation par des allergènes et/ou des microorganismes, les cellules épithéliales libèrent des cytokines comme la TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*), l'IL-33 ou l'IL-25, qui déclenchent et amplifient les réponses immunitaires (**Figure 10**) (Hammad and Lambrecht, 2008).

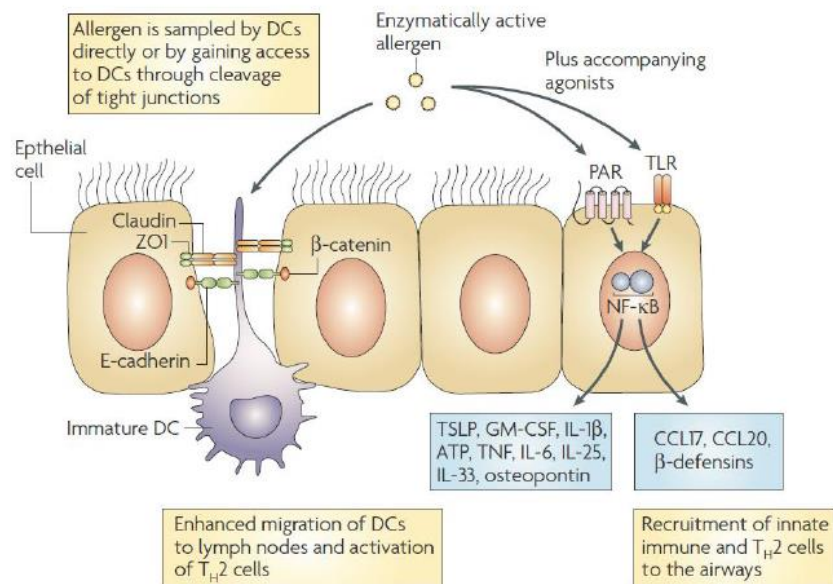


Figure 10. Interaction entre les cellules épithéliales, les cellules dendritiques et les allergènes à l'interface de la muqueuse bronchique.

(d'après (Hammad and Lambrecht, 2008))

5.2. Les cellules présentatrices d'antigène

La réponse immunitaire adaptative est différente de la réponse immunitaire innée car elle est spécifique d'un antigène. Les principales cellules impliquées dans cette réponse sont les CPA et les lymphocytes activés lors de la reconnaissance de l'antigène. Le terme CPA regroupe les cellules exprimant les molécules du CMH de classes I et II telles que les macrophages, les DC et les lymphocytes B (LB). Les CPA ont la capacité d'endocytose ainsi que celle de communiquer avec les LT (**Tableau 3**). Les DC sont les CPA les plus efficaces. De plus, elles sont capables de stimuler des LT naïfs (Schlitzer *et al.*, 2015).

Tableau 3. Spécialisation des différentes cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

| | DCs | Macrophages | Lymphocytes B |
|---|--|---|--|
| Capture antigénique | <ul style="list-style-type: none"> - Phagocytose - Macropinocytose - Endocytose médiée par des récepteurs | <ul style="list-style-type: none"> - Phagocytose - Endocytose médiée par des récepteurs | <ul style="list-style-type: none"> - Phagocytose - Macropinocytose - Endocytose médiée par des récepteurs |
| Expression de CMH de classe II | <ul style="list-style-type: none"> - Expression constitutive très élevée - Inductible | <ul style="list-style-type: none"> - Faible taux d'expression - Inductible | <ul style="list-style-type: none"> - Expression constitutive - Inductible |
| Fonction de présentation antigénique | Activation des LT naïfs | Recrutement des LT CD4+ pour l'activation des LB naïfs | Recrutement des LT CD4+ pour la production d'anticorps |

5.2.1. Les cellules dendritiques

Les DC ont été isolées pour la première fois dans l'épiderme, par Paul Langerhans en 1868, qui les nomme alors « cellules de Langerhans ». Ce n'est qu'une centaine d'années plus tard que des cellules présentant une morphologie similaire aux cellules isolées par Paul Langerhans seront identifiées par Steinman et Cohn (Steinman and Cohn, 1973) dans la rate de souris. Ces cellules sont nommées « cellules dendritiques » du fait de leur morphologie présentant des dendrites (**Figure 11**). Par la suite, les DC, cellules dérivées de la moelle osseuse, furent décrites non seulement dans tous les tissus lymphoïdes, mais également dans les non lymphoïdes. Steinman et collaborateurs, poursuivent ensuite leur étude phénotypique et fonctionnelle des DC, montrant qu'elles expriment constitutivement les CMH de classe I et II (Steinman and Cohn, 1973, 1974; Steinman *et al.*, 1975).

Les DC répondent à trois critères : ce sont des CPA exprimant constitutivement des molécules du CMH de classe II, elles sont capables de stimuler les LT naïfs et elles présentent une morphologie dendritique une fois activées (Steinman, 1991). Les DC sont des CPA dites « professionnelles », jouant un rôle majeur tant dans l'immunité innée que dans l'immunité acquise ou adaptative, spécifique d'un pathogène. Les DC

assurent le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les DC immatures ont la capacité de capturer les antigènes (Ag). Cette capture induit leur maturation et leur capacité à présenter les Ag aux LT naïfs entraînant l'activation de ces derniers (**Figure 12**). Les DC sont ainsi uniques dans l'initiation d'une réponse immunitaire spécifique de l'Ag (Banchereau and Steinman, 1998).

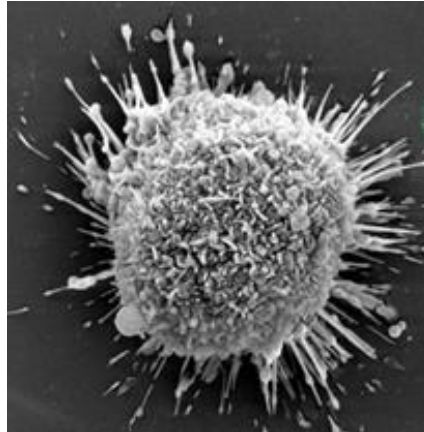


Figure 11. Image d'une cellule dendritique dérivée de la moelle osseuse obtenue par microscopie électronique à balayage.

5.2.2. Ontogenèse des cellules dendritiques

Les DC constituent une famille très hétérogène de cellules, tant par leur morphologie que par leur phénotype, leurs fonctions, leur localisation et leur origine hématopoïétique.

Les DC se développent à partir de cellules souches hématopoïétiques. Pendant longtemps, il a été admis que les DC dérivent d'un progéniteur myéloïde commun, à l'exception des DC plasmacytoïdes, qui dérivent d'un progéniteur lymphoïde (Geissmann *et al.*, 2010). Cependant des travaux récents montrent que l'ontogénie des DC est plus complexe, et que les sous-populations de DC, en particulier les pDC, peuvent partager plusieurs origines à la fois myéloïdes et lymphoïdes (Merad *et al.*, 2013; Schlitzer *et al.*, 2015). La capacité des DC à se différencier à partir de deux types de précurseurs est, à ce jour, une caractéristique exclusive des DC.

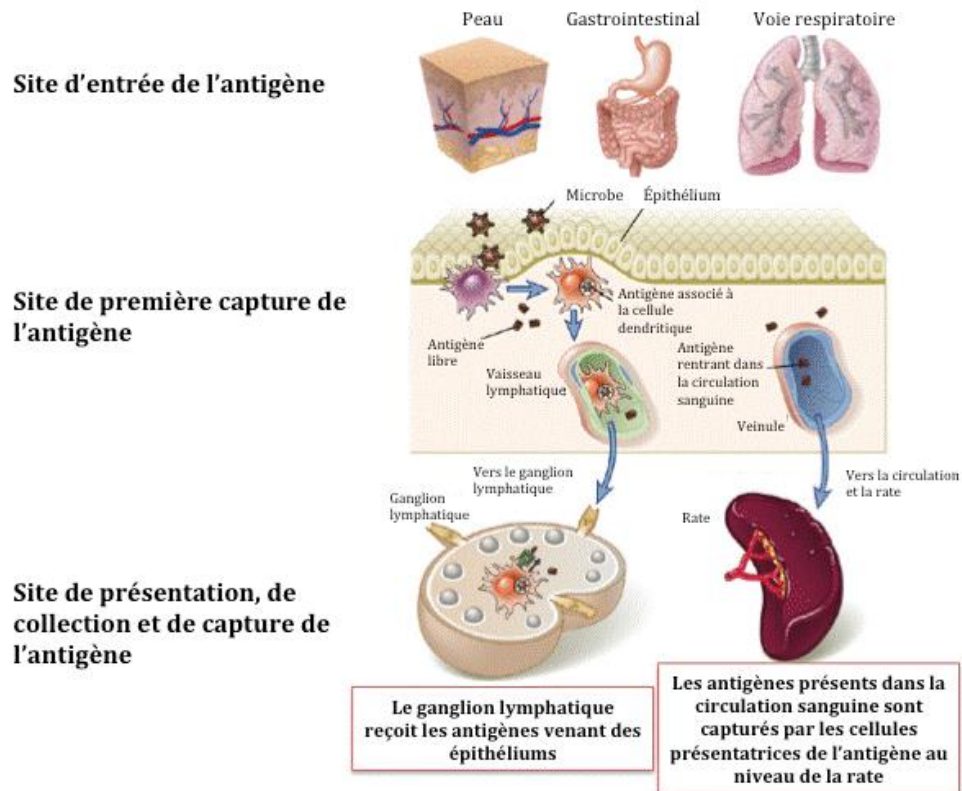


Figure 12. La reconnaissance et la capture de l'antigène.

(d'après Abbas, Lichtman et Pillai. *Cellular and Molecular Immunology*. 7ème édition).

Cette caractéristique leur permet d'adapter le nombre et la nature des DC au sein d'un tissu, en fonction de l'état d'inflammation de ce dernier, faisant des DC un acteur clé dans la mise en place et dans la régulation de la réponse immunitaire. L'homéostasie des DC dans les organes est maintenue grâce à un équilibre dynamique entre trois paramètres : un enrichissement continu par les pré-DC circulantes, la prolifération *in situ* limitée et la mort cellulaire (Macri *et al.*, 2017).

Les DC se différencient à partir des progéniteurs hématopoïétiques présents dans la moelle osseuse. Leur croissance et l'acquisition de leurs fonctions nécessitent la présence de facteurs de croissance, essentiellement le GM-CSF (*Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor*) (Merad *et al.*, 2013). Des facteurs comme le Flt3L (*Fms-like tyrosine Kinase-3 ligand*), le TNF- α et d'autres cytokines seraient nécessaires pour le développement des différents types de DC (Merad *et al.*, 2013). Le Flt3L

apparaît comme un facteur majeur pour l'homéostasie des DC à l'état basal. Chez l'Homme comme chez la souris, on distingue des DC dites « lymphoïdes » et des DC dites « myéloïdes ». Ces deux populations diffèrent par leurs marqueurs membranaires et les facteurs de croissance nécessaires à leur différenciation mais sont issues d'une cellule souche hématopoïétique commune CD34⁺.

5.2.2.1. Ontogenèse des cellules dendritiques chez l'Homme

Chez l'Homme, cette cellule souche hématopoïétique CD34⁺ se différencie dans la moelle osseuse en précurseur lymphoïde (*common lymphoïde progenitor*, CLP) et en précurseur myéloïde (*common myeloïd progenitor*, CMP) qui sera également à l'origine des polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles, mais aussi des macrophages des mégacaryocytes et des érythrocytes (**Figure 13**) (Schott, 2006; Merad *et al.*, 2013). Les voies de différenciation des DC dites myéloïdes sont les mieux connues (Steinman and Inaba, 1999).

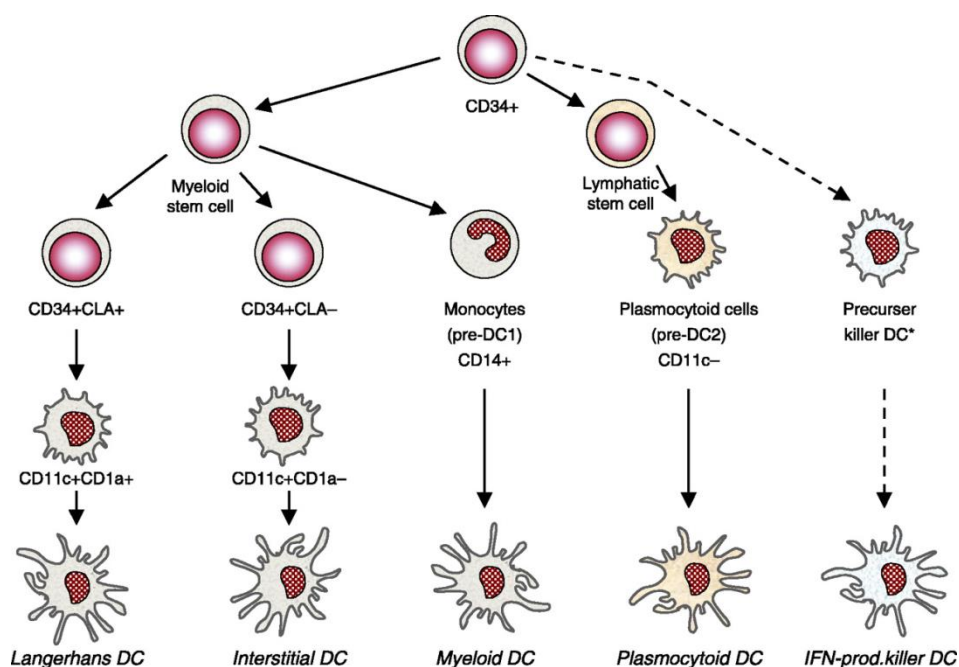


Figure 13. Ontogenèse des cellules dendritiques humaines.

(d'après (Schott, 2006)).

La culture de cellules souches hématopoïétiques CD34⁺, extraites de la moelle osseuse d'adulte ou du sang de cordon, en présence de GM-CSF et de TNF- α permet l'obtention de deux types de précurseurs intermédiaires CD14⁻CD11c⁺ et CD14⁺CD11c⁺ (Schott, 2006; Merad *et al.*, 2013; Schlitzer *et al.*, 2015). Sous l'action du GM-CSF, de l'IL-4 et du TGF- β le précurseur CD14⁻ se différencie en cellules de Langerhans (Birbeck⁺, CD1a⁺, facteur de coagulation XIIIa⁻), qui expriment la molécule CLA (*cutaneous lymphocyte-associated antigen*) permettant leur migration vers la peau (Gros and Novak, 2012).

Le précurseur CD14⁺ (monocyte), sous l'action du GM-CSF et de l'IL-4 se différencie en DC immatures, dont l'équivalent *in vivo* est la DC interstitielle (Birbeck⁻, Langerine⁻, CD1a⁻, CD9⁺, CD68⁺, XIIIa⁺) (Steinman and Inaba, 1999). *In vitro*, en présence de GM-CSF et d'IL-4, les monocytes peuvent se différencier en DC (Steinman and Inaba, 1999; Schott, 2006; Schlitzer *et al.*, 2015). Dans le sang, deux types de cellules précurseurs sont retrouvés (**Figure 13**). Les précurseurs appelés pré-DC1 possèdent le marqueur CD14 et auraient une origine commune avec les cellules CD14⁺CD11c⁺ de la moelle osseuse. En effet, il s'agit des monocytes, les précurseurs les plus utilisés *in vitro* pour l'obtention des DC myéloïdes à partir du sang. Les seconds précurseurs pré-DC2 retrouvés dans le sang ne possèdent pas de marqueurs myéloïdes, et n'expriment pas le récepteur du GM-CSF. Il s'agit des DC plasmacytoïdes (pDC) (Schott, 2006). La voie de développement des pDC n'est pas très bien connue mais le Flt3L est la principale cytokine impliquée dans le développement des pDC à la fois chez l'Homme et chez la souris (Pulendran *et al.*, 2000).

Une autre sous-population de DC capable de produire de grandes quantités d'IFN de type I et possédant une activité cytolytique a été décrite (Bonmort *et al.*, 2008). Ces cellules dénommées IKDC (*Interferon-producing Killer Dendritic Cells*) se distinguent des DC myéloïdes et des pDC par leur phénotype mixte de cellules *Natural Killer* (NK) et de DC. Du fait de leur caractère mixte, l'origine des IKDC reste méconnue. Welner *et al.*, ont suggéré que les IKDC provenaient d'un précurseur commun aux DC et aux

cellules NK mais que leurs voies de différenciation divergeaient rapidement (**Figure 13**) (Welner *et al.*, 2007).

Parallèlement à l'étude des DC chez l'Homme, de nombreuses recherches ont été menées sur le modèle murin. L'utilisation d'animaux KO ou transgéniques ont apporté de précieux renseignements pour comprendre l'origine de ces cellules.

5.2.2.2. Ontogenèse des cellules dendritiques chez la souris

Les DC myéloïdes et lymphoïdes murines diffèrent par leur phénotype, leur localisation splénique et leurs fonctions. L'expression des marqueurs CD4, CD8 et CD205 permet de distinguer 5 populations :

- DC myéloïdes CD11c⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD205⁻ CD11b⁺
- DC myéloïdes CD11c⁺ CD4⁻ CD8⁻ CD205⁻ CD11b⁺
- DC myéloïdes CD11c⁺ CD4⁻ CD8⁻ CD205⁺ CD11b⁺
- Cellules de Langerhans (LC) CD4⁻ CD8^{low} CD205^{high} CD11b⁺
- DC lymphoïdes CD4⁻ CD8⁺ CD205^{high} CD11b⁻, Siglec-H, PDCA1

Le marqueur CD8 est exprimé sous la forme d'un homodimère $\alpha\alpha$ dans les DC, alors qu'il est sous la forme d'un hétérodimère $\alpha\beta$ dans les lymphocytes T. Le marqueur CD8 α n'est pas présent sur les DC humaines, contrairement au CD4.

Chez la souris, différentes origines hématopoïétiques des DC ont été suggérées pour les DC CD8⁺ thymiques et pour les DC CD8⁺ et CD8⁻ spléniques qui sont fonctionnellement différentes. Les DC thymiques CD8⁺ ont été décrites comme des DC lymphoïdes du fait de l'expression de marqueurs communs entre les cellules pro-T et les DC et de leur différenciation simultanée à celles des cellules T, à partir du précurseur commun lymphoïde (Kamath *et al.*, 2000; Shortman, 2000). Dans la rate, les DC CD8⁻ dériveraient du précurseur myéloïde commun (CMP) sous l'action du GM-

CSF (Inaba *et al.*, 1992). Le CLP et le CMP peuvent engendrer les deux types de DC CD8⁺ et CD8⁻ spléniques et thymiques (Merad *et al.*, 2013; Schlitzer and Ginhoux, 2014). De plus, les DC CD8⁻ peuvent acquérir l'expression du CD8 et d'autres marqueurs spécifiques aux DC CD8⁺ après migration, ce qui suggère que les DC CD8⁺ et CD8⁻ dans la rate représentent deux stades de maturation différents d'une même population de cellules.

Les précurseurs lymphoïdes génèrent des pDC (Schlitzer and Ginhoux, 2014; Macri *et al.*, 2017). Les pDC murines présentent un phénotype CD11c^{dull}, CD4^{+/-}, IL-3R⁻, CD45R⁺ alors que les pDC humaines sont CD11C⁻, CD4⁺, IL-3R^{high}, CD45R⁻, CD45⁺ (Macri *et al.*, 2017). Les pDC apparaissent progressivement au cours du développement embryonnaire de la souris et sont détectables dans le thymus à partir du 17ème jour de la vie embryonnaire et dans la rate, le jour de la naissance (Naik *et al.*, 2005).

Chez la souris, les pDC sont caractérisées par la forte production d'IFN- α en réponse à une stimulation virale. Le Flt3 entraîne le développement des pDC à partir des cellules souches de la moelle osseuse (Naik *et al.*, 2010). Cependant, le GM-CSF bloque complètement le développement de ces cellules *in vitro* (Macri *et al.*, 2017). La population pDC splénique murine est hétérogène quant à l'expression des molécules CD4 et CD8 ; elle peut être classée en plusieurs sous-populations (O'Keeffe *et al.*, 2002). Les pDC CD4⁻ peuvent être des précurseurs de pDC CD4⁺ (O'Keeffe *et al.*, 2002; Naik *et al.*, 2010). Toutefois, toutes les sous-populations de pDC produisent de l'IFN- α suite à une stimulation par les CpG (O'Keeffe *et al.*, 2002). De plus, suite à une stimulation du TLR2 (Toll-like receptor 2), seule la population pDC CD4⁻ produit du TNF- α , ce qui suggère que la fonction des pDC peut changer en fonction du stade de développement de ces cellules. Il existe peu d'informations sur la relation entre les pDC CD8⁻ et CD8⁺. En revanche, toutes les cellules pDC, suite à une stimulation de leurs TLR7 et-9, présentent une population homogène qui exprime CD8^{high} CMH-II^{high}. *In vivo*, les pDC

activées sont CD205⁻ à la différence des DC conventionnelles qui peuvent être CD205⁺ (Naik *et al.*, 2005).

La **figure 14** ci-dessous présente un résumé de l'ontogénèse des DC humaines et murines :

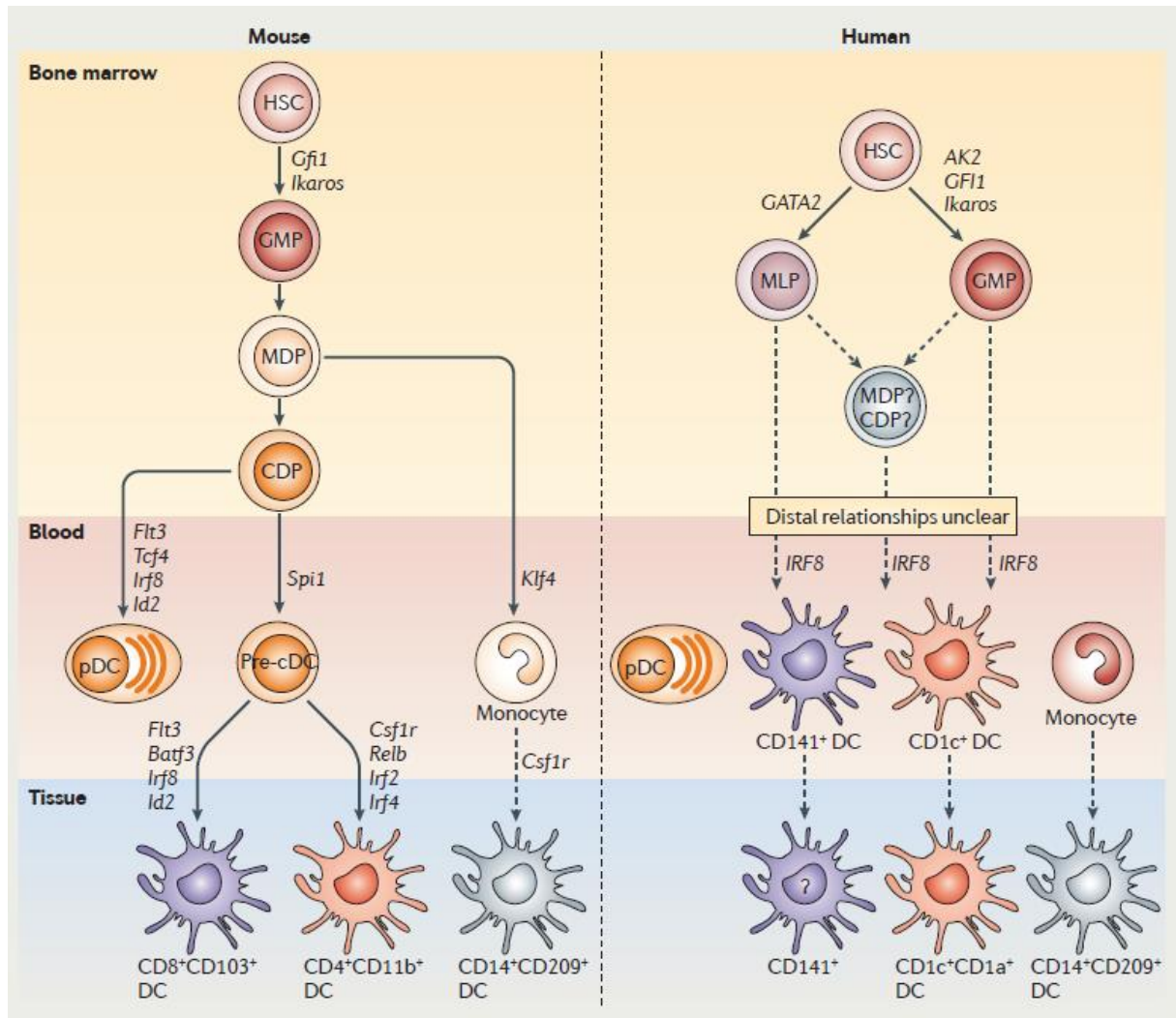


Figure 14. Synthèse de l'origine des cellules dendritiques murines et humaines.

(d'après (Collin *et al.*, 2011)).

5.2.3. Les sous-populations de cellules dendritiques

Il existe plusieurs façons de classer les DC chez l'Homme et la souris. Classiquement, on les sépare en DC plasmacytoïdes et DC myéloïdes, appelées aussi DC conventionnelles ou DC classiques. Une autre nomenclature tient compte du caractère résident ou migrateur des DC. Dans le paragraphe suivant, nous avons choisi de présenter les sous-populations de DC selon ces deux classifications.

Les DC sont présentes dans le sang, la lymphe, le thymus et les organes lymphoïdes secondaires mais également et surtout dans des tissus non lymphoïdes comme la peau, les poumons et l'intestin (Schlitzer *et al.*, 2015). Elles résident principalement aux points d'entrée des agents pathogènes, où elles jouent le rôle de sentinelles. Les DC constituent un groupe de cellules très hétérogène, aux fonctions et origines variées. Leurs caractéristiques communes sont la capture, la présentation d'antigènes et l'activation des cellules effectrices de la réponse adaptative : les LT naïfs. Les sous-types de DC diffèrent par leur localisation, leur capacité migratoire et certaines fonctions immunologiques spécifiques. Ces différentes sous-populations de DC sont identifiées à l'aide de marqueurs de surface. À l'inverse des cellules B et T, il n'existe pas de marqueur unique commun à toutes les DC. Plus récemment, les DC ont été divisées en trois sous-catégories, les DCs conventionnelles (cDC), les DCs plasmacytoïdes (pDC) et les DC dérivées de monocytes (moDC) (Merad *et al.*, 2013; Sichien *et al.*, 2017).

5.2.3.1. Les cellules dendritiques conventionnelles

Elles correspondent aux DC initialement décrites par Steinman et Cohn (Steinman and Cohn, 1973) ; elles expriment l'intégrine CD11c (intégrine- α X) et des molécules du CMH II (Schlitzer *et al.*, 2015). Toutes les cDC sont considérées comme des CPA. On

distingue deux catégories de cDC : les DC migratoires et les DC résidentes présentes dans les organes lymphoïdes (rate, ganglions, plaques de Peyer, thymus).

- ***Les cellules dendritiques migratoires***

Les DC migratoires sont localisées dans la peau, dans les muqueuses et les tissus périphériques mais aussi dans les ganglions lymphatiques. Elles représentent l'ensemble des cellules dendritiques dermiques, cellules dendritiques interstitielles et les cellules de Langerhans (Schlitzer and Ginhoux, 2014). Elles capturent les antigènes et migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques par les vaisseaux lymphatiques afférents. Elles se distinguent les unes des autres par des caractéristiques phénotypiques différentes qui dépendent du tissu d'où elles proviennent. Les DC de la peau sont présentes dans le derme et l'épiderme.

Les cellules les mieux étudiées sont les cellules de Langerhans (LC) qui représentent 3 à 5 % des cellules épidermiques humaines et murines (Merad *et al.*, 2013). Elles forment un réseau dense entre les interstices des kératinocytes. En conditions non inflammatoires, les LC présentent une activité mobile unique, appelée dSEARCH, qui consiste à explorer la présence d'Ag dans le milieu environnant en contractant ou en allongeant leurs dendrites (Früge *et al.*, 2012). Chez l'Homme comme chez la souris, ces cellules peuvent être caractérisées par l'expression à leur surface du marqueur hématopoïétique CD45 (antigène leucocytaire commun, également connu sous le nom de LY5) et les molécules du CMH de classe II (**Tableau 4**). Le phénotype des LC est caractérisé par l'expression à leur surface de la langérine (CD207), un récepteur de lectine C de type II et par la présence d'organelles cytoplasmiques appelés granules de Birbeck. La formation des granules de Birbeck dépend de la présence de langérine, suggérant leur implication dans les mécanismes d'endocytose des antigènes (Gros and Novak, 2012; Merad *et al.*, 2013). De plus, les LC murines et humaines expriment

constitutivement des molécules d'adhésion telles que l'E-cadhérine, l'EpCAM (*epithelial-cell adhesion molecule*), et la 1-intégrine qui leur permettent de s'ancrer aux kératinocytes (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 Ag (Merad *et al.*, 2008).

Tableau 4. Phénotype des cellules de Langerhans et des cellules dendritiques dermales murines et humaines.

(ND : non déterminé, ↑ : marqueur exprimé lors de la maturation ; d'après (Merad *et al.*, 2008))

| Cellular markers | Skin Mice | | | | Skin-draining lymph nodes Mice | | | | Skin Humans [†] | | |
|------------------|-----------|---------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|--|--------------------------|---------------|---------------------------|
| | LCs | Migrating LCs | Langerin ⁺ DCs | Langerin ⁻ DCs | Migrating LCs | Langerin ⁺ DCs | Langerin ⁻ DCs | Langerin ⁺ CD8 ⁺ DCs | LCs | Migrating LCs | Langerin ⁻ DCs |
| Langerin | +++ | ++ | ++ | - | ++ | ++ | - | + | +++ | ++ | - |
| Birbeck granules | ++ | + | - | - | + | - | - | - | ++ | + | - |
| CD45 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| MHC class II | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | +++ | ++(↑) |
| CD11c | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | + | + | + |
| CD205 | ++ | +++ | - | ++ | ++ | - | ++ | + | - | - | - |
| CD11b | + | + | low | ++ | + | low | ++ | - | +or- | +or- | ++ |
| F4/80 | + | + | - | + | + | - | + | - | ND | ND | ND |
| E-cadherin | ++ | + | ND | ND | + | ND | ND | ND | ++ | + | - |
| EpCAM | ++ | ++ | - | - | ++ | +or- | - | - | + | + | - |
| CD8 | - | - | - | - | - | - | - | ++ | ND | ND | ND |
| CD103 | - | - | ++ | - | - | ++ | - | + [§] | ND | ND | ND |
| CCR6 | + | - | ND | - | - | ND | - | - | + | - | - |
| CCR7 | - | + | ↑ | ↑ | + | + | + | + | - | + | ↑ |
| CD1a | - | - | - | - | - | - | - | - | +++ | +++ | ++ |
| CD1d | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | - | - | + |
| CD83 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ↑ | ↑ | ↑ |

Contrairement à l'épiderme, le derme présente plusieurs sous-populations de DC. Les cellules dendritiques dermales (dDC) représentent 3 % de la population totale des DC et constituent une autre sous-population de DC localisées dans la peau. 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 (Geissmann *et al.*, 2010; Gros and Novak, 2012).

Les dDC sont divisées en plusieurs sous-populations : elles sont tout d'abord caractérisées par l'expression ou non du CD11b chez la souris et du CD1c chez l'Homme (Schlitzer *et al.*, 2015). Les cellules CD11b⁺ et CD1c⁺ sont les cDC les plus abondantes dans le derme sain.

Chez la souris, les dDC CD11b⁻ sont divisées en 2 sous-populations : CD103⁺ et CD103⁻. Chez l'Homme, les cDC CD1c⁻ sont CD141⁺ (thrombomoduline, BDCA-3) et forment une population mineure. Les dDC murines CD103⁺, langérine⁺ et les dDC humaines CD141⁺ excellent dans la présentation d'auto-Ag dérivés des kératinocytes (Schlitzer and Ginhoux, 2014; Schlitzer *et al.*, 2015).

Chez la souris, une population de dDC CD103⁺, CD207⁺ (langérine⁺) n'est pas retrouvée chez l'homologue CD141⁺ humain. Des dDC myéloïdes CD1c⁺ expriment la langérine et sont présentes dans plusieurs organes comme la peau, le foie et les poumons (Schlitzer *et al.*, 2015).

Une partie de ces données est résumée dans la **Figure 15**.

- **Les cellules dendritiques résidentes des organes lymphoïdes**

Les DC résidentes sont restreintes aux organes lymphoïdes. Elles représentent la plus grande partie des cellules dendritiques isolées de la rate, du thymus et des ganglions périphériques. On les retrouve essentiellement dans les zones T (manchon périartériolaire de la pulpe blanche de la rate et paracortex des ganglions lymphatiques), où elles furent nommées initialement cellules interdigitées en raison de leurs longs prolongements cytoplasmiques s'immisçant entre les cellules T (Steinman *et al.*, 1997). Dans le thymus, les DCs se localisent dans la médullaire et surtout à la jonction cortico médullaire et jouent un rôle majeur dans la sélection négative des thymocytes (Inaba *et al.*, 1994; Geissmann *et al.*, 2010; Gros and Novak,

2012). Des DC sont également présentes dans la zone marginale de la rate ainsi que dans le cortex inter folliculaire des ganglions lymphatiques (Inaba *et al.*, 1994).

a) Chez la souris : diverses populations de cellules dendritiques résidentes ont été identifiées en fonction de l'expression des molécules CD4 et CD8. Les marqueurs CD11b et CD205 permettent également de discriminer des sous-populations de DC murines (Merad *et al.*, 2013; Schlitzer and Ginhoux, 2014). Ces cellules se sont différenciées dans les organes lymphoïdes à partir de précurseurs de la moelle osseuse et n'ont pas forcément transité vers la périphérie (Schlitzer and Ginhoux, 2014).

Dans la rate, la presque totalité des DC spléniques expriment à leur surface le marqueur CD11C⁺, les molécules du CMH de classe II ainsi que les molécules de costimulation. L'étude de Vremec *et al.*, permet d'identifier trois populations de DC spléniques par les marqueurs CD4 et CD8 (Vremec *et al.*, 2000). Ces trois populations de DC spléniques sont : CD4⁺CD8⁻CD11b⁺CD205⁻, CD4⁻CD8⁻CD11b⁺CD205⁻, et CD4⁻CD8⁺CD11b⁻CD205⁺. Toutes ces populations présentent une activité optimale de présentation d'antigène et induisent l'activation des lymphocytes T dans les réactions mixtes allogéniques.

Une des caractéristiques de la population de DC CD4⁺ est leur propriété initiale d'adhésion au plastique ce qui permet de les séparer des deux autres populations *in vitro* (Vremec *et al.*, 2000). Les DC CD8⁻ spléniques peuvent acquérir l'expression du CD8 ainsi que celle d'autres marqueurs spécifiques des DC CD8⁺ après migration, ce qui laisse penser que l'expression du marqueur CD8 représente un stade de différenciation et/ou maturation des DC spléniques (Merad *et al.*, 2013; Schlitzer *et al.*, 2015). La présence de pDC de phénotype CD11c⁺CD45RA⁺B220⁺ a également été observée dans la rate (Asselin-Paturel *et al.*, 2001).

On a identifié dans les ganglions lymphatiques, en plus des trois populations de DC retrouvées dans la rate, deux autres sous-populations de DC : des DC CD4⁻CD8⁻CD205^{low}CD11b⁺ dans les ganglions mésentériques et des DC CD4⁻CD8^{low}CD205^{high}CD11b⁺ dans les ganglions de la peau (Henri *et al.*, 2001).

Dans le thymus, la majorité des DC expriment la molécule CD8 (70 %), cependant il est difficile de déterminer réellement la proportion des différentes populations de DC car elles sont capables d'acquérir les molécules CD4 et CD8 des thymocytes (Vremec *et al.*, 2000). Ces DC semblent jouer un rôle important dans la tolérance centrale au soi. Les cellules CD8⁻ et CD8⁺ se différencient par des fonctions différentes telles que la production de cytokines ou la capacité à présenter des peptides antigéniques.

b) Chez l'Homme : Chez l'Homme, les marqueurs permettant de distinguer les sous-types de DC sont différents de ceux exprimés chez la souris, néanmoins des équivalents fonctionnels ont pu être décrits. Le marqueur CD8 α , très discriminant chez la souris, est absent chez les autres espèces et notamment chez l'Homme. L'existence de DC comparables aux DC CD8 α ⁺ n'a été décrite que récemment grâce à l'identification d'une lectine de type C, Clec9A, (également nommé DNGR-1) exprimée à la fois chez la souris et chez l'Homme (Crozat *et al.*, 2010). Ces DC expriment également les marqueurs BDCA-3 (*Blood dendritic cell antigen*) et le récepteur aux chimiokines XCR1 (Crozat *et al.*, 2010). Le marqueur BDCA-1 est lui spécifique de DC équivalentes aux DC CD8 α ⁻CD11b⁺ murines. Ces cellules peuvent être retrouvées dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires comme les amygdales.

Une classification plus récente a été proposée pour les DC conventionnelles. Elle propose de classer les cDC en 2 catégories les cDC1 et cDC2 sur la base de leurs facteurs de transcription et de leurs phénotypes communs (Macri *et al.*, 2017; Sichien *et al.*, 2017). La **figure 15** reprend l'ensemble des paramètres de ces deux catégories.

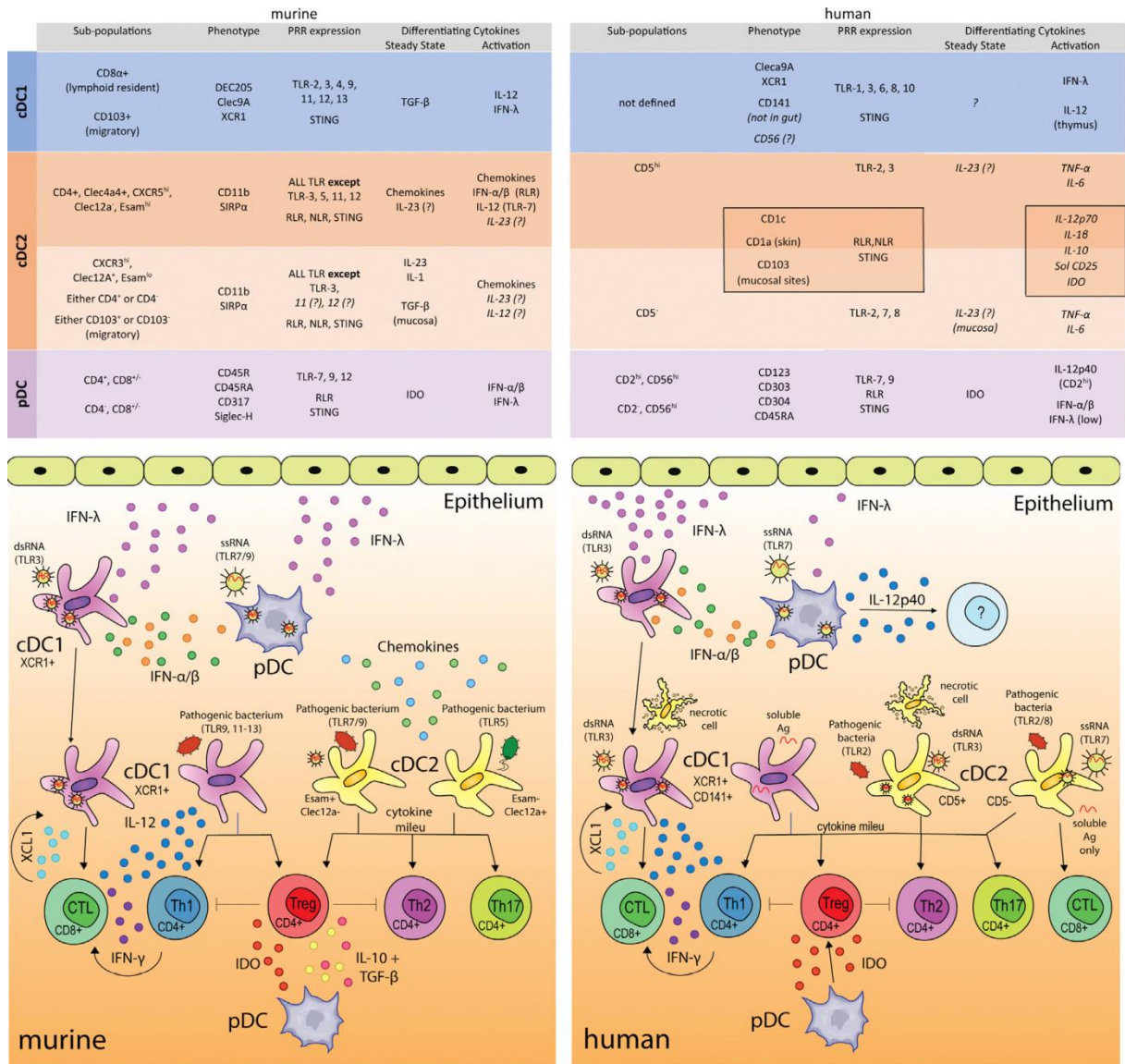


Figure 15. Classification des cellules dendritiques conventionnelles murines et humaines.

(selon (Macri et al., 2017))

5.2.3.2. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) représentent la seconde grande catégorie de DC. Actuellement, elles forment une population plus homogène que les cDC. Elles possèdent des fonctions bien particulières, comme la capacité à produire de grande quantité d'IFN- α en réponse à une stimulation virale. Elles expriment un répertoire limité de TLR avec une expression spécifique des TLR7 et-9 ce qui leur

confère une réponse spécifique à certains déterminants pathogéniques (Macri *et al.*, 2017). Le profil d'expression des marqueurs de surface des pDC diffère en fonction des espèces.

Bien qu'elles aient été découvertes dès 1958 au sein des tissus lymphoïdes chez l'Homme, leur identification en tant que DC remonte à la fin des années 1990 (Grouard *et al.*, 1997; Cella *et al.*, 1999; Siegal *et al.*, 1999). Morphologiquement, elles ne ressemblent pas aux cDC qui arborent de longues dendrites. Ce sont de petites cellules (8 à 10 µm) rondes avec un large cytoplasme faisant penser à des plasmocytes, d'où leur dénomination originelle de cellules T plasmacytoïdes ou monocytes plasmacytoïdes. En revanche, elles changent de morphologie pour ressembler à une DC mature typique après stimulation par l'interleukine-3 (IL-3) et le CD40L (Grouard *et al.*, 1997) ou par des virus (Naik *et al.*, 2005; Reizis *et al.*, 2011). Les pDC chez l'Homme ou la souris sont dépourvues de marqueurs du lignage lymphoïde (CD3, lymphocyte T ; CD19, lymphocyte B ; CD56, cellules NK) ou myéloïde (CD14 et CD16) (Reizis *et al.*, 2011; Macri *et al.*, 2017). Chez l'Homme, les pDC n'expriment pas la molécule CD11c, mais expriment fortement la chaîne α du récepteur de l'IL-3 (CD123) et l'isoforme CD45RA de la phosphatase CD45.

Chez la souris, les pDC expriment plus faiblement les molécules CD11c et CMH II que les cDC. Elles sont identifiables au sein des cellules CD11c⁺ par l'expression de B220, une isoforme particulière de la phosphatase CD45 normalement caractéristique du lignage B et par celle des molécules Siglec-H (*Sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin*) et Ly49Q (Macri *et al.*, 2017). Le marqueur CCR9, récepteur de la chimiokine CCL25 permettant la migration dans les intestins, a permis de distinguer des sous-populations de pDC. Les travaux du groupe de Butcher ont montré que les pDC CCR9⁺ dans les organes lymphoïdes secondaires possédaient des propriétés immunosuppressives importantes (Hadeiba *et al.*, 2008). Dans la moelle osseuse, les

pDC CCR9⁻ sont les précurseurs directs des pDC CCR9⁺ et gardent la capacité de se différencier en cDC CD11b⁺ en réponse au GM-CSF (Schlitzer and Ginhoux, 2014).

- ***Les cellules dendritiques inflammatoires ou cellules dendritiques dérivées de monocytes***

Bien que leur appartenance à la catégorie des DC soit controversée, elles ne peuvent être exclues de cette présentation des populations de DC (Sichien *et al.*, 2017).

Le terme de DC inflammatoires se réfère aux populations de DC qui n'apparaissent qu'au cours d'une infection ou d'une inflammation mais ne sont pas observables en condition homéostatique (Naik *et al.*, 2006). Les archétypes des DC inflammatoires sont les TipDC (*TNF and iNOS producing DC*). Elles ont été mises en évidence après infection par *Listeria monocytogenes*, et appelées ainsi à cause de leur capacité à produire du TNF- α et des radicaux oxygénés par l'induction d'iNOS (*inducible Nitric-Oxide synthase*) (Serbina *et al.*, 2003).

Elles proviennent majoritairement de la différenciation des monocytes circulants et sont donc également appelées moDC (*monocyte-derived dendritic cells*). Les monocytes sont des leucocytes circulants effecteurs de l'immunité innée et précurseurs de types cellulaires clés comme les macrophages ou les moDC. Sous l'influence de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance, les monocytes recrutés sur un site inflammatoire peuvent se différencier en moDC (Merad *et al.*, 2013). Dans un contexte inflammatoire, la différenciation des moDC à partir des monocytes permet d'amplifier rapidement une population de cellules présentatrices d'antigènes fonctionnelles aisément mobilisables. Les moDC sont capables de présenter des antigènes aux LT CD4⁺; cependant, différentes caractéristiques fondamentales des moDC comme leur morphologie, leur localisation dans les zone T des ganglions et leur capacité à capturer et apprêter des antigènes ne sont pas encore bien comprises (Schlitzer *et al.*, 2015).

Chez la souris, à la suite d'une inflammation les moDC expriment fortement les marqueurs et molécules suivantes : CDC11c, CMH II, CD11b, CD64, ainsi que Ly6C (*Lymphocyte antigen 6C*) (Schlitzer *et al.*, 2015). Les moDC ont un rôle important dans l'activation des LT de type Th1 pour lutter contre les infections par divers pathogènes (Nakano *et al.*, 2009). Une seconde population de moDC exprimant le marqueur DC-SIGN/CD209 α (*dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non-integrin*) a été identifiée à la suite d'une infection par des bactéries Gram + (Cheong *et al.*, 2010; Schlitzer *et al.*, 2015).

Le DC-SIGN est un récepteur de lectines de type C, dont la fonction principale est la reconnaissance des glycanes contenant du mannose ou du fucose. Il permet notamment une endocytose spécifique et rapide, lors de la reconnaissance de son ligand. Il facilite également les interactions physiques directes des DC avec les LT (Garcia-Vallejo and van Kooyk, 2013). Il est exprimé par les DC immatures dans les tissus périphériques et par les DC matures dans les organes lymphoïdes. Son expression est régulée notamment par l'IL-4.

Chez l'Homme, trois sous-populations de moDC ont été identifiées. Les moDC CD14⁺CD16⁻, les moDC CD14⁺CD16⁺, et les moDC CD14^{low}CD16⁺ représentant respectivement 85 %, 5 % et 10 % des DC dérivées de monocytes sanguins (Ziegler-Heitbrock and Hofer, 2013). Les moDC CD14⁺ peuvent se différencier à partir de monocytes sanguins CD14⁺ en présence de GM-CSF et d'IL-4 *in vitro*, et *in vivo* lors d'une inflammation (Ziegler-Heitbrock and Hofer, 2013; Schlitzer *et al.*, 2015). Les moDC CD14⁺ sont retrouvées dans les tissus et les ganglions lymphatiques. Elles possèdent une forte capacité à stimuler les LT naïfs CD4⁺, à effectuer une présentation croisée aux LT CD8⁺ et à produire des cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α , l'IL-12 et l'IL-23 (Schlitzer *et al.*, 2015). Les DC inflammatoires se distinguent par l'expression de CD1c, CD1a, CD206, FcRI, SIRP α mais n'expriment pas de CD16 et CD209. *In vitro*, ces cellules synthétisent de l'IL-1 β , du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-23 et stimulent des réponses de type Th17.

La **Figure 16** présente une synthèse des différentes populations de DC chez la souris et l'Homme.

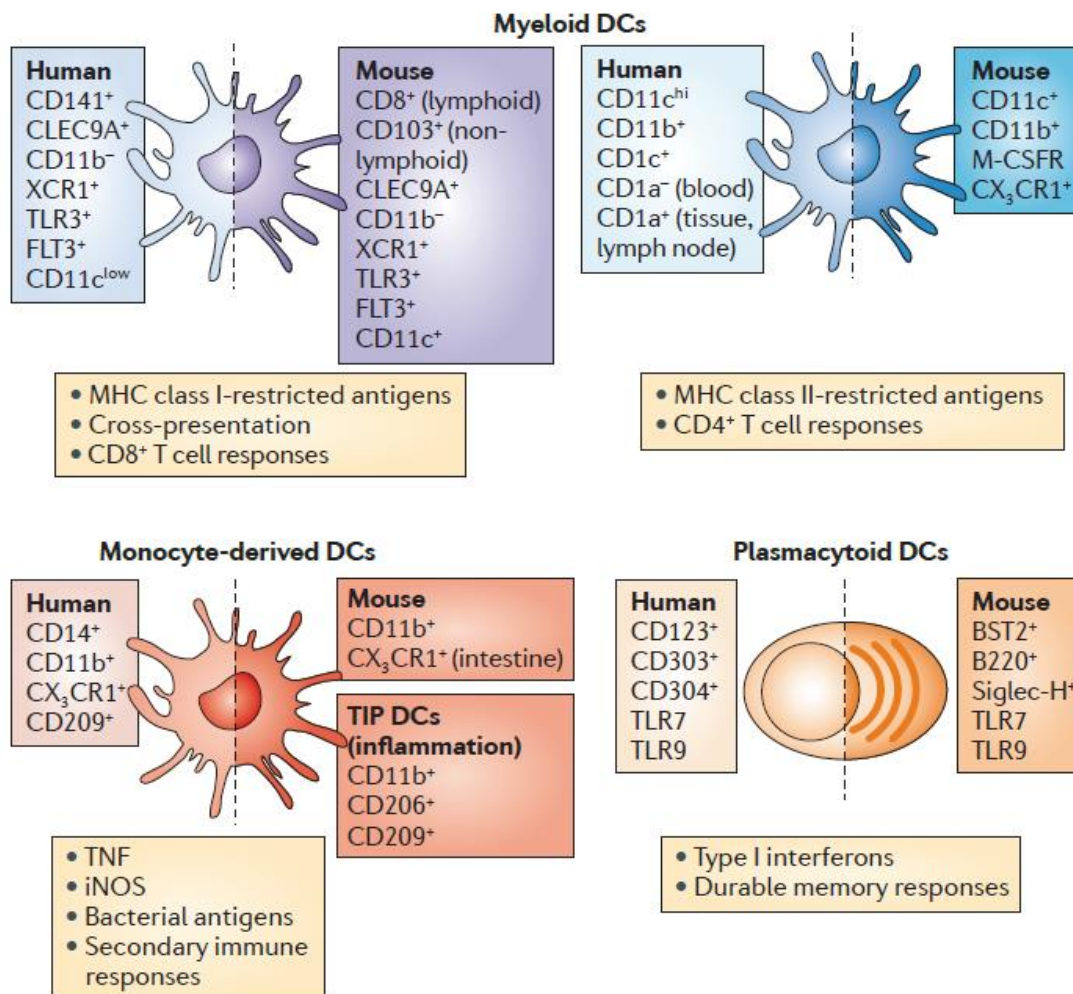


Figure 16. Classification des cellules dendritiques murines et humaines.

(d'après (Collin et al., 2011))

Alors que les DC jouent un rôle majeur dans l'initiation d'une réponse immunitaire spécifique d'un antigène, elles peuvent aussi induire et maintenir un état de tolérance central et périphérique (Steinman and Nussenzweig, 2002). Cette fonction, opposée à celle initialement découverte, est possible par le maintien des DC dans un état immature (« steady-state ») et l'induction de LT régulateurs (LTreg) et/ ou de LT anergiques (Probst et al., 2014). En effet, selon leur état phénotypique et fonctionnel, les DC peuvent promouvoir une réponse immunogène ou tolérogène.

Les DC tolérogènes (tDC), ou DC semi-matures, peuvent exprimer des molécules de costimulation mais ne sont pas capables de produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, menant ainsi à la génération de LTreg (Saei and Hadjati, 2013). Par ailleurs, les tDC sont capables de sécréter des médiateurs anti-inflammatoires tels que l'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO), l'IL-10, le TGF- β (*Transforming Growth Factor*), le monoxyde d'azote (NO) et la prostaglandine E2 (PGE2), leur permettant d'induire et stimuler les Treg. Ces Treg vont alors sécréter diverses cytokines (TGF- β , IL-35 et IL-10) et exprimer des molécules inhibitrices comme les protéines CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Associated protein 4*), PDL-1 (*Programmed cell Death Ligand 1*), et LAG-3 (*Lymphocyte Activation Gene-3*) permettant l'inhibition de l'activation des DC (Saei and Hadjati, 2013).

Le microenvironnement cellulaire, via les interactions cellule-cellule, la flore microbienne et/ou la présence de corps apoptotiques, sont importants dans la génération de tDC par la production de médiateurs anti-inflammatoires et tolérogènes. Parmi eux, le TGF- β , la TSLP, ou l'acide rétinoïque (RA) peuvent induire un environnement tolérogène (Saei and Hadjati, 2013). De plus, les tDC jouent un rôle important dans la tolérance cutanée via la sécrétion de TNF- α par les tDC permettant la lyse des LT CD8 cytotoxiques et ainsi l'induction d'un état de tolérance à des allergènes cutanés chez la souris (Luckey *et al.*, 2011).

5.2.4. Recrutement des cellules dendritiques

Comme nous avons pu le voir dans les paragraphes précédents, les DC sont générées dans la moelle osseuse puis migrent à un stade immature dans la circulation sanguine. Dans des conditions basales, les monocytes ne sont pas les précurseurs des DC des organes lymphoïdes, ni des DC CD103⁺ des tissus. En revanche, dans des conditions inflammatoires, les monocytes sont attirés au site inflammatoire et gardent leur

capacité de différenciation (Schlitzer *et al.*, 2015; Sichier *et al.*, 2017). Diverses conditions de stress et d'inflammation vont attirer les monocytes, les DC et les précurseurs circulants vers le site inflammatoire.

Ce recrutement est une réponse à la production des chimiokines au site inflammatoire. Une production basale de chimiokines est observée dans les différents tissus de l'organisme. Elle permet le recrutement constant des DC, maintenant ainsi la densité de cellules nécessaires à l'immunosurveillance (Schlitzer *et al.*, 2015). Les chimiokines sont de petites cytokines secrétées, à fonction chimiotactique, qui régulent la circulation des leucocytes dans des conditions basales ou inflammatoires. Les DC immatures expriment un répertoire de récepteurs de chimiokines (CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1, CXCR2 et CXCR4), avec quelques différences dans les profils d'expression entre les sous-types de DC, qui leur permettent de répondre à des chimiokines inflammatoires incluant CCL5, CCL2, CCL3, CCL4, CCL20 (CC Chemokine Ligand) (**Figure 17**). Dans des conditions inflammatoires, un panel de chimiokines sera produit par des cellules résidentes et par des cellules endothéliales activées (CCL2, CCL5, CCL7, CCL13, CCL20, CCL22) (**Figure 17**). Les DC elles-mêmes présentes au site inflammatoire vont constituer une source de chimiokines attirant d'autres effecteurs de la réponse immunitaire. Les cytokines inflammatoires, TNF- α et IL-1, produites par les macrophages, vont contribuer à l'expression de récepteurs des chimiokines et à la sécrétion des chimiokines inductibles pratiquement par toutes les cellules du site inflammatoire (Sozzani, 2005; Bachmann *et al.*, 2006; Tiberio *et al.*, 2018).

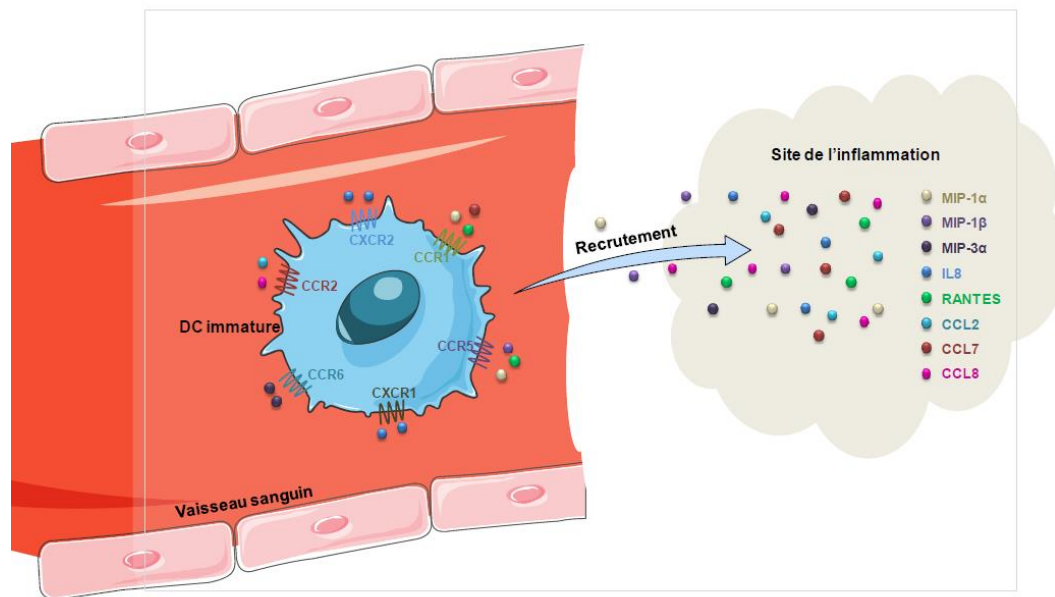


Figure 17. Rôle des chimiokines dans le recrutement des cellules dendritiques sur le site de l'inflammation.

(Inspiré de (Tiberio et al., 2018))

L'induction de la sécrétion de la chimiokine MIP-3 α (*Macrophage Inflammatory Protein-3 α*)/CCL20 au cours du processus inflammatoire représente un mécanisme fondamental de chimiotactisme des DC immatures vers le site inflammatoire (Bachmann *et al.*, 2006; Tiberio *et al.*, 2018).

De plus, les DC expriment une variété de récepteurs pour des stimuli chimiotactiques autres que les chimiokines, tels que les signaux de "danger tissulaire". Ces stimuli sont produits rapidement (quelques minutes) au site inflammatoire et représentent le signal précoce permettant le recrutement des DC ou de leurs précurseurs. Il s'agit de molécules lipidiques, de composants dérivés des bactéries comme les peptides formylés, de composants du complément comme la fraction C5a, de substances antimicrobiennes telles que les défensines (Sozzani, 2005). Des signaux sont également délivrés par des cellules engagées dans la voie de mort cellulaire, comme les petites protéines de choc thermique, les HSP (*Heat Shock Protein*) libérées par les cellules nécrotiques ou l'acide urique (Schaefer, 2014).

Dans le paragraphe suivant, nous allons aborder la reconnaissance de ces signaux de danger par les DC.

5.2.5. Reconnaissance des signaux de danger

Selon la théorie de Polly Matzinger, les DC ont besoin non seulement de la présence d'un pathogène ou d'un antigène du « non-soi » mais surtout de recevoir des « signaux de danger » exogènes ou endogènes afin d'être complètement matures et de pouvoir activer de manière efficace les LT (Matzinger, 1994). Ces signaux de danger sont des structures moléculaires présentes sur les pathogènes, ou des molécules produites par les cellules épithéliales environnantes suite à l'intrusion de pathogènes dans l'organisme. Ces molécules seront ensuite reconnues par des récepteurs, les PRR (*Pattern Recognition Receptor*), extracellulaires et intracellulaires du système de défense inné. Les cellules des barrières épithéliales et les cellules de l'immunité innée résidentes, expriment des PRR. C'est par l'intermédiaire de ces récepteurs qu'elles sont capables de reconnaître des motifs moléculaires spécifiques des allergènes (Willart and Lambrecht, 2009). Les allergènes miment donc une infection en déclenchant une réponse immunitaire innée via les PRR et induisent ainsi une réponse inflammatoire stérile (Martin, 2012).

Les principaux signaux de danger sont regroupés sous les appellations de DAMP (*Damage-Associated Molecular Pattern*) et PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*) (Willart and Lambrecht, 2009; Newton and Dixit, 2012; Schaefer, 2014).

Les DAMPs, appelés également alarmines, sont des signaux de danger endogènes, issus des molécules du soi libérées durant une nécrose cellulaire (Schaefer, 2014). Ces molécules regroupent, entre autres, l'acide urique, la protéine HMGB1 (*high mobility group box 1 protein*) sécrétée par les cellules nécrotiques, les β -défensines sécrétées

par les neutrophiles activés, les protéines de choc thermique HSP, les acides nucléiques du soi, les espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote (respectivement ROS et RNS), l'ATP (Adenosine Tri Phosphate), l'IL-1 β , le TNF- α , l'IFN- α et les protéines de liaison au calcium (S100A8 et S100A9) (**Figure 18**) (Willart and Lambrecht, 2009; Schaefer, 2014; Patel, 2017).

Les PAMPs sont des signaux de dangers exogènes issus de motifs moléculaires spécifiques exprimés par les bactéries, les virus, les parasites ou les moisissures ; ils incluent les acides nucléiques de virus ou de bactéries, des composants de la paroi fongique (β -glucanes et α -mannane), la protéine bactérienne flagelline, des peptidoglycanes de la paroi bactérienne ou des LPS des bactéries Gram négatif (**Figure 18**) (Newton and Dixit, 2012; Patel, 2017).

Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires ou PRR jouent un rôle crucial dans le bon fonctionnement du système immunitaire inné. Ce sont des protéines principalement exprimées par les cellules du système immunitaire inné, telles que les DC, les macrophages, les monocytes, les neutrophiles et les cellules épithéliales, capables d'identifier les deux classes de signaux de danger cités précédemment : les PAMPs et les DAMPs. Il y a plusieurs sous-groupes de PRR classés selon leur spécificité de ligand, leur fonction et leur localisation. Sur la base de leur localisation, les PRR peuvent être divisés en PRR liés aux membranes et en PRR cytoplasmiques. On distingue quatre familles de PRR : les TLRs (*Toll Like Receptors*) associés aux membranes cytoplasmiques et de l'endosome, les CLR (*C-type lectin receptors*) solubles ou associés à la membrane cytoplasmique, les NLRs (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain-Like receptors* ou *NOD-like receptors*) cytoplasmiques et les RLRs (*Retinoic acid-inducible gene-1 like receptors* ou *RIG-1 like receptors*) cytoplasmiques (Portnoy *et al.*, 2016).

De plus, les récepteurs activés par les protéases (PAR) et les protéines de liaisons d'acides sialiques (Siglecs, *sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins*) sont souvent inclus dans ce groupe.

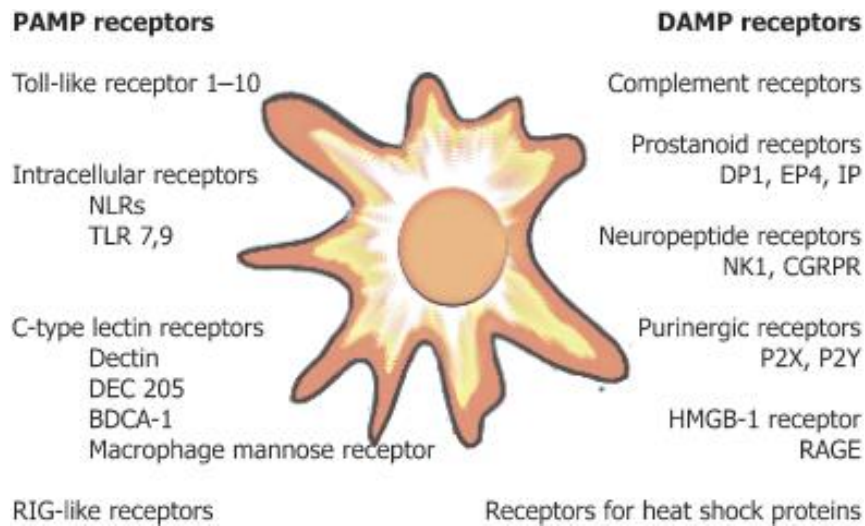


Figure 18. Expression des récepteurs de signaux de danger par les cellules dendritiques.

(d'après (Willart and Lambrecht, 2009))

5.2.5.1. Les récepteurs Toll-like

La famille des TLR est la catégorie de PRR la mieux caractérisée à ce jour. Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires avec un domaine extracellulaire riche en leucine et un domaine TIR (*Toll-IL-1 Receptor*) cytoplasmique similaire au récepteur de l'IL-1 (Schaefer, 2014). Les analyses structurales ont montré que les TLR se présentent sous la forme d'homo-ou d'hétérodimères (TLR1/2 ou -2/6 ou -3/3...) (**Figure 19**) (Kawai and Akira, 2010; McClure and Massari, 2014). La liaison entre les sous-unités s'effectue au niveau du domaine extracellulaire, impliqué dans la reconnaissance des ligands. Cette dimérisation est nécessaire pour la transduction du signal d'activation (Kawai and Akira, 2010). Certains TLR peuvent s'associer à d'autres molécules. Ainsi le TLR2 s'associe à la dectin-1 pour reconnaître certains glycanes alors que le complexe

TLR2/6 peut se lier au CD36 pour déclencher certaines réponses inflammatoires (McClure and Massari, 2014). Enfin, la reconnaissance par le TLR4 peut nécessiter l'implication des molécules MD-2 et CD14 (Kawai and Akira, 2010; McClure and Massari, 2014; Portnoy *et al.*, 2016).

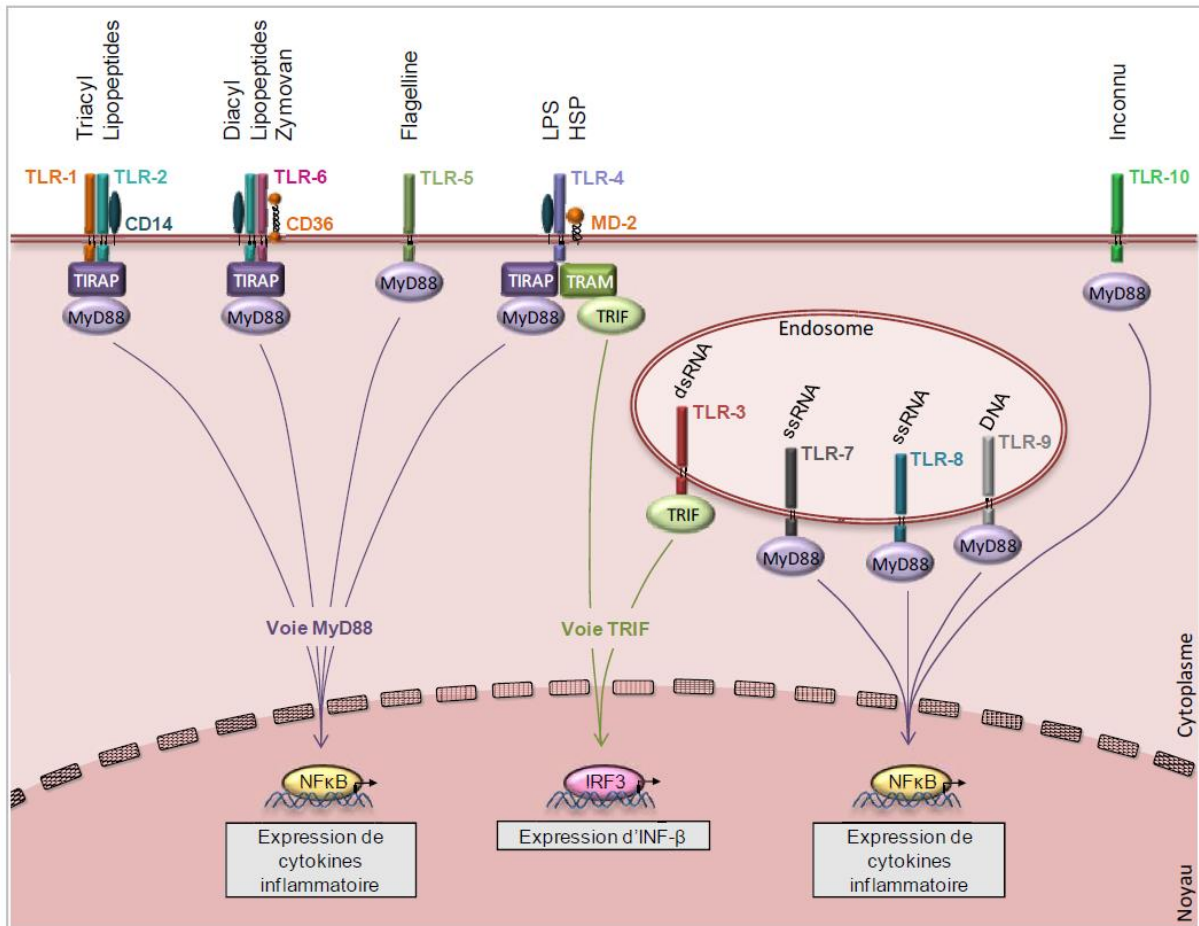


Figure 19. Les différents récepteurs *Toll-like* exprimés à la surface des cellules dendritiques humaines.

(d'après (Barton and Kagan, 2009))

Les hétérodimères TLR1/2 et TLR2/6 reconnaissant les lipoprotéines, le TLR4 fixant le LPS, le TLR5 reconnaissant la flagelline et le TLR10, exprimés à la surface des DC, vont induire une production de cytokines pro-inflammatoires par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice MyD88 (*Myeloid differentiation antigen 88*). Les TLR7, TLR8 et TLR9, présents dans des endosomes, vont s'associer à la même protéine adaptatrice. Les TLR3 et TLR4 induiront la production d'IFN de type I, par l'intermédiaire de la

protéine adaptatrice TRIF (*Toll-IL-1R domain containing adapter inducing interferon- β*) (Newton and Dixit, 2012; McClure and Massari, 2014).

À ce jour, 15 TLR ont été identifiés chez les mammifères, dont 12 sont présents chez l'Homme (Portnoy *et al.*, 2016). Notons qu'il existe treize TLR chez la souris (**Tableau 5**) (Schaefer, 2014). Les TLR11, -12 et -13 sont exprimés chez la souris mais sont absents chez l'Homme. Certains TLR ancrés dans la membrane plasmique possèdent un domaine extracellulaire (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, et TLR6) reconnaissant des structures lipidiques, des lipoprotéines ou les peptidoglycanes des bactéries, des champignons et des protozoaires. Les TLR intracellulaires ancrés dans les membranes des endosomes (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9) sont spécialisés de préférence dans la reconnaissance des acides nucléiques bactériens et viraux (Newton and Dixit, 2012; Portnoy *et al.*, 2016).

Les sous-populations de DC sont caractérisées par des profils d'expression des TLR différents. Chez l'Homme, les pDC sont spécialisées dans la détection des virus et expriment principalement les TLR endosomaux -7 et -9 alors que les cDC expriment la plupart des TLR : TLR1 à -6, -8 et -10. Chez la souris, ces différences sont moins marquées. Toutes les DC expriment les TLR décrits chez cette espèce, de -1 à -13, à l'exception du TLR3 absent des pDC, et des CD4⁺CD8 α ⁻, et des TLR5 et -7 absents des DC CD8 α ⁺ (**Tableau 5**) (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Nace *et al.*, 2012).

Tableau 5. Expression des récepteurs *Toll-like* (TLR) dans les sous-populations de cellules dendritiques chez l'Homme et la souris.

(d'après (Iwasaki and Medzhitov, 2004; McClure and Massari, 2014; Schaefer, 2014))

| | Homme | | Souris | | |
|--------|-------|-----|--------------------|--------------------|-----|
| | cDC | pDC | cDC CD8 α - | cDC CD8 α + | pDC |
| TLR-1 | ++ | + | ++ | + | ++ |
| TLR-2 | ++ | - | ++ | ++ | ++ |
| TLR-3 | ++ | - | - | ++ | - |
| TLR-4 | - | - | ++ | ++ | + |
| TLR-5 | + | - | ++ | - | + |
| TLR-6 | ++ | - | ++ | ++ | + |
| TLR-7 | - | ++ | ++ | - | ++ |
| TLR-8 | + | - | ++ | ++ | ++ |
| TLR-9 | - | ++ | ++ | ++ | ++ |
| TLR-10 | + | + | | | |
| TLR-11 | | | + | ++ | - |
| TLR-12 | | | + | ++ | + |
| TLR-13 | | | + | ++ | - |

Le niveau et le type d'activation dépendent de la nature de l'agoniste des TLR et du sous-type de DC. En effet, la fixation du ligand sur les TLR aboutit à un assemblage complexe et sélectif des protéines adaptatrices cytoplasmiques et à une cascade de phosphorylations. Les deux protéines adaptatrices les plus fréquemment impliquées sont le MyD88 et le TRIF, conduisant aux trois voies principales de signalisation et de transduction du signal des TLR (Barton and Kagan, 2009; McClure and Massari, 2014), à savoir : l'activation des facteurs de transcription NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*) et IRF3 (*Interferon Regulatory Factor-3*) et des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), conduisant ainsi, à l'induction de la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN- β .

Les voies dépendantes de MyD88 (TLR1, -2, -6, -4, -7, -8 et -9) induisent la production cellulaire de cytokines comme le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, et l'IL-12, de chimiokines comme l'IL-8 et MIP2, l'augmentation de l'expression de molécules de costimulation telles que CD40, CD80, CD86 et l'augmentation de la production de molécules d'adhésion telle

qu'ICAM-1 (Newton and Dixit, 2012). Les voies de signalisation dépendantes de la protéine TRIF (TLR3 et -4) conduisent essentiellement à la production d'IFN de type 1 (IFN α/β) (Newton and Dixit, 2012).

5.2.5.2. Les récepteurs NLR

Les récepteurs NLR constituent une vaste famille de PRR intracellulaires comprenant notamment les NOD (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein*) et les NLRP (*NOD-Like Receptor Proteins*). Ils jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée en reconnaissant divers PAMPs et DAMPs (Portnoy *et al.*, 2016). Les NLR sont exprimés dans les cellules de l'immunité telles que les lymphocytes, les macrophages et les DC ainsi que dans des cellules non immunitaires telles que les cellules épithéliales et mésothéliales.

Leur organisation générale comprend 1) une région C-terminale riche en LRR (*Leucine-Rich-Repeat*) qui reconnaît les motifs particuliers des PAMPs ou DAMPs ; 2) un domaine central NOD qui permet l'auto-oligomérisation lors de l'activation ; et 3) un domaine variable N-terminal constitué de domaines d'interaction protéines-protéines tels que le domaine de recrutement des caspases (CARD, *caspase recruitment domain*) impliqués dans l'initiation de la signalisation, le PYD (*pyrin domain*), *acid transactivating* ou le BIR (*baculovirus inhibitor repeat*). Ce domaine est crucial pour la signalisation en aval. Certains NLRP forment un complexe multi-protéique nommé l'inflammasome qui contrôle l'activité d'une enzyme la caspase-1.

Les NLR comptent 22 membres identifiés chez l'Homme, divisés en 4 sous-familles selon la composition de leur domaine N-terminal (Portnoy *et al.*, 2016) :

- NLRA, avec un domaine de transactivation acide : CIITA. Il est impliqué dans la transcription du CMH II.

- NLRB, avec un domaine N-terminal BIR, composé d'un seul membre : NAIP.
- NLRC, avec un domaine N-terminal CARD, est composé de 6 membres : NOD1, NOD2, NLRC3 (ou NOD3), NLRC4 (ou NOD4), NLRC5 (ou NOD5), NLRX.
- NLRP, avec un domaine N-terminal PYR, est composé de 14 membres : NLRP1 à 14.

Les NLR partagent certaines propriétés des TLR (Awad *et al.*, 2018). Ainsi, NOD1 et NOD2 sont aujourd'hui bien connus pour leur capacité à activer la voie NF- κ B ainsi que la voie des MAPK, induisant la transcription et la production de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines, de molécules d'adhésion et de molécules telles que la cyclo-oxygénase 2 (Cox2) ou l'iNOS (Franchi *et al.*, 2009). Les protéines NLRP, quant à elles, sont plutôt mentionnées pour leur capacité à réguler la sécrétion de l'IL-1 et de l'IL-18 suite à l'activation de l'inflammasome. Celle-ci requiert le recrutement de la protéine ASC (*adaptor protein apoptosis speck protein with caspase recruitment*) pour activer la caspase 1 qui pourra alors cliver les formes inactives de pro-IL-1 et de pro-IL-18 en formes actives.

L'inflammasome le mieux caractérisé et le plus souvent impliqué dans les allergies cutanées est l'inflammasome NLRP3. Son activation conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (Patel, 2017; Awad *et al.*, 2018). Des souris déficientes en NLRP3 développent une inflammation d'origine allergique diminuée en réponse aux allergisants cutanés tels que le DNFB ou le TNCB (Watanabe *et al.*, 2007). Les souris invalidées pour le gène NLRP12 (NLRP12^{-/-}) développent une réaction allergique plus faible que les souris sauvages en réponse à l'oxazolone (Arthur *et al.*, 2010).

5.2.5.3. Les récepteurs de la famille des lectines de type C

Les récepteurs de la famille des lectines de type C (CLR) forment une famille hétérogène de protéines solubles et transmembranaires caractérisées par leur domaine lectine de type C. Les CLR sont des molécules glycosylées, reconnaissant des ligands carbohydrogénés. Cette reconnaissance est médiée par un mécanisme dépendant du calcium. Les CLR exprimés à la surface des DCs comprennent de nombreux récepteurs comme le récepteur au mannose (CD206), DC-SIGN (CD209, récepteur humain sans équivalent murin), la langérine (CD207), dectin-1 (CLEC7A), DGNR-1 (CLEC9A), dectin-2, DEC-205 (CD205), le récepteur *dendritic-cell-associated lectin-1* (DCAL-1), le récepteur *myeloid-DAP12-associating lectin* (MDL-1), le récepteur *macrophage C-type lectin* (MCL), le récepteur *Macrophage inducible Ca²⁺-dependent lectin* (MINCLE), SIGN-R1 (CD209b, récepteur murin sans équivalent humain) et le MGL (CD301) (Cummings and McEver, 2009; Hardison and Brown, 2012). La plupart de ces lectines de type C possèdent de fortes capacités d'endocytose et certaines sont associées à des capacités d'induction de la maturation des cellules dendritiques.

Le récepteur au mannose, en particulier, possède d'importantes capacités d'endocytose et reconnaît une large variété de ligands carbohydrogénés regroupant des motifs bactériens et viraux mais aussi des ligands endogènes tels que des protéines de la matrice extracellulaire ou des hormones glycosylées. Il est exprimé par les macrophages, les DC et les cellules endothéliales non vasculaires (Salazar *et al.*, 2013; Portnoy *et al.*, 2016). Chez l'Homme, l'expression du récepteur au mannose par les DC est souvent associée à l'état de maturation de ces dernières. Ainsi, on observe une surexpression du CD206 par les DC dans des conditions inflammatoires (Martinez-Pomares, 2012).

Les lectines telles que DC-SIGN et la langérine sont plus spécifiquement associées à certaines sous-populations de DC comme les DC du derme et les LC, respectivement.

La protéine DC-SIGN, qui reconnaît des ligands associés au mannose ou au fucose, est associée à de fortes capacités d'endocytose, ainsi qu'à une capacité de maturation des DC (Gros and Novak, 2012; Garcia-Vallejo and van Kooyk, 2013). La langérine, quant à elle, favorise l'endocytose de ligands mannosylés. Leur internalisation est associée à la formation des granules de Birbeck, spécifiques des LC (Garcia-Vallejo and van Kooyk, 2013). Ces structures sont des sous-domaines des compartiments d'endocytose et permettent la présentation des antigènes ainsi capturés par des voies non classiques de présentation. Si ces deux récepteurs sont capables de reconnaître des ligands de type sucre, les mécanismes de présentation croisée associés à chacun de ces récepteurs sont différents. Ainsi, certains ligands reconnus à la fois par DC-SIGN et par la langérine, ne seront adressés vers la présentation croisée que par l'un ou l'autre de ces récepteurs, en fonction de la longueur de leur chaîne glycosylée (Fehres *et al.*, 2015).

5.2.5.4. Activation par les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène ou ROS (*Reactive Oxygen Species*) se forment au cours du métabolisme normal, lors de la réduction tétravalente de l'oxygène en eau ; ces intermédiaires sont beaucoup plus réactifs que l'oxygène qui leur a donné naissance. Ils comprennent des radicaux oxygénés tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), ou des molécules pouvant produire des radicaux libres oxygénés telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). On parle de stress oxydant lorsque la production, endogène ou exogène, de radicaux libres oxygénés dépasse les capacités antioxydantes de l'organisme.

Certains allergènes de contact, par des processus encore mal identifiés, ont la capacité d'induire la production de ROS par les cellules cutanées (**Figure 20**) (Kaplan *et al.*,

2012). Le stress oxydant produit dans le milieu intracellulaire va conduire à la production de DAMPs tels que l'ATP ou l'acide hyaluronique (HA).

Les ROS peuvent dégrader l'HA de la matrice extracellulaire en fragments de plus faible poids moléculaires (Kaplan *et al.*, 2012). Ces fragments d'HA possèdent une activité pro-inflammatoire et, par interaction avec les TLR et activation de l'inflammasome peuvent induire l'activation de l'immunité innée. Les molécules d'ATP peuvent activer l'inflammasome par liaison au récepteur purinergique P2X7 (Martin, 2012).

Ce mécanisme d'activation cellulaire par les ROS a été mis en évidence dans les kératinocytes et les DC dermiques et épidermiques (Kim *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012). Dans les DC, les ROS semblent impliqués dans l'augmentation de l'expression de molécules de surface telle le CMH II, de molécules de costimulation (CD86 et CD40), et de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-12, TNF- α) (Martin, 2015a).

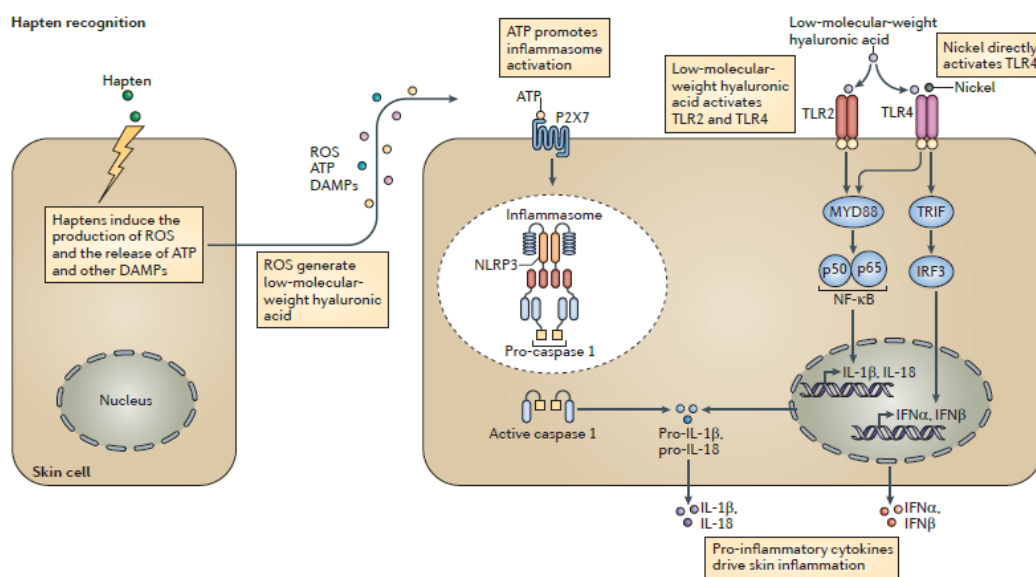


Figure 20. Activation cellulaire par les haptènes et le nickel.

(d'après (Kaplan *et al.*, 2012))

5.2.6. Capture des antigènes

Après déclenchement des signaux de dangers ou après stimulation par des cytokines inflammatoires, les DC immatures (iDC) vont capturer les antigènes ainsi reconnus. Les iDC sont capables de capturer et d'apprêter une grande variété de molécules et de microorganismes. Leur capacité à phagocyter les antigènes est plus importante que celles des DC matures chez qui cette fonction est régulée négativement (Steinman and Swanson, 1995). Elles peuvent utiliser différentes voies pour la capture de l'antigène : la macropinocytose, l'endocytose, médiée par les récepteurs de type lectine C ou par les récepteurs Fc γ de type I pour les complexes immuns et les particules opsonisées, ou la phagocytose pour les particules, les cellules nécrotiques ou apoptotiques, les virus ou les bactéries (**Figure 21**) (Banchereau *et al.*, 2000; Roche and Furuta, 2015).

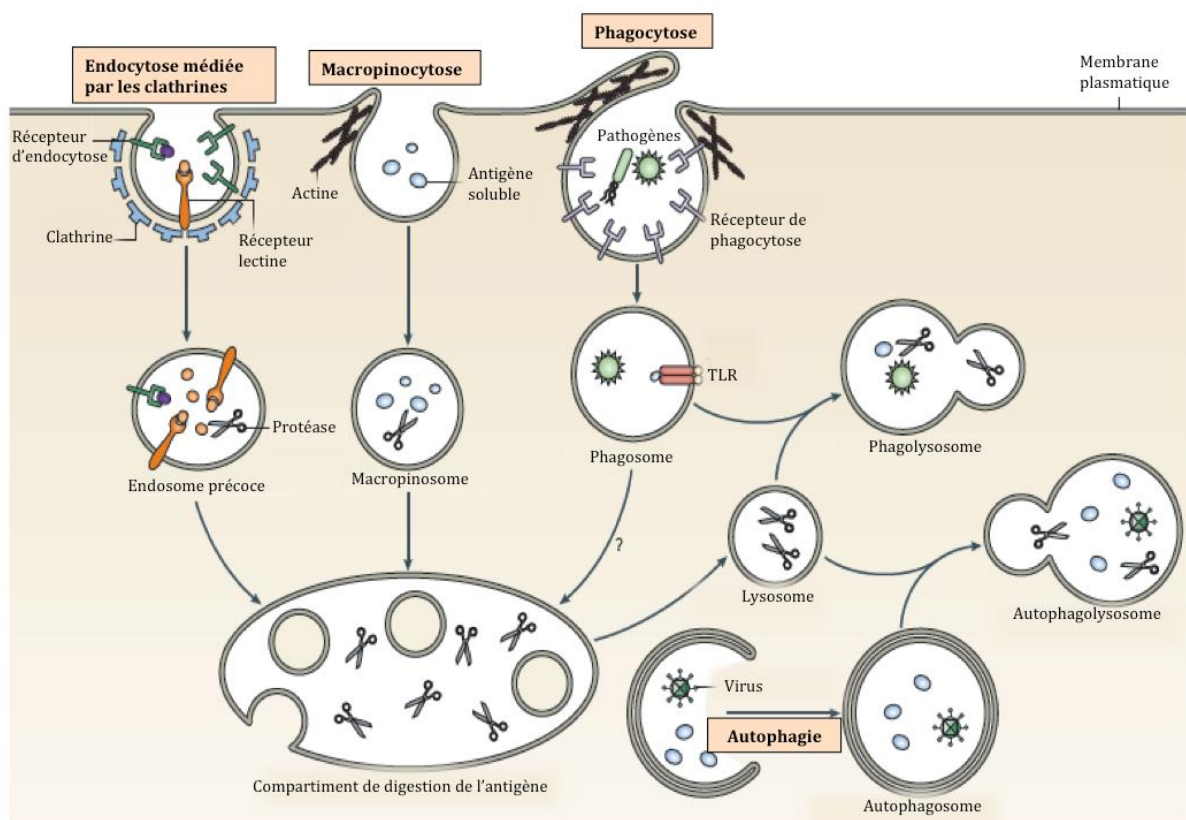


Figure 21. Voies d'internalisation de l'antigène et association aux molécules du CMH II.

(d'après (Roche and Furuta, 2015))

Après capture, l'antigène sera digéré et un fragment peptidique sera présenté par les molécules du CMH aux LT. Les DC peuvent également, après capture des antigènes, présenter ces derniers aux LT cytotoxiques par libération de vésicules comportant l'ensemble des éléments nécessaires à la présentation d'antigène, les exosomes (Harshyne *et al.*, 2001; Roche and Furuta, 2015). Plusieurs populations cellulaires sont capables de capturer les antigènes (DC, LB, macrophages), mais seules les DC peuvent assurer leur transport jusqu'aux ganglions lymphatiques drainants afin de les présenter aux LT naïfs et induire une réponse immunitaire primaire.

Deux voies de présentation des antigènes phagocytés par les DC existent : la voie endogène ou protéosomale faisant intervenir le CMH de classe I, et la voie exogène ou endosomale faisant intervenir le CMH de classe II.

5.2.7. Présentation de l'antigène par les DC

Les DC matures sont les seules cellules capables d'activer les LT naïfs dans les ganglions lymphatiques. Ceci est en partie dû à leur capacité à capturer l'allergène et à le présenter à leur surface sous la forme d'un fragment antigénique spécifique associé à des récepteurs immuns spécialisés : les molécules du CMH. Chez la souris et l'Homme, le CMH prend respectivement le nom de H-2 (*Histocompatibility 2*) et HLA (*Human Leucocyte Antigen*) car la première description de ce système a été faite sur des leucocytes par Jean Dausset en 1958 (Dausset, 1958). La principale fonction biologique des molécules HLA est de présenter des antigènes aux LT. Pour cela, elles prennent en charge des peptides provenant de la dégradation de protéines endogènes ou de cellules mortes, ou des peptides issus de la dégradation de microorganismes ou du non-soi. Elles les acheminent à la surface des CPA afin de les présenter aux LT. Il s'agit d'un système multigénique, multiallélique, d'expression codominante (Neefjes *et al.*, 2011). Chez l'Homme, ce système est très polymorphe (plus de 1000 allèles HLA différents répartis sur plusieurs loci) et est constitué de 200 gènes localisés sur un

segment du bras court du chromosome 6 (bande p 21.3). Les molécules du CMH sont des glycoprotéines de surface se liant à des fragments protéiques qui ont été synthétisés dans la cellule (molécules du CMH de classe I) ou qui ont été ingérés et protéolysés (molécules du CMH de classe II). Les deux types de glycoprotéines membranaires se comportent comme des molécules présentatrices d'antigènes formant des complexes très stables avec les peptides antigéniques. Ainsi les protéines allergéniques présentes dans le cytosol empruntent la voie de présentation du CMH I et les allergènes pénétrant par endocytose ou phagocytose utilisent la voie du CMH II. Malgré tout, ce modèle est assez restrictif.

5.2.7.1. La voie endogène : présentation par les molécules du CMH I

Le CMH I est ubiquitaire et présent à la surface de toutes les cellules nucléées (de 10^4 à $5 \cdot 10^5$ molécules/cellules) et des plaquettes. Il permet l'interaction avec les LT naïfs $CD8^+$. Il est constitué par une chaîne lourde polymorphe formée de trois domaines extracellulaires $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ et d'une chaîne légère non polymorphique, la β -2 microglobuline ($\beta 2$ -m). Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forment la région de liaison au peptide antigénique et les domaines $\alpha 3$ et $\beta 2$ -m constituent la région immunoglobuline-*like*. Le domaine $\alpha 3$ contient une séquence de liaison de la molécule membranaire CD8 présente sur les lymphocytes T (Neefjes *et al.*, 2011).

Les molécules du CMH I présentent le plus souvent des peptides dérivés de la protéolyse de protéines endogènes de la cellule telles que les constituants naturels en fin de vie ou malformés de la cellule. Ces dernières s'associent à des protéines de stress telles que l'ubiquitine qui va permettre leur étiquetage et leur acheminement vers le protéasome pour être dégradées en peptides. Le protéasome est un complexe protéasique multi-catalytique formé de 28 protéines organisées en quatre anneaux. Il est doté de trois spécificités catalytiques considérées comme similaires celles de la

trypsine (clivage après les résidus Arg et Lys), de la chymotrypsine (clivage après les résidus Tyr, Phe, Leu et Ile) et de la caspase (clivage après Glu et Asp). Du fait de ces spécificités multiples, le protéasome est capable de dégrader la quasi-totalité des protéines, en produisant des fragments peptidiques d'une longueur de 4 à 15 résidus. Les produits de dégradation de petite taille sont éliminés. Les oligopeptides susceptibles de devenir antigéniques sont ceux qui présentent une extrémité C-terminale définie par le protéasome et une extrémité N-terminale plus ou moins longue qui sera secondairement clivée par des aminopeptidases (Neefjes *et al.*, 2011). Les protéines allergéniques ou les protéines endogènes ayant fixé un haptène, vont être dégradées en peptides par le protéasome. La translocation des peptides antigéniques, du cytosol au réticulum endoplasmique (RE) où se produit l'assemblage peptides-CMH-I, est prise en charge par le transporteur TAP (*transporter associated with antigen processing*) comprenant les protéines TAP1 et TAP2 dépendantes de l'ATP. Dans le RE, les aminopeptidases ERAP 1 et 2 confèrent aux peptides transportés, la taille idéale (environ 9 acides aminés) pour la liaison de ces derniers aux molécules du CMH I. Le TAP appartient à la famille des protéines ABC (*Androgen Binding Cassette*) utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie pour le transport des molécules à travers les membranes. Le TAP humain présente une affinité pour les peptides d'une longueur de 8 à 16 acides aminés et son expression est induite par l'IFN- γ (Madden, 1995; Neefjes *et al.*, 2011).

La formation d'un complexe peptide-CMH I, dans le RE, implique l'action de trois protéines chaperons différentes (**Figure 22**). Lors de sa formation, les molécules du CMH I restent associées à ces protéines, ce qui assure la stabilité du complexe jusqu'à sa liaison avec un peptide de haute affinité. Les chaînes lourdes néo-formées sont d'abord associées à la calnexine puis la calnexine est remplacée par la calréticuline lors de l'association des chaînes lourdes avec la β 2-m. Le complexe ainsi formé se lie aux pompes TAP par l'intermédiaire de la tapasine, constituant ainsi le « complexe de chargement » des molécules CMH I (Neefjes *et al.*, 2011). Les molécules de CMH I ainsi chargées en peptides, vont être adressées et exprimées à la surface cellulaire. Certains

haptènes peuvent se complexer directement aux peptides endogènes présentés par les molécules du CMH I à la surface de la membrane plasmique (Olasz *et al.*, 2002; Karlberg *et al.*, 2013).

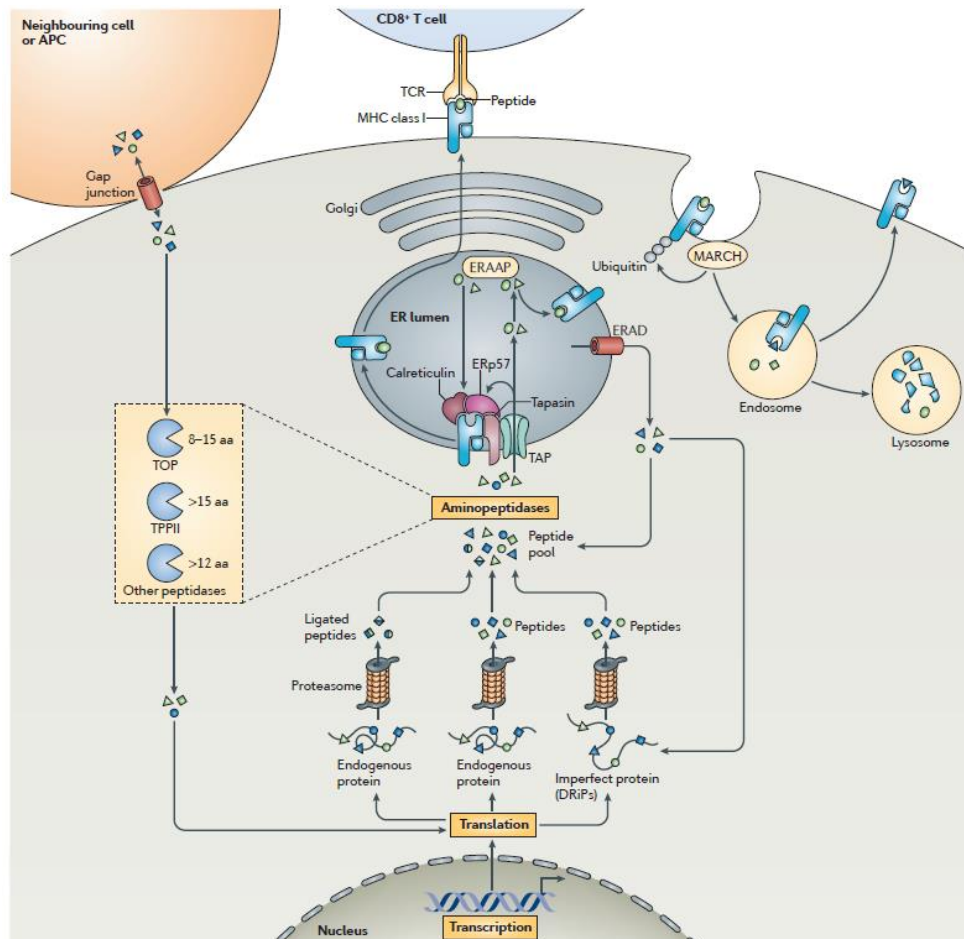


Figure 22. Complexité de la voie de présentation des antigènes par le CMH I.

(d'après (Neefjes *et al.*, 2011))

5.2.7.2. La voie exogène : présentation par les molécules du CMH II

L'expression du CMH II est plus restreinte que celle du CMH I. Il est exprimé en grande majorité par les CPA professionnelles, les LB et LT activés et les macrophages. L'expression du CMH II par les cellules épithéliales et endothéliales, peut être induite par l'IFN- γ (Roche and Furuta, 2015). Le CMH II permet l'activation spécifique des LT CD4⁺ naïfs. Sa densité est de l'ordre de 10^5 molécules/cellule. Il est composé de 2

chaînes transmembranaires α et β codées chez l'Homme, par les loci DP, DQ et DR situés sur le chromosome 6. Ainsi pour chaque locus (DR, DQ, DP), il existe un gène (A1) codant pour une chaîne polypeptidique α (ex : DRA1, DQA1, DPA1) et un gène (B1) codant pour une chaîne polypeptidique β (ex: DRB1, DQB1, DPB1). Pour le locus DR, trois autres gènes (DRB3, B4 ou B5) codent pour une chaîne β (β 3, β 4 ou β 5) qui s'associe à la chaîne α pour former une deuxième molécule HLA-DR (Neefjes *et al.*, 2011). Les domaines α 1 et β 1 forment la région de liaison au peptide antigénique alors que β 2 et α 2 constituent la région de liaison de la glycoprotéine membranaire CD4 des LT. Du fait de la variabilité allélique, la présentation antigénique n'est pas forcément similaire entre les individus ce qui entraîne des réponses différentes lors d'une infection. Les individus homozygotes pour de nombreux gènes HLA vont également être capables de se défendre contre des pathogènes variés, malgré le nombre plus restreint de molécules HLA différentes à la surface des cellules. Cela signifie qu'une molécule HLA ne fixe pas un seul peptide mais possède une capacité d'interaction assez large pour présenter le plus de peptides possibles. Cette spécificité se manifeste par des préférences ou des incompatibilités pour certains types de chaînes latérales et des séquences peptidiques précises. Le polymorphisme des allèles HLA et l'étude des peptides qui leur sont associés ont permis de mettre en évidence l'existence de motifs d'ancrage cruciaux, spécifiques d'un allèle HLA donné, permettant la fixation du peptide immunogène à la molécule HLA (Madden, 1995; Roche and Furuta, 2015).

Lors de la biosynthèse dans le RE, les dimères $\alpha\beta$ sont liés à une chaîne invariante, notée Ii, de façon transitoire et non covalente (Neefjes *et al.*, 2011). Les chaînes α et β synthétisées au niveau du RE, s'associent rapidement à la chaîne Ii qui joue le rôle de protéine chaperonne. Ce trimère ne migre pas directement vers la membrane plasmique mais vers des compartiments endosomiaux/lysosomiaux appelées MIIC (*MHC class II compartment*) ou vésicules de classe II (Neefjes *et al.*, 2011; Roche and Furuta, 2015). Dans ces compartiments, la chaîne Ii est graduellement dégradée. Cependant, un court fragment de la chaîne invariante, le CLIP (*Class II associated*

invariant chain Peptide), reste lié à la molécule du CMH II empêchant ainsi toute liaison prématurée avec un autre peptide (**Figure 23**).

Les allergènes exogènes internalisés par endocytose, transitent dans des endosomes précoces puis tardifs où ils seront dégradés par des systèmes enzymatiques endolysosomiaux en peptides d'une taille variable (12 à 35 aa). Ces peptides seront associés aux molécules du CMH-II dans les MIIC par l'action de la protéine HLA-DM qui permet leur échange avec le fragment CLIP. Les complexes CMH II/peptides qui en résultent sont adressés vers la membrane plasmique.

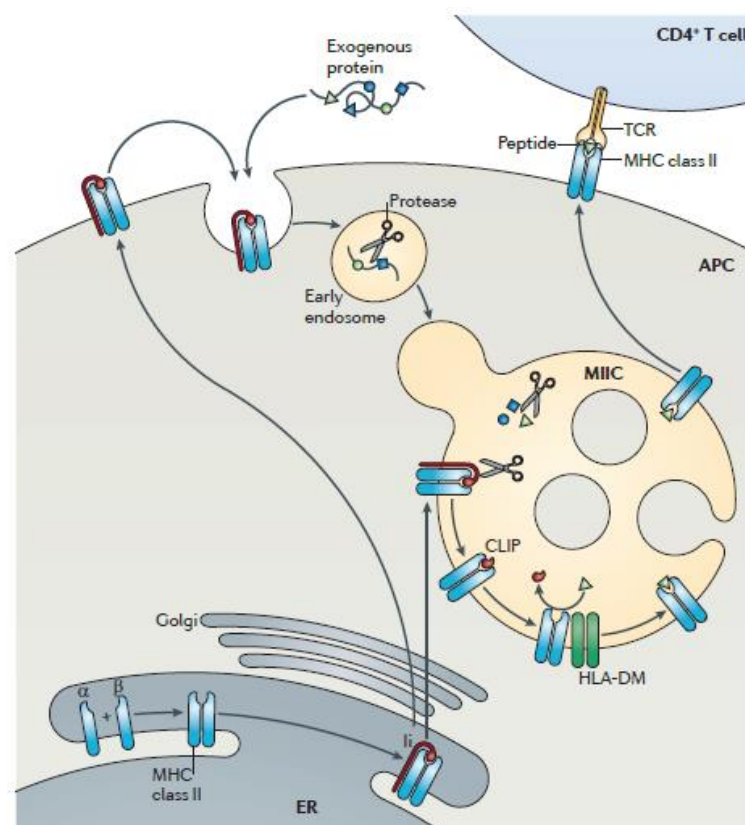


Figure 23. Voie de présentation des antigènes par le CMH II.

(d'après (Neefjes et al., 2011))

5.2.7.3. La présentation croisée

En dehors de ces deux voies classiques de présentation des antigènes, il existe une voie alternative propre aux DC : la présentation croisée, connue sous le terme de « *cross-presentation* ». Cette voie permet la présentation d'antigènes exogènes via le CMH I, ou la présentation d'antigènes cytoplasmiques générés par autophagie par le CMH II (Nakayama, 2014). 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 ; elle permet aussi une réponse anti-tumorale (Figure 24) (Nakayama, 2014).

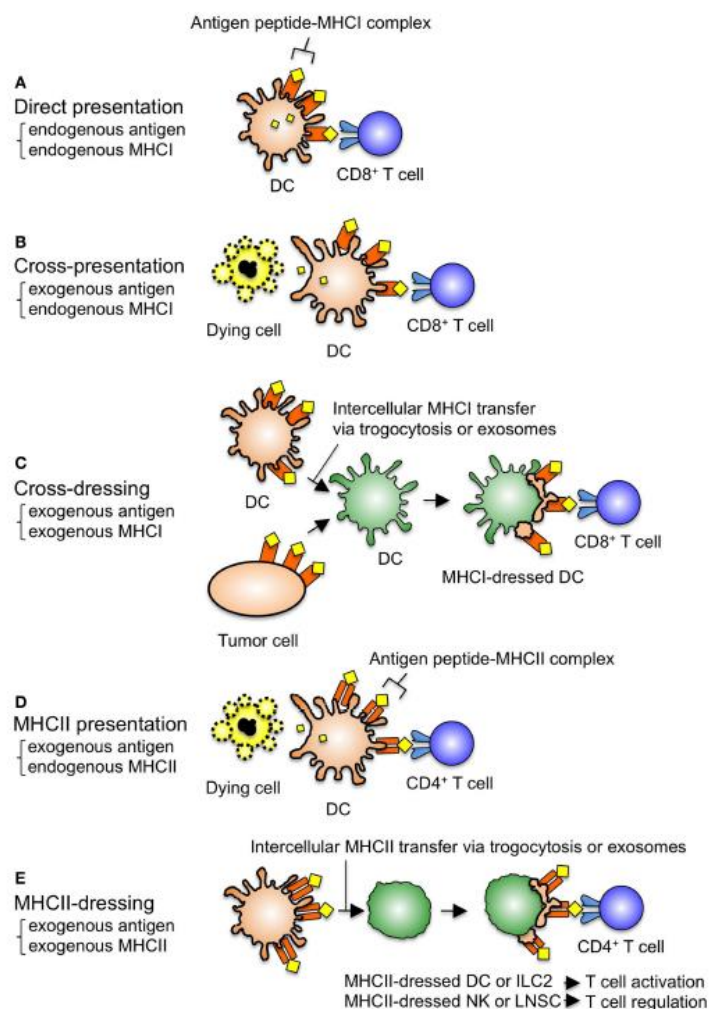


Figure 24. Présentation directe ou croisée des antigènes via les molécules du CMH I et II.

(d'après (Nakayama, 2014))

Le mécanisme de la présentation croisée repose principalement sur deux phénomènes biologiques (Nakayama, 2014) :

- Voie TAP dépendante : Les antigènes présents dans les endosomes vont subir une translocation, par un moyen de transport exclusif vers le cytosol. Ainsi, les antigènes capturés peuvent rejoindre les antigènes endogènes et suivre la voie classique de l'apprêtement du CMH I.

- Voie TAP indépendante : elle semble due à un échange de peptides chargés sur les molécules du CMH I avec les antigènes exogènes au cours du recyclage de la molécule du CMH I. Cette étape s'effectuerait au niveau des endosomes et le complexe retournerait directement à la membrane sans passer par les protéasomes.

5.2.8. Maturation et migration des cellules dendritiques

L'engagement des récepteurs PRR, les types de ligands impliqués, la dose de ces ligands, la durée d'exposition et le microenvironnement (notamment la présence d'autres signaux de danger) dans lequel les DC demeurent, conduisent à l'activation de la DC et déterminent sa polarisation. L'activation passe par une signalisation intracellulaire via ces récepteurs aboutissant à l'activation des voies MAPK, NF- κ B et IRF (*interferon regulating factors*) à l'origine des changements phénotypiques et fonctionnels des DC. Ce phénomène appelé maturation se traduit par une diminution de la capacité de capture de l'antigène suite à une perte des récepteurs d'endocytose ou de phagocytose. Les autres modifications phénotypiques retrouvées sont la surexpression des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86, des molécules d'adhésion (CD54, CD58) et du marqueur phénotypique de maturation CD83, la sécrétion de cytokines et de chimiokines (IL-12, IFN- α , IL-8, TNF- α), une surexpression des molécules du CMH et la régulation différentielle dans le répertoire des récepteurs de chimiokines tels CCR1, CCR5 et CCR7, et des métalloprotéases matricielles (MMP)

(**Figure 25**) (Toebak *et al.*, 2009; Holgate, 2012; Kaplan *et al.*, 2012). Par ailleurs, les DC perdent l'expression de l'E-cadhérine (molécule d'adhésion intercellulaire) ; cette perte d'expression est principalement déclenchée par la présence d'au moins une des deux cytokines pro-inflammatoires TNF- α ou IL1- β (Forster *et al.*, 2012). De ce fait, les DC vont quitter la zone inflammatoire et entrer dans la circulation lymphatique pour gagner les ganglions lymphatiques drainants. CCR7 est le récepteur principal qui va orienter la migration des DC vers les compartiments ganglionnaires riches en LT.

Toutes ces modifications sont nécessaires pour que la DC devienne une CPA efficace. Cependant, l'acquisition des molécules de costimulation permettant d'activer les lymphocytes T est primordiale, sans ce signal, les LT meurent par apoptose ou entrent en anergie.

Les cDC, ayant un rôle de sentinelle dans les tissus périphériques, migrent secondairement pour entrer en contact avec les LT afin de les activer. Ainsi, lors de leur maturation, les cDC diminuent l'expression du récepteur CXCR1 et perdent l'expression de CCR1, CCR5 et CCR6 et leur capacité de réponse aux chimiokines CCL3, CCL5 et CCL20, qui les recrutaient au sein des tissus périphériques (Holgate, 2012; Kaplan *et al.*, 2012). En revanche, l'augmentation de l'expression des récepteurs CXCR4 et CCR7 rend les cDC matures sensibles aux chimiokines CCL19 et CCL21 produites par les cellules stromales de la zone riche en LT des organes lymphoïdes secondaires. Les cDC matures, en suivant les gradients de CCL19 et CCL21, migrent alors vers les zones riches en LT des ganglions lymphatiques où elles vont pouvoir présenter l'antigène aux LT (Holgate, 2012; Kaplan *et al.*, 2012; Tiberio *et al.*, 2018).

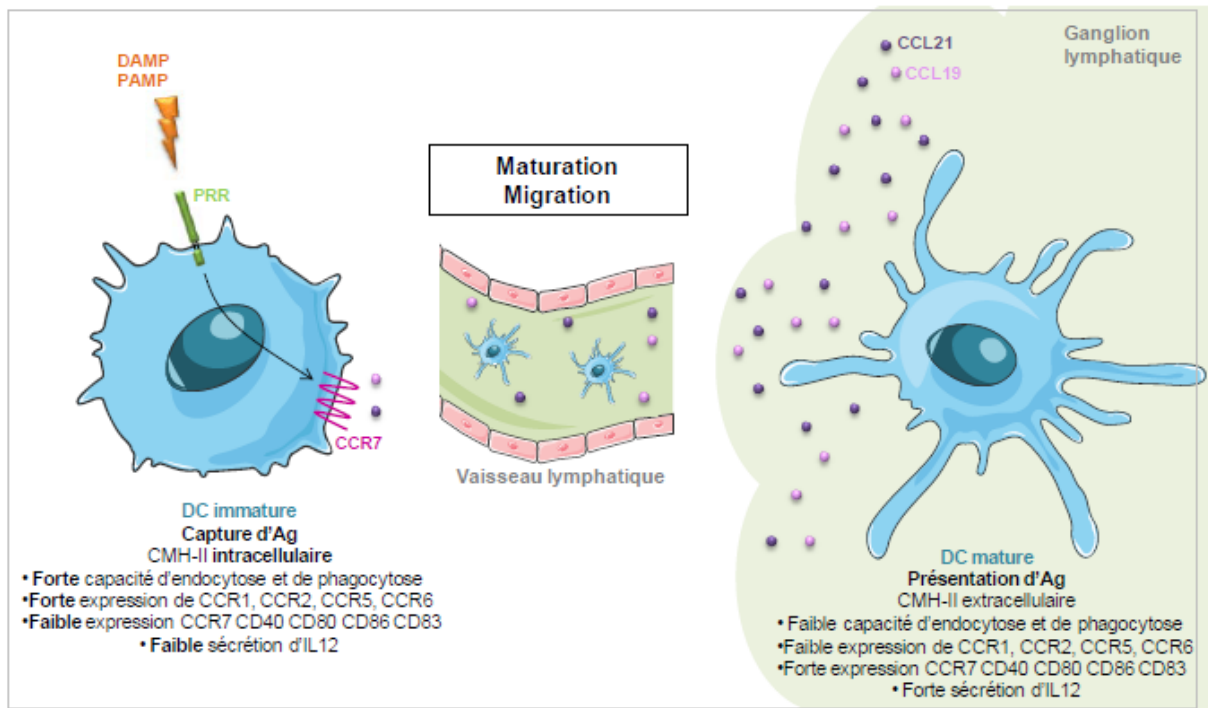


Figure 25. Modifications phénotypiques et fonctionnelles au cours de la maturation des cellules dendritiques.

(d'après (Toebak et al., 2009))

Un autre changement induit par la maturation des cDC est l'acquisition de la fonction de CPA. Les cDC vont ainsi perdre leur capacité d'endocytose/phagocytose et elles vont augmenter leur expression des molécules de CMH II. Alors que les cDC immatures expriment constitutivement, à leur surface, un nombre constant de complexe CMH-peptide qui sont continuellement recyclés, l'activation des cDC va conduire à l'augmentation temporaire de la capture des antigènes et de la synthèse des molécules de CMH II qui sont acheminées vers les endosomes contenant les antigènes (Sichien *et al.*, 2017). Cette augmentation est rapidement inhibée par la perte, due à la maturation des DC, de l'expression du facteur de transcription CIITA qui contrôle l'expression du CMH II, ce qui conduit à une diminution du recyclage des molécules de CMH II. De plus la maturation des cDC entraîne l'arrêt de l'ubiquitination des molécules de CMH, ce qui provoque une accumulation des complexes CMH-peptide à la surface. Ces mécanismes permettent aux cDC matures de présenter pendant plusieurs jours les antigènes aux LT (Kaplan *et al.*, 2012; Macri *et al.*, 2017; Sichien *et al.*, 2017).

Contrairement aux cDC, les pDC migrent directement de la moelle osseuse vers les zones riches en LT. Elles peuvent ensuite être recrutées sur le site d'inflammation lors d'une infection virale ou d'une maladie auto-immune, notamment via l'expression de CMKLR1 (*Chemokine-like receptor-1*) qui reconnaît la chémérine, une chimiokine produite par les vaisseaux sanguins enflammés (Macri *et al.*, 2017). De plus, chez les pDC, le facteur de transcription CIITA reste fonctionnel et l'ubiquitination des molécules de CMH II est maintenue. Le recyclage des complexes CMH-peptide est donc conservé. Cette absence d'accumulation des complexes à la surface des pDC explique leur plus faible efficacité dans la présentation des antigènes exogènes, particulièrement lorsque la quantité d'antigène est faible. En revanche, cette propriété confère aux pDC la capacité de présenter efficacement les Ag endogènes, disponibles en permanence. De plus, lors d'une infection virale, contrairement aux cDC matures infectées, les pDC conservent la capacité de présenter les Ag viraux.

Les DC immatures dérivées de monocytes sont caractérisées par l'expression membranaire d'au moins deux marqueurs spécifiques, le DC-SIGN et le CD1a. Le DC-SIGN permet notamment une endocytose spécifique et rapide, lors de la reconnaissance de son ligand. Il facilite également les interactions physiques directes des DC avec les LT (Garcia-Vallejo and van Kooyk, 2013). Le DC-SIGN est exprimé par les DC immatures dans les tissus périphériques et par les DCs matures dans les organes lymphoïdes.

Le CD1a est une glycoprotéine appartenant à la famille des CD1. Cette famille de protéines contribue, comme les molécules du CMH I et CMH II, à la présentation de l'antigène aux LT. Elle est spécialisée dans la présentation des antigènes lipidiques, glycolipidiques et lipopeptidiques. Les molécules de la famille des CD1, dont le CD1a, sont fortement exprimées sur les DC immatures dérivées de monocytes. En effet, alors que l'expression membranaire des molécules du CMH dépend de la maturation des DCs, l'expression du CD1a est beaucoup plus élevée dans les iDC que dans les DC

matures. Cette particularité rend les iDC capables de présenter aux LT les antigènes spécifiquement associés au CD1a, ce qui permet, en court-circuitant le processus de maturation, de déclencher une réponse des LT spécifique plus rapide (Cao *et al.*, 2002; Schlitzer *et al.*, 2015).

Les iDC expriment faiblement les molécules de CMH II. Les molécules de costimulation ne sont pas (CD80), ou légèrement (CD86), exprimées. Enfin, elles ont une capacité de présentation des peptides antigéniques aux LT très modeste (Banchereau and Steinman, 1998; Banchereau *et al.*, 2000).

Lorsque les moDC sont activées, un changement du profil migratoire des DC s'opère. La maturation se traduit par l'acquisition du récepteur de surface CCR7. Ce récepteur reconnaît les chimiokines CCL19 et CCL21, exprimées par les vaisseaux lymphatiques et les organes lymphoïdes secondaires. L'expression de CCR7 permet à la moDC de quitter les tissus et de gagner les ganglions drainant la zone d'inflammation (Schlitzer *et al.*, 2015). Pendant leur migration, elles continuent d'être soumises au processus de maturation jusqu'au ganglion lymphatique où elle stimule les LT naïfs. Les moDC matures sont caractérisées, en plus de l'expression de CCR7, par une expression membranaire importante des molécules de CMH II, des molécules de costimulation CD80 et CD86, et de CD83 (Mbongue *et al.*, 2017).

Le CD83 est une glycoprotéine de 45 kDa, appartenant à la superfamille des immunoglobulines, décrit comme un marqueur spécifique de moDC matures (Zhou and Tedder, 1995). En effet, les monocytes et macrophages expriment le CD83, mais de façon transitoire, contrairement aux moDC matures qui l'expriment de manière stable. Cependant, le CD83 a été décrit comme étant exprimé par de nombreux autres types cellulaires comme les LT, les LB, les neutrophiles activés ou les cellules épithéliales thymiques (Breloer and Fleischer, 2008). Les fonctions de ce marqueur ne sont pas très bien connues (Mbongue *et al.*, 2017). Cependant, l'extinction de CD83 dans les moDC, avec des siRNA (*short Interfering RNA*), réduit leur capacité de

stimulation des LT, suggérant donc un rôle essentiel du CD83 dans ce processus d'activation.

Les molécules de costimulation CD80 (ou B7-1) et CD86 (B7-2) sont exprimées de manière abondante à la surface des DC matures (Peiser *et al.*, 2014). Ces ligands interagissent avec la molécule CD28, exprimée constitutivement par les LT, mais avec des affinités différentes. En effet, l'affinité de CD80 pour CD28 est supérieure à celle de CD86. Lors de la présentation de l'antigène couplée au CMH, la liaison des molécules de costimulation à leur récepteur est responsable d'une sécrétion optimale d'IL-2 et d'une forte expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25) dans les LT (Sharpe and Freeman, 2002).

L'expression de CD40 par les DC fournit un autre signal de costimulation via son interaction avec CD40L (CD154) exprimé par les LT (Mbongue *et al.*, 2017). La maturation des DC s'accompagne aussi d'une augmentation de l'expression des molécules d'adhérence qui participent au fonctionnement de la synapse immunologique.

Les différences dans les modifications induites par leur maturation rendent les cDC, pDC et moDC complémentaires dans l'activation des LT.

Une autre modification intervient lors de la maturation des DC et contribue également à la migration vers les ganglions lymphatiques. Cet événement concerne les métalloprotéases matricielles (MMP). Elles constituent une famille de protéases comprenant les collagénases et les gélatinases (Forster *et al.*, 2012; Saalbach *et al.*, 2015) et sont exprimées à la surface des cellules immunitaires telles que les DC. Ces molécules permettent la protéolyse et la dégradation des composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, permettant le détachement des DC de la membrane basale (Saalbach *et al.*, 2015). Parmi les MMP, la MMP-2 et la MMP-9 sont les principales impliquées dans la dégradation du collagène (Toebak *et al.*, 2009). La MMP-9 (gélatinase B) est sécrétée sous forme d'une pro-enzyme inactive (pro-MMP-

9) par différents types cellulaires tels que les macrophages, les monocytes et les DC activés. La pro-MMP-9 est ensuite clivée par d'autres MMP telles que la MMP-2 (gélatinase A), la MMP-3 (stromélysine-1) et la MMP-13 (collagénase 3) et peut agir à la fois comme une protéase sécrétée ou une protéase membranaire.

5.2.9. Activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques matures

Après avoir capturé et endocyté l'allergène, acquis un phénotype mature et migré jusqu'aux ganglions drainants, les DC vont interagir avec les LT naïfs pour leur présenter l'allergène. La reconnaissance de l'allergène induit chez le lymphocyte T la réorganisation de la membrane plasmique et du cytosquelette sous-jacent. Il se forme alors à la jonction entre le lymphocyte T et la DC un contact étroit appelé « synapse immunologique » (**Figure 26**).

Les DC vont ainsi pouvoir délivrer aux LT des signaux d'activation, de prolifération et de différenciation. L'interaction DC-lymphocyte implique un dialogue dans les deux sens faisant intervenir la reconnaissance du complexe CMH-peptide (CMHp) par le récepteur TCR associé à la machinerie de signalisation CD3, les molécules du CMH, les molécules de costimulation et les molécules d'adhérence (Bajenoff *et al.*, 2003; Kimber and Pallardy, 2014). Les DC vont intervenir dans ce dialogue comme activateurs mais aussi comme régulateurs de la réponse immunitaire car elles vont polariser les LT et les orienter vers la voie de différenciation la plus adaptée à l'agression. L'activation efficace des LT va aboutir à leur expansion clonale et à leur différenciation en cellules effectrices et en cellules mémoire. Une interaction avec des DC matures est nécessaire pour une survie à long terme des LT et la différenciation en cellules mémoire.

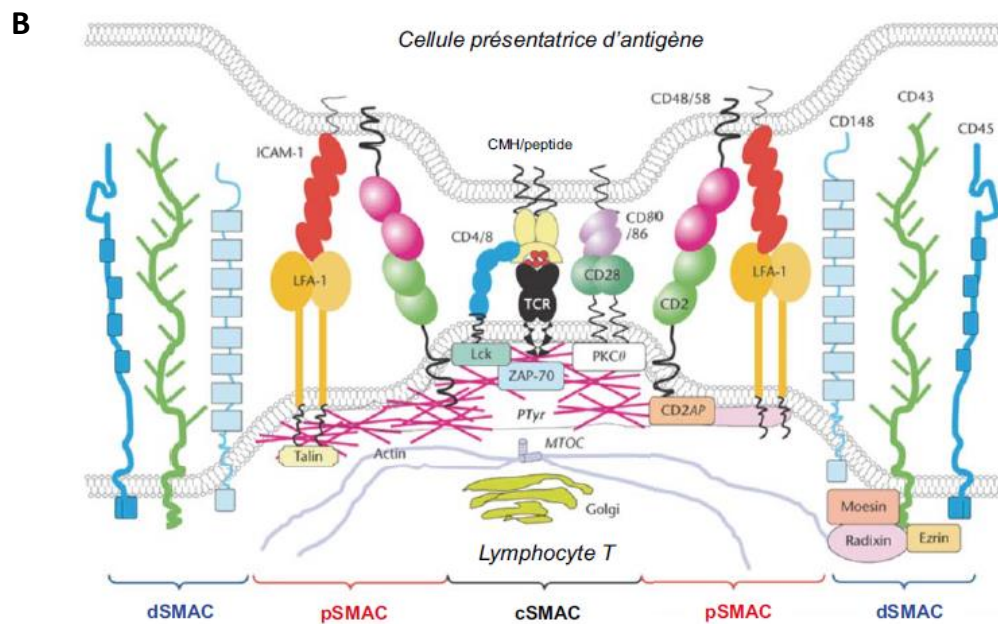
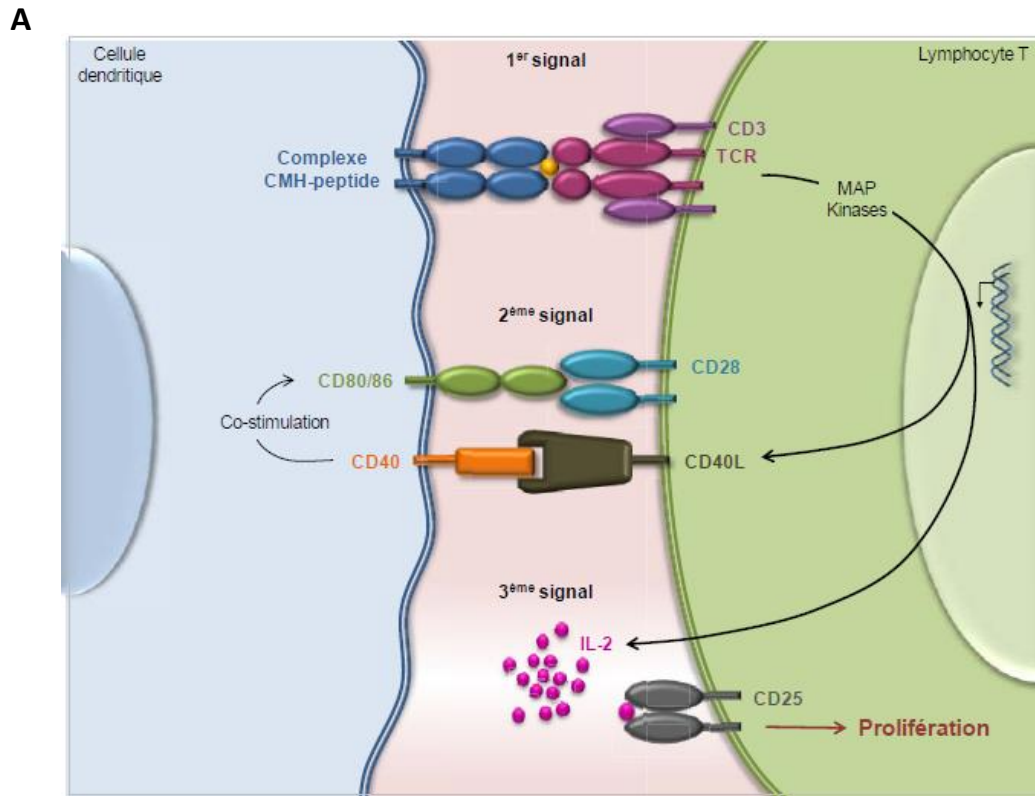


Figure 26. Organisation de la synapse immunologique entre les LT et les DC.

A : Représentation schématique de la synapse immunologique et des 3 signaux d'activation des LT ; **B** : Architecture de la synapse immunologique (vue latérale et verticale).

(d'après (Huppa and Davis, 2003; Yokosuka and Saito, 2010))

Le comportement des LT est très différent selon qu'ils rencontrent ou non des DC présentant un antigène spécifique. En absence de ce dernier, les LT sont très mobiles, leurs trajectoires sont aléatoires et leurs contacts avec les DC sont nombreux mais courts. Le comportement des LT change radicalement quand les DC présentent à leur surface des antigènes spécifiques. La vitesse de déplacement des LT va diminuer et la durée de contact avec les DC va augmenter progressivement permettant la mise en place de la synapse immunologique. La quantité d'antigène présentée par les DC et l'affinité du TCR pour ces antigènes sont des paramètres pouvant moduler la cinétique d'activation des LT (Mempel *et al.*, 2004; Henrickson *et al.*, 2008; Louis-Dit-Sully *et al.*, 2014).

La formation de la synapse immunologique entraîne une restructuration du cytosquelette des LT menant à la formation de complexes supramoléculaires concentriques (Huppa and Davis, 2003; Yokosuka and Saito, 2010; Kulpa *et al.*, 2013). La partie centrale appelée cSMAC (*central Supramolecular Activation Cluster*) comprend le TCR, interagissant avec le CMHp, les molécules de costimulation CD28 - CD80/86, des protéines tyrosines kinases come Lck (*Lymphocyte specific protein tyrosine Kinase*), Fyn et Zap 70 (*ζ-chain (TCR) associated protein kinase 70 kDa*), et la protéine kinase PKC θ qui participent à la transduction du signal TCR (Kulpa *et al.*, 2013). A la périphérie, se trouve la région pSMAC (*peripheral Supramolecular Activation Cluster*), composée des molécules d'adhésion, notamment ICAM-1 (*Intracellular Adhesion Molecule 1*) et LFA-1 (*Lymphocyte Function associated Antigen 1*) (Yoshida *et al.*, 2003; Kulpa *et al.*, 2013). Un troisième complexe a été identifié également et se nomme dSMAC (*SMAC distal*). Il est composé notamment de la phosphatase CD45 ou du CD43 responsables d'un fort encombrement stérique au niveau de la synapse. La synapse immunologique facilite la transmission efficace du signal d'activation aux LT et confère une stabilité à l'interaction du lymphocyte à la DC (**Figure 26**).

L'interaction entre les DC et les LT est un processus complexe et ordonné, qui fait intervenir de nombreux signaux membranaires ou solubles habituellement classés en

3 catégories (**Figure 26**). Le signal 1 consiste en la reconnaissance par le lymphocyte via son TCR du complexe CMHp porté par la DC (Huppa and Davis, 2003).

Les TCR sont des récepteurs membranaires caractéristiques des LT qui leur procurent la propriété de reconnaître de manière spécifique des fragments peptidiques antigéniques associés aux molécules du CMH (Yokosuka and Saito, 2010; Louis-Dit-Sully *et al.*, 2014). Le TCR est un hétérodimère extrêmement polymorphe au sein de l'individu constitué de deux chaînes polypeptidiques α/β pour la majorité des LT, ou γ/δ pour une minorité des LT. Ces chaînes contiennent des régions hypervariables. Chaque chaîne est constituée de 4 domaines : un domaine variable (noté $V\alpha$ ou $V\beta$) interagissant avec l'Ag et à l'origine du polymorphisme des TCR ; un domaine constant (noté $C\alpha$ ou $C\beta$) ; une région transmembranaire et une région intracytoplasmique très courte. Enfin, les chaînes α et β sont associées entre elles par un pont disulfure. Les TCR $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ sont associés sur la membrane des LT au complexe moléculaire CD3, nécessaire pour leur expression en surface (**Figure 26**). CD3 assure la transduction des signaux provoqués par l'interaction des TCR avec l'antigène. Le complexe TCR/CD3 est également associé pour la majorité des $LT\alpha\beta$, à des molécules invariantes, dites « corécepteurs » CD4 ou CD8, qui interagissent respectivement avec les molécules du CMH II ou CMH I et participent à la transduction du signal activateur par CD3. La grande diversité des TCR (plus de 10^7 /individu) repose sur un codage génétique particulier, provenant d'un réarrangement génique des chaînes α et β ou γ et δ , ce qui contribue à la formation du répertoire T. Il est important de préciser qu'un lymphocyte ne possède qu'un seul type de TCR exprimé en plusieurs exemplaires (Janeway *et al.*, 2009).

Seul, ce signal 1 ne permet pas l'activation des lymphocytes. Il doit être accompagné par un signal 2, produit par les molécules de costimulation exprimées par les DC et leurs ligands exprimés sur les LT ; citons en particulier, l'interaction des molécules de costimulation CD80/CD86 exprimées par les DC avec CD28, une glycoprotéine exprimée par les LT (Bakdash *et al.*, 2013). L'engagement du CD28 en synergie avec celui du TCR induit la sécrétion d'IL-2. L'IL-2, facteur d'expansion et de différenciation,

agit de manière autocrine et paracrine, jouant un rôle essentiel dans la prolifération des LT. Une fois activées, les cellules T expriment CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) (CD152) qui possède une affinité supérieure à celle du CD28 pour les molécules CD80/CD86. CTLA-4 délivre un signal négatif à la cellule T activée, permettant une régulation négative de la réponse immune. Le contact intercellulaire permet l'internalisation du TCR ce qui entraîne diminution de l'expression de LFA-1. Graduellement, le contact entre les cellules se dissipe. Simultanément, le LT accroît l'expression des molécules de régulation négative CTLA-4 et PD-1 (*Programmed cell death 1*).

CTLA-4 est une glycoprotéine transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines. Contrairement au CD28, le CTLA-4 n'est pas constitutivement exprimé par le LT naïf mais induit chez les LT activés (Kulpa *et al.*, 2013). La molécule CTLA-4 possède 100 fois plus d'affinité pour le CD80 et le CD86 que la molécule CD28. Le CTLA possède un motif ITIM (*Immune receptor tyrosine inhibitory motif*) permettant le recrutement des phosphatases SHP-1 (*Src homology domain-containing phosphatase*) et SHP-2. Ces phosphatases déphosphorylent les sous-unités CD3, inhibant ainsi l'activation des LT (Kulpa *et al.*, 2013).

PD-1 est une glycoprotéine induite à la surface des LT activés. Elle est exprimée par différentes cellules immunitaires telles que les LT, les Treg, le LB, les DC, les cellules NK, et les monocytes activés. Le ligand PD-L1 (B7-H1) est exprimé par les LT, les LB, les DC, les macrophages et les mastocytes tandis que l'expression de PD-L2 (B7-DC) est limitée aux DC et aux macrophages. La liaison de PD-1 à ses ligands PDL-1 et PDL-2 inhibe l'activation des LT. De plus, le récepteur PD-1 possède un motif ITIM et un motif ITSIM (*Immune receptor switch motif*) qui se lie aux phosphatases SHP-1 et SHP-2 transmettant ainsi un signal inhibiteur aux LT caractérisé par une diminution de l'expression de Bcl-xl (protéine anti-apoptotique essentielle à la survie des LT activés) aboutissant à l'apoptose (Kulpa *et al.*, 2013).

L'interaction soutenue de CTLA-4 et PD-1 avec leurs ligands respectifs CD80/CD86 et PDL-1 inhibe la cascade de signalisation du TCR. Cela informe la cellule T qu'elle doit se

détacher de la CPA pour proliférer et se différencier (Yokosuka and Saito, 2010; Kulpa *et al.*, 2013).

CD40 et Ox40 (CD134), deux membres de la superfamille des récepteurs du TNF jouent également un rôle important dans l'activation des LT (Chen and Flies, 2013). La liaison du CD40, marqueur d'activation de la DC, à son ligand CD40L (ou CD154), amplifie le processus d'activation des LT en induisant une forte production de cytokines, tout particulièrement de l'IL-12, et l'induction d'autres molécules de costimulation comme Ox40 (Summers deLuca and Gommerman, 2012). Le blocage de l'interaction CD40-CD40L par un anticorps monoclonal anti-CD40L inhibe la génération d'une réponse Th1 et entraîne la production de cytokines de la voie Th2 telles que l'IL-4 (Hancock *et al.*, 1998). De plus, les DC issues de souris déficientes pour CD40 induit un état de tolérance via l'induction de LTreg sécréteurs d'IL-10 (Martin *et al.*, 2003).

L'interaction d'Ox40, présent sur les LT naïfs et de son ligand Ox40-L (CD252), à la surface des DC, renforce l'expression de CD80 et CD86 à la surface des DC (Chen *et al.*, 1999). Par ailleurs, des souris invalidées pour le gène Ox40l développent une HSC et une prolifération lymphocytaire diminuées en réponse à l'oxazolone ou au DNFB (Chen *et al.*, 1999).

Les molécules d'adhésion telles qu'ICAM-1 (CD54) et LFA-3 (*Lymphocyte Function associated Antigen-3*) sont exprimées par les DC et lient leurs ligands à la surface des LT, LFA-1 et CD2 respectivement. Leur liaison stabilise l'interaction entre les DC et les LT et délivrent un signal costimulateur en renforçant la prolifération et la différenciation des LT (Bakdash *et al.*, 2013).

Un nombre important d'autres marqueurs de costimulation ou de co-inhibition a été identifié. Leur rôle et leur importance lors de la mise en place de la synapse immunologique ne seront pas développés dans cette revue de la littérature. La figure

27 présente néanmoins les principales molécules costimulatrices ou co-inhibitrices lors de l'amorçage (*priming*) des LT naïfs par les DC matures (**Figure 27**).

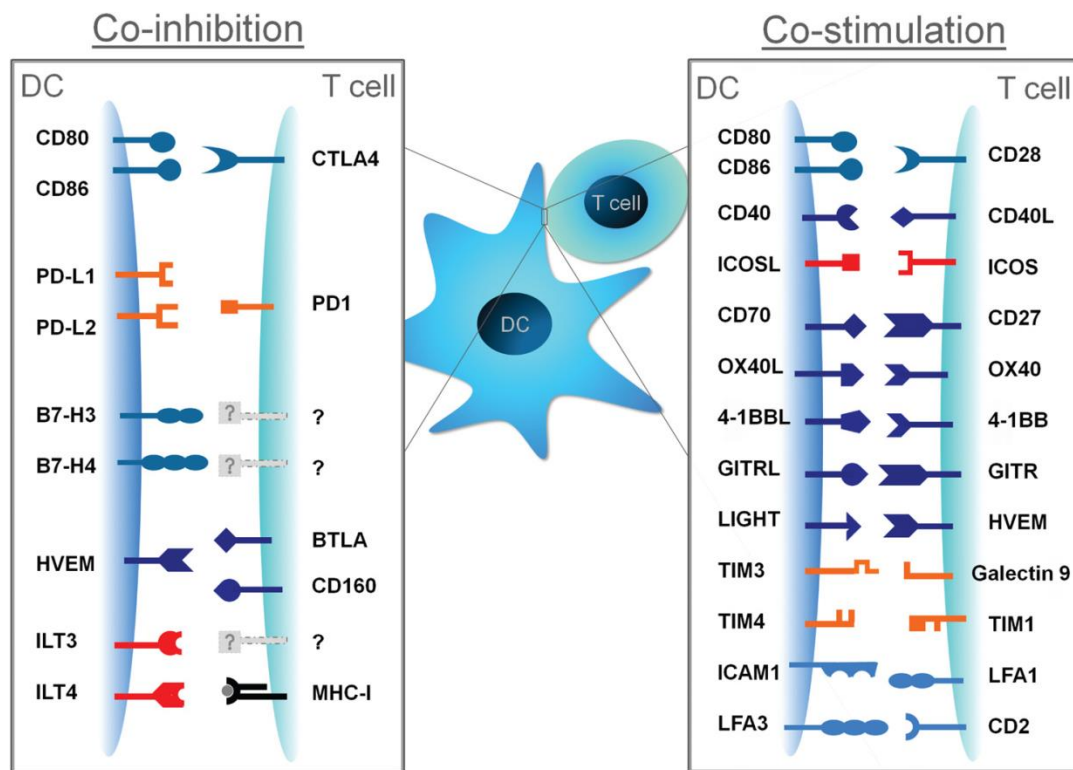


Figure 27. Principales molécules costimulatrices et co-inhibitrices lors du priming des LT naïfs par les DC matures.

(d'après (Bakdash et al., 2013))

5.2.1. La polarisation de la réponse immunitaire

Afin d'identifier les processus cruciaux dans la pathogenèse des allergies, il est essentiel de comprendre comment le développement des LT se produit. Après avoir été soumis aux sélections positives et négatives dans le thymus, les LT ayant atteint leur maturité entrent dans la circulation sanguine. A ce stade, ils sont qualifiés de naïfs, car ils n'ont pas encore rencontré l'antigène reconnu par leur TCR. Les LT naïfs ont une durée de vie de plusieurs années et restent jusqu'à leur activation dans un état quiescent. La fréquence de LT naïfs spécifiques d'un antigène donné est très faible (de l'ordre de 1

pour 100000 cellules). L'activation et la polarisation d'une cellule T se différencient à partir d'un précurseur naïf sont déterminées par son interaction avec les DC. Ces événements dépendent d'une multitude de facteurs. Citons entre autres les cytokines présentes dans l'environnement, les molécules de costimulation, le type et la quantité d'antigène présenté ainsi que de la cascade de signalisation. Les LT naïfs peuvent rejoindre les organes lymphoïdes secondaires ou circuler d'une façon continue d'un organe à un autre jusqu'à la reconnaissance spécifique d'un antigène présenté par le CMH I pour les LT CD8⁺ ou le CMH II pour le LT CD4⁺. Cette réponse primaire comporte généralement 4 phases : une phase d'activation suivie d'une phase d'expansion clonale, d'une phase de contraction clonale et d'une phase de maintien des cellules mémoires.

La différenciation des LT naïfs en LT *helper* et cytotoxiques est dépendante de la présence de cytokines secrétées au cours de l'interaction entre les DC et les LT. La sécrétion de cytokines par les DC constitue le signal 3 de la synapse immunologique ; en l'absence de celui-ci, il n'y a pas de polarisation lymphocytaire T malgré le phénotype mature des DC. Après avoir endocytées un haptène et migrées jusqu'aux ganglions drainants, les DC vont activer des LT CD4⁺ et LT CD8⁺ spécifiques de cet haptène (Vocanson *et al.*, 2009b). 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_{FH} (T *follicular helper*), qui sécréteront à leur tour des cytokines spécifiques (Akdis *et al.*, 2012).

L'orientation de la réponse immunitaire dépend du stimulus de maturation mais aussi d'autres facteurs comme le type de DC impliquées, la cinétique de la maturation, la concentration en antigène lors du chargement des DC, ou le ratio entre DC et LT (Tanaka *et al.*, 2000; Hopken *et al.*, 2005; Toebak *et al.*, 2009; Swain *et al.*, 2012).

5.3. Les lymphocytes T

Contrairement à l'immunité innée qui fait face immédiatement aux agents pathogènes, la mise en route d'une réponse immunitaire adaptative efficace prend plus de temps. En effet, la mise en place d'une réponse adaptative nécessite la capture d'antigènes par les CPA, la migration de ces dernières dans les organes lymphoïdes secondaires (rate / ganglions), l'apprêtement et la présentation des antigènes aux LT pour activer ces derniers. Les LT CD4, instruits par les signaux environnants, ont la capacité de se différencier en plusieurs sous-populations effectrices, responsables de la mise en place de réponses spécifiques et adaptées.

La génération aléatoire du répertoire des LT permet à un faible nombre seulement de cellules d'être capable de répondre spécifiquement à un pathogène donné. La mise en place d'une réponse T nécessite une phase d'expansion clonale permettant de générer une population lymphocytaire conséquente à partir des clones ayant reconnu l'antigène ainsi que la migration de ces cellules au site de l'infection.

5.3.1. Les lymphocytes T CD4⁺

Au cours de la dernière décennie, le spectre des sous-populations de lymphocytes T CD4 s'est considérablement élargi (Sun and Zhang, 2014). La diversité de ces sous-populations effectrices révèle l'ensemble des activités que peuvent exercer les LT CD4 dans leur fonction auxiliaire (*helper*). Les cellules naïves T CD4⁺, activées par le complexe CMHp de la DC, commencent à produire de l'IL-2 et sont nommées Th0. Sous l'influence de l'environnement cytokinique, les Th0 se polarisent en différents sous-types de cellule T CD4⁺ effectrices (Crotty, 2014; Sun and Zhang, 2014; Tumes *et al.*, 2017). Les DC sont capables, via la sécrétion de différentes cytokines comme l'IL-12, l'IL-4, l'IL-6 ou le TGF- β (Transforming Growth Factor), d'induire l'expression de facteurs de transcription nécessaires à la différenciation des LT CD4⁺ en Th1, Th2, Th9,

Th17, Th22 ou Treg (**Figure 28**) (Tumes *et al.*, 2017). Ces sous-populations sont en partie définies par le profil de cytokines (signature cytokinique) qu'elles produisent.

5.3.1.1. Les lymphocytes Th1

En réponse à des pathogènes intracellulaires, tels que les virus ou bactéries, les DC, induisent une réponse de type Th1. En effet, la sécrétion d'IL-12 et d'IFN- γ par les DC conduit à l'expression, chez les LT, du facteur de transcription T-bet (*T Box Transcription*) et STAT4 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-4*), ainsi qu'à la production d'IFN- γ , d'IL-2 et de TNF- α , caractéristiques des Th1 (**Figure 28**) (Zhang *et al.*, 2014b).

T-bet est peu abondant dans les LT CD4 naïfs. Suite aux signaux induits par la stimulation du TCR, son expression augmente via un ensemble d'interactions faisant intervenir notamment la voie mTORC1/akt et menant à l'activation de STAT4 (Delgoffe *et al.*, 2011). Cette signalisation requiert la présence de la GTPase Rheb, activatrice de mTORC1. Parallèlement l'IL-12 sécrétée par les DC se lie à son récepteur IL-12R et induit à son tour l'expression du facteur T-bet via STAT4. Seul ou complexé avec d'autres protéines, le facteur T-bet assure la régulation des gènes de l'IL-2, de l'IFN- γ , du TNF- α ou encore du récepteur à l'IL-12 (IL-12R), amplifiant ainsi les mécanismes de la polarisation Th1 (Delgoffe *et al.*, 2011; Sun and Zhang, 2014; Zhang *et al.*, 2014b). T-bet s'avère aussi nécessaire à l'expression de gènes impliqués dans la migration des cellules Th1 vers le site de l'inflammation. Ainsi, il régule positivement l'expression de CXCR3, récepteur des chimiokines CXCL9/CXCL10. Le récepteur CCR5 des chimiokines RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein 1-alpha*), MIP-1 β est aussi exprimé fortement par les populations de Th1 (Zhang *et al.*, 2014b). Les LT CD4⁺ Th1 sécrètent de l'IFN- γ et de l'IL-2 et sont principalement impliqués dans la réaction immunitaire à médiation cellulaire. Ils conduisent à l'activation des LT cytotoxiques et des macrophages qui participent à la réaction immunitaire antitumorale, antivirale mais également dans les

réactions d'hypersensibilité retardée. Ils vont soutenir le développement des fonctions effectrices et l'établissement de la mémoire des LT CD8⁺.

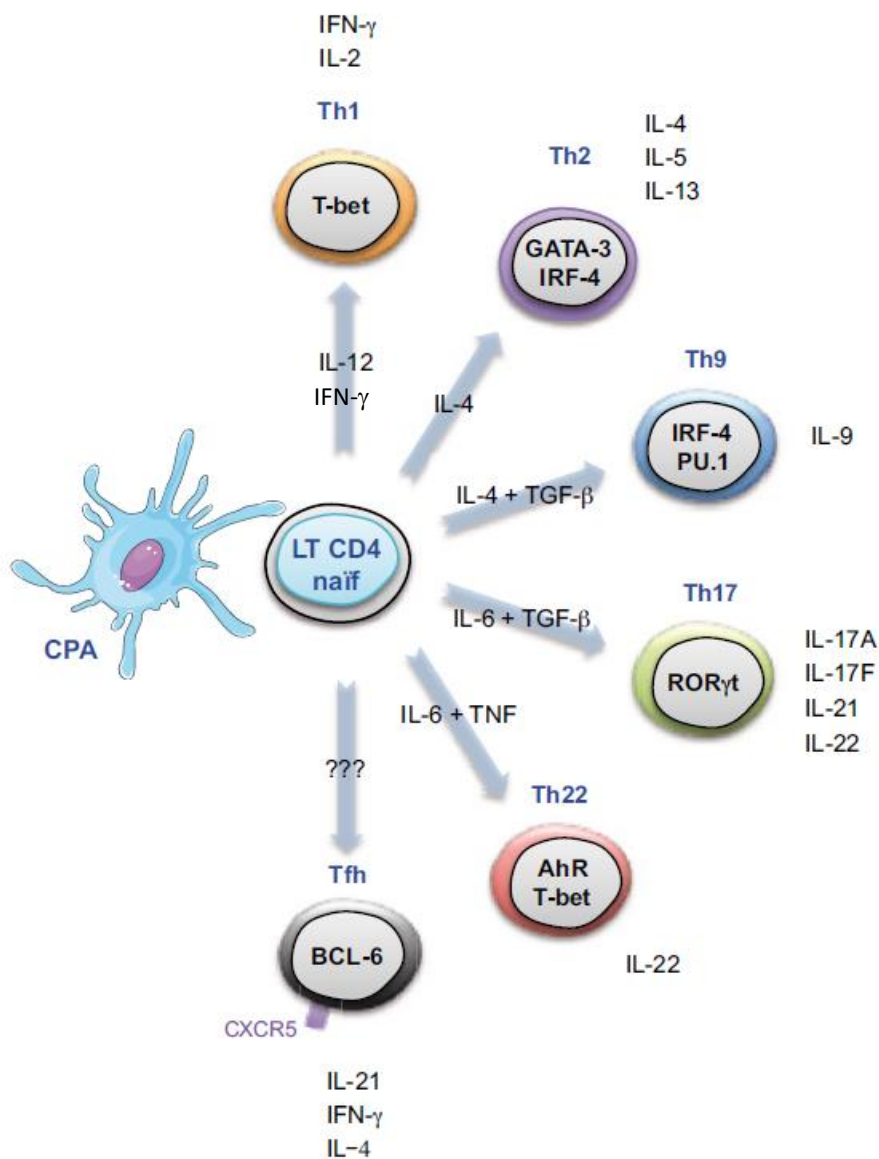


Figure 28. Les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4.

(d'après (Sun and Zhang, 2014))

5.3.1.2. Les lymphocytes Th2

L'absence de sécrétion d'IL-12 et la présence d'IL-4 va orienter la différenciation des LT vers une réponse Th2 avec production d'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13 (Figure 28) (Sun

and Zhang, 2014). La polarisation Th2 est induite par la production d'IL-4, qui active les facteurs de transcription STAT6 et GATA3. La fixation de l'IL-4 sur son récepteur conduit à l'activation du facteur de transcription STAT6, qui, avec NFAT, AP-1 et NF- κ B induit l'expression de l'IL-4 et du facteur de transcription GATA3 (Zhang *et al.*, 2014b). L'expression de GATA3 est requise pour la différenciation en Th2. Cependant, la présence seule de GATA3 ne suffit pas pour permettre la production d'IL-4. L'activation concomitante de STAT5 par l'IL-2 est en effet requise (Zhang *et al.*, 2014a). STAT5 se lie au locus de l'IL-4 à un endroit différent de GATA3 et permet également le maintien de l'expression de GATA3 par les LT CD4 Th2 différenciés. L'expression de GATA3 induit la production d'IL-5 et d'IL-13 et réprime la différenciation Th1 et Th17, notamment grâce à l'augmentation de la production du facteur de croissance indépendant 1 (Gfi-1) qui est un inhibiteur de la production d'IFN γ et d'IL-17. Enfin, le facteur de transcription IRF4 participe, avec NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*), à l'activation du promoteur de l'IL-4 et est essentiel à la différenciation Th2 (Rengarajan *et al.*, 2002).

Les Th2 jouent un rôle important dans la défense humorale contre les parasites et sont également responsables de réactions d'hypersensibilité immédiate médiées par les IgE, et de manière générale dans les réactions d'hypersensibilité immédiate extracellulaire (Peiser *et al.*, 2014; Sun and Zhang, 2014).

5.3.1.3. Les lymphocytes Th17

Les cytokines produites par les Th1 (IFN- γ) inhibent les Th2 et inversement les cytokines produites par les Th2 (IL-4) inhibent les Th1. Ces 2 populations de Th s'inhibent mutuellement. Elles s'auto amplifient aussi, ce qui favorise leur propre développement (Sun and Zhang, 2014). Cependant, la dualité Th1/Th2 a été remise en cause au début des années 2000. En 2000, la découverte de l'IL-23 (Oppmann *et al.*, 2000) et le fait que cette nouvelle cytokine partage avec l'IL-12 la chaîne p40, a conduit à réévaluer le

rôle de ces deux cytokines. L'analyse de souris déficientes pour la sous-unité p40 (absence d'IL-12 et d'IL-23), pour la sous-unité p35 (absence d'IL-12) ou la sous-unité p19 (absence d'IL-23) a montré que l'IL-23 était une cytokine majeure dans la physiopathologie de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). Cette découverte a conduit à l'identification d'un nouveau lignage appelé Th17 caractérisé par la capacité à produire une cytokine fortement pro-inflammatoire, l'IL-17 (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Les lymphocytes Th17 sont impliqués dans la réponse immunitaire anti-infectieuse, mais aussi dans la physiopathologie de plusieurs maladies immunitaires. Ces cellules se différencient en présence de TGF- β et d'IL-6 et expriment les facteurs de transcription ROR γ t et ROR α (**Figure 28**) (Sun and Zhang, 2014; Zhang *et al.*, 2014b). L'IL-6, l'IL-21 et l'IL-23, trois cytokines activatrices de STAT3, jouent des rôles critiques dans la différenciation, l'amplification et le maintien du phénotype des Th17 (Sandquist and Kolls, 2018). L'IL-21 agit de manière autocrine et permet l'amplification de la différenciation Th17 et l'expression du récepteur à l'IL-23. Enfin, l'IL-23 joue un rôle critique dans la différenciation terminale des Th17 en favorisant leur survie et le maintien de leurs fonctions effectrices (Sandquist and Kolls, 2018).

Via leur sécrétion d'IL-17A, d'IL-17F, d'IL-21 et d'IL-22, les LT Th17 jouent un rôle critique lors de réponses immunes contre les bactéries extracellulaires et les champignons. L'IL-17A et l'IL-17F favorisent le développement et le recrutement des neutrophiles aux sites d'inflammation. L'IL-21 et l'IL-17 sont également capables d'engendrer la commutation isotypique chez les LB et la formation de centres germinatifs. Enfin, l'IL-17 peut directement inhiber la différenciation Th1 *in vitro* en inhibant l'expression de T-bet (Sun and Zhang, 2014; Sandquist and Kolls, 2018).

5.3.1.4. Les lymphocytes Th9

L'IL-9 était initialement considérée comme une cytokine Th2, cependant, aujourd'hui, les Th9 sont définis comme une population distincte de LT CD4⁺ « *helpers* » produisant de l'IL-9 mais pas d'IFN- γ , d'IL-4 ou d'IL-17 (Jia and Wu, 2014b). *In vitro*, leur différenciation est dépendante du TGF- β et de l'IL-4. Deux facteurs de transcription capables de se lier au promoteur du gène de l'IL-9 sont connus, PU.1 et IRF4 (**Figure 28**). PU.1 exerce un effet répresseur sur la production de cytokines Th2 et induit la production d'IL-9. IRF4 est également requis, en collaboration avec PU.1, pour la production d'IL-9 (Jia and Wu, 2014b).

L'IL-9 exerce des effets multiples par son action sur les lymphocytes, les mastocytes, les cellules épithéliales et musculaires. Elle augmente la production d'immunoglobulines par les LB et l'expression des protéases et cytokines inflammatoires par les mastocytes (Jia and Wu, 2014b). L'IL-9 est impliquée dans l'inflammation allergique (Shik *et al.*, 2017).

5.3.1.5. Les lymphocytes Th22

L'IL-22, décrite initialement comme sécrétée par les Th17 a permis d'identifier une nouvelle population « *helper* », les LT CD4⁺ Th22 (**Figure 28**) (Duhon *et al.*, 2009; Eyerich *et al.*, 2009; Trifari *et al.*, 2009). Les Th22 sont caractérisés par leur production d'IL-22 et l'absence de production d'IL-17 et d'IFN- γ . Leur différenciation *in vitro* à partir de cellules naïves requiert la présence d'IL-6 et est amplifiée par le TNF (Duhon *et al.*, 2009). Le facteur de transcription AhR, également exprimé par les Th17, est essentiel pour le développement des Th22 (Trifari *et al.*, 2009; Basu *et al.*, 2012; Jia and Wu, 2014a). Son activation inhibe la production d'IL-17 et augmente celle d'IL-22. La coexpression des facteurs de transcription T-bet et AhR (*Aryl hydrocarbon receptor*)

permet de distinguer le lignage Th22 des Th17 par la production de l'IL-22 (Basu *et al.*, 2012; Jia and Wu, 2014a).

Ces cellules expriment les récepteurs aux chimiokines CCR6, CCR4 et CCR10 (Jia and Wu, 2014a). L'expression de CCR10 permet le chimiotactisme en réponse à CCL27 et à CCL28. CCL27 est produite par les kératinocytes et confère ainsi aux Th22 un tropisme cutané. CCL28 est sécrétée par les muqueuses intestinale et pulmonaire et régule ainsi la localisation des Th22 dans les muqueuses. Enfin, CCR6 permet la migration dans certaines parties des intestins, comme les plaques de Peyer, où son ligand CCL20 est exprimé.

Les Th22 sont impliqués dans les désordres inflammatoires cutanés comme le psoriasis ou la DAC (Eyerich *et al.*, 2009; Jia and Wu, 2014a). Les Th22 représentent également une composante importante de l'immunité des muqueuses (Basu *et al.*, 2012).

5.3.1.6. Les Lymphocytes T folliculaires « helpers »

Les LT CD4⁺ folliculaires « *helpers* » (Tfh) présentent un phénotype unique caractérisé par une forte expression de CXCR5 et la perte de l'expression de CCR7, récepteur de localisation dans les zones T (Breitfeld *et al.*, 2000; King, 2009). Ainsi, ces cellules se localisent dans les follicules B ou leur interaction directe avec les LB joue un rôle crucial dans la formation des centres germinatifs et la mise en place de la maturation d'affinité, de la commutation isotypique et des réponses B mémoires (Qi *et al.*, 2014). Les Tfh sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription BCL6 et l'absence d'expression de Blimp-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein*). BCL6 est un antagoniste réciproque de Blimp-1, qui est exprimé par les autres sous-populations de Th (Crotty, 2014). Bcl-6 a été initialement identifié dans les LB dont il contrôle la différenciation dans les centres germinatifs. Par son association avec des cofacteurs différents dans les LT et les LB, BCL6 contrôle de manière différente la différenciation T et B. BCL6 affecte la différenciation T en contrôlant l'expression de miRNAs (*micro*

RNA) et en inhibant la différenciation vers les autres lignages Th (Crotty, 2014; Qi *et al.*, 2014). La différenciation en Tfh est médiée par l'IL-21, l'IL-6 et l'interaction ICOS-ICOSL avec les LB. Les Tfh produisent de l'IL-21 essentielle pour la formation des centres germinatifs. L'IL-21 n'est pas spécifique des Tfh, les Th17 peuvent également en produire. Les Tfh peuvent également produire de l'IFN- γ et de l'IL-4 (Crotty, 2014; Qi *et al.*, 2014).

5.3.1.7. Les Lymphocytes T régulateurs

Les LT régulateurs (Treg) CD4⁺ CD25⁺ découverts en 1995 par l'équipe de Sakaguchi, font partie des mécanismes immunosuppresseurs qui, dans les conditions physiologiques, participent à l'homéostasie immunitaire et au maintien d'une tolérance immunitaire centrale et périphérique (Sakaguchi *et al.*, 1995). La caractérisation du phénotype Treg a été modifiée en 2003 par l'identification d'un nouveau gène appelé FoxP3 (*Forkhead box P3*) (Piccioni *et al.*, 2014; Kitagawa and Sakaguchi, 2017). Il existe deux classes de Treg : les Treg naturels, chez lesquels l'expression du facteur de transcription FoxP3 apparaît dans le thymus et les Treg adaptatifs ou induits, chez lesquels FoxP3 est induit en périphérie. Les Treg naturels, caractérisés par un phénotype CD4⁺CD25⁺, sont présents spontanément sans induction. Cette population est d'origine thymique et représente environ 5 % des LT circulants (Piccioni *et al.*, 2014). Les Treg expriment de façon non spécifique des molécules de surface comme CTLA-4 (CD152), GITR (*glucocorticoidinduced tumor necrosis factor family related gene*), mTGF- β (*membrane-tethered transforming growth factor*), PD-1, CD73 (chez la souris uniquement) et CD39 (Piccioni *et al.*, 2014; Kitagawa and Sakaguchi, 2017). Chez l'Homme comme chez la souris, les Treg expriment le récepteur aux chimiokines CCR4 plus fréquemment que les LT conventionnels.

Les mécanismes de régulation exercée par ces populations de cellules Treg sont relativement indépendants de la production de cytokines exogènes, mais dépendent d'un contact cellulaire. Les Treg naturels semblent par ailleurs capables d'induire des Treg induits à partir de Th conventionnels (Piccioni *et al.*, 2014; Kitagawa and Sakaguchi, 2017). La seconde catégorie de Treg est constituée de Treg dits induits. Ces cellules se différencient en périphérie lors de la maturation de LT CD4⁺, dans des conditions particulières. L'apport de TGF- β exogène, mais aussi celui d'IL-10 par la DC, associés à une faible stimulation par des molécules CD80-86/CD28 semblent nécessaires à leurs différenciations (Kryczek *et al.*, 2009; Piccioni *et al.*, 2014). Les Treg naturels peuvent contribuer à cette différenciation par apport d'IL-10 exogène.

Le mode d'action de ces Treg induits semble être favorisé préférentiellement par la production de cytokines suppressives comme l'IL-10 et le TGF- β plutôt que par contact cellulaire. Il a été montré également que ces cellules exercent également des fonctions suppressives via la production d'IL-35 (Collison *et al.*, 2007). La régulation par sécrétion d'IL-10 semble un mécanisme commun aux Treg naturels et aux Treg induits antigènes spécifiques (appelés également Tr1). L'IL-10 a d'abord été décrite comme une cytokine spécifiquement Th2 car inhibitrice de la sécrétion des cytokines Th1. Il semble toutefois que cette cytokine, effectivement produite dans un contexte Th2, ait un rôle immunorégulateur plus général en inhibant les réactions inflammatoires à plusieurs niveaux (Schulke, 2018). L'IL-10 inhibe la différenciation des DC à partir des monocytes circulants, la production de cytokines par les mastocytes ainsi que la survie et la fonction des éosinophiles. Chez l'Homme, l'IL-10 présente par ailleurs la capacité d'inhiber les réponses de type Th1. Elle bloque en effet la production d'IL2, d'IFN- γ par les Th1 mais aussi d'IL-4 et d'IL-5 par les Th2 en interférant avec les voies de signalisation CD28-CD80 dépendantes (Schulke, 2018). L'IL-10 est en effet capable d'agir directement sur la transduction intracellulaire du signal généré par le CD28 et de diminuer les signaux de costimulation (Akdis *et al.*, 2000).

Le second mécanisme de suppression implique l'activité cytotoxique des Treg. Cette cytotoxicité serait médiée par la sécrétion de perforine et de granzyme A et B, et toucherait les cellules T effectrices, les monocytes et les cellules dendritiques (Piccioni *et al.*, 2014).

Enfin, un troisième type de régulation par les Treg est envisagé via l'interaction avec certaines voies métaboliques des LT effecteurs. Il a récemment été montré que certaines sous-populations de Treg expriment deux enzymes membranaires, le CD39 et le CD73, qui permettent d'hydrolyser l'ATP et de libérer des quantités très importantes d'adénosine extracellulaire. Ce produit du catabolisme de l'ATP, active un récepteur spécifique, le récepteur à l'adénosine 2A, qui permet d'une part d'inhiber les fonctions effectrices des LT, et d'autre part, maintient une anergie et facilite la génération de Treg adaptatifs en favorisant la production de TGF- β par les cellules cibles (Deaglio *et al.*, 2007; Piccioni *et al.*, 2014).

De nombreuses données suggèrent l'implication des Treg, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ dans la résolution de pathologies allergiques, avec un rôle apparemment prédominant de l'IL-10 comparé à celui du TGF- β (Schulke, 2018). Comparés aux individus non allergiques, les individus allergiques présentent une augmentation de la fréquence des cellules T sécrétrices d'IL-4 spécifiques de l'allergène et une diminution de la fréquence des Treg sécrétant de l'IL-10 (Akdis *et al.*, 2004). De plus, les profils cytokiniques observés dans une cohorte d'enfants allergiques et non allergiques montrent qu'une augmentation des taux d'IL-4, IL-5, IL-13 est associée avec l'allergie et que l'IL-10 produite par les Treg, est associée avec une réactivité négative (Holgate, 2012). Les Treg CD4⁺CD25⁺ pourraient aussi supprimer la réponse allergique vis-à-vis d'allergènes inhalés (Bellinghausen *et al.*, 2005).

Il est important de signaler qu'il existe une certaine plasticité entre les différents profils de LT CD4⁺ décrits ci-dessus (Tumes *et al.*, 2017). Cette plasticité est sous le contrôle de modifications épigénétiques des gènes cibles de facteurs de transcription, résultant en une adaptation des cellules T effectrices au contexte immunologique dans lequel

elles se trouvent. Par exemple, des cellules Th17 peuvent, sous l'effet de l'IL-12, produire de l'IFN- γ plus caractéristique d'un profil Th1 (Tumes *et al.*, 2017).

5.3.2. Les lymphocytes T CD8⁺

Les LT CD8⁺ sont des cellules de l'immunité adaptative capables, après activation, de reconnaître et d'éliminer des cellules infectées ou des protéines du soi modifiées. La réponse immunitaire des LT CD8⁺ peut être initiée lorsqu'un LT CD8⁺ naïf reconnaît un antigène fixé sur une molécule du CMH de classe I à la surface des CPA. Lorsque le LT CD8⁺ reçoit en outre les co-sigaux nécessaires à une activation optimale, celui-ci entre alors dans une phase d'expansion clonale, caractérisée par une amplification du nombre de LT spécifiques de l'antigène et par une différenciation des cellules en LT CD8 effecteurs capables de reconnaître et de lyser les cellules infectées (**Figure 29**) (Williams and Bevan, 2007; Harty and Badovinac, 2008). Une partie de ces cellules va ensuite se différencier pour former un pool de cellules mémoires capable de répondre plus rapidement et plus efficacement lors d'une réinfection par le même pathogène. La réponse primaire d'activation des LT CD8⁺ naïfs peut se diviser en 3 parties (**Figure 29**) :

- une phase d'activation et d'expansion clonale,
- une phase de contraction clonale et
- une phase de maintien des cellules mémoires.

La première phase de la réponse primaire est caractérisée par la présentation spécifique d'un antigène par les CPA et la reconnaissance spécifique de cet antigène par le LT naïf. Cette première phase est suivie par une phase de division cellulaire où le nombre de LT CD8⁺ activés croît de façon exponentielle. Durant cette phase les LT CD8⁺ vont se différencier et acquérir des fonctions effectrices comme la cytotoxicité et la capacité à sécréter différentes cytokines. Cette première phase est suivie d'une

phase de contraction au cours de laquelle 90 % environ des LT effecteurs meurent par apoptose (Kaech *et al.*, 2002; Badovinac and Harty, 2006). La fraction de la population des LT spécifiques de l'antigène maintenue va se différencier en cellules mémoires (Williams and Bevan, 2007).

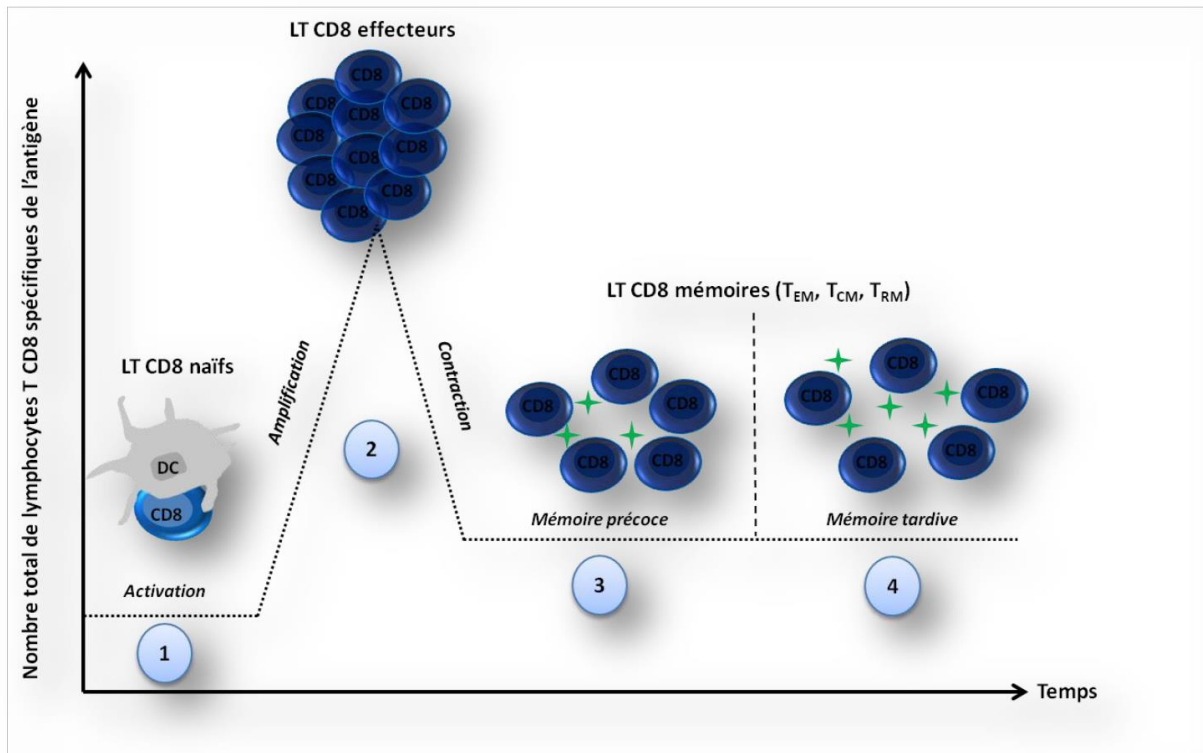


Figure 29. La réponse primaire adaptative conduit à l'édification de la mémoire immunologique.

(d'après (Williams and Bevan, 2007; Harty and Badovinac, 2008))

L'activation des LT CD8⁺ conduit à la différenciation en cellules effectrices et à une modification profonde du métabolisme de la cellule. Lors de la stimulation spécifique des LT CD8⁺ par le complexe CMHp, le complexe TCR-CD3 va induire une cascade de signalisation impliquant de nombreuses protéines intracellulaires comme Lck, ZAP-70 ou Fyn. Ces modifications intracellulaires se traduisent également par une modification phénotypique avec une expression différentielle de nombreuses molécules de surface qui vont permettre d'identifier les cellules activées : CD25, CD40L, CD69, CD71, Ki67, CD38 (Janeway *et al.*, 2009). Le CD25 et le CD40 ont été décrits précédemment.

Le marqueur CD69 est constitué d'un homodimère avec deux sous-unités de 28 et 32 kDa. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de signalisation qui est impliquée dans l'induction de la prolifération des LT. Le CD69 est exprimé à de très faibles niveaux sur les LT CD4⁺ et CD8⁺ au repos (< 5-10 %). Il s'agit d'une des premières molécules d'activation qui est exprimée à la surface de la cellule (Cosulich *et al.*, 1987; Cebrian *et al.*, 1988; Yokoyama *et al.*, 1988; Testi *et al.*, 1989; Janeway *et al.*, 2009). Le pic d'expression de cette molécule est autour de 16-24 heures post activation puis cette expression diminue et devient à peine détectable après 72 heures. Lorsque la protéine CD69 est exprimée à la surface des LT, elle agit comme une molécule de costimulation pour l'activation et la prolifération des cellules T (Ziegler *et al.*, 1994). L'incapacité d'augmenter l'expression de CD69 après activation par le TCR se traduit par une mauvaise fonctionnalité des LT (Critchley-Thorne *et al.*, 2007).

Le marqueur CD71 (TFRC, *Transferrin Receptor*, TfR) est un récepteur membranaire de transport du fer dont l'expression augmente 24 à 48 heures après activation des LT. Cette expression continue d'augmenter et est maintenue à la surface pendant plusieurs jours (Caruso *et al.*, 1997). Le CD71 est associé à la chaîne ζ du TCR et à la molécule ZAP-70 et peut participer au signal TCR. Cette molécule est un facteur essentiel à la prolifération des LT.

Le marqueur CD44 est une protéine sulfatée acide de 80 kDa contenant de nombreux résidus phosphosérine et de ponts disulfures intrachaîne (Haynes *et al.* 1989). Il se lie à l'acide hyaluronique, un composant de la matrice extracellulaire ; cet appariement provoque l'extravasation au niveau des sites inflammatoires (Yang *et al.* 2006 ; Aruffo *et al.* 1990 ; Stoop *et al.* 2002). L'expression du CD44 est augmentée sur les LT activés et les LT mémoires et son expression commence à augmenter après un ou deux cycles de division cellulaire pour atteindre un niveau maximum après trois à quatre cycles de division (Gerberick *et al.* 1997 ; Yang *et al.* 2006).

Ki67 est une protéine nucléaire qui est associée à la prolifération de la cellule. L'activation de la cellule précède la phase de prolifération et ce marqueur peut donc être utilisé à la fois comme marqueur de prolifération mais également comme marqueur tardif d'activation des cellules. Cette protéine est présente lors des phases G1, S et G2 et aussi lors de la mitose mais est absente des cellules au repos (Scholzen and Gerdes, 2000).

Le CD38 humain est une glycoprotéine transmembranaire de 45 kDa qui est exprimé à la surface des LT CD8⁺ après activation. Trois grandes fonctions ont été découvertes pour cette protéine : la fonction de transducteur, la fonction d'adhésion et la fonction enzymatique (Savarino *et al.*, 2000; Malavasi *et al.*, 2008).

L'activation induit l'acquisition de nouvelles fonctions qui vont permettre aux LT CD8⁺ effecteurs de déclencher la destruction des cellules exprimant un complexe CMHP pour lequel ils sont spécifiques. Cette activité implique plusieurs voies qui pourraient agir en synergie : la voie perforine / granzyme (dépendante de calcium), la voie Fas / FasL (indépendante de calcium). Ces différents mécanismes ne seront pas décrits dans cette introduction.

Les LT CD8⁺ produisent aussi différentes cytokines après activation (Annunziato *et al.*, 2015). Les LT CD8⁺ effecteurs se caractérisent principalement par la sécrétion d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-2. Ces cytokines ont des rôles très divers: augmentation de l'expression de molécules impliquées dans la présentation de l'Ag sur les CPA ou les cellules cibles et activation de l'activité anti-microbienne d'autres types cellulaires par l'IFN- γ ; d'autres cytokines comme l'IL-2 auraient un effet autocrine sur les LT ; le TNF- α est une molécule effectrice proinflammatoire (Mittrucker *et al.*, 2014).

Tout comme les LT CD4⁺, les LT CD8⁺ peuvent se polariser en deux sous types en fonction des cytokines produites. En présence d'IFN- γ et d'IL-12, les LT CD8⁺ se

différencient en une sous-population Tc1 sécrétant de l'IFN- γ et de l'IL-2 tandis qu'en présence d'IL4, les LT CD8⁺ se différencient en Tc2 sécrétant des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 (Annunziato *et al.*, 2015). Néanmoins, les LT CD8⁺ peuvent aussi avoir un rôle régulateur et sont qualifiés de CD8⁺ supresseurs. Par la suite, comme pour les LT CD4⁺, les LT CD8⁺ ont été divisées en différentes sous-populations en fonction des cytokines produites et des diverses fonctions de ces sous-populations de LT CD8⁺ dites « alternatives » (Mittrucker *et al.*, 2014; Huber and Lohoff, 2015).

5.3.3. Les lymphocytes T mémoires

Suite à l'induction de la prolifération clonale de LT effecteurs spécifique d'un Ag par les DC dans les ganglions lymphatiques permettant la clairance de l'agent pathogène, l'effectif des LT effecteurs diminue et seuls les LT mémoires, cellules à longue durée de vie, différenciés à partir des LT effecteurs persistent dans la circulation sanguine (Mueller *et al.*, 2013). Ils requièrent une restimulation additionnelle avant de pouvoir passer à l'état de LT effecteurs et d'agir sur leurs cellules cibles. Les LT mémoires expriment entre autres le marqueur membranaire CD45RO, isoforme du CD45RA (présent sur les LT naïfs). La survie des LT CD4 mémoires nécessite une stimulation par des cytokines telles que l'IL-7 et l'IL-15 (Janeway *et al.*, 2009). Les cellules mémoires peuvent être subdivisées selon leurs fonctions effectrices, leurs capacités migratoires et prolifératives mais aussi selon leurs capacités à persister *in vivo*. Une des questions centrales au sujet des cellules mémoires concerne leur lignage et les mécanismes contrôlant leur génération.

Malgré cette hétérogénéité, deux principales sous-populations ont été définies: les sous-populations de cellules mémoires TCM (*Central Memory T cells*) et TEM (*Effector Memory T Cells*) (Gerritsen and Pandit, 2016). Les TEM auraient un rôle important dans la réponse immédiate du fait de leurs capacités effectrices et de leur localisation en

périphérie, proche des sites d'entrée des pathogènes. Ces cellules sont présentes au niveau de la rate, des ganglions lymphatiques, dans le sang, au niveau des voies pulmonaires, le foie, l'intestin, les reins, et le tissu adipeux. Les TEM sont aussi caractérisés par leur faible capacité à proliférer suite à une stimulation antigénique ou en réponse aux cytokines (IL-7 et l'IL-15) indispensables à la prolifération homéostatique (Sallusto *et al.*, 2004; Fletcher *et al.*, 2005; Huster *et al.*, 2006; Mueller *et al.*, 2013). Ces cellules sont CD44^{high} CD62L⁻ CCR7⁻ CD127⁺ CD69⁻ CD103⁻ (Mueller *et al.*, 2013). Les TEM peuvent se différencier rapidement en LT effecteurs et sécréter de grandes quantités de cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-5) après leur restimulation par l'Ag alors que les TCM ont besoin de plus de temps pour sécréter des cytokines après la restimulation par l'Ag (Boyman *et al.*, 2009). En ce qui concerne les TCM, elles sont localisées préférentiellement au niveau des ganglions lymphoïdes, de la rate, de la moelle osseuse et dans le sang, et possèdent des faibles capacités effectrices immédiates mais une forte capacité d'expansion. La majorité des études réalisées pour caractériser les TCM ont également montré que ces derniers pouvaient produire de grandes quantités d'IL-2 suite à une stimulation antigénique (Sallusto *et al.*, 2004; Huster *et al.*, 2006). Contrairement aux TEM, les TCM expriment CCR7 et CD62L, des récepteurs de localisation ou « *homing* » leur permettant de circuler dans les ganglions lymphatiques et la rate (Mueller *et al.*, 2013).

Une troisième population de cellules T mémoires appelée TRM (*Resident Memory T cells*) a été identifiée et elle persiste au niveau des tissus après l'élimination du pathogène. Ces cellules sont CD44^{high} CD62L⁻ CCR7⁻ CD11 α ^{high} CD69⁺ (Mueller *et al.*, 2013).

6. Les mécanismes de l'allergie aux substances chimiques

Les réactions allergiques à des produits chimiques correspondent à des réponses immunitaires d'hypersensibilité de type I ou de type IV (chapitre 2). Les mécanismes

immunologiques conduisant au développement des réactions allergiques aux produits chimiques peuvent être décomposés en deux phases bien distinctes (**Figure 30**) (Deckers *et al.*, 2017; Esser and Martin, 2017). La première, appelée phase de sensibilisation, concerne les individus exposés pour la première fois à l'haptène. Elle dure en moyenne de 10 à 15 jours chez l'homme et 5 jours chez la souris. Muette d'un point de vue clinique (absence de symptômes visibles), elle aboutit à la production de LT mémoires spécifiques de l'haptène qui migrent ensuite vers le site de pénétration de l'haptène (Vocanson *et al.*, 2009b; Deckers *et al.*, 2017). La deuxième phase, appelée phase d'élicitation ou de déclenchement, dure quant à elle, 24 à 72 heures après une nouvelle exposition à l'haptène. C'est au cours de cette phase que vont apparaître les signes cliniques de l'allergie.

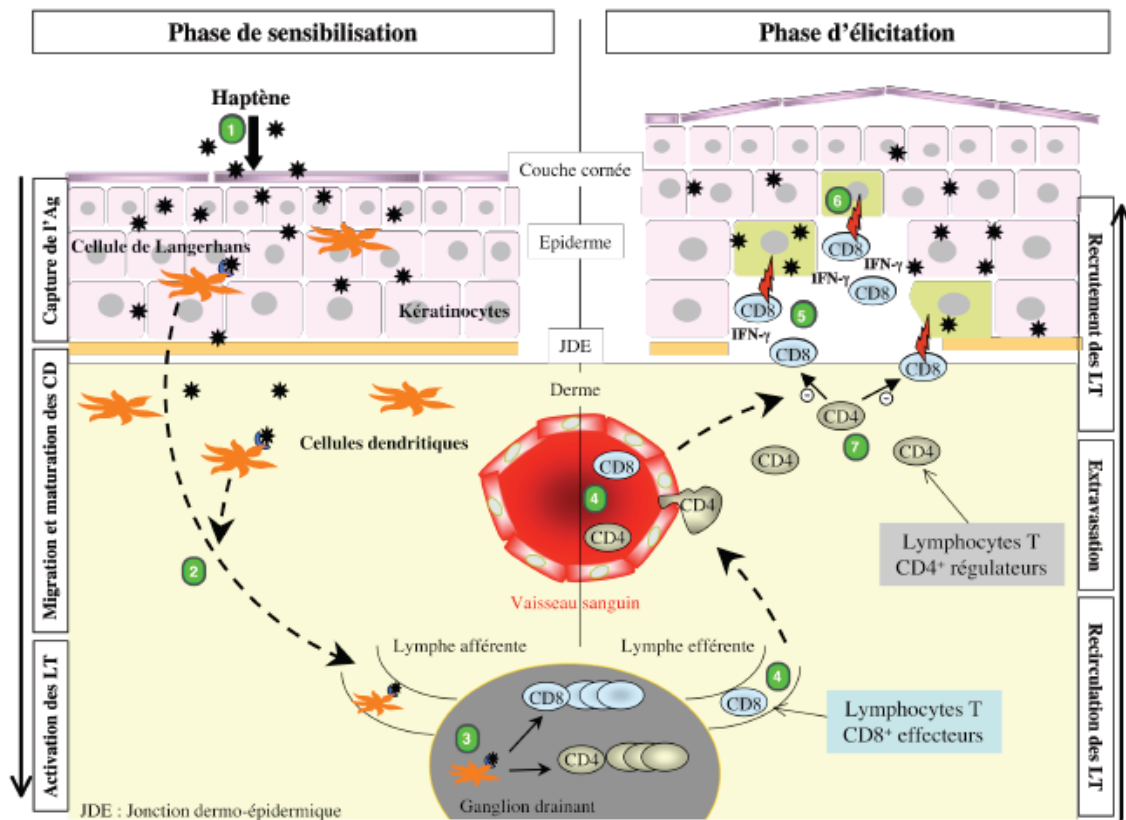


Figure 30. Mécanismes cellulaires de la dermatite de contact allergique.

(d'après (Saint-Mezard et al., 2004))

L'application épicutanée d'une molécule sensibilisante induit une activation du système immunitaire inné cutané, associée à la migration et la maturation des cellules de Langerhans et des cellules dendritiques du derme qui présentent l'haptène en tant qu'antigène aux lymphocytes T (LT) dans le ganglion drainant. Ces cellules dendritiques activent des populations LT spécifiques CD8⁺ effectrices et CD4⁺ régulatrices qui vont ensuite recirculer en périphérie. Lors d'un deuxième contact avec le même haptène, les LT CD8⁺ spécifiques sont recrutés dans la peau et activés. 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 des lésions cutanées qui vont être résolues lors de l'arrivée secondaire de LT CD4⁺ régulateurs sécrétant des cytokines anti-inflammatoires.

6.1. Phase de sensibilisation

La phase de sensibilisation consiste en une cascade de mécanismes dépendants des propriétés physico-chimiques des molécules exogènes et impliquant le système immunitaire.

La première étape de la phase de sensibilisation consiste en la pénétration de l'allergène au travers de la barrière épithéliale. Cette couche est de nature lipophile du fait du grand nombre de lipides qu'elle contient, et seules les molécules hydrophobes sont capables de la traverser (Holgate, 2011; Eyerich *et al.*, 2018). En effet, pour traverser cette barrière, ces molécules doivent posséder un coefficient de partage octanol/eau supérieur à 1 (Smith Pease *et al.*, 2003). De plus, seules les molécules de faible poids moléculaire sont capables de pénétrer cette couche et d'atteindre ainsi les couches plus profondes (Berard *et al.*, 2003). Là, l'haptène seul ou le complexe haptène-protéine est pris en charge par les CPA (Lanzavecchia, 1996; Kaplan *et al.*, 2012). Le mode de cette prise en charge de l'antigène par ces cellules peut se faire de différentes manières.

Soit l'haptène est internalisé par les DC et se fixe sur une protéine intracellulaire : c'est la voie de prise en charge dite « endogène ». Soit l'haptène se fixe sur une protéine extracellulaire ou membranaire formant ainsi le complexe haptène-protéine qui est ensuite internalisé dans les DC. Cette voie est nommée « exogène ». Enfin, l'haptène peut se fixer directement sur des peptides présents dans le sillon des molécules du CMH de classe I et II, à la surface de la membrane plasmique des DC.

Les principaux modèles proposés pour expliquer comment les haptènes interagissent avec le système immunitaire regroupent l'hypothèse de l'haptène / prohaptène, le concept du *p-i* (*pharmacological interaction of drugs with immune receptors*) et le modèle de l'altération du répertoire peptidique du soi. Dans le chapitre 4, nous avons abordé les différentes caractéristiques des haptènes vrais, les pré/pro-haptènes et leurs réactivités chimiques.

Le concept du p-i modifie fondamentalement notre compréhension de l'interaction des haptènes avec le système immunitaire spécifique (**Figure 31**) (Pichler, 2008). Il implique que certaines molécules peuvent se lier directement à des récepteurs immunitaires et ainsi stimuler les cellules. Par exemple, une molécule médicamenteuse capable de se lier à un récepteur T particulier suffit pour stimuler les cellules T, leur prolifération, la sécrétion de cytokines, et exercer une cytotoxicité.

En effet, le sulfaméthoxazole, la lidocaïne, la mépivacaïne, le célécoxib, la lamotrigine et la carbamazépine sont capables d'activer directement les LT, sans apprêtement ni métabolisme, en se fixant de manière non covalente sur les récepteurs immunologiques (molécules du CMH de classe II des CPA, ou les TCR des LT principalement) via une interaction réversible (liaison de coordination) et stable pour être pris en charge par le système immunitaire (Pichler *et al.*, 2006; Chipinda *et al.*, 2011; Pichler *et al.*, 2015).

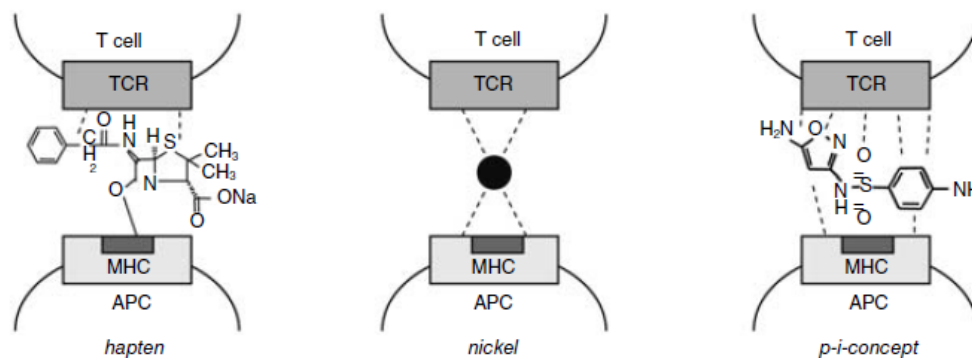


Figure 31. Représentation des hypothèses d'interactions haptènes /LT.

(d'après (Pichler *et al.*, 2006))

Une dernière hypothèse postule que la liaison d'un haptène à une molécule du CMH modifie la spécificité de la niche du CMH, permettant à un nouveau répertoire de peptides du soi d'être présenté, aboutissant à une réponse alloréactive des LT CD8⁺. Trois équipes indépendantes travaillant sur l'hypersensibilité à l'abacavir, un anti-viral, ont validé ce modèle (Illing *et al.*, 2012; Norcross *et al.*, 2012; Yun *et al.*, 2012).

En l'absence de l'abacavir, la molécule HLA-B*5701 présente des peptides du soi n'entraînant aucune réponse immunitaire effectrice. En présence de l'abacavir, le médicament se lie au sillon de présentation de la molécule HLA-B*5701 au niveau de la poche F, altérant le répertoire habituel de peptides qui se lient à cette molécule HLA. L'abacavir favorise la liaison de peptides contenant un tryptophane ou une phénylalanine au niveau de l'extrémité C-terminale (en position 9) au lieu des résidus aliphatiques de petite taille (ex: valine, alanine ou isoleucine) qui se lient habituellement à la molécule HLA-B*5701 non modifiée (Ostrov *et al.*, 2012; Pavlos *et al.*, 2015). Cela permet la liaison d'un nouveau répertoire peptidique contenant des néo-épitopes immunogéniques.

La reconnaissance des métaux peut toutefois être différente de celle des haptènes non métalliques. Similairement à la reconnaissance des haptènes vrais, les TCR spécifiques des métaux reconnaissent les déterminants formés par le complexe des ions métalliques avec des peptides du soi ancrés dans le CMH (Gamerding *et al.*, 2003). Certains TCR reconnaissent des complexes formés par le métal avec les acides aminés du CMH lui-même. Lors d'une étude des cellules SE9 issues d'un clone de LT humains, il a été observé que le nickel interagit directement avec la Tyr29 et la Tyr94 de la chaîne du TCR et le résidu conservé His81 de la chaîne du CMH (Gamerding *et al.*, 2003). Ainsi, tout comme les superantigènes, le nickel peut réaliser des liaisons directes avec le CMH et le TCR en l'absence de modification peptidique, mais contrairement aux superantigènes, le nickel nécessite la présence d'acides aminés spécifiques au sein du TCR (Gamerding *et al.*, 2003).

6.2. Activation et maturation des cellules dendritiques par les haptènes

Les DC stimulées par les molécules allergisantes, et non pas par les molécules irritantes, vont acquérir un phénotype dit mature, par l'augmentation de l'expression du CMH II, des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86, et des molécules d'activation

CD83 ou d'adhésion CD54 et CD58 (Toebak *et al.*, 2009; Mbongue *et al.*, 2017; Tiberio *et al.*, 2018). Les DC activées par les molécules allergisantes vont également sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-8 et le TNF- α (Aiba *et al.*, 1997; Tiberio *et al.*, 2018).

L'acquisition de ces différents caractères phénotypiques est sous le contrôle de diverses voies de signalisation. De nombreuses études ont mis en évidence que la voie NF- κ B, ainsi que la voie des MAPK jouent un rôle particulièrement important dans l'activation des DC en réponse aux molécules allergisantes. Il existe trois voies principales des MAPK distinctes : p38 MAPK, ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) et JNK (*c-Jun N-terminal kinases*).

Des voies différentes seront activées en fonction de la nature de l'haptène. Ainsi, dans les moDC humaines stimulées par du DNCB, l'expression du CMH II, de CD86, CD83 ainsi que la production d'IL-8 sont sous le contrôle de p38 MAPK. Des moDC stimulées avec du NiCl₂ expriment CD83 et produisent de l'IL-12p40 dépendamment de p38 MAPK, alors que leur production de TNF- α et d'IL-1 β est contrôlée par ERK (Aiba *et al.*, 2003).

Le NiCl₂ et le NiSO₄ activent la voie NF- κ B et la voie des MAPK dans les moDC et dans les DC différenciées à partir de progéniteurs de sang de cordon (DC CD34⁺) (Aiba *et al.*, 2003; Boisleve *et al.*, 2004; Boisleve *et al.*, 2005; Ade *et al.*, 2007). L'expression de CD86, CD83, CCR7 en réponse au NiSO₄ est contrôlée par p38 MAPK, JNK et ERK, tandis que l'expression du CMH II et la production d'IL-6, d'IL-8 et d'IL-12p40 sont contrôlées par la voie NF- κ B (Boisleve *et al.*, 2004; Boisleve *et al.*, 2005; Ade *et al.*, 2007). Antonios *et al.*, ont mis en évidence que les haptènes métalliques CoCl₂ et NiSO₄ activent des voies similaires dans les DC CD34⁺, mais que ces voies ont des rôles différents dans l'activation des DC (Antonios *et al.*, 2009). Ainsi, p38 MAPK contrôle l'expression de CD86 et CD83 en réponse au NiSO₄ et l'expression de CD83 en réponse au CoCl₂. La production d'IL-6 par ces deux haptènes dépend de toutes les MAPK, mais la production d'IL-12p40 en réponse au NiSO₄ est régulée positivement par p38 MAPK et JNK, tandis que ERK semble avoir un rôle inhibiteur (Antonios *et al.*, 2009).

D'autres allergènes chimiques tels que le TNCB ou l'oxazolone induisent la génération de fragments d'acide hyaluronique qui activent les TLR2 et TLR4 (Esser *et al.*, 2012). La signalisation induite par les TLR activés et leurs protéines adaptatrices Myd88 et Trif va conduire à l'activation de NF- κ B, des MAPK, et des IRF 3 et 7, ainsi qu'à la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (**Figure 32**) (Martin, 2015b). Par ailleurs, les allergisants de contact vont générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la libération d'ATP. Les ROS contribuent à la dégradation de l'acide hyaluronique de la matrice extracellulaire MEC et génèrent des fragments pro-inflammatoires importants pour l'activation et la migration des DC (Muto *et al.*, 2014). D'autre part, les produits chimiques génèrent des ROS qui augmentent l'expression et l'activité des hyaluronidases via p38 MAPK participant à la génération de fragments d'acide hyaluronique (Monzon *et al.*, 2010). De plus, les ROS promeuvent la signalisation des TLR ainsi que l'activation de l'inflammasome, conduisant à la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 et IL-18 (Martinon, 2010). L'ATP généré par les cellules cutanées au contact des molécules allergisantes active le récepteur P2X7 qui participe également à l'activation de l'inflammasome. Tous ces mécanismes nécessaires à l'activation des DC, permettent de déclencher la phase de sensibilisation (Martin, 2015b).

Bien que les molécules allergisantes aient des structures diverses et induisent un stress oxydant variable, elles possèdent une réactivité chimique intrinsèque envers les acides aminés nucléophiles. Les propriétés oxydantes et électrophiles de ces molécules sont détectées par le complexe protéique Nrf2/Keap1 (*Nuclear Factor erythroid-2-Related Factor 2 / Kelch-like ECH-associated protein 1*). L'activation de la voie Nrf2/Keap1 est garante de l'équilibre redox cellulaire. La réactivité chimique des molécules allergisantes cutanées permet l'activation de la voie Nrf2/Keap1 au sein de la DC, permettant de réguler le stress cellulaire provoqué par la molécule allergisante (Migdal *et al.*, 2013).

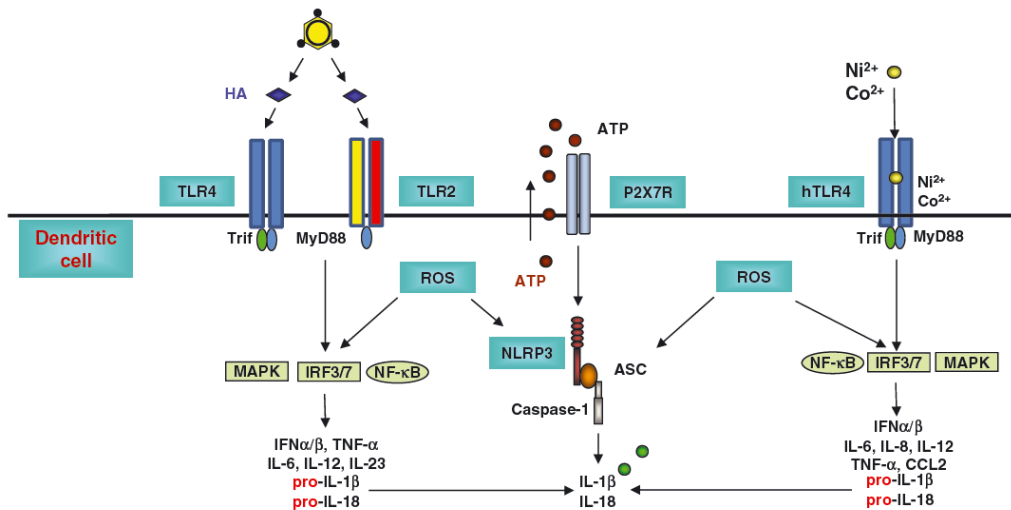


Figure 32. Modèle des voies d'activation du système immunitaire inné des DC.

(d'après (Martin, 2015b))

Les cellules luttent contre les différents stress grâce à la combinaison de mécanismes de réparation et de défense antioxydante. Le système de défense antioxydante est le mécanisme de protection majeur ; les cellules utilisent les antioxydants pour neutraliser les ROS générées par les molécules oxydantes et/ou électrophiles. Les antioxydants « directs » (glutathion et vitamines) ont une courte durée de vie, sont consommés durant le processus de détoxification et nécessitent d'être régénérés pour exercer leur effet protecteur. Les voies antioxydantes « indirectes », quant à elles, exercent leur effet via l'augmentation de l'expression de protéines telles que la NAD(P)H : Quinone Oxydoréductase-1 (NQO1), la Superoxide Dismutase (SOD), la Glutathione S-Transférase (GST), la Glutathion Peroxidase (GPx), l'Hème Oxygenase-1 (HMOX), la Glutamate-Cystéine Ligase (GCL), la catalase (CAT), et la Thioredoxine 1 (Trx1). Ces protéines ont une longue durée de vie, ne sont pas consommées durant le processus antioxydant, sont capables de catalyser une large variété de réactions de détoxification et sont impliquées dans la régénération de divers antioxydants directs comme le glutathion (GSH) (Dinkova-Kostova and Talalay, 2008). La régulation de la réponse antioxydante est assurée par le facteur de transcription Nrf2 et son inhibiteur endogène Keap1 via les séquences ADN ARE (*Antioxidant Response Elements*). La voie

Nrf2/Keap1 régule au niveau transcriptionnel une batterie de protéines cytoprotectrices participant ainsi activement au métabolisme et au maintien de l'équilibre rédox de la cellule.

Le facteur de transcription Nrf2 a été identifié pour la première fois par Moi *et al.*, en 1994 comme un homologue du facteur de transcription érythroïde NF-E2 (*Nuclear Factor Erythroid 2*) capable d'interagir avec une séquence d'ADN contrôlant le gène de la β -globine (Moi *et al.*, 1994). Nrf2 est exprimé de façon ubiquitaire. Il est présent dans de nombreux organes détoxifiants comme le foie et les reins ainsi que dans la peau, les poumons, le tube digestif et les muscles (Baird and Dinkova-Kostova, 2011).

L'étude du phénotype des souris Nrf2^{-/-} a permis de confirmer les fonctions biologiques de Nrf2 entrevues par la nature de ses gènes cibles. En effet, ces souris sont viables et parviennent à l'âge adulte. Cependant, elles présentent une susceptibilité accrue à différents facteurs de stress. Ainsi, les souris Nrf2^{-/-} sont plus sensibles au stress chimique, comme en témoignent plusieurs études montrant une toxicité exacerbée de plusieurs xénobiotiques chez ces souris. L'hépatotoxicité induite par le paracétamol est augmentée (Enomoto *et al.*, 2001; Goldring *et al.*, 2004), de même que la toxicité pulmonaire induite par le butyl-hydroxytoluène (Chan and Kan, 1999) et l'inflammation intestinale provoquée par des traitements au DSS (Dextran Sulfate Sodium) (Osburn *et al.*, 2007). Les souris Nrf2^{-/-} présentent également une mortalité plus importante suite au choc endotoxinique induit par le LPS (Lipopolysaccharide) (Thimmulappa *et al.*, 2006). De plus les effets cancérigènes de certaines substances sont exacerbés dans ces modèles, comme la cancérogénicité gastrique du B(a)P (Benzo(a)pyrène) (Ramos-Gomez *et al.*, 2001; Bryan *et al.*, 2013). Ces observations chez les souris déficientes en Nrf2 confirment le rôle majeur de Nrf2 dans la cytoprotection contre le stress oxydant induit notamment par les xénobiotiques.

A l'état quiescent, Nrf2 est séquestré dans le cytosol par sa protéine inhibitrice, la protéine Keap1. Cette protéine, associée en homodimère, interagit avec Nrf2 et

permet l'ubiquitination constante de Nrf2 qui est alors dégradée par le protéasome 26S. Ainsi à l'état basal, les niveaux cytoplasmiques de Nrf2 sont très bas. Sa demi-vie dans le cytoplasme est estimée entre 10 et 20 min dans les cellules de mammifères, et varie selon le type cellulaire (Bryan *et al.*, 2013). Keap1 verrouille Nrf2 dans une conformation stable qui facilite son ubiquitination par l'enzyme Cul3 (*Cullin based E3 ligase*), une ubiquitine ligase interagissant avec Keap1. De plus, Keap1 joue le rôle de « *senseur* » de stress oxydant. En effet, cette protéine contient 27 résidus cystéine chez l'Homme, dont 9 hautement réactifs. Leur oxydation induit des changements conformationnels de Keap1 aboutissant à l'activation de la voie Nrf2 (Brigelius-Flohe and Flohe, 2011). Dans ce cadre, il est démontré que des composés électrophiles oxydent certaines cystéines clés de la protéine Keap1, en particulier la cystéine 151. Cette oxydation des groupements thiols perturbe l'interaction entre Cul3 et Keap1 et bloque l'ubiquitination de Nrf2. L'oxydation d'autres cystéines de Keap1, notamment les cystéines 273 et 288, favorisent la dissociation de Nrf2 de Keap1 (Brigelius-Flohe and Flohe, 2011). Une fois dissociée, la protéine Nrf2 subit des modifications post-traductionnelles, notamment des phosphorylations par les isoformes atypiques de la famille des PKC (Protéine Kinase C) (PKC δ et PKC ι) activées en réponse à un stress oxydant (Bryan *et al.*, 2013).

Ces modifications facilitent la translocation nucléaire de Nrf2 en inhibant sa réassociation avec Keap1 (Huang *et al.*, 2002; Bloom and Jaiswal, 2003). Une fois présent dans le noyau, Nrf2 se dimérise avec des protéines porteuses des domaines bZip, ses partenaires principaux étant les petites protéines Maf (*Musculo-Aponeurotic Fibrosarcoma*). L'hétérodimère formé se fixe alors sur ses éléments de réponse de type ARE, nommé également EpRE (*Electrophile Responsive Element*), et recrute le coactivateur CBP/p300, afin d'initier la transcription de ses gènes cibles (Bryan *et al.*, 2013).

6.3. Génération des lymphocytes T spécifiques des haptènes

La phase de sensibilisation de l'eczéma allergique de contact s'achève par la génération de LT effecteurs et mémoires. L'activation des LT varie selon la nature de l'antigène. Certaines molécules allergisantes, telles que les allergisants respiratoires comme les anhydrides phtallique ou triméllitique vont induire une réponse Th2. D'autres molécules allergisantes telles que les allergènes cutanés comme le DNCB, le DNFB ou l'oxazolone favoriseront une réponse Th1/Tc1 (Gorbachev and Fairchild, 2001; Martin and Jakob, 2008; Goutet *et al.*, 2012; Holgate, 2012; Martin, 2015b; Deckers *et al.*, 2017). Certains allergènes peuvent également induire une voie Th17. Ainsi le NiSO₄ induit une réponse Th1/Tc1 et Th17/Tc17 (Vocanson *et al.*, 2009b).

Les sous-populations Th1, Th2 et Th17 sont caractérisées par les cytokines qu'elles produisent mais également par l'expression de facteurs de transcription différents. Ainsi, les Th1 expriment le facteur TBX21 ou t-bet (*T Box Transcription*) ainsi que la protéine STAT4 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-4*) et secrètent tout particulièrement de l'IFN- γ mais aussi du TNF- α et de l'IL-2. La sous-population Th2 est caractérisée par l'expression de STAT6 et GATA3, et la sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. Enfin, les Th17 expriment STAT3 et ROR α / γ T (*RAR -Related Orphan Receptor α or γ T*) et produisent principalement de l'IL-17 (Lahoute *et al.*, 2011). Enfin, les DC immatures ou semi-matures sont tolérogènes et vont favoriser la différenciation des LT en Treg (décrits précédemment).

Il suffit d'une brève stimulation antigénique (environ 24 h) pour entraîner la différenciation de LT naïfs en LT effecteurs. Cependant, 2 à 4 jours d'exposition sont nécessaires pour permettre une expansion clonale optimale et la génération de T mémoires. En cas d'exposition prolongée (supérieure à 14 jours environ), les LT CD8⁺ effecteurs seront épuisés par la présence continue de l'antigène et de l'inflammation

et leur différenciation en LT mémoires compétents sera affectée (**Figure 33**) (Arens and Schoenberger, 2010).

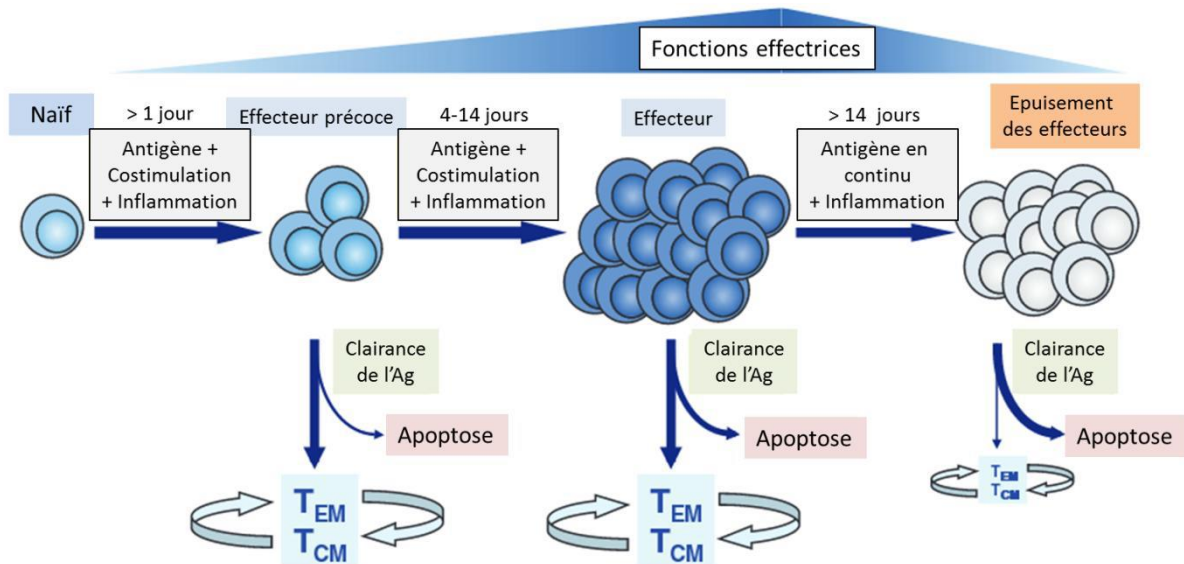


Figure 33. Expansion et différenciation des LT CD8+ en LT effecteurs et mémoires après l'interaction avec des DC activées par un antigène.

*T_{EM} : T effecteurs mémoires ; T_{CM} : T centraux mémoires
(d'après (Arens and Schoenberger, 2010))*

Différentes sous-populations de LT sont générées au cours d'une réponse immunitaire. Deux sous-populations de LT activés spécifiques diminuent l'expression de CCR7 perdant ainsi leur capacité de recirculer dans les dLN. Ces sous-populations CCR7⁻ comprennent les T_{EFF} et les T_{EM}, capables de gagner les tissus périphériques et tout particulièrement la peau. Les LT CCR7⁺ constituent l'autre sous-population de LT mémoires, et sont appelés LT centraux mémoires (T_{CM}). Ils conservent leur capacité à recirculer depuis le sang jusqu'aux ganglions lymphatiques drainants mais ne peuvent être recrutés dans les tissus (Sallusto *et al.*, 1999). Lors d'un contact ultérieur avec l'haptène, les T_{EM} spécifiques peuvent agir comme des cellules de l'immunité innée en libérant rapidement de grandes quantités d'IFN- γ et de CCL-5, augmentant l'efficacité de la réponse lymphocytaire T (Walzer *et al.*, 2003). Les T_{EFF} et T_{EM} murins retrouvés dans la peau expriment les récepteurs aux chimiokines CCR4 et/ou CCR10, $\alpha 4\beta 1$

intégrine et CLA, qui sont cruciaux pour l'efficacité du « homing » des LT dans la peau (Santamaria-Babi, 2004). Ainsi, à la fin de la phase de sensibilisation, les LT spécifiques activés par les DC présentant l'haptène sont trouvés dans les ganglions lymphatiques drainants (T_{CM}), dans le sang et dans la peau (T_{EFF} périphériques et T_{EM}). La peau conserve une apparence normale. Des LT spécifiques seront activés directement dans la peau et massivement recrutés lors d'un contact cutané ultérieur avec le même haptène : il s'agira de la phase de déclenchement.

6.4. La phase de déclenchement

Certains individus préalablement sensibilisés à un haptène et réexposés au même haptène vont développer des symptômes des réactions allergiques : il s'agit de la phase de déclenchement ou d'élicitation, cliniquement apparente. Cette phase de déclenchement, ou phase efférente, se déroule en trois étapes : (1) le recrutement précoce des LT $CD8^+$ effecteurs activés au cours de la sensibilisation environ 2h après réexposition à l'haptène, (2) la production subséquente de cytokines/chimiokines conduit à l'activation des cellules résidentes, 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 l'allergie aux haptènes (Vocanson *et al.*, 2009b; Kimber *et al.*, 2014b; Martin, 2015a). Les mécanismes cellulaires et moléculaires de la phase d'élicitation ne seront pas développés dans cette introduction.

7. Les méthodes de détection des sensibilisants

En moins d'un demi-siècle, l'allergie aux substances chimiques est devenue un problème majeur de santé publique. Actuellement, les diagnostics et traitements mis en place pour contrôler les manifestations cutanées allergiques ont peu évolué depuis les années 60. Le test épicutané (ou « patch test » en anglais) reste le meilleur moyen de diagnostiquer une allergie de contact à un composé chimique (Yang *et al.*, 2018). Malheureusement, une fois l'allergène incriminé identifié, seule une éviction totale permet au patient de contourner l'apparition des symptômes. Dans le cas où l'éviction est impossible, les seuls traitements disponibles sont basés sur l'utilisation d'anti-inflammatoires stéroïdiens puissants (Cohen and Heidary, 2004). Dans le but de minimiser les risques liés aux allergies aux haptènes, il est crucial de pouvoir déterminer avec précision le potentiel sensibilisant des substances chimiques avant leur commercialisation. En ce sens, de nombreuses méthodes qualitatives et quantitatives ont déjà prouvé leur efficacité. D'autres très prometteuses sont encore en phase de développement.

Les premiers tests d'évaluation du potentiel sensibilisant des molécules de faible poids moléculaire ont été réalisés sur l'animal. En 1959, après avoir évalué les souffrances subies par les animaux lors de ces tests, Russel et Burch énoncèrent le concept déontologique des « 3R » signifiant (*Replace, Reduce, Refine*) (Russell *et al.*, 1959). Toujours d'actualité, ce concept vise à Remplacer autant que possible les expérimentations *in vivo* par des tests *in vitro*, à Réduire au maximum le nombre d'animaux en expérimentation et à affiner (*Refine*) les méthodes utilisées sur ces derniers dans l'optique de réduire au minimum leurs souffrances. Cette prise de conscience s'est peu à peu généralisée et a été confortée puis renforcée par le 7ème amendement de la Directive Cosmétique Européenne interdisant l'importation et la vente de produits cosmétiques dont les ingrédients auraient été testés sur des animaux (European and Commission, 2003, 2006). Cet amendement a pris effet en 2013.

Dans le même temps, deux directives adoptées par la Commission Européenne (European and Commission, 1967, 1999) et l'instauration en 2006 de l'ambitieux projet REACH (*Registration, Evaluation, Autorisation and restriction of Chemicals*) imposent aux industriels de connaître les effets sur la santé des substances chimiques et mettent notamment l'accent sur l'importance d'évaluer l'effet sensibilisant de ces substances. Le projet REACH prévoit l'évaluation toxicologique de plus de 30 000 substances chimiques. Dans ce contexte, il est essentiel de disposer de méthodes d'évaluation des propriétés toxiques des produits chimiques qui soient à la fois de haut rendement, pas trop coûteuses et éthiquement acceptables. Ainsi, le développement de méthodes dites « alternatives » visant à évaluer le potentiel sensibilisant des molécules sans recours à l'animal vivant représente un objectif prioritaire. Qu'elles soient *in vivo*, *in vitro*, *in silico* ou encore *in chemico*, ces méthodes ont toutes le même objectif : détecter le potentiel sensibilisant des molécules avant leur mise sur le marché tout en s'accordant au concept des « 3R ».

Selon les lignes directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) pour les essais des produits chimiques, un sensibilisant cutané est une substance qui provoque une réponse allergique suite à un contact avec la peau. Les principales phases du processus biologique de sensibilisation cutanée font l'objet d'un consensus général. Les connaissances actuelles sur les mécanismes chimiques et biologiques associés à la sensibilisation sont résumées sous la forme d'une voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables (AOP, *Adverse Outcome Pathway* (OECD.)). Cette AOP décrit les différentes étapes allant de l'événement moléculaire initiateur jusqu'aux effets indésirables sur la santé comme la DAC chez l'Homme ou l'hypersensibilité retardée de contact chez les rongeurs (HSRC) (Adler *et al.*, 2011; ONU, 2013) (**Figure 34**). L'événement moléculaire initiateur est la formation d'une liaison covalente entre des substances chimiques électrophiles et les centres nucléophiles des protéines de la peau. Le deuxième événement clé de cet AOP se déroule dans les kératinocytes et comprend des réponses inflammatoires et des

modifications d'expression génique, liées à des voies de signalisation cellulaire spécifiques telles que les voies dépendantes de l'élément de réponse antioxydant/électrophile (ARE, *Antioxidant Response Element*). Le troisième événement clé est l'activation des cellules dendritiques, évaluée par l'étude de l'expression de marqueurs de surface spécifiques de la cellule et par l'étude de la production de chimiokines et de cytokines. Le quatrième événement clé est la prolifération des lymphocytes T, évaluée indirectement par le LLNA chez la souris (OECD.; Strickland *et al.*, 2016).

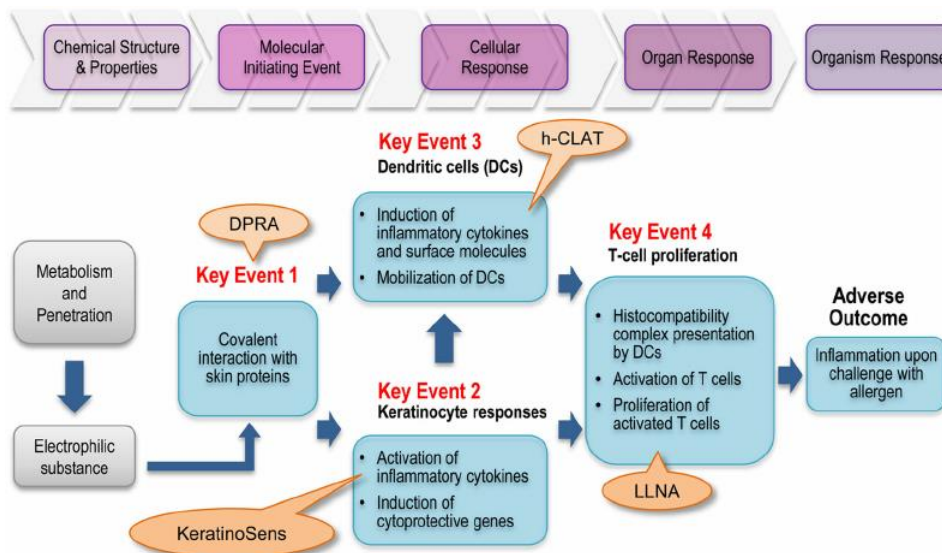


Figure 34. Schéma de l'AOP établie dans le cadre de la sensibilisation cutanée.

(d'après (Strickland *et al.*, 2016))

Les méthodes de substitution destinées à évaluer le potentiel sensibilisant des produits chimiques de bas poids moléculaire reproduisent l'un ou l'autre de ces événements clés. Dans la suite de cette introduction, nous présenterons, dans un premier temps, les tests historiques réalisés sur l'animal vivant puis les tests de substitution.

7.1. Les méthodes *in vivo*

Historiquement les tests d'évaluation du potentiel sensibilisant des molécules de faible poids moléculaire ont été réalisés *in vivo*. Deux tests réglementaires décrits dans la ligne directrice OCDE 406 sont réalisés sur le cobaye: le test de maximisation (GPMT : *Guinea Pig Maximization Test*), qui utilise un adjuvant, et le test de Buehler (sans adjuvant) (Buehler, 1965; Magnusson and Kligman, 1969; OECD, 1992). Ces deux méthodes évaluent le déclenchement d'une réaction allergique après application topique d'un composé chimique sur des cobayes préalablement sensibilisés à ce même composé. Dans le test de Buehler, l'application de la substance chimique est cutanée. Dans le GPMT, la substance chimique est injectée à l'animal par voie intradermique. Ces deux tests reproduisent les quatre événements clés de la phase de sensibilisation et la phase de déclenchement de la réaction allergique. Les deux méthodes nécessitent des durées d'expérimentation longues (20 jours pour le GPMT, plus de 30 jours pour le test de Buehler) et l'utilisation d'un nombre important d'animaux. De plus, ces tests soumettent les animaux à des stress et souffrances non négligeables (contention, utilisation de l'adjuvant complet de Freund). Ces tests sont à la fois inadaptés à l'évaluation d'un nombre très important de substances chimiques (objectif du projet REACH) et en désaccord avec la règle des « 3R » (European and Commission, 2006).

- ***Essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (LLNA)***

Le LLNA (*Local Lymph Node Assay*) a été développé dans les années 90 par Kimber et Basketter, et validé en 2001 par l'ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*). Ce test réalisé sur la souris, reproduit uniquement la phase de sensibilisation (les quatre événements clés), et non celle de déclenchement (élicitation), contrairement au test de Buehler et au GPMT (OECD, 2001; Basketter *et al.*, 2002; Kimber *et al.*, 2002).

L'essai repose sur le principe suivant (**Figure 35**) : les sensibilisants induisent une prolifération primaire de lymphocytes dans les ganglions lymphatiques auriculaires qui drainent le site d'application de la substance chimique. Cette prolifération est proportionnelle à la dose et à la puissance de l'allergène appliqué. Elle est évaluée par mesure de la radioactivité après incorporation de méthylthymidine tritiée par les lymphocytes. Quatre animaux au minimum sont utilisés par groupe de concentration, avec au minimum trois concentrations de la substance d'essai, plus un groupe contrôle négatif traité avec le véhicule, et, au besoin, un contrôle positif. Le programme expérimental dure 6 jours. Après injection de méthylthymidine tritiée dans la veine caudale, les animaux sont tués et une suspension de cellules de ganglion lymphatique est préparée. L'incorporation de la ^3H -méthylthymidine se mesure par comptage à β scintillation en désintégrations par minute (DPM). Les résultats sont exprimés par l'indice de stimulation (SI : *Stimulation Index*). Ce dernier est obtenu par calcul et justifie une classification de la substance d'essai comme sensibilisant de la peau de catégorie 1 s'il est ≥ 3 . Les données recueillies au cours de la réalisation de ce test permettent de classer les sensibilisants cutanés en fonction de leur puissance sensibilisante dans les sous-catégories 1A ou 1B du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques de l'Organisation des Nations-Unies.

La concentration efficace, induisant un SI de 3 (EC3), peut être calculée ; elle est considérée comme prédictive du potentiel sensibilisant d'une substance (Basketter *et al.*, 1999; Vandebriel and van Loveren, 2010).

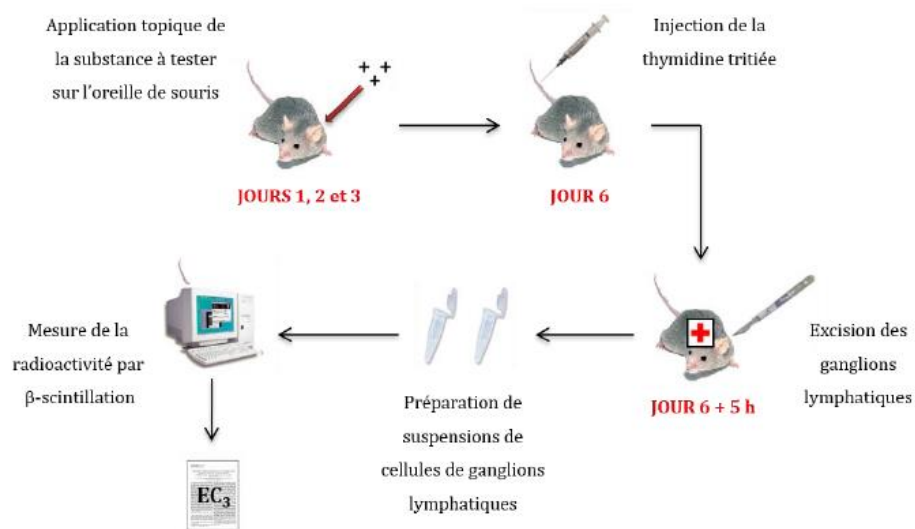


Figure 35. Protocole expérimental du LLNA.

(d'après (OECD, 2001))

Il existe deux variantes non radioactives du test LLNA. L'une conduite chez la souris (de souche CBA/J), se base sur la quantification par bioluminescence, dans les ganglions lymphatiques auriculaires, du contenu en ATP, indicateur de cette prolifération. Le protocole expérimental dure 8 jours. La méthode luciférine/luciférase quantifie la bioluminescence exprimée en unités relatives de luminescence (RLU). Les résultats sont exprimés en SI obtenu par calcul. Le test est considéré comme positif si le SI est $\geq 1,8$. Cet essai réglementaire est décrit dans la ligne directrice OCDE 442A (OECD., 2010a).

L'autre variante, conduite chez la souris (de souche CBA/JN), évalue la prolifération cellulaire en mesurant l'incorporation de la 5-bromo-2-désoxyuridine (BrdU), un analogue de la thymidine, dans l'ADN des lymphocytes des ganglions auriculaires. Le protocole expérimental dure 6 jours. La BrdU intégrée dans l'ADN des lymphocytes ganglionnaires est quantifiée à l'aide d'un kit de dosage ELISA. Les résultats sont exprimés en SI obtenu par calcul. Le test est considéré comme positif si le SI est $\geq 1,6$. Cet essai réglementaire est décrit dans la ligne directrice OCDE 442B (OECD., 2010b).

Le LLNA par la simplicité de son protocole et la nature « quantitative » du paramètre mesuré est moins susceptible d'erreurs techniques que les tests conduits chez le cobaye; cependant, il n'est pas dénué de tout résultat faussement positif ou négatif (Basketter *et al.*, 2009; Loveless *et al.*, 2010; Vandebriel and van Loveren, 2010).

Si le LLNA permet la détection des molécules allergisantes et la quantification de leur potentiel sensibilisant, il n'en demeure pas moins un test *in vivo* nécessitant un nombre non négligeable de souris de laboratoire.

La durée, le coût des tests réalisés chez l'animal ainsi que l'incitation à limiter l'utilisation d'animaux de laboratoire pour l'évaluation des substances chimiques ont conduit à développer des tests de substitution. Ils sont basés sur les connaissances actuelles des mécanismes de l'allergie de contact et s'inscrivent dans des approches *in silico* (modélisation informatique), *in chemico* (étude de la réactivité chimique des agents sensibilisants vis-à-vis des protéines), et *in vitro* (utilisation de cultures cellulaires).

7.2. Les méthodes *in silico*

Le développement d'outils informatiques fiables couplé à la croissance de la puissance informatique a permis la mise en place de techniques de simulations numériques centrées sur la prédiction du pouvoir sensibilisant des allergènes cutanés. Les méthodes *in silico* axées sur les relations de structure-activité (SARs : *Structure-Activity Relationships*) des composés allergisants permettent de faire le rapprochement entre leurs propriétés physico-chimiques et leur potentiel sensibilisant (Lepoittevin, 1999). Trois approches différentes basées sur les SARs existent actuellement et sont brièvement détaillées ci-dessous.

- **Les bases de données**

Les bases de données cherchent à compiler un maximum d'informations relatives à des cas d'allergies observés. Généralement hospitalières, les informations sont basées sur des données cliniques et non chimiques. En 1985, Benezra *et al.*, ont développé une base de données prenant en compte les caractéristiques physico-chimiques des molécules allergisantes et fonctionnant via un programme informatique appelé PROPHET (Benezra *et al.*, 1985). À l'origine, cette base de données regroupait toutes les données extraites du journal *Contact Dermatitis* (sur la période 1975-1982). La recherche s'effectue à l'aide d'un arbre de classification (structures, sous-structures chimiques, etc.). La limite de cette méthode tient à la manière dont la base de données est alimentée. En effet, dans la littérature, les cas d'allergies les plus bénins, mais les plus communs, sont souvent moins cités que des cas atypiques.

- **Les logiciels informatiques experts**

Les logiciels informatiques dits « experts » sont fondés sur la comparaison structurale de la molécule suspectée sensibilisante avec des motifs réactifs déjà référencés (Karlberg *et al.*, 2008). Pour chaque molécule un profil des risques peut ainsi être dressé. Outre les données structurales, certains paramètres physico-chimiques sont également pris en compte (capacité à pénétrer l'épiderme, faculté des métabolites de réagir avec les acides aminés, etc.). Suite à l'évaluation de plus de 200 composés, plusieurs de ces logiciels experts ont été validés par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique) parmi lesquels DEREK (*Deduction and Estimation of Risk from Existing Knowledge*) et TOPKAT (*Toxicity Prediction by Komputer Assisted Technology*) (Sanderson and Earnshaw, 1991; Enslein *et al.*, 1997). Bien que performantes, ces méthodes informatiques sont quelque peu limitées en raison de leur incapacité à identifier les pré- et les pro-haptènes, molécules qui, au regard de leur structure chimique, sont non sensibilisantes. Ces deux systèmes experts reposent sur une approche empirique et statistique. TIMES-SS (*Tissue Metabolism Simulator for Skin Sensitization*) est un système expert hybride entre les systèmes

basés sur la connaissance et les systèmes statistiques ; il prédit le métabolisme cutané et l'interaction du composé parent et de ses métabolites avec les protéines cutanées (Patlewicz *et al.*, 2007).

- **Les méthodes quantitatives basées sur la relation structure-activité**

Les méthodes quantitatives basées sur la relation structure-activité (QSARs : *Quantitative Structure-Activity Relationships*) permettent également de quantifier l'intensité d'une réponse biologique. Dans le domaine de l'allergie de contact, la méthode la plus couramment utilisée est le RAI (*Relative Alkylation Index*) (Roberts *et al.*, 1991). Suivant cette méthode, le potentiel sensibilisant d'une molécule est en rapport avec son aptitude à se lier à une protéine. Le RAI estime le taux d'hapténisation des protéines par une substance chimique donnée et en déduit l'intensité de la réponse biologique. Trois paramètres sont ainsi pris en compte : la dose de produit appliquée, la lipophilie de la molécule et sa réactivité chimique. Il en découle une relation mathématique :

$$\text{RAI} = \mathbf{A} \log(\mathbf{k}) + \mathbf{B} \log(\mathbf{P}) + \mathbf{C} \log(\mathbf{D})$$

où **k**, la constante cinétique de la réaction entre la molécule à tester et le nucléophile modèle

log(P), le coefficient de partage octanol/eau

D, la dose du produit à tester

A, B et C, le poids de chacun des paramètres

Chaque famille de molécules a une équation qui lui est propre en fonction de la manière dont les molécules sont susceptibles d'interagir avec des nucléophiles (S_N , accepteur de Michael, etc.). Initialement, le modèle du RAI s'appuyait uniquement sur des données fournies par le GPMT. Par la suite, des données issues du LLNA ont été introduites dans ce modèle mathématique (Gerberick *et al.*, 2004a) Si le RAI permet d'évaluer avec une bonne précision le potentiel sensibilisant de deux molécules issues

d'une même famille, il ne permet pas d'évaluer deux substances provenant de familles chimiques différentes. C'est-à-dire qu'aucune extrapolation de résultats d'une famille de composés à une autre n'est possible. Pour cette raison, d'autres méthodes complémentaires sont nécessaires pour évaluer le potentiel sensibilisant des molécules xénobiotiques.

7.3. Les méthodes *in chemico*

Au courant des années 1930, Landsteiner et Jacobs ont entrepris les premiers travaux sur l'étude de la réactivité de molécules sensibilisantes (Landsteiner and Jacobs, 1936). Ils ont fait réagir des dérivés halogénés du nitrobenzène avec un nucléophile simple, l'aniline. Parallèlement, les réponses allergiques provoquées par ces dérivés halogénés ont été étudiées chez le cobaye. Ces auteurs ont constaté qu'un dérivé halogéné du nitrobenzène réactif vis-à-vis de l'aniline présentait également la faculté d'induire une allergie cutanée chez le cobaye et, qu'inversement, un dérivé non réactif vis-à-vis de l'aniline était non allergisant chez ce même animal. Ainsi, pour la première fois, les auteurs ont démontré qu'une corrélation existe entre la réactivité d'une molécule et son pouvoir allergisant.

Si les premiers travaux réalisés sur la réactivité chimique entre haptènes et protéines ont été entrepris dans les années 30, ce n'est qu'à partir des années 2000, en raison des législations européennes, que des méthodes de détection *in chemico* d'allergènes cutanés ont été développées. Elles sont fondées sur le postulat que le potentiel sensibilisant d'une substance chimique est directement corrélé à sa réactivité vis-à-vis de peptides. Si certaines de ces méthodes sont à l'heure actuelle en phase de développement, d'autres ont déjà démontré leur justesse. (Gerberick *et al.*, 2008).

- **Test de réactivité avec des peptides synthétiques (DPRA : direct peptide reactivity assay)**

Le DPRA (*Direct Peptide Reactivity Assay*) est un test rapide d'évaluation du pouvoir sensibilisant des composés chimiques basé sur leur réactivité avec des peptides. Développé en 2004 par Gerberick *et al.*, le DPRA reposait à l'origine sur l'observation de la déplétion de quatre peptides différents après incubation/réaction de ces derniers avec la molécule soumise au test (Gerberick *et al.*, 2004b). Ces peptides correspondent au glutathion, un peptide naturel impliqué dans les processus de détoxification de l'organisme, et trois peptides de synthèse de séquence générale AcRFAAXAA (avec X = cystéine, lysine ou histidine).

Dans la pratique, l'haptène sélectionné est incubé 24 h séparément avec chacun des peptides à température ambiante. La déplétion des différents peptides est ensuite mesurée par CLHP (chromatographie liquide haute performance) couplée à une détection UV. Basé sur les données de déplétion peptidique obtenues avec les peptides à lysine ou à cystéine, un arbre décisionnel permet de classer les haptènes en quatre catégories: non sensibilisants, sensibilisants faibles, sensibilisants modérés et sensibilisants forts (**Figure 36**) (Gerberick *et al.*, 2007).

Les premiers essais réalisés sur 82 molécules, ont montré une bonne précision concernant la prédiction des allergènes ; on a observé une exactitude de l'ordre de 89 %, par comparaison avec les résultats obtenus dans le test du LLNA. Le test du DPRA est depuis 2013 validé par l'ECVAM (*European Center for Validation of Alternative Methods*) (Silvia and Claudius, 2013). Ce test réglementaire est décrit dans la ligne directrice OCDE 442C (OECD, 2015). Cependant, il ne permet pas de détecter les pré- et les pro-haptènes. Autre écueil : des problèmes liés à la faible solubilité des haptènes lipophiles dans le milieu semi-organique imposé par le protocole expérimental du DPRA ont été décrits. Pour surmonter cette difficulté, Merckel *et al.*, ont proposé en 2010 l'utilisation de microémulsions permettant une meilleure solubilité des différents

réactifs (Merckel *et al.*, 2013). Leurs travaux ont démontré la possibilité d'effectuer des réactions de type haptènes-peptides dans un milieu contenant une phase aqueuse, une phase organique, un surfactant et un co-surfactant. Néanmoins, les études de réactivité menées par RMN du carbone 13 ont montré la limite de la méthode puisque les réactivités observées en milieu semi-organique ne sont pas toujours identiques à celles réalisées dans les microémulsions.

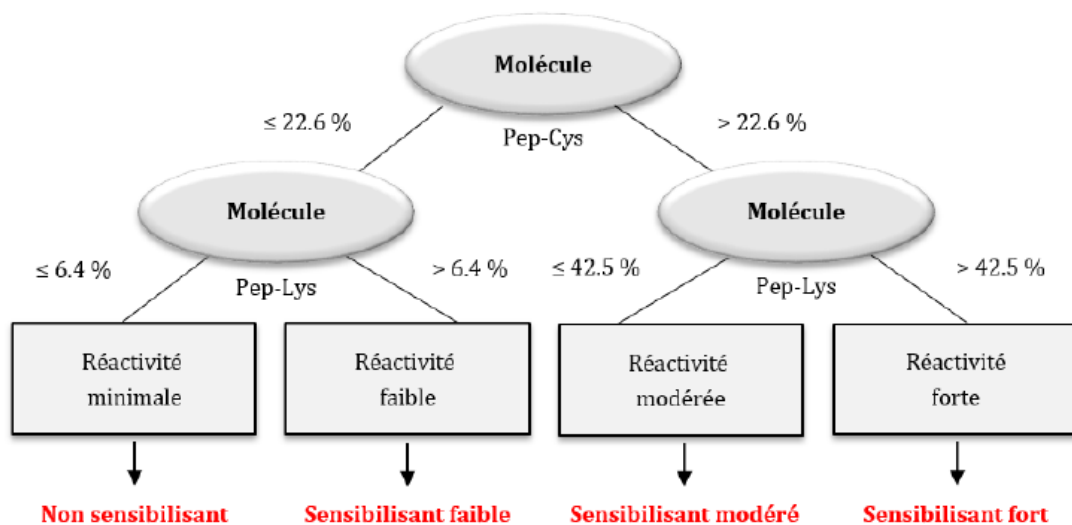


Figure 36. Arbre décisionnel de classification des allergènes selon la méthode du DPRA.

(d'après (Gerberick *et al.*, 2007))

- **Test de réactivité : Peroxydase Peptide Reactivity Assay (PPRA)**

Le PPRA est un test de détection des allergènes qui s'inscrit dans la continuité du DPRA (Gerberick *et al.*, 2009). Mis au point en 2009 par Gerberick *et al.*, il vient pallier les déficiences du DPRA en proposant l'évaluation du pouvoir sensibilisant de pré- et pro-haptènes. Le PPRA se différencie du DPRA par l'intégration d'une étape d'oxydation dans son protocole expérimental. Les peroxydases sont largement présentes dans la peau et leur rôle dans l'activation de certains xénobiotiques est important (Smith *et al.*, 1991). Les premières études réalisées ont utilisé un système oxydant composé de peroxydases de raifort et d'eau oxygénée (HRP/P). Depuis 2011, le PPRA ne se limite

plus à l'utilisation unique du peptide à cystéine. Si bon nombre d'allergènes sont réactifs vis-à-vis du groupement thiol des résidus cystéines, d'autres sont plus spécifiques des groupements aminés. Ainsi, le peptide à lysine possédant une amine primaire nucléophile a été introduit dans le PPRA (Troutman *et al.*, 2011).

7.4. Les méthodes *in vitro*

La réglementation européenne encadrant la mise sur le marché européen des substances ou mélanges dangereux, sous conditions d'enregistrement, d'évaluation et d'autorisation par les autorités européennes, a récemment évolué, notamment avec le dispositif REACH (European and Commission, 2006). Cette réglementation impose aux industriels de connaître les effets sur la santé des substances chimiques et met notamment l'accent sur l'importance d'évaluer l'effet sensibilisant de ces substances.

Plusieurs tests *in vitro* destinés à évaluer le potentiel sensibilisant des produits chimiques ont été développés au cours des deux dernières décennies. Le h-CLAT (*human Cell Line Activation Test*), le U-SENSTM (*In Vitro Skin Sensitisation: U937 Cell Line Activation Test*) (anciennement appelé MUSST : *Myeloid U-937 Skin Sensitization Test*), le *keratinoSens*[®] assay ou encore l'utilisation d'épidermes reconstruits peuvent ainsi être cités (Wong *et al.*, 2015).

- Tests basés sur l'utilisation de kératinocytes : *KeratinoSens*[®], *LuSens*

Des études suggèrent que les sensibilisants de contact activent une voie de signalisation en réponse au stress électrophile provoqué par ces derniers. Dans cette voie, la protéine Keap1 normalement associée au facteur de transcription nucléaire Nrf2, réagit avec les haptènes électrophiles présents dans le cytoplasme. Le facteur Nrf2 se dissocie alors de Keap1, migre dans le noyau où, après avoir formé un hétérodimère avec la protéine MAF, il se fixe sur des éléments de réponse antioxydants (ARE) et induit ainsi la transcription de gènes contenant ARE dans leur promoteur. Les

tests KeratinoSens[®] et LuSens utilisent une lignée cellulaire humaine HaCaT dérivée de kératinocytes. Le test repose sur l'activation d'un gène reporteur (la luciférase) contrôlé par des éléments de réponse antioxydants (**Figure 37**) (Natsch and Emter, 2008; Emter *et al.*, 2010). La luciférase est une enzyme capable d'émettre un rayonnement lumineux au contact de son substrat. Dans les deux tests, les kératinocytes humains, la molécule à tester et le substrat de l'enzyme sont incubés 48 heures avant de mesurer l'activité de la luciférase par luminescence. Si l'activité de la luciférase des cellules exposées au produit à tester est 1,5 fois celle de la luciférase des cellules contrôles, la molécule testée est jugée sensibilisante. Le test a été soumis à des essais de reproductibilité inter et intra-laboratoires et a donné un taux de réponses exactes de 85 % en testant 28 substances à l'aveugle (Natsch *et al.*, 2011). Le *KeratinoSens[®] assay* est un test réglementaire depuis 2015 décrit dans la ligne directrice 442D de l'OCDE (OCDE, 2015).

- ***Tests basés sur l'utilisation de cellules dendritiques et de lignées de cellules dendritiques-like***

Jouant un rôle clé dans l'initiation de la sensibilisation, les cellules dendritiques ont rapidement été proposées et identifiées comme des candidates prometteuses pour le développement de tests *in vitro*. Au début des années 2000, plusieurs équipes ont rapporté des résultats encourageants obtenus à partir de DC humaines dérivées de monocytes du sang circulant, après exposition *in vitro* aux allergènes (dos Santos *et al.*, 2009). Ces tests sont basés sur les changements phénotypiques dans les DC, tels que l'augmentation de l'expression de CD86 et CD54, le relargage d'interleukine 1 β ou l'internalisation de molécules de CMH II. Mais ces cellules présentent un certain nombre d'inconvénients, dont le coût et la complexité des procédures d'obtention et de préparation, ainsi que leur inhérente variabilité inter donneurs. Comme alternative possible, les lignées cellulaires myéloïdes de leucémie humaine représentent des candidates appropriées en tant que cellules dendritiques de substitution. Plusieurs

études ont démontré que les lignées humaines myéloïdes THP-1, KG-1, U937 et MUTZ-3 ont la capacité d'afficher un phénotype proche de celui des DC.

Acceptés par l'ECVAM, le h-CLAT et le U-SENSTM reposent sur la mesure de l'activation de marqueurs de surface (CD54 ou CD86) des DC après exposition à une substance sensibilisante donnée (**Figure 37**) (Aeby *et al.*, 2010). Ces tests sont réglementaires et décrits dans la ligne directrice 442E de l'OCDE (OECD, 2017). Dans le cas du h-CLAT, des cellules de la lignée cellulaire THP-1 (issue d'une leucémie humaine à monocytes) sont mises en pré-culture (48 à 72 heures) avant d'être exposées à la molécule à tester pendant 24 heures. La surexpression des marqueurs de surface CD54 ou CD86 est évaluée à l'aide d'anticorps fluorescents dirigés contre les marqueurs CD54 ou CD86. Après incubation, la molécule testée est répertoriée comme sensibilisante si l'expression des marqueurs CD54 et CD86 des cellules exposées est respectivement 2 fois et 1,5 fois celle des cellules de contrôle. Deux études donnent une prédictibilité du test de 89 % et 93,1 % (Sakaguchi *et al.*, 2006; Sakaguchi *et al.*, 2009). Des essais conduits sur une centaine de produits chimiques pour comparer les tests h-CLAT et LLNA donnent une concordance de 84 % entre les deux tests (dos Santos *et al.*, 2009; Ashikaga *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2015).

Le test U-SENSTM ressemble fortement au test h-CLAT (Python *et al.*, 2007). Des cellules de la lignée cellulaire U-937 (issue d'un lymphome histiocytaire humain) sont exposées à la molécule à tester pendant 48 heures, puis la viabilité des cellules et la surexpression du marqueur CD86 sont testées via un anticorps fluorescent spécifique au marqueur CD86. Après incubation des cellules testées, la molécule est considérée comme allergisante si l'expression du marqueur CD86 des cellules exposées est 1,2 fois celle des cellules témoins. Les résultats des essais conduits sur 50 composés donnent une prédictibilité du test de 90 % (Ade *et al.*, 2006; Python *et al.*, 2007; dos Santos *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2015).

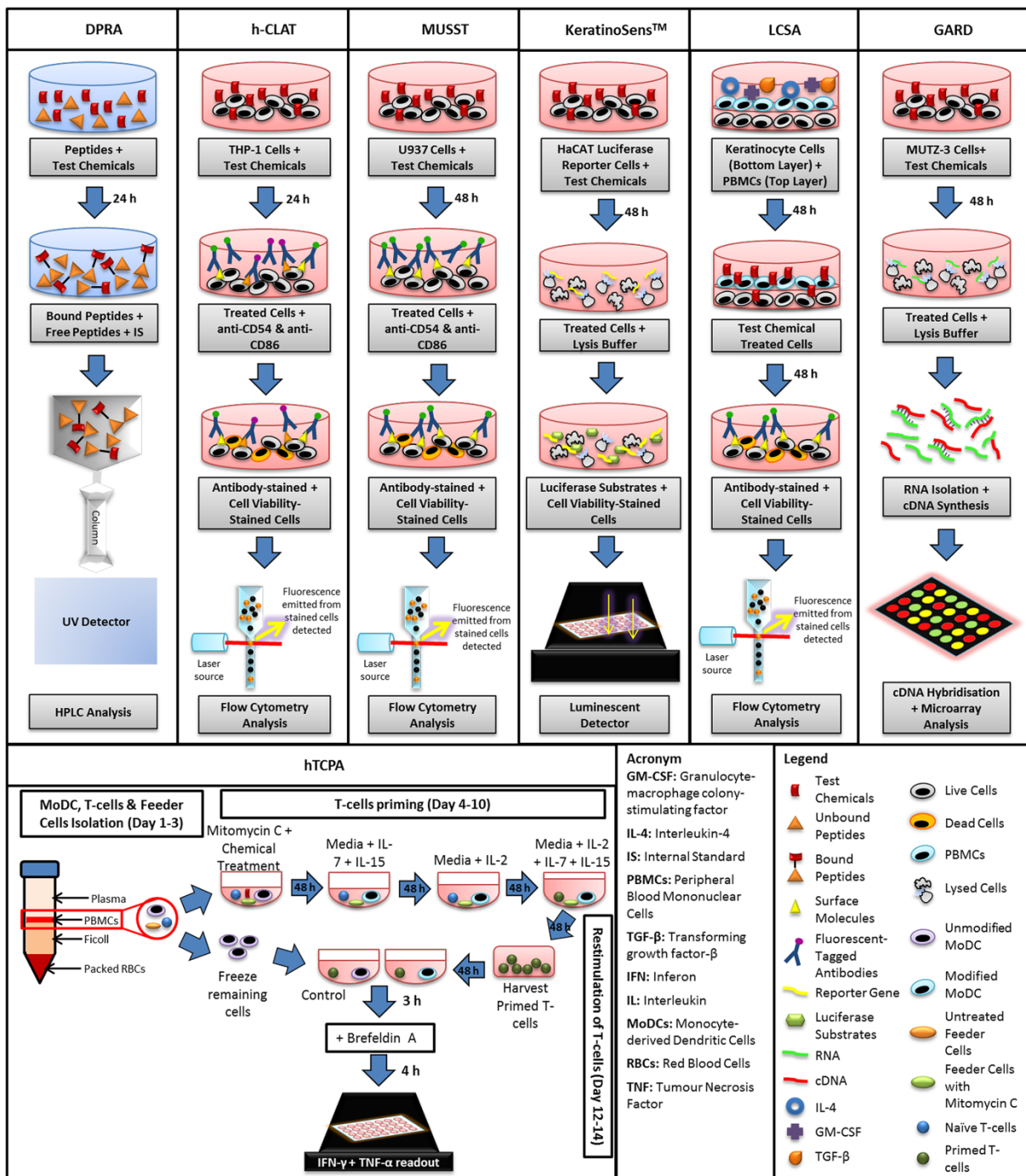


Figure 37. Résumé du déroulement des différents tests de substitution disponibles pour l'évaluation du potentiel sensibilisant de substances chimiques.

(d'après (Wong et al., 2015))

- ***Autres méthodes de substitution en développement***

Le test SENS-IS, développé par ImmunoSearch, est conduit sur un épiderme 3D reconstruit, pour mieux prendre en compte la biodisponibilité des produits qui dépend de leur solubilité ou état physique (Cottrez *et al.*, 2016). De plus, l'utilisation de cet épiderme permet de s'assurer que le métabolisme cutané est pris en compte dans l'évaluation du potentiel sensibilisant. Pour répondre à tous les aspects de la complexité de la sensibilisation cutanée et pour prendre en compte la variété de sensibilisants différents, SENS-IS utilise un ensemble de 62 marqueurs séparés en 3 groupes. Un groupe de 24 gènes pour mesurer l'irritation cutanée et déterminer la dose minimale irritante, un groupe de 17 gènes impliqués dans la voie de détoxification REDOX (gènes ARE) et un groupe de 21 gènes impliqués dans l'inflammation, les communications et l'homéostasie cellulaires (gènes SENS-IS). Le produit testé est considéré comme sensibilisant s'il induit au moins 7 gènes dans l'un ou dans les deux groupes de gènes ARE ou SENS-IS. Le test SENS-IS est en évaluation auprès de l'ECVAM.

Le GARD (*Genomic Allergen Rapid Detection Test*) est un test récent en développement, étudié par l'équipe Johansson *et al.* d'ImmunoSearch, basé lui aussi sur l'activation de marqueurs de cellules dendritiques, mais dans la lignée cellulaire myélomonocytaire MUTZ-3 (Johansson *et al.*, 2013). Après stimulation de ces cellules avec des molécules sensibilisantes ou non, l'expression des gènes a été analysée par RT-qPCR en temps réel (*quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction*), pour en retirer une signature de biomarqueurs discriminant les substances sensibilisantes des non sensibilisantes. Les marqueurs sélectionnés sont impliqués dans certaines voies biologiques avec des composantes immunologiques pertinentes, telles que le stress oxydant et la réponse induite aux xénobiotiques, et pourraient apporter des explications sur les interactions moléculaires impliquées dans le processus de sensibilisation.

Le nombre de méthodes *in vitro* destinées à évaluer le potentiel sensibilisant des allergènes est en constante augmentation. Dans le cadre des approches intégrées en matière d'essais et d'évaluation (IATA, *Integrated Approaches to Testing and Assessment*), des combinaisons de tests de substitution à l'expérimentation animale (modèles *in silico*, *in chemico*, *in vitro*) seront nécessaires pour remplacer complètement les essais actuellement pratiqués sur l'animal, compte tenu de la restriction de chacune de ces méthodes à une seule étape de l'AOP (Casati *et al.*, 2013; ONU, 2013; Casati, 2018).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires des allergies cutanées et respiratoires sont différents, cependant certains événements clés communs pourraient être communs dans la phase de sensibilisation de ces deux pathologies (Chary *et al.*, 2018). Bien que les événements moléculaires de la phase de sensibilisation de l'allergie respiratoire ne soient pas tous identifiés, un projet d'AOP basé sur les connaissances existantes sur la sensibilisation cutanée est initié par l'OCDE (Mekenyan *et al.*, 2014; Chary *et al.*, 2018).

Objectifs

Les allergies représentent un problème majeur dans le domaine des maladies professionnelles et ont un impact sérieux sur la vie des travailleurs. Il est donc essentiel de pouvoir identifier les produits susceptibles d'entraîner des allergies chez les personnes qui y sont exposées afin de mettre en place des mesures de prévention adaptées. Comme nous avons pu le voir en introduction, les tests d'évaluation du potentiel sensibilisant des substances étaient réalisés sur l'animal (test de maximisation sur cobaye, test de lymphoprolifération sur souris). Or, la législation européenne actuelle engage à limiter le recours à l'expérimentation animale pour évaluer le pouvoir sensibilisant des substances chimiques mises sur le marché européen, incitant ainsi à développer des tests de substitution.

C'est dans ce contexte que ces dernières années, ont été développés des tests *in vitro* reproduisant l'une ou l'autre des étapes clés de la phase de sensibilisation des réactions allergiques.

L'objectif de notre laboratoire est de développer des outils permettant d'évaluer le potentiel sensibilisant cutané et/ou respiratoire des substances industrielles. Nous travaillons depuis quelques années sur un modèle de culture de cellules dendritiques issues de moelle osseuse de souris (BMDC) permettant de mesurer l'expression de marqueurs d'activation de ces cellules exposées à des agents sensibilisants. Cette activation des cellules dendritiques correspond au troisième événement clé (KE3) de la phase de sensibilisation. Ce modèle cellulaire donne des résultats prometteurs pour l'identification de produits sensibilisants et leur catégorisation selon leur puissance sensibilisante et a fait l'objet d'une publication (annexe I). Celle-ci est résumée dans la première partie des résultats.

L'activation des lymphocytes (KE4) est la dernière étape du mécanisme physiopathologique de la sensibilisation allergique schématisé dans l'AOP. À l'heure actuelle, seuls les 3 premiers événements sont évaluables par les tests validés : il n'existe pas à ce jour de test réglementaire correspondant à ce 4^{ème} événement. Or il est admis qu'un tel test apporterait des informations essentielles pour l'évaluation des sensibilisants (classification, catégorisation, polarisation Th1/Th2...). L'objectif principal de ma thèse était de développer un modèle cellulaire permettant de reproduire *in vitro* cet événement. En d'autres termes mon travail a consisté à étudier la fonctionnalité des BMDC activées du modèle précédemment développé ; c'est-à-dire à savoir si ces DC étaient capables d'activer les LT comme cela est observé *in vivo* dans la quatrième étape clé de la phase de sensibilisation (KE4).

Mes travaux ont dans un premier temps consisté à vérifier que la voie de signalisation Nrf2/Keap1 était bien activée dans notre modèle de BMDC lors d'une exposition à deux sensibilisants respiratoires, un sensibilisant cutané, et un produit chimique non sensibilisant. Pour ce faire, une étude de la transcription de six gènes sous le contrôle de Nrf2 a été réalisée (*nqo-1*, *hmox*, *cat*, *srxn-1*, *il6* et *gclc*), et est présentée dans la première partie des résultats.

Ensuite j'ai développé un modèle de coculture BMDC-LT permettant d'évaluer l'activation de LT mis en culture avec des BMDC pré-exposées à un sensibilisant respiratoire de référence, l'hexachloroplatinate d'ammonium (AHCP). Au cours de cette phase de mise au point, nous avons cherché à identifier des marqueurs sensibles d'activation des LT (marqueurs membranaires, production de cytokines, prolifération). Nous avons aussi recherché les conditions de coculture et d'exposition des BMDC à l'AHCP conduisant à une activation maximale des LT. Enfin, nous avons cherché à déterminer le rôle des sous-populations de LT (naïfs/mémoires, Treg, CD4⁺, CD8⁺) dans les réponses observées.

La troisième partie de nos travaux a été consacrée à évaluer les performances du modèle de coculture en termes de sensibilité, spécificité et exactitude, en élargissant

la gamme des produits de référence testés (sensibilisants cutanés, sensibilisants respiratoires, irritants, non sensibilisants-non irritants). Au cours de cette phase, nous avons aussi cherché à voir si un profil particulier se dégageait dans la réponse des LT en fonction de la nature des sensibilisants utilisés (sensibilisants cutanés *versus* sensibilisants respiratoires, sensibilisants forts *versus* sensibilisants faibles).

Enfin, nous avons voulu vérifier si la réponse des LT observée pouvait être modulée en fonction de la souche de souris d'où sont issues les cellules du modèle. À cette fin, nous avons comparé les résultats obtenus avec les cellules issues de souris BALB/C connues pour donner des réponses de polarité Th2 à ceux obtenus avec des cellules issues de souris C57/BL6J connues pour donner des réponses de polarité Th1.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel et méthodes

Les principales étapes de la coculture BMDC-LT sont schématisées dans le diagramme ci-dessous (**Figure 38**). Ce dernier décrit le protocole le plus fréquemment utilisé, toutefois en fonction des expériences certains paramètres peuvent varier (souche de souris utilisée, type de tri cellulaire...).

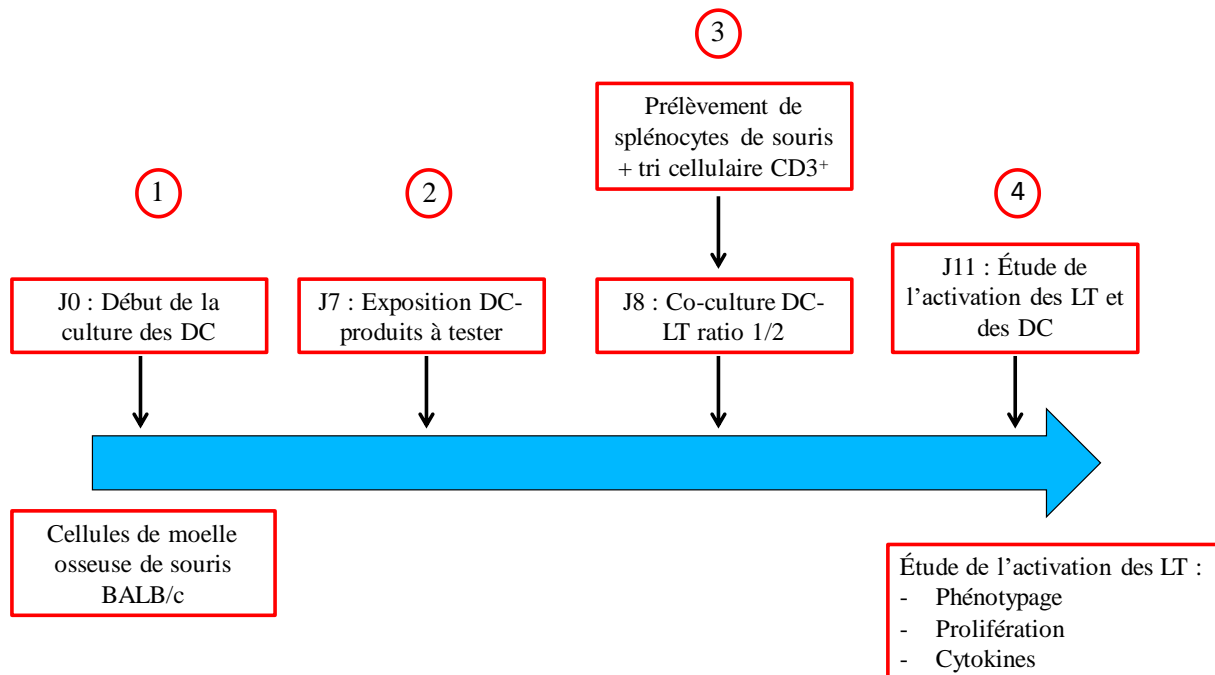


Figure 38 . Protocole de coculture cellules dendritiques-lymphocytes T.

Les cellules de moelle osseuse de souris sont décongelées à J 0 et mises en culture pendant 7 jours pour différenciation en DC. À J 7, les DC immatures sont exposées pendant 24 h aux différents produits à tester. À J 8, les LT sont recueillis à partir des splénocytes de souris et mis en culture avec les DC préalablement rincées et reprises dans du milieu de culture frais (rapport DC/LT de ½). Après 72 h de coculture, l'activation des cellules récupérées est analysée.

1. Animaux

Les DC et les LT utilisés pour les cocultures proviennent de souris femelles BALB/c AnNCrI et C57BL/6NCrI âgées de 6 à 8 semaines. Elles sont obtenues auprès de Charles River, (Sulzfeld, 97633, Allemagne). Les animaux séjournent à l'animalerie pendant une

semaine d'acclimatation avant le commencement des expérimentations et reçoivent nourriture et eau *ad libitum*. L'animalerie est un établissement accrédité pour l'expérimentation animale (NC54- 547-10). Les expérimentations ont été menées dans le respect du décret n°2013-118 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

2. Produits chimiques

Les produits chimiques de référence pour l'étude de l'activation des LT sont ceux proposés par le Centre Européen de Validation des Méthodes Alternatives (*European Centre for the Validation of Alternative Methods* ECVAM), le Centre Européen d'Écotoxicologie et de Toxicologie des Produits Chimiques (*European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals* ECETOC) et le projet européen Sens-it-iv, afin de constituer un panel représentatif d'irritants, de non-sensibilisants et de sensibilisants de contact et respiratoires (Rovida *et al.*, 2007; Casati *et al.*, 2009).

Tableau 6. Produits de référence testés.

| Noms | Abréviations | N° CAS | Concentrations testées (µM) | Classification | Véhicule |
|-----------------------------------|-------------------|------------|---|----------------------------|-----------|
| Dinitrofluorobenzène | DNFB | 70-34-8 | 5 ; 10 ; 15 | Sensibilisant cutané | HBSS/DMSO |
| Base de Bandrowski | BB | 20048-27-5 | 5 ; 10 ; 20 | Sensibilisant cutané | HBSS/DMSO |
| <i>para</i> -Phénylènediamine | pPD | 106-50-3 | 50 ; 100 ; 200 ; 300 | Sensibilisant cutané | HBSS |
| Cinnamaldéhyde | Cinn | 104-55-2 | 100 | Sensibilisant cutané | HBSS/DMSO |
| Sulfate de nickel | NiSO ₄ | 10101-97-0 | 300 | Sensibilisant cutané | HBSS |
| Eugénol | Eug | 97-53-0 | 500 ; 620 ; 750 | Sensibilisant cutané | HBSS/DMSO |
| Chlorure de cobalt | CoCl ₂ | 7646-79-9 | 300 | Sensibilisant cutané | HBSS/DMSO |
| Hexachloroplatinate d'ammonium IV | AHCP | 16919-58-7 | 12,5 ; 50 ; 75 ; 100 ; 150 ; 200 | Sensibilisant respiratoire | HBSS |
| <i>para</i> -Tolyl isocyanate | TMI | 622-58-2 | 300 ; 400 | Sensibilisant respiratoire | DMSO |
| Glutaraldéhyde | Glut | 111-30-8 | 20 | Sensibilisant respiratoire | HBSS |
| Dodécyl sulfate de sodium | SDS | 151-21-3 | 100 ; 200 | Irritant | HBSS |
| Acide <i>para</i> -aminobenzoïque | pABA | 150-13-0 | 2,5.10 ³ ; 5.10 ³ ; 10.10 ³ | Irritant | HBSS |
| Sulfate de zinc | ZnSO ₄ | 7446-20-0 | 50 ; 100 ; 200 | Non sensibilisant | HBSS |
| Isopropanol | Isoprop | 67-63-0 | 25.10 ³ ; 50.10 ³ ; 100.10 ³ | Non sensibilisant | HBSS |

3. Mise en place de la coculture cellules dendritiques-lymphocytes T

Les cultures cellulaires et l'analyse de l'activation des cellules nécessitent l'utilisation de plusieurs milieux, tampons et réactifs répertoriés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7. Réactifs utilisés dans les différentes cultures cellulaires

| Désignation | Composition |
|---|---|
| IMDM complet | Milieu de Dulbecco modifié par Iscove (IMDM, Fisher scientific,) contenant 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF), 100 U/mL de pénicilline (Biowest), 100 µM de streptomycine (Fisher scientific), 50 µM de β-mercaptoéthanol (Sigma) et 50 ng/mL de GM-CSF recombinant (rGM-CSF preprotech) |
| Tampon de congélation | 90 % de SVF additionné de 10 % de Diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma) |
| RPMI complet | Milieu <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI, Fisher scientific) contenant 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF), 100 U/mL de pénicilline, 100 µM de streptomycine (Fisher scientific), 50 µM de β-mercaptoéthanol (Sigma) |
| Tampon pour sélection magnétique | Tampon phosphate salin (<i>Phosphate Buffered Saline</i> : PBS Fisher scientific) sans ions Ca ²⁺ et Mg ²⁺ contenant 0,5 % SVF (v/v) et 2 mM d'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) |
| Tampon pour marquage au CFSE : | Tampon phosphate salin (<i>Phosphate Buffered Saline</i> : PBS Fisher scientific) sans ions Ca ²⁺ et Mg ²⁺ contenant 0,1 % SVF (v/v) |
| Tampon de marquage pour cytométrie : | Tampon phosphate salin (<i>Phosphate Buffered Saline</i> : PBS Fisher scientific) sans ions Ca ²⁺ et Mg ²⁺ contenant 2 % SVF (v/v) |

3.1. Différenciation des cellules dendritiques issues de moelle osseuse

Les DC utilisées dans les cocultures sont obtenues par différenciation de cellules de moelle osseuse de souris dans du milieu de culture enrichi en GM-CSF (J0 à J7 **Figure 38**).

Les souris BALB/c sont mises à mort par dislocation cervicale. Les tibias et fémurs sont prélevés et sectionnés en leur milieu. Les cellules de moelle osseuse sont obtenues par rinçage avec du milieu IMDM complet (**Tableau 7**). Après un comptage par la technique d'exclusion du bleu trypan réalisé au Vicell (Beckman Coulter), elles sont mises en suspension dans le tampon de congélation (**Tableau 7**) à raison de 25. 10⁶ cellules/mL et conservées dans l'azote liquide jusqu'à leur utilisation (Pepin *et al.*, 2007).

Avant mise en culture, les cellules sont décongelées rapidement par immersion dans un bain-marie à 37 °C. Elles sont ensuite rincées dans de l'IMDM complet (14 mL/mL de suspension cellulaire décongelée) puis remises en suspension dans 15 mL d'IMDM complet et ensemencées dans des boîtes de Pétri de 150 mm de diamètre non traitées

pour la culture cellulaire (Fisher). Les cellules sont placées dans un incubateur à atmosphère contrôlée (Température 37 °C, 5 % de CO₂). Après 4 jours de culture, 15 mL d'IMDM complet sont ajoutés.

3.2. Exposition des BMDC aux produits de référence testés

Après 7 jours de culture (**Figure 38**), les cellules sont décollées avec 4 mL d'une solution de trypsine 0,05 %-EDTA 0,02 % (Fisher scientific) puis centrifugées et remises en suspension dans du milieu complet avant d'être réparties en plaques 6 puits non traitées pour la culture cellulaire (Dutscher) à raison de $2 \cdot 10^6$ cellules par puits dans 2 mL de milieu. Les produits de référence sont solubilisés dans leur véhicule respectif (HBSS (Fisher scientific) (maximum 0,5 % v/v) ou HBSS-DMSO (maximum 0,1 % v/v) (**Tableau 7**) à la concentration souhaitée et ajoutés délicatement sur les cultures. Le milieu est homogénéisé par agitation douce. Les cellules sont placées dans l'incubateur jusqu'à leur mise en culture avec les LT à J 8 (**Figure 38**).

3.3. Sélection des populations de LT par séparation magnétique

Les LT sont obtenus à partir de splénocytes de souris. Ils sont isolés par tri cellulaire magnétique dont le principe est illustré dans la **Figure 39**. Les souris BALB/c sont mises à mort par dislocation cervicale, les rates sont prélevées et plongées dans du milieu RPMI. Chaque rate est ensuite broyée sur un tamis de 70 µm. Puis un comptage cellulaire est réalisé grâce à un compteur automatique ViCell (Beckman Coulter). C'est à partir de la suspension de splénocytes ainsi obtenue que sont réalisées les sélections cellulaires magnétiques décrites ci-dessous.

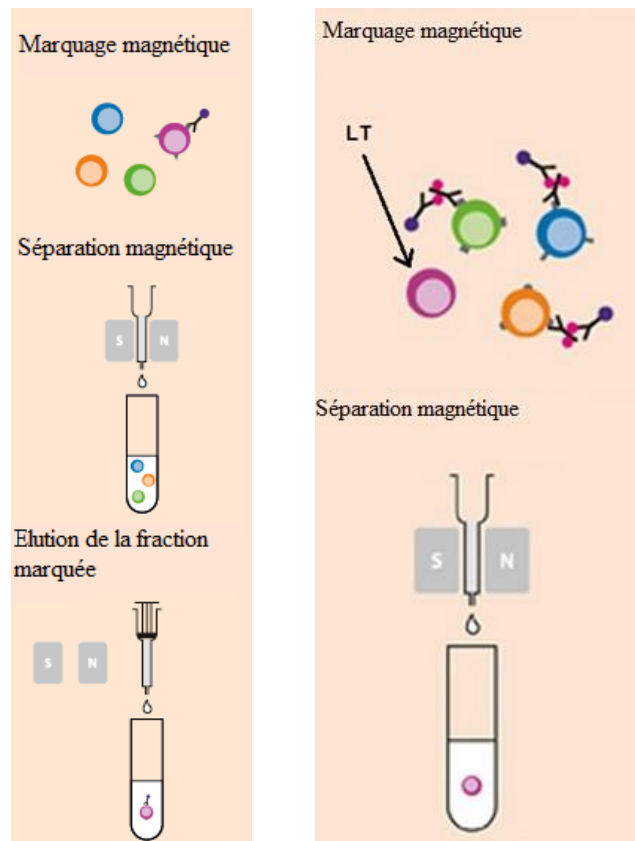
A : sélection positive B : sélection négative

Figure 39. Principe de l'enrichissement cellulaire magnétique (Miltenyi biotec).

La suspension cellulaire, précédemment incubée avec un ou plusieurs anticorps couplés à des billes magnétiques, traverse une colonne insérée dans un aimant. Les cellules marquées par les anticorps resteront piégées dans la colonne tandis que les cellules non marquées sont éluées. Les cellules retenues par le champ magnétique peuvent ensuite être récupérées en retirant la colonne de l'aimant et en les éluant dans du tampon pour sélection magnétique.

La sélection est dite « positive » (**Figure 39 A**) lorsque les cellules d'intérêt, marquées avec un anticorps spécifique restent piégées dans la colonne, ou « négative » (**Figure 39 B**) lorsque les anticorps utilisés sont dirigés contre toutes les cellules autres que la population d'intérêt. Dans ce dernier cas, c'est la suspension contenue dans l'éluât qui est utilisée dans la suite de l'essai.

Isolement des Lymphocytes T CD3⁺

Les LT CD3⁺ sont isolés à partir des splénocytes par sélection négative à l'aide du kit « *Pan T cell Isolation Kit II* » pour souris (Miltenyi). Les anticorps utilisés dans ce kit sont détaillés dans le **Tableau 8**.

Tableau 8. Composition du cocktail d'anticorps du tri "Pan T cell Isolation kit II, mouse".

| Désignation | Sélection | Antigènes cibles | Type cellulaire marqué |
|--|-----------|------------------|---|
| <i>Pan T Cell Isolation Kit II, mouse</i> | Négative | CD11b | Cellules myéloïdes, cellules Natural Killer (NK) |
| | | CD11c | Cellules myéloïdes |
| | | CD19 | Cellules B |
| | | CD45R (B220) | Cellules B |
| | | CD49b (DX5) | Cellules B, monocytes, plaquettes, cellules endothéliales |
| | | CD105 | Cellules endothéliales, monocytes et macrophages activés |
| | | CMH II | Cellules présentatrices d'antigènes |
| | | TER-119 | Érythrocytes |

La suspension de splénocytes est centrifugée 10 min à 300 g ; le culot est remis en suspension dans du tampon pour sélection magnétique ($2,5 \cdot 10^8$ cellules/mL). Les volumes de réactifs sont donnés pour 10^7 cellules reprises dans 40 μ L de tampon pour sélection magnétique. Les cellules sont incubées avec 10 μ L du cocktail d'anticorps couplés à la biotine pendant 5 min à 4 °C. Puis 30 μ L de tampon et 20 μ L de microbilles magnétiques recouvertes d'anticorps anti-biotine sont ensuite mélangés à la suspension. Après 10 min d'incubation à 4 °C, le volume de la suspension est ajusté à 500 μ L à l'aide du tampon. La suspension cellulaire est ensuite passée sur la colonne insérée dans l'aimant et les cellules d'intérêt non marquées sont récupérées dans l'éluât.

Pour isoler la population cellulaire CD3⁺ CD25⁻, une sélection négative a été réalisée à l'aide du kit « CD25 Microbeads Kit, mouse », comprenant des anticorps anti-CD25, à la suite de l'isolement des CD3⁺. En suivant le protocole suivant : Après comptage au Vicell, la suspension de splénocytes est centrifugée 10 min à 300 g ; le culot est repris dans du tampon pour sélection magnétique (2,5.10⁸ cellules/mL) et traité selon les instructions du fournisseur : les volumes de réactifs sont donnés pour 10⁷ cellules reprises dans 30 µL de tampon pour sélection magnétique. Dans un premier temps, 10 µL d'anticorps anti-CD25 couplés à la phycoérythrine (PE) et 10 µL du cocktail d'anticorps couplés à la biotine sont ajoutés à la suspension cellulaire. Après 10 min d'incubation à 4°C, 20 µL de tampon, 10 µL de microbilles anti-PE et 20 µL de microbilles anti-biotines sont rajoutés. Après 10 min à 4°C, la suspension cellulaire est transférée sur la colonne insérée dans l'aimant. Les cellules d'intérêt non marquées sont récupérées dans l'éluât.

Afin d'étudier plus précisément le rôle des cellules CD3⁺CD62L⁺ dans la réponse observée, une sélection positive des cellules CD62⁺ a été réalisée à la suite de l'isolement des CD3⁺. Cette sélection a été réalisée à l'aide du kit « CD62L MicroBeads Kit, mouse », comprenant des anticorps anti-CD62L en suivant le protocole suivant : après comptage au Vicell, la suspension de splénocytes est centrifugée 10 min à 300 g ; le culot est repris dans du tampon pour sélection magnétique et traité selon les instructions du fournisseur : 10⁷ cellules reprises dans 90 µL de tampon pour sélection magnétique. Dans un premier temps, 10 µL d'anticorps anti-CD62L couplés à la PE sont ajoutés à la suspension cellulaire et incubés 15 min à 4 °C. Après incubation, les cellules sont rincées en ajoutant 1 mL de tampon pour 10⁷ cellules et centrifugées 10 min à 300 g avant d'être reprises dans 500 µL de tampon pour 10⁸ cellules. La suspension cellulaire est transférée sur la colonne insérée dans l'aimant. Les cellules d'intérêt marquées sont récupérées après rinçage de la colonne séparée de l'aimant.

Isolement des cellules CD4⁺ CD44⁻ et CD8⁺ CD44⁻

Pour connaître la contribution de la population des lymphocytes T naïfs dans la réponse observée, deux kits de tri cellulaire magnétique ont été employés : le « *Naive CD4⁺ T cell Isolation Kit, mouse* » et le « *Naive CD8⁺ T cell Isolation Kit, mouse* » (Miltenyi) (**Tableau 9**). Ils permettent respectivement d'isoler par sélection négative les populations T CD4⁺ CD44⁻ et CD8⁺ CD44⁻ (**Tableau 9**).

Tableau 9. Composition des cocktails d'anticorps des kits de tri cellulaire "Naive CD4⁺ T cell Isolation Kit, mouse" et "Naive CD8a⁺ T cell Isolation Kit, mouse ».

| Désignation | Sélection | Antigènes cibles | Type cellulaire marqué |
|--|--|---|--|
| Naive CD4⁺ T cell Isolation Kit, mouse | Négative | CD8a | Cellules T CD8 ⁺ , cytotoxiques |
| | | CD11b | Cellules myéloïdes, cellules Natural Killer (NK) |
| | | CD11c | Cellules myéloïdes |
| | | CD19 | Cellules B |
| | | CD25 | Cellules T activées, T régulatrices, cellules B, monocytes |
| | | CD44 | Cellules T mémoires |
| | | CD45R (B220) | Cellules B |
| | | CD49b (DX5) | Cellules B, monocytes, plaquettes, cellules endothéliales |
| | | CD105 | Cellules endothéliales, monocytes et macrophages activés |
| | | Anti-CMH II | Cellules présentatrices d'antigènes |
| | | TER-119 | Erythrocytes |
| | | TCR γ/δ | Cellules T activées |
| | | Naive CD8a⁺ T cell Isolation Kit, mouse | Négative |
| CD11b | Cellules myéloïdes, cellules Natural Killer (NK) | | |
| CD11c | Cellules myéloïdes | | |
| CD19 | Cellules B | | |
| CD25 | Cellules T activées, T régulatrices, cellules B, monocytes | | |
| CD44 | Cellules T mémoires | | |
| CD45R (B220) | Cellules B | | |
| CD49b (DX5) | Cellules B, monocytes, plaquettes, cellules endothéliales | | |
| CD105 | Cellules endothéliales, monocytes et macrophages activés | | |
| Anti-CMH II | Cellules présentatrices d'antigènes | | |
| TER-119 | Erythrocytes | | |
| TCR γ/δ | Cellules T activées | | |

La procédure suivie est la suivante : après comptage au Vicell la suspension de splénocytes est centrifugée 10 min à 300 g, le culot est repris dans du tampon pour sélection magnétique ($2,5 \cdot 10^9$ cellules/mL) et traité selon les instructions du fournisseur : les volumes de réactifs sont donnés pour 10^8 cellules reprises dans 400 μ L de tampon pour sélection magnétique. Dans un premier temps, 100 μ L de cocktail d'anticorps couplés à la biotine sont ajoutés et incubés 5 min à 4 °C. Deux cents μ L de tampon, 200 μ L de microbilles anti-biotine et 100 μ L d'anticorps anti-CD44 couplés à la biotine sont ensuite mélangés à la suspension et incubés 10 min à 4 °C. La suspension est reprise dans 10 mL de tampon, puis centrifugée 10 min à 300 g. Le surnageant est éliminé et le culot re-suspendu dans du tampon pour sélection magnétique ($2 \cdot 10^8$ cellules/mL). La colonne est placée sur le support du séparateur magnétique adapté, puis rincée avec 3 mL de tampon. Après passage de la suspension cellulaire dans la colonne, les cellules d'intérêt non marquées sont récupérées dans l'éluât.

Ces tris pratiqués sur les splénocytes de souris permettent d'isoler différentes populations de LT. Chacune possède des caractéristiques spécifiques en fonction de leur mode de sélection et du matériel disponible chez le fournisseur.

A l'issue du tri *Pan T cell*, la population totale des LT CD3⁺ est récupérée par sélection négative, ce qui signifie que la population d'intérêt n'a pas subi de marquage et n'a pas été retenue dans la colonne magnétique. Le kit de tri *CD25 MicroBeads Kit, mouse* permet, à partir des LT CD3⁺ d'obtenir des LT CD3⁺ CD25⁻ dépourvus d'une partie des LT dits « régulateurs ». Là encore, la population d'intérêt est obtenue par sélection négative et n'a pas subi de marquage.

La sélection des cellules naïves a été réalisée à l'aide de deux tris différents.

Les tris CD4⁺ CD44⁻ et CD8⁺ CD44⁻ permettent de sélectionner à partir de splénocytes les sous-populations CD4⁺ naïves et CD8⁺ naïves par sélection négative ; les cellules exprimant le marqueur CD44⁺ qui caractérise une partie des cellules mémoires, sont retenues sur la colonne. Le tri CD62L⁺ couplé au tri *Pan T cell* permet quant à lui de sélectionner les LT CD3⁺ exprimant le CD62L caractéristique d'une partie des LT naïfs.

Ce tri utilise la sélection positive, ce qui signifie que les cellules d'intérêt CD62L⁺ sont marquées et retenues sur la colonne magnétique.

3.4. Marquage des lymphocytes T au Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)

La prolifération des LT à J11 (**Figure 38**) est analysée après marquage au CFSE, une molécule fluorescente permettant de compter les différentes générations cellulaires (**Figure 40**).

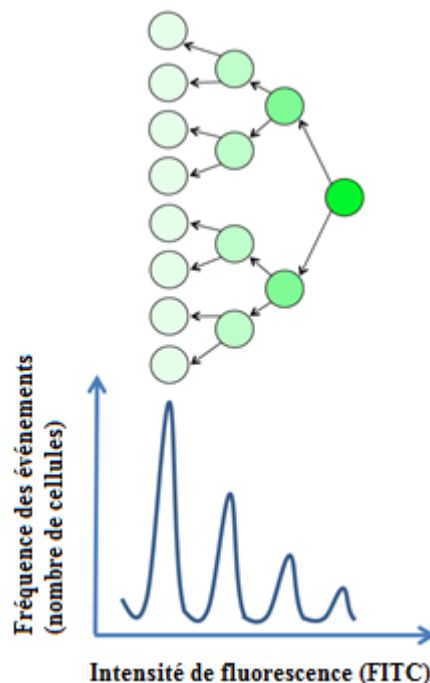


Figure 40. Marquage cellulaire au CFSE.

Illustration du marquage cellulaire au CFSE La répartition du CFSE entre les cellules filles se traduit par une diminution de la fluorescence au cours des divisions cellulaires successives.

Le CFSE se fixe de manière covalente aux molécules intracellulaires. Lorsque la cellule marquée au CFSE se divise, chacune des cellules filles renferme la moitié des molécules marquées au CFSE ; ainsi, chaque division (génération) peut être identifiée par

l'intensité de fluorescence mesurée par cytométrie en flux. Dans le schéma ci-dessus on peut identifier 4 générations cellulaires (Lyons *et al.*, 2001).

À l'issue de l'enrichissement cellulaire, les cellules sont centrifugées 5 min à 4 °C à 800 g ; les culots sont repris dans du PBS 0,1 % SVF à raison de 1.10^6 cellules/mL. Un μ l de solution de CFSE à 1,25 mM (ThermoFisher) est ajouté à 1 mL de suspension cellulaire ; celle-ci est homogénéisée par retournements et incubée 10 min à 37 °C. Cinq mL de milieu RPMI complet froid sont ajoutés ; la suspension est incubée 5 min dans la glace avant d'être centrifugée à 4 °C pendant 5 min à 800 g. Les étapes de suspension dans le RPMI complet froid, d'incubation à 4 °C et de centrifugation sont répétées. À l'issue de la deuxième centrifugation, les cellules sont reprises à raison de $1,8.10^6$ cellules/mL dans du milieu RPMI complet. Les cellules non marquées au CFSE suivent les mêmes étapes de centrifugation et de rinçage que les cellules marquées.

3.5. Coculture des cellules dendritiques avec les lymphocytes T

Après 24 h d'incubation avec les produits testés (J8 **Figure 38**), les DC semi-adhérentes sont décollées pendant 2 min avec du tampon de décollement. Les cellules présentes dans la suspension sont comptées puis centrifugées avant d'être resuspendues dans de l'IMDM complet. Elles sont ensuite réparties dans des plaques 96 puits non traitées pour la culture cellulaire à raison de 90 000 cellules dans 100 μ L/puits.

Après marquage au CFSE, les LT remis en suspension dans du milieu RPMI complet ($1,8.10^6$ cellules/mL) sont déposés dans les puits contenant les DC à raison de 100 μ L/puits ; il en résulte un ratio de 1 DC pour 2 LT.

4. Phénotypage cellulaire par cytométrie en flux

Deux marquages différents ont été réalisés pour phénotyper les DC ou les LT. Le phénotypage des DC intervient à la suite de l'exposition aux produits testés (J8, étape 3 **Figure 38**) afin d'étudier leur activation. Le panel d'anticorps utilisé dans le marquage des DC est présenté dans le **Tableau 10**. Après leur décollement, les DC sont déposées à raison de 40 000 cellules/puits dans des plaques 96 puits dans 100 µL de tampon de marquage pour cytométrie. La plaque est centrifugée à 4 °C (7 min, 320 g). Les surnageants sont éliminés et les culots cellulaires sont remis en suspension et incubés 15 min à 4 °C dans 20 µL d'une solution de Fc block (Anticorps de rat anti-CD16/CD32 de souris BD Pharmingen) diluée au 50^{ème} dans du tampon de marquage. Après 15 min, 25 µL d'un mélange d'anticorps réalisé selon le **Tableau 10** sont ajoutés dans les puits. Après 20 min d'incubation à 4 °C, 100 µL de tampon de marquage sont ajoutés dans chaque puits, les plaques sont centrifugées à 4 °C (7 min à 370 g) et les culots cellulaires sont repris dans 200 µL de tampon de marquage. La mortalité des cellules dendritiques est mesurée après marquage avec l'intercalant 7 AAD, émettant dans le canal du PerCP-Cy5.5. Il est ajouté 10 min avant la lecture de la plaque à raison de 2 µL par puits.

Tableau 10. Anticorps utilisés lors du marquage des DC.

| Antigène cible | Fluorochrome | Clone | Concentration finale dans le puits |
|-------------------------------|--------------|----------|------------------------------------|
| Cd11c | PE | HL3 | 2 µg/mL |
| CD40 | BV 421 | 3/23 | 2 µg/mL |
| CD54 ; ICAM-1 | APC | 3E2 | 2 µg/mL |
| CD 86 | PE-Cy7 | GL1 | 2 µg/mL |
| IAd ; CMH de classe II | FITC | AMS-32.1 | 5 µg/mL |

Le phénotypage des LT, quant à lui, est réalisé à l'issue des 72 h d'incubation des cellules (J11, étape 4, **Figure 38**). Les plaques contenant les cocultures sont centrifugées à 4 °C (7 min à 370 g), les surnageants sont récupérés puis congelés à -80 °C pour le dosage ultérieur des cytokines.

Les cellules du culot sont rincées avec le tampon de marquage (150 µL par puits) ; la plaque est à nouveau centrifugée pendant 7 min à 370 g. Les culots cellulaires sont remis en suspension et incubés 15 min à 4 °C dans 20 µL d'une solution de Fc block (Anticorps de rat anti-CD16/CD32 de souris BD Pharmingen,) diluée au 50^{ème}. Après 15 min, 25 µL d'un mélange d'anticorps et du marqueur de mortalité dilué au 1/100^{ème} (**Tableau 11**) sont ajoutés dans les puits. Après 20 min d'incubation à 4 °C, 100 µL de tampon sont ajoutés dans chaque puits, les plaques sont centrifugées à 4 °C (7 min à 370 g), et les culots cellulaires sont repris dans 200 µL de tampon de marquage.

Tableau 11. Anticorps utilisés pour le phénotypage des cocultures.

| Antigène cible | Fluorochrome | Clone | Concentration finale dans le puits |
|---|--|----------|------------------------------------|
| CD3 | PerCP-Cy5.5 | 145-2C11 | 2 µg/mL |
| CD4 | BV786 | RM4-5 | 1 µg/mL |
| CD8a | Pe-CF594 (lu dans le canal PE-Texas Red) | 53-6.7 | 1 µg/mL |
| CD11c | PE | HL3 | 1 µg/mL |
| CD25 ; chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 | BV605 | PC61 | 2 µg/mL |
| CD44; H-CAM | APC-Cy7 | IM7 | 2 µg/mL |
| CD69 ; <i>Very Early Activation Antigen</i> | APC | H1.2F3 | 2 µg/mL |
| CD86 | PE-Cy7 | B7-2 | 1 µg/mL |
| CD124 ; chaîne alpha du récepteur à l'IL-4 | BV421 | mIL4R-M1 | 2 µg/mL |
| LIVE/DEAD | Canal du BV510 | - | 1/100 ^{ème} |

La viabilité cellulaire est mesurée à l'aide du colorant LIVE/DEAD. Seules les cellules dont l'intégrité membranaire est compromise (cellules mortes), fixent ce colorant et sont donc marquées.

Afin d'éviter les interférences entre le CFSE et le marquage avec les anticorps, les cellules marquées au CFSE sont marquées avec un mélange ne comprenant que les anticorps anti-CD3, anti-CD4 et anti-CD8 permettant de discriminer les différentes sous-populations cellulaires.

L'expression des différents marqueurs d'activation ainsi que la prolifération cellulaire sont étudiées dans les populations CD3⁺, CD4⁺ et CD8⁺.

Les cellules marquées sont analysées avec un cytomètre LSR Fortessa X20 de chez BD Biosciences et les résultats sont acquis avec le logiciel DIVA (BD biosciences) en suivant le fenêtrage montré sur la **Figure 41**. Les données acquises de cette façon sont ensuite analysées à l'aide du logiciel Flow Jo (BD Biosciences).

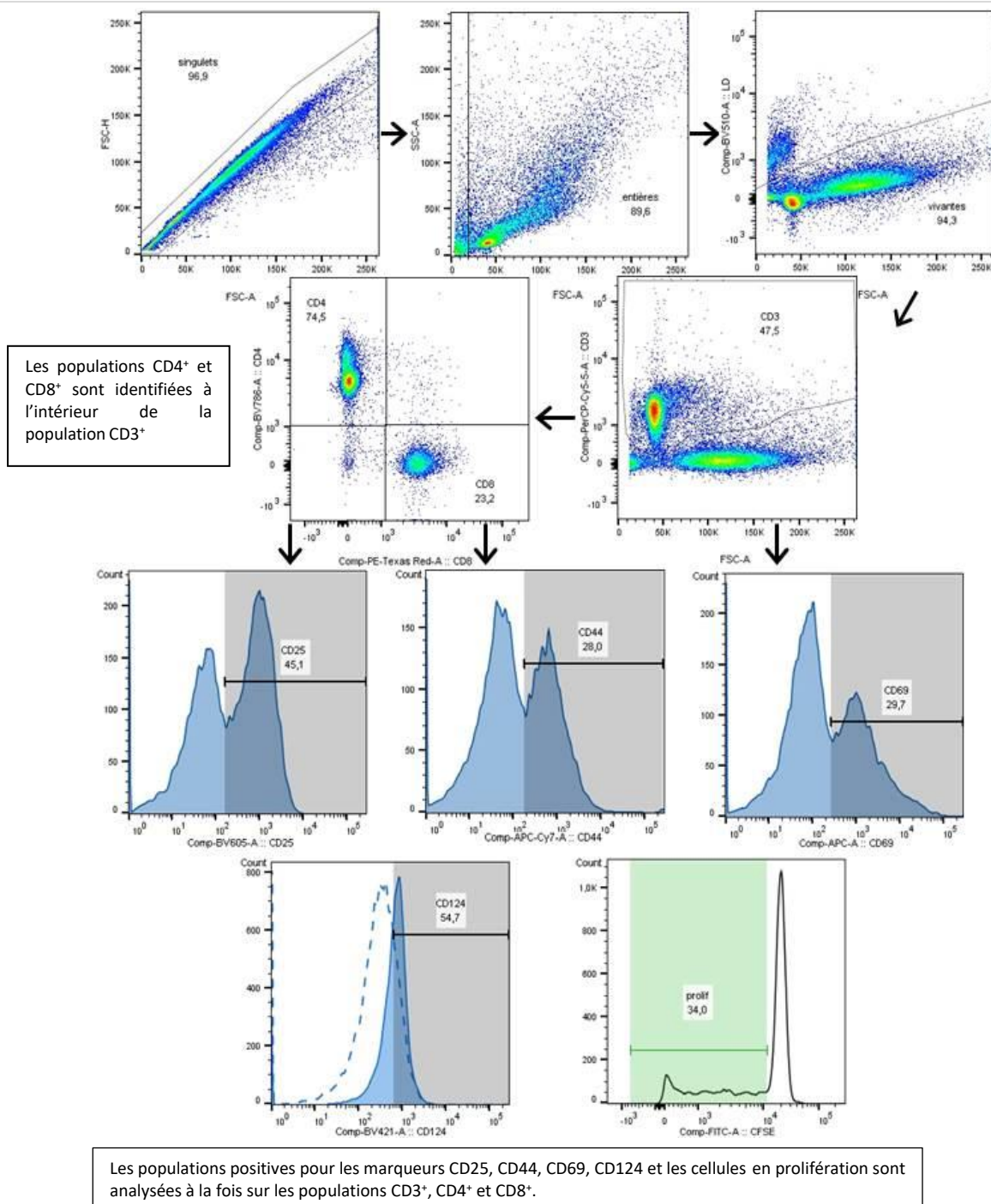


Figure 41. Procédure de fenêtrage suivie pour l'analyse des résultats de cytométrie en flux.

Les doublets sont éliminés par un fenêtrage sur les singulets réalisé sur un graphique FSH-H/FSC-A. Les débris cellulaires sont éliminés à l'aide d'une fenêtre pratiquée sur les cellules « entières » sur un graphique SSC-A/FSC-A. Les cellules vivantes sont sélectionnées parmi les cellules « entières » en éliminant les cellules positives au colorant LIVE/DEAD (graphique BV510/FSC-A). Les cellules CD3⁺ sont isolées parmi les cellules vivantes à l'aide d'une fenêtre sur les cellules positives au CD3-Percp5.5. À l'intérieur de la population CD3⁺ les populations CD4⁺ et CD8⁺ sont différenciées à l'aide d'un cadrant permettant de sélectionner les LT CD3⁺ CD4⁺ et CD3⁺ CD8⁺ (graphique BV786/PE-Texas-Red). L'expression des différents marqueurs d'activation CD25, CD44, CD69 et CD124 ainsi que les populations cellulaires en prolifération (CFSE) sont étudiées dans les différentes populations CD3⁺, CD4⁺ et CD8⁺.

5. Dosage des cytokines dans le surnageant

Les DC préalablement exposées à des sensibilisants sont capables d'activer les LT en coculture. Nous avons voulu mesurer les cytokines produites par les LT dans le surnageant de culture. Les cytokines produites peuvent correspondre à une certaine sous-population de LT (Th1, Th2, Th9, Th17...) comme nous l'avons décrit dans l'introduction (signature cytokinique).

Les cytokines dans le surnageant de culture cellulaire sont dosées par la technique *Cytometric Bead Arrays* (CBA, BD Biosciences). Les cytokines dosées sont l'IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17. Le principe de cette technique est présenté sur la **Figure 42** :

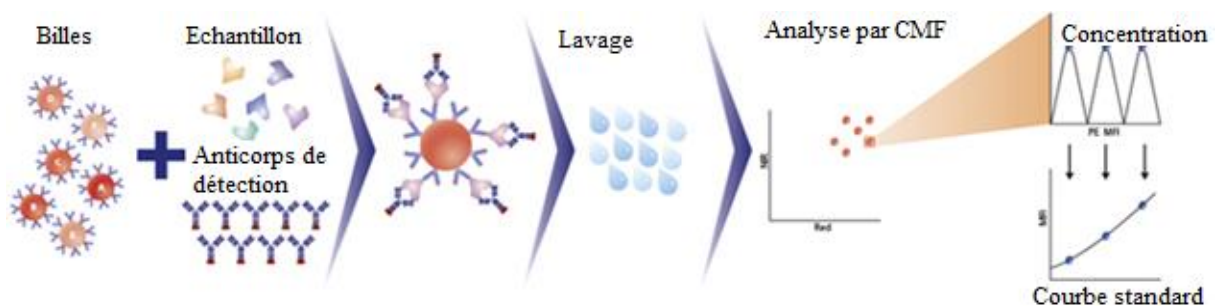


Figure 42. Principe de la technique des CBA.

Source : <http://www.bdbiosciences.com/in/research/cytometricbeadarray/formats/index.jsp>

Chaque bille recouverte d'un anticorps de capture spécifique d'un analyte a une intensité de fluorescence qui lui est propre, détectable dans les canaux correspondants à l'APC/APC-Cy7. Une combinaison de plusieurs billes peut être mélangée avec un échantillon ou un standard de la gamme étalon et des anticorps de détection correspondants conjugués à la PE. Après incubation, les échantillons sont lavés et analysés par cytométrie en flux. L'analyse de la fluorescence en APC/APC-Cy7 permet d'identifier une cytokine particulière parmi l'ensemble des analytes testés. L'analyse de la fluorescence de la PE résultant de la fixation des anticorps de détection permet de doser la cytokine à analyser.

Le dosage des cytokines dans les surnageants de culture cellulaire est réalisé à l'aide du kit *CBA Soluble Protein Master Buffer Kit* (BD Biosciences) selon les instructions du fournisseur.

Après décongélation, 50 µL de surnageant sont incubés 1 h à température ambiante avec 50 µL d'une solution de billes de capture, spécifiques de chaque cytokine étudiée, diluées au 1/50^{ème} dans le tampon de dilution spécial « billes de captures ». Après l'incubation, 50 µL d'anticorps de détection dilués au 1/50^{ème} dans le tampon fourni dans le kit sont ajoutés dans chaque tube et incubés 1 h à température ambiante. À l'issue de l'incubation, un rinçage est effectué avec 1 mL de tampon de lavage puis les tubes sont centrifugés 5 min à 200 g. Les culots sont repris dans 300 µL de tampon de lavage filtré. Le contenu des tubes est remis en suspension avant lecture sur le cytomètre BD FACSCanto™ II.

Une gamme étalon est préparée à l'aide du standard et du diluant fournis dans le kit. Le paramétrage de l'acquisition se fait en suivant les instructions du fournisseur à l'aide des réactifs de calibration fournis dans le kit. L'acquisition des données et leur analyse sont réalisées respectivement à l'aide des logiciels BD FACS Diva et FCAP Array.

Lors du dosage des cytokines IL-4, IL-5, IL-10 et IL-17 les valeurs des témoins étaient inférieures à la limite de quantification, mais les cytokines ont tout de même été mesurées. Nous avons donc réalisé une extrapolation à partir des courbes étalon de ces 4 cytokines pour déterminer leurs concentrations. Dans les tableaux 20 et 21 présentant les résultats des dosages de cytokines, ces valeurs sont indiquées en vert pour ces raisons.

6. Extraction d'ARN et PCR quantitative

L'implication de la voie de signalisation Nrf2/Keap1 a été étudiée chez les DC exposées aux produits testés. L'étude de cette voie de signalisation a été réalisée par qPCR sur des extraits de DC récoltées à J 8 (**Figure 38**).

6.1. Extraction des acides ribonucléiques (ARN) totaux

Les ARN sont extraits des DC par purification sur colonnes (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Allemagne) en suivant les recommandations du fournisseur. Les culots cellulaires de DC récupérés à l'issue de leur incubation avec les produits sont suspendus dans 350 μ L d'un mélange de tampon dénaturant RLT contenant 1 % de β -mercaptoéthanol. Les échantillons sont agités au vortex pendant 30 secondes et déposés sur des colonnes *Qiashredder* (Qiagen) permettant d'éliminer les débris cellulaires. Après centrifugation des échantillons 1 min à 8000 *g*, l'éluât est déposé sur des colonnes *DNAg Eliminator*. Les échantillons sont alors centrifugés 1 min à 8000 *g* repris par de l'éthanol 70 % et déposés sur des colonnes *RNeasy mini spin*. Les échantillons sont centrifugés 1 min à 8000 *g* puis lavés avec une solution RW1 qui permet de digérer les ADN. Les colonnes sont ensuite lavées deux fois avec du tampon RPE contenant de l'éthanol. L'éluât est écarté et les colonnes sont centrifugées 1 min à 8000 *g*. Enfin, les ARN sont élués avec 40 μ L d'eau « RNase free » et conservés à -80°C.

6.2. Transcription inverse des ARNm en ADNc

Les ARN extraits (500 ng) sont rétrotranscrits à l'aide du kit *iScript cDNA synthesis* (BioRad, Hercules, Californie, États-Unis). Quatre μ L de « mix » de réaction iScript 5X et 1 μ L d'*iScript Reverse Transcriptase MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus)* sont

ajoutés aux ARN. Le tube « *mix* » contient : le tampon, les désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP), les amorces (mélange optimisé d'amorces aléatoires et oligo-dT) et une protéine inhibitrice de la RNase.

Un contrôle est effectué sans enzyme afin de vérifier que les échantillons ne sont pas contaminés par de l'ADN, il sera appelé « RT- ».

Les échantillons sont incubés dans un thermocycleur (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) selon le programme suivant : 5 min à 25 °C, puis 30 min à 42 °C, enfin 5 min à 85 °C. À la fin du programme, les échantillons sont conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation pour l'étape de qPCR.

6.3. Amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel

La PCR quantitative, ou PCR en temps réel, est une technique de réaction en chaîne par polymérase permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN dans un échantillon.

La méthode du SYBR[®] *Green* a été utilisée. Cette molécule se fixe dans le petit sillon de l'ADN ; elle émet très peu de fluorescence à l'état libre. Après fixation dans le petit sillon de l'ADN bicaténaire, il émet fortement à 520 nm lors d'une excitation à 497 nm. L'amplification de la séquence d'ADN cible suit les mêmes étapes qu'une PCR classique.

La quantification d'un échantillon par PCR en temps réel s'effectue en déterminant le cycle seuil ou « *quantification cycle* » (Cq). Cela correspond au nombre de cycles à partir duquel le signal émis par le produit formé est distinct du « bruit de fond ». Ce Cq marque le début de la phase exponentielle d'amplification et sa valeur est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon relative. La quantification relative par PCR en temps réel est déterminée par rapport à un gène de référence interne (gène de ménage) du même échantillon. Un gène de référence est un gène dont l'expression ne varie pas quels que soient le stade de développement des cellules ou le traitement réalisé sur ces dernières. Il permet de normaliser les éventuels biais dus à l'opérateur

et/ou à des variations lors de la transcription inverse. (**Tableau 12**). Les séquences des amorces sens et anti-sens sont présentées dans le **Tableau 12**. Les amorces ont été diluées afin d'obtenir une concentration finale de 2,5 $\mu\text{mol/L}$.

Vingt microlitres des ADNc obtenus par transcription inverse sont dilués avec 210 μL d'eau « RNase free ». Les solutions sont conservées au congélateur à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tableau 12. Séquences des amorces utilisées pour l'analyse de l'expression génique.

Gènes d'intérêt sous le contrôle de Nrf2 :

| Gène cible | Séquences des amorces sens et anti-sens | Taille des amplicons |
|---|---|----------------------|
| <i>NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 (nqo-1)</i> | Sens : ACGGGGACATGAACGTCATTCT Anti-sens : AGTGTGGCCAATGCTGTAAACC | 104 pb |
| Hème oxygénase 1 (hmx-1) | Sens : AGGGTCAGGTGTCCAGAGAA Anti-sens : CTCCAGGGCCGTGTAGATA | 72 pb |
| Catalase (cat) | Sens : GTGGTTTTCACTGACGAGATGGCA Anti-sens : TCGTGGGTGACCTCAAAGTATCC | 107 pb |
| Sulfirédoxine 1 (srxn-1) | Sens : GGACCCGGCCAAAGTGCAGA Anti-sens : CCACCCTGGGCCCTTTGAT | 99 pb |
| Interleukine-6 (IL-6) | Sens : AGTTGCCTTCTGGGACTGA Anti-sens : CAGAATTGCCATTGCACAAC | 191 pb |
| Sous-unité catalytique de la glutamate-cystéine ligase (gclc) | Sens : ATTCGTGGTACTGCTCACTAGGGT Anti-sens : TCTGGGCCACTTTCATGTTCTCGT | 95 pb |

Gènes de ménage :

| Gènes cibles | Séquences des amorces sens et anti-sens | Taille des amplicons |
|---------------------------------------|---|----------------------|
| Actine- β | Sens : GGCCAACCGTGAAAAGATGA Anti-sens : TACGACCAGAGGCATACAGG | 104 pb |
| <i>Tata box Binding Protein (Tbp)</i> | Sens : ACGGACAACCTGCGTTGATTTT Anti-sens : ACTTAGCTGGGAAGCCCAAC | 128 pb |

La technique de PCR en temps réel est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (CFX96 Bio-Rad). Dans chaque puits sont déposés, 4 μL d'ADNc dilué, 2 μL du mélange d'amorces,

10 μL de SYBR *Green* supermix (2X) (Biorad) et 4 μL d'eau « RNase free ». Le *supermix* contient une ADN polymérase thermorésistante qui assure l'amplification « iTaq DNA polymerase », des dNTP, du MgCl_2 (cofacteur essentiel de la polymérase iTaq), du SYBR *Green I*, des stabilisateurs, et de la fluorescéine. Un contrôle négatif est effectué avec 4 μL d'eau en l'absence l'ADNc afin de vérifier qu'il n'y a pas de contamination du mélange par de l'ADN. Nous procédons également à un contrôle avec les produits de transcription inverse sans enzyme (RT-). Une augmentation de la fluorescence indiquerait une contamination par de l'ADN génomique. Chaque échantillon est testé trois fois dans les mêmes conditions.

Le programme de PCR quantitative est comparable à celui d'une PCR classique. Après une étape de 3 minutes à 95 °C permettant l'activation de l'enzyme et la dénaturation des acides nucléiques, 35 cycles d'amplification se succèdent comprenant chacun les 3 paliers suivants : une étape de dénaturation de 15 secondes à 95 °C, une étape combinant l'hybridation et l'élongation de 1 minute à 60 °C. Une étape supplémentaire est rajoutée pour la détermination de la courbe de fusion (T_m) des produits de PCR afin de s'assurer de la spécificité de la réaction en vérifiant la présence d'un seul type d'amplicon.

6.4. Analyse du niveau d'expression des gènes

À la fin de la PCR les valeurs de fluorescence obtenues sont exprimées en « quantification cycle » ou Cq ce qui nous permet de quantifier le nombre de copies de l'ADNc de l'ARNm étudié pour chaque échantillon.

Les gènes de référence (*actine- β* et *Tbp*) présents dans l'échantillon sont quantifiés en même temps que le gène étudié. Ainsi, la moyenne géométrique des Cq des gènes de

ménage *actine* et *Tbp* est alors calculée. Puis les Cq des gènes d'intérêt sont analysés pour chaque traitement par la méthode du $\Delta\Delta Cq$:

$$\Delta Cq = Cq_{\text{gène intérêt}} - Cq_{\text{moyenne géométrique des gènes de ménage}}$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{\text{traité}} - \Delta Cq_{\text{témoin}}$$

$$2^{-\Delta\Delta Cq} = \text{variation de l'expression génique}$$

7. Traitement statistique :

Les résultats sont présentés comme des moyennes de pourcentage de cellules positives \pm l'erreur type de la moyenne (SEM). Le test de Student a été utilisé pour les comparaisons entre deux groupes, et l'analyse de variance (ANOVA) suivie par un test multiparamétrique avec la correction de Bonferroni a été utilisée pour comparer les effets de différentes concentrations de produits. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives pour une valeur de $p \leq 0,05$.

RÉSULTATS

Résultats

1. Partie I: Un modèle cellulaire basé sur des cellules dendritiques issues de cellules de moelle osseuse de souris pour l'évaluation du pouvoir sensibilisants des produits chimiques.

Nous avons développé au laboratoire un modèle murin basé sur l'utilisation de DC issues de moelle osseuse de souris (BMDC) afin d'évaluer le pouvoir sensibilisant des allergènes industriels. Comme nous l'avons présenté en introduction de nombreux modèles ont été développés ou sont en cours de développement à partir de cellules humaines. Ces modèles ont été mis au point notamment dans le cadre des allergies de contact. Nous avons souhaité développer un modèle murin afin de proposer un modèle simple, reproductible et peu coûteux qui permette d'évaluer toutes les substances chimiques qui pourraient avoir un potentiel sensibilisant cutané ou respiratoire comme le préconise le règlement REACH.

Pour cela, nous avons développé un modèle BMDC qui a fait l'objet d'un article présenté en annexe 1. Les principaux résultats et observations qui en découlent vous sont présentés dans cette première partie des résultats.

1.1. Résumé de l'article "In vitro detection of chemical allergens: an optimized assay using mouse bone marrow-derived dendritic cells", annexe 1

Les allergies professionnelles représentent un problème majeur de santé publique. Elles peuvent être provoquées par une exposition à des produits chimiques de faible poids moléculaire qui induisent principalement des allergies cutanées et respiratoires. Ainsi, il est important de connaître leur pouvoir sensibilisant avant leur mise sur le marché afin de préserver la santé des utilisateurs. Pendant longtemps, les tests destinés à évaluer ce pouvoir sensibilisant étaient pratiqués sur l'animal. Mais les nouvelles réglementations européennes concernant l'utilisation des animaux à des fins scientifiques, ainsi que l'évolution des réglementations REACH et CLP rendent nécessaire le développement de méthodes de substitution à l'expérimentation animale *in silico*, *in chemico*, ou *in vitro*.

Les modèles *in vitro* basés sur des cultures de cellules de lignées présentent un certain nombre de limites, comme les altérations et l'instabilité de leur génome. Un modèle de cellules dendritiques issues de moelle osseuse (BMDC) de souris a donc été développé au laboratoire afin d'apporter des informations complémentaires à celles apportées par les modèles cellulaires issus de lignées. Au cours du développement de ce modèle de substitution pour évaluer le pouvoir sensibilisant des produits chimiques, les BMDC ont été exposées à différents produits de référence.

Le panel de produits chimiques utilisés a été sélectionné à partir des listes proposées par l'ECVAM et l'ECETOC. Il comprend deux produits irritants (SDS et *p*ABA), deux produits non-sensibilisants (ZnSO₄, Isoprop), six sensibilisants provoquant des allergies respiratoires (AHCP, anhydride phtalique (PA), anhydride trimellitique (TMA), TMI, diisocyanate de toluène (TDI), diisocyanate de diphenylméthane (MDI), neuf sensibilisants entraînant des allergies cutanées (Oxazolone, DNFB, dinitrochlorobenzène (DNCB), BB, *p*PD, NiSO₄, Eug, Benzocaïne (Bzc), cinnamaldéhyde (Cinn)) et une substance décrite comme provoquant des symptômes cutanés ou

respiratoires (chlorure de benzalkonium (BC)). L'activation des BMDC a été évaluée en mesurant l'expression de quatre marqueurs d'activation de surface cellulaire : la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), impliquée dans la présentation des antigènes aux LT, deux molécules de co-stimulation CD40 et CD86 et une molécule d'adhérence intercellulaire, le CD54.

Onze des 16 produits sensibilisants testés ont entraîné une augmentation significative de l'expression d'un des 4 marqueurs. Parmi ces produits figurent des sensibilisants cutanés, comme le DNFB, la BB, la pPD ou l'Eug ; mais aussi des sensibilisants respiratoires comme l'AHCP et le TMI. L'absence d'activation significative des DC par le PA, le TMA, le TDI et le MDI pourrait s'expliquer par leur faible stabilité en milieu aqueux et donc dans le milieu de culture cellulaire (Narita *et al.*, 2018). En revanche, aucun des produits non sensibilisants, y compris le SDS, n'a entraîné d'augmentation de l'expression des marqueurs d'activation, ce qui montre une excellente spécificité du modèle. Ces résultats ont été corroborés par l'étude de la sécrétion des cytokines par les BMDC exposées à 9 des produits chimiques testés. Par ailleurs, ce modèle permet également de catégoriser les produits chimiques testés selon leur puissance sensibilisante (extrême, fort, modéré et faible) ; les résultats obtenus sont comparables à ceux du LLNA considéré comme le test *in vivo* de référence.

Ce modèle cellulaire basé sur l'analyse de marqueurs phénotypiques des BMDC est un outil prometteur pour discriminer une substance sensibilisante d'une substance non sensibilisante. De plus, il montre une excellente spécificité et il pourrait permettre de catégoriser les substances en fonction de leur puissance sensibilisante, ce qui serait un atout important pour un modèle *in vitro*. Ce modèle est en cours de validation au laboratoire sur un nombre très important de substances (sensibilisantes, pré-/pro-haptènes, non sensibilisantes) afin d'évaluer ses performances et d'envisager une proposition comme modèle alternatif à l'expérimentation animale auprès de l'ECVAM. Néanmoins, si les modifications phénotypiques des cellules dendritiques activées ou de leurs substituts ont été bien étudiées (Schuurhuis *et al.*, 2006), les mécanismes d'action conduisant à l'activation de ces cellules sont moins connus. En effet, une

question essentielle subsiste, à savoir si les sensibilisants peuvent être classés sur la base du/des profils de transduction et si ce profil peut être utilisé pour distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants. C'est pourquoi des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre quelles voies de signalisation fonctionnent comme « détecteurs » de sensibilisants et sont responsables des modifications phénotypiques et fonctionnelles des cellules dendritiques. Ainsi, l'étude des voies de signalisation impliquées dans l'activation de ces cellules pourrait apporter des informations susceptibles d'améliorer les tests prédictifs basés sur l'utilisation de ces cellules.

1.2. Implication de la voie Nrf2 dans les DC issues de souris BALB/c

Parmi les voies de signalisation les plus souvent étudiées dans les phénomènes de sensibilisation aux agents chimiques de faible poids moléculaire, la voie Nrf2/Keap1 est celle qui a donné lieu au plus grand nombre de travaux et de publications. Les études *in vitro* portant sur l'implication de cette voie dans les phénomènes de sensibilisation, ont été menés principalement sur des kératinocytes (Emter *et al.*, 2010; Emter *et al.*, 2013; Natsch and Emter, 2016; van der Veen *et al.*, 2016). Ces travaux ont abouti à la mise au point d'un test *in vitro* prédictif du pouvoir sensibilisant des produits chimiques (OECD., 2015). Les recherches menées pour connaître l'implication de la voie Nrf2/Keap1 dans la sensibilisation aux produits chimiques de faible poids moléculaire conduites sur les cellules dendritiques ou leurs substituts sont plus limitées. Elles ont été menées sur des cellules humaines dérivées de monocytes ou de cellules de cordon ombilical (Ade *et al.*, 2009; Migdal *et al.*, 2013; El Ali *et al.*, 2017a), sur la lignée humaine THP-1 (Ade *et al.*, 2009; Migdal *et al.*, 2013; Raffalli *et al.*, 2018) et sur des BMDC de souris C57BL/6J (Mussotter *et al.*, 2016; El Ali *et al.*, 2017a).

Tandis que de nombreuses études de la voie Nrf2/Keap1 ont été conduites dans le cadre des allergies cutanées (Ade *et al.*, 2009; Mussotter *et al.*, 2016; El Ali *et al.*, 2017a), l'effet des sensibilisants respiratoires, notamment de l'AHCP sur cette voie de

signalisation dans des modèles *in vitro*, est peu documenté (Ferreira *et al.*, 2018). Dans la première partie de nos travaux nous avons vérifié si l'activation de la voie Nrf2/Keap1 se produisait dans les BMDC de souris BALB/c utilisées dans notre modèle. Les BMDC ont été directement mises en contact avec un produit chimique non sensibilisant, le SDS, un sensibilisant cutané, le DNFB, et deux sensibilisants respiratoires, l'AHCP et le TMI. Alors que dans le modèle BMDC développé au laboratoire, l'expression phénotypique des marqueurs d'activation des DC était maximale après 48 h d'exposition des cellules aux produits sensibilisants, d'autres équipes conduisant des travaux sur l'expression des gènes sous la dépendance de Nrf2 ont observé une augmentation de la transcription de ces gènes dès les premières heures d'exposition aux agents sensibilisants (Ade *et al.*, 2009; Migdal *et al.*, 2013; El Ali *et al.*, 2017b; Ferreira *et al.*, 2018). C'est pourquoi nous avons choisi pour la suite de l'étude, d'évaluer la transcription de ces gènes après 2 et 6 h d'incubation des BMDC avec les produits étudiés.

Afin de savoir si cette voie de signalisation Nrf2/Keap1 est activée dans les DC de notre modèle cellulaire, une étude de la transcription de six gènes sous le contrôle de Nrf2 a été réalisée (*nqo-1*, *hmox*, *cat*, *srxn-1*, *il6* et *gclc* (**Tableau 12** du « Matériel et Méthodes »)). Des BMDC de souris BALB/c ont été exposées à trois produits sensibilisants (AHCP, DNFB et TMI) et un non sensibilisant (SDS) dans les conditions du modèle précédemment développé (annexe 1). L'étude de l'expression de ces six gènes a été réalisée sur des DC exposées 2 h et 6 h aux produits testés. On n'observe pas d'augmentation statistiquement significative de la transcription des six gènes étudiés dans les DC exposées au SDS, quelle que soit la durée d'exposition (**Figure 43**). Les deux sensibilisants de référence AHCP et DNFB induisent une augmentation concentration-dépendante de la transcription de ces six gènes (**Figure 44** et **Figure 45**). Les valeurs de $2^{\Delta\Delta Cq}$ peuvent différer fortement entre les deux produits ; pour *srxn1* par exemple, le $2^{\Delta\Delta Cq}$ est de l'ordre de 40 avec l'AHCP après 2 h d'exposition alors qu'il est de 7 avec le DNFB pour la même durée

d'exposition. Par ailleurs, les cinétiques d'expression des différents gènes varient en fonction des sensibilisants étudiés. Ainsi, l'expression maximale des gènes *hmox* et *il6* survient après 2 h d'exposition des DC à l'AHCP, tandis que celle des gènes *nqo1*, *cat*, *srxn1* et *gclc* est observée après 6 h d'exposition. Chez les DC exposées au DNFB, la majorité des gènes étudiés présentent leur expression maximale après 2 h d'exposition. L'expression de *hmox*, *il-6*, *srxn1* et *gclc* est maximale après 2 h d'exposition tandis que celle de *nqo1* et *cat* est maximale après 6 h d'exposition. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus avec des cellules de lignée humaine THP-1 exposées au DNFB (Ferreira *et al.*, 2018) ou avec des cellules dendritiques d'origine humaine exposées au DNCB (Ade *et al.*, 2009). C'est à notre connaissance la première fois que l'activation de la voie Nrf2 est observée dans des DC en culture suite à une exposition à un sel de platine.

Nous avons également réalisé un essai en exposant les BMDC pendant 6 h à un autre sensibilisant respiratoire, le TMI, (**Figure 46**). Ce dernier a induit une augmentation de la transcription de *hmox1* et de *cat* mais pas de *nqo-1*, de *srxn-1*, d'*il-6* ni de *gclc*. Nous ne pouvons conclure de façon définitive si le TMI active ou non la voie Nrf2 dans les BMDC ; outre le fait que seuls deux de gènes sur les 6 étudiés ont leur expression augmentée, l'expérience n'ayant été réalisée qu'une seule fois aucune analyse statistique n'a pu être faite. Par ailleurs, seule une exposition de 6 h à 300 μ M de TMI a été testée, or les essais réalisés avec le DNFB et l'AHCP montrent l'importance des conditions expérimentales d'exposition tant en termes de concentrations en sensibilisant que de durée. L'essai avec le TMI devrait être renouvelé et ce, avec d'autres concentrations et durées d'exposition avant de conclure d'une façon certaine à l'implication de Nrf2 dans la réponse des DC au TMI.

Ces travaux confirment que la concentration et la durée d'exposition sont des facteurs déterminants à prendre en compte dans l'étude de la réponse Nrf2/Keap1 des DC aux sensibilisants (Ferreira *et al.*, 2018(Ade *et al.*, 2009). Enfin, ces expériences montrent que les BMDC de BALB/c constituent un bon modèle d'exploration des voies de transduction du signal activées par les sensibilisants.

SDS

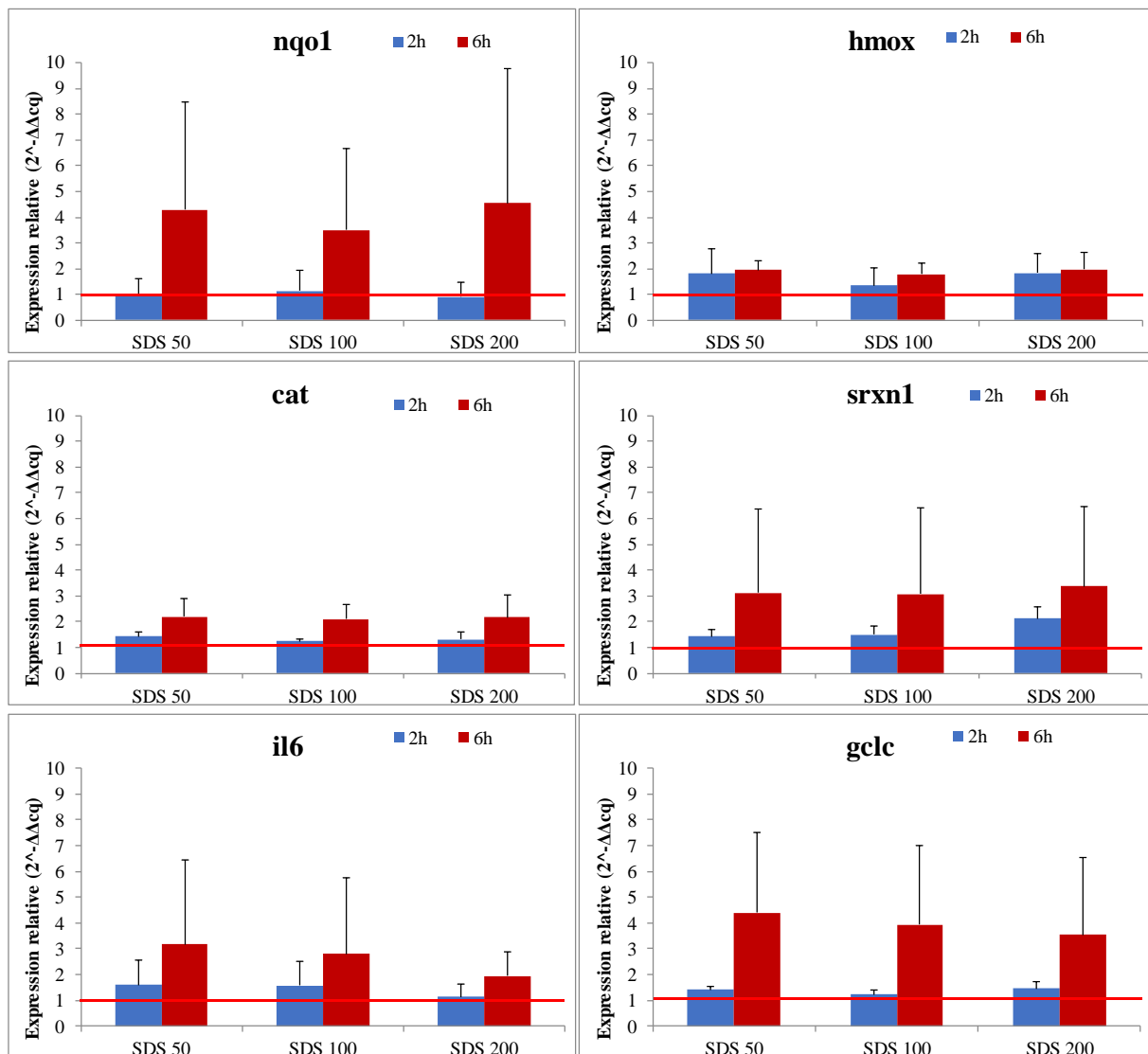


Figure 43. Expression relative de gènes sous le contrôle de Nrf2 après une exposition de 2 h et 6 h des cellules dendritiques (DC) de souris BALB/c à différentes concentrations de sodium dodécyl sulfate (SDS) (50, 100 et 200 mM).

La valeur de 1 pour le témoin (véhicule) est représentée par le trait rouge. Les amorces utilisées ont permis d'amplifier les gènes *nqo1*, *hmox*, *cat*, *srxn1*, *IL6*, *gclc* ainsi que les gènes de ménage actine- β et *Tbp* utilisés pour la normalisation. Les histogrammes représentent la moyenne des expressions relatives +/- l'écart type de deux expériences indépendantes réalisées en triplicats avec * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

AHCP

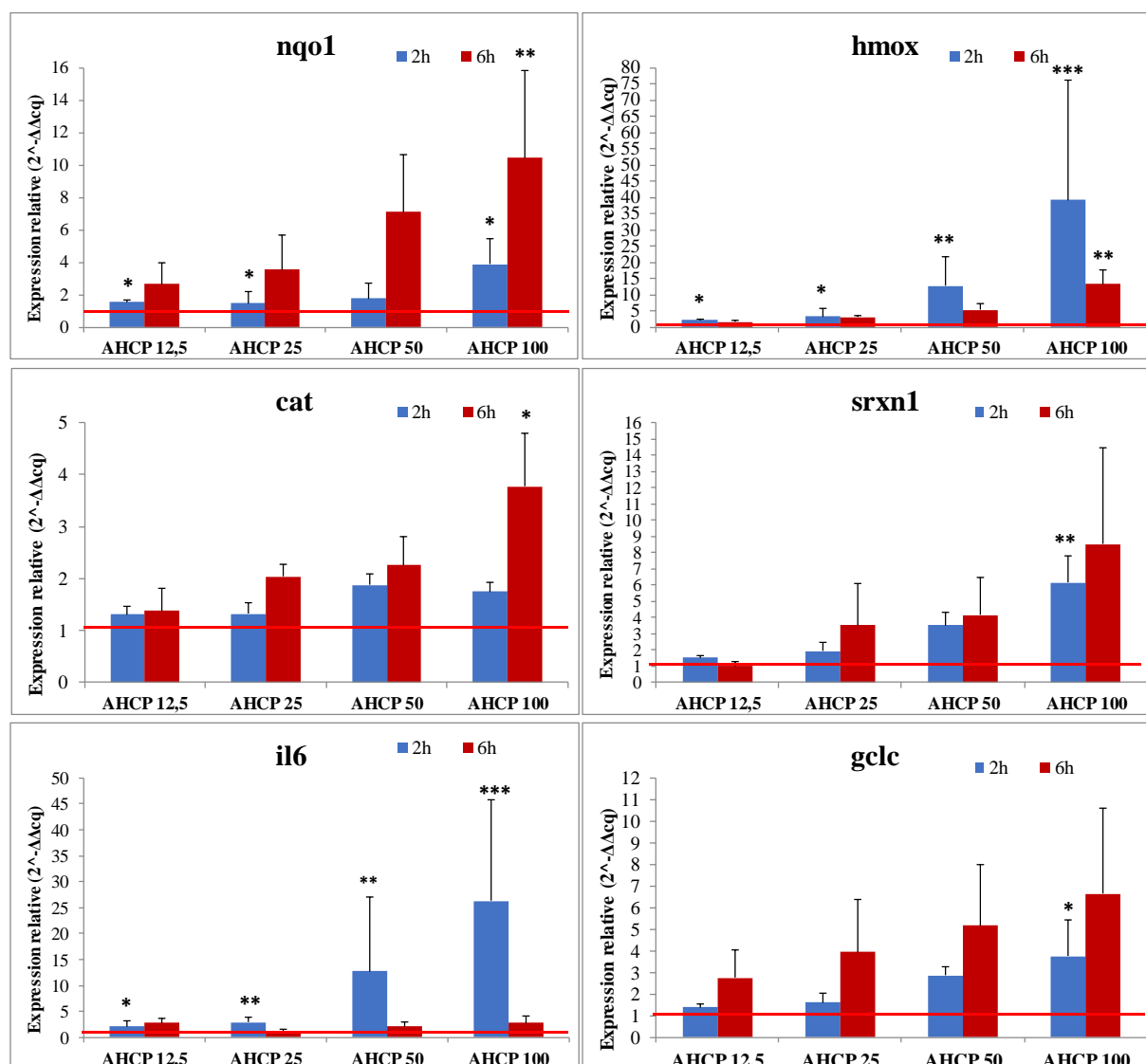


Figure 44. Expression relative de gènes sous le contrôle de Nrf2 après une exposition de 2 h et 6 h des cellules dendritiques (DC) de souris BALB/c à différentes concentrations d'hexachloroplatinat d'ammonium (12,5 ; 25 ; 50 ; 100 μM).

La valeur de 1 pour le témoin (véhicule) est représentée par le trait rouge. Les amorces utilisées ont permis d'amplifier les gènes *nqo1*, *hmox*, *cat*, *srxn1*, *il6*, *gclc* ainsi que les gènes de ménage actine-β et *Tbp* utilisés pour la normalisation. Les histogrammes représentent la moyenne des expressions relatives +/- l'écart type de deux expériences indépendantes réalisées en triplicats avec * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,005.

DNFB

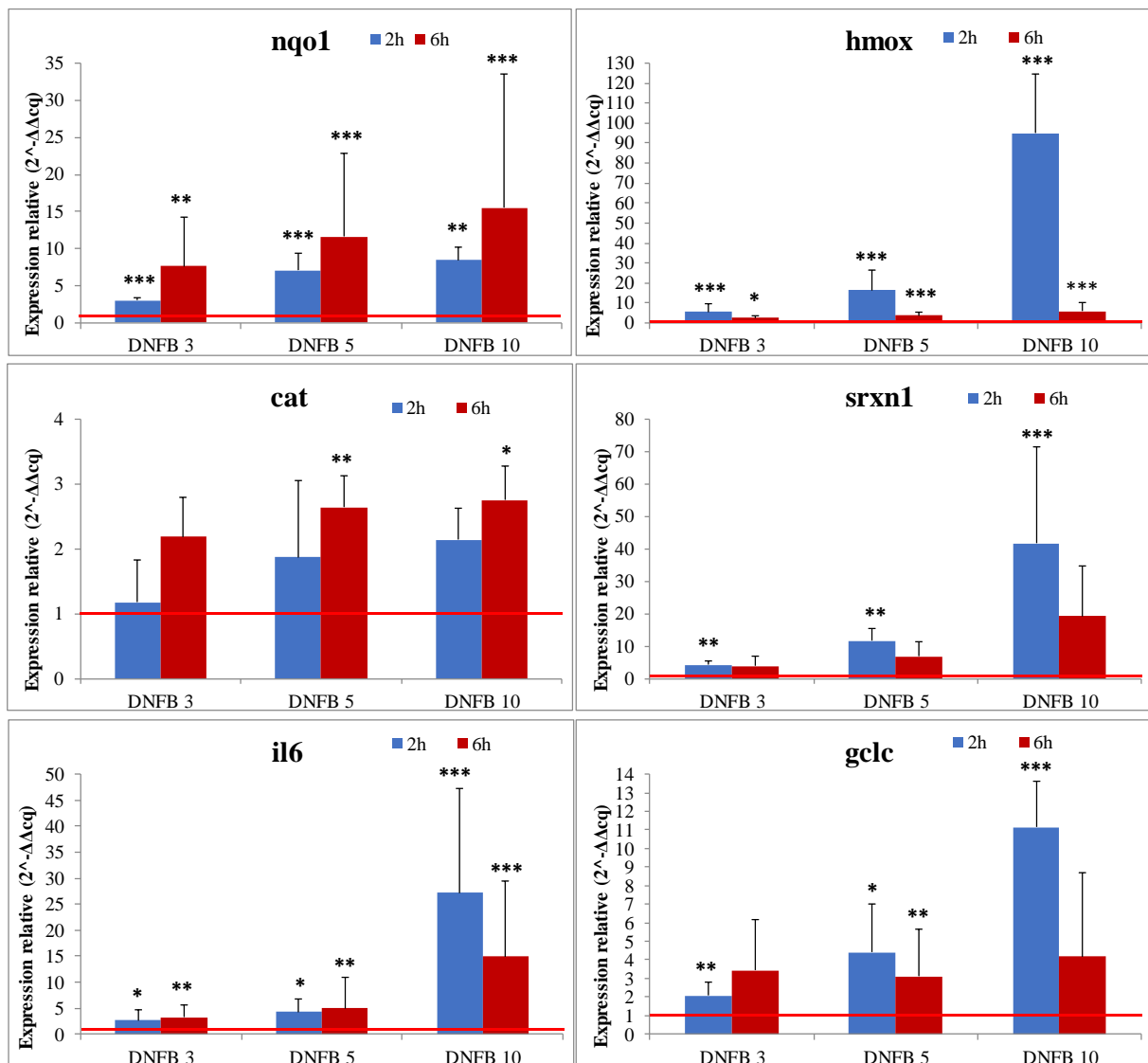


Figure 45. Expression relative de gènes sous le contrôle de Nrf2 après une exposition de 2 h et 6 h des cellules dendritiques (DC) de souris BALB/c à différentes concentrations de dinitrofluorobenzène (3 ; 5 et 10 μM).

La valeur de 1 pour le témoin (véhicule) est représentée par le trait rouge. Les amorces utilisées ont permis d'amplifier les gènes *nqo1*, *hmox*, *cat*, *srxn1*, *IL6*, *gclc* ainsi que les gènes de ménage *actine-β* et *Tbp* utilisés pour la normalisation. Les histogrammes représentent la moyenne des expressions relatives +/- l'écart type de deux expériences indépendantes réalisées en triplicats avec * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

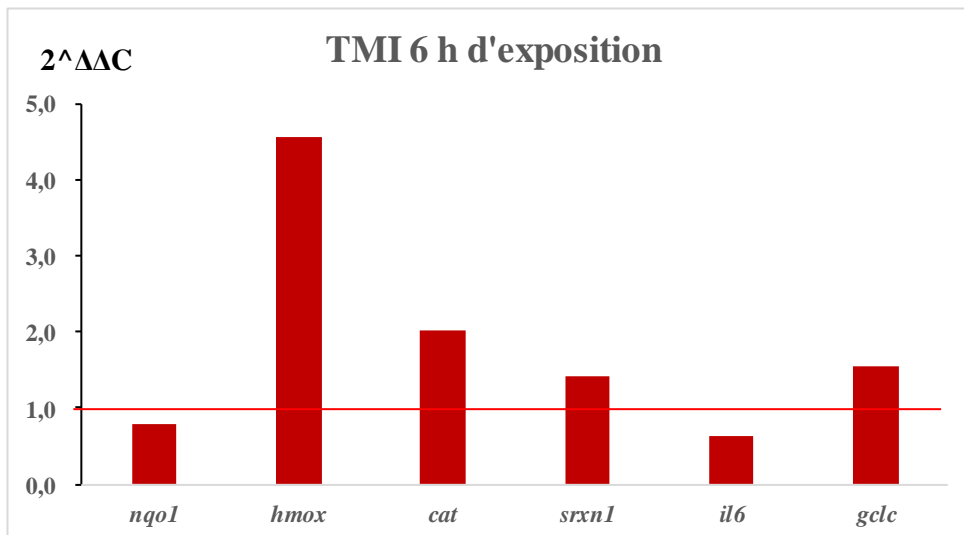


Figure 46. Expression relative de gènes sous le contrôle de Nrf2 après une exposition de 6 h des cellules dendritiques (DC) de souris BALB/c à 300 μ M de para-tolylisocyanate (TMI).

*La valeur de 1 pour le témoin (véhicule) est représentée par le trait rouge. Les amorces utilisées ont permis d'amplifier les gènes *nqo1*, *hmox*, *cat*, *srxn1*, *IL6*, *gclc* ainsi que les gènes de ménage actine- β et *tbp* utilisés pour la normalisation. L'histogramme représente la moyenne des expressions relatives des triplicats obtenus au cours d'une expérience.*

2. Partie II : Mise au point d'un modèle de coculture avec le produit de référence hexachloroplatinate d'ammonium (AHCP)

Alors que le modèle de BMDC de souris BALB/c développé précédemment (annexe 1) est prometteur pour l'évaluation du pouvoir sensibilisant de produits chimiques, il semble essentiel de vérifier si les BMDC activées par ces produits sont capables d'activer des LT. Dans notre modèle BMDC, les marqueurs membranaires IAd, CD40, CD54 et CD86 sont surexprimés par les BMDC activées par des sensibilisants de référence. La surexpression de ces marqueurs impliqués dans la présentation des antigènes aux LT suggère qu'une interaction entre ces deux types cellulaires est possible et pourrait conduire à la stimulation des LT par les BMDC activées. Le développement d'un modèle de coculture BMDC-LT et l'étude de l'activation de ces derniers permettraient d'évaluer la capacité des BMDC de souris de notre modèle à stimuler des LT.

Pour la mise au point des conditions de coculture des BMDC et des LT, l'hexachloroplatinate d'ammonium (AHCP) a été sélectionné comme produit sensibilisant de référence au vu des résultats obtenus avec ce produit au cours de l'étude sur l'activation des BMDC (Partie I des résultats, figures 2, 3 et 4 de l'annexe 1). Une partie de ces résultats a fait l'objet d'une publication parue dans la revue « *Contact Dermatits* » (Annexe 2).

Nous avons recherché les conditions optimales de coculture permettant d'obtenir l'activation des LT par des BMDC pré-exposées à un produit sensibilisant de référence, l'AHCP et à un stimulant non spécifique des DC : le lipopolysaccharide bactérien (LPS). Pour une facilitation de lecture, dans la suite de ce manuscrit, les LT mis en coculture avec des DC pré-exposées à un agent sensibilisant ou stimulant seront appelés LT « exposés » et les LT mis en coculture avec des DC pré-exposées au véhicule (HBSS ou

HBSS + DMSO) seront appelés LT « témoins ». Au cours de cette phase de mise au point, les marqueurs d'activation des LT et les paramètres de coculture les plus pertinents ont été recherchés : choix de l'organe d'origine des LT et du *ratio* BMDC/LT optimal, durée d'exposition des BMDC aux produits à tester, durée des cocultures des BMDC activées avec les LT. Par ailleurs, le rôle de différentes sous-populations de LT a été étudié afin, d'une part de s'assurer que l'activation observée était bien le fait des LT naïfs, et d'autre part, de détecter une éventuelle influence de la population des LTregs sur la réponse cellulaire. Enfin nous avons réalisé un essai de re-stimulation des LT par des BMDC pré-exposées pour essayer d'amplifier la réponse cellulaire (Vocanson *et al.*, 2014).

2.1. Sélection de l'organe d'origine des LT et du ratio BMDC/LT

Afin de choisir l'origine des LT utilisés dans l'étude, nous avons comparé les rendements en cellules CD3⁺ extraites des ganglions auriculaires d'une part et de rates de souris d'autre part. Deux souris ont été mises à mort par dislocation cervicale afin de prélever leurs ganglions auriculaires et leurs rates. Les différents organes ont été broyés séparément sur un tamis cellulaire et repris dans du milieu de culture. Un comptage cellulaire a été réalisé, suivi d'un phénotypage des différentes populations cellulaires par cytométrie en flux afin d'estimer la quantité de LT présents dans chaque organe.

Tableau 13. Comptages cellulaires effectués sur les broyats de rate et ganglions auriculaires de souris, n=2.

| | Nombre de cellules obtenues par souris (moyenne ± SD) | % moyen de cellules CD3 ⁺ | Nombre de cellules CD3 ⁺ récupérées par souris (moyenne) |
|------------------|---|---|--|
| Ganglions | 2,5.10 ⁶ ± 4.10 ⁵ | 71 % | 1,8.10⁶ |
| Rates | 80,5.10 ⁶ ± 5.10 ⁶ | 21 % | 17.10⁶ |

Les rates de souris permettent d'obtenir de l'ordre de 17.10^6 LT par souris tandis que les ganglions ne permettent d'en obtenir que $1,8.10^6$ (**Tableau 13**). Dans un souci de réduction du nombre de souris utilisées dans les expériences ultérieures, le choix s'est donc porté sur les LT issus de splénocytes de souris.

2.2. Sélection de marqueurs d'activation pertinents

Différents indicateurs d'activation des LT ont été étudiés par cytométrie en flux, à savoir :

- les marqueurs membranaires CD25, CD44, CD69 et CD124,
- la prolifération cellulaire et
- le dosage des cytokines IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 et IL-17.

Le protocole de culture utilisé est celui décrit dans la partie Matériel et Méthodes, **Figure 38**.

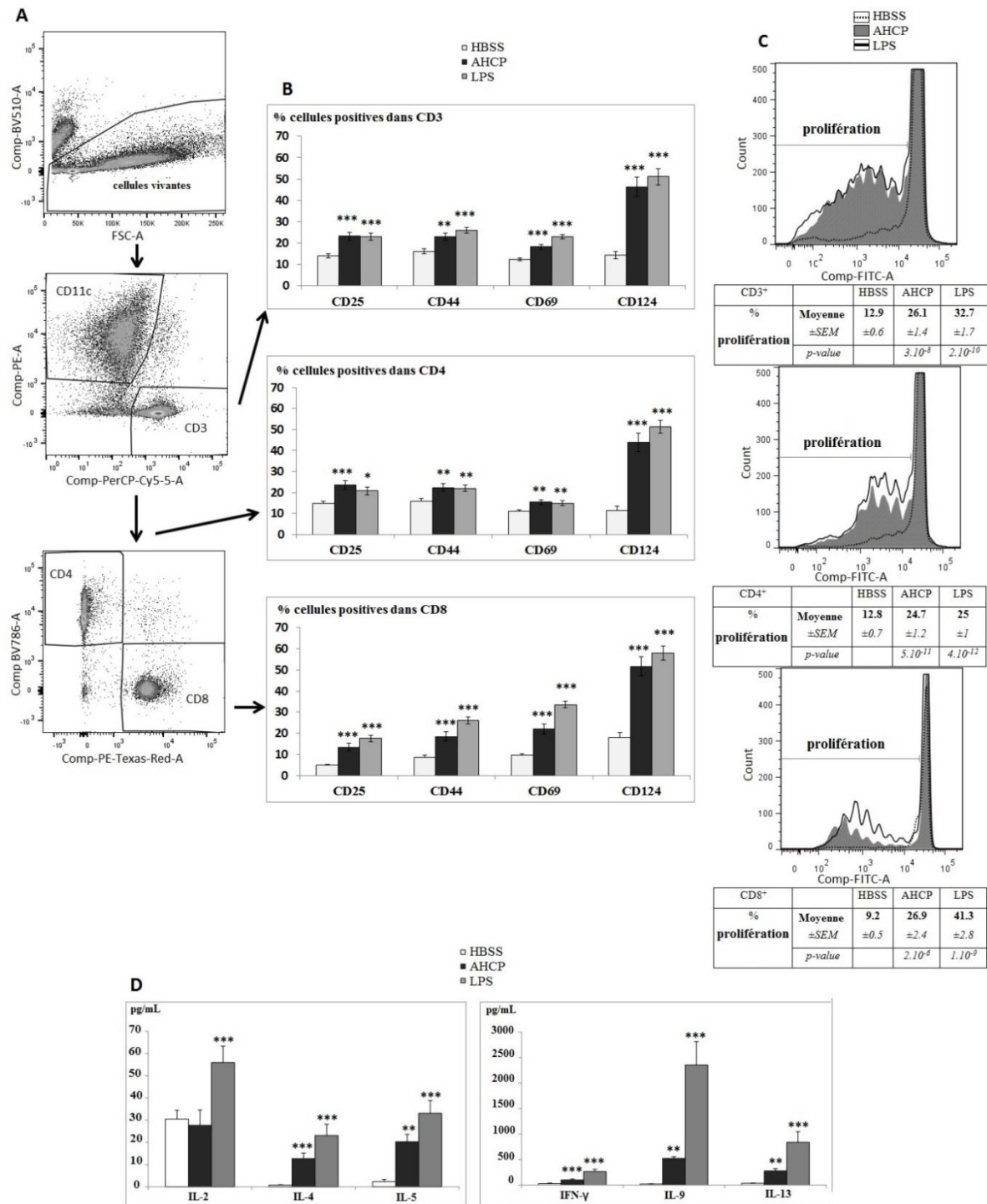


Figure 47. Caractérisation de l'activation des LT après 72 h de coculture avec les BMDC.

La caractérisation de l'activation des LT après 72 h de coculture avec les BMDC pré-exposées à l'AHCP ou au LPS est réalisée dans les populations CD3⁺, CD4⁺ et CD8⁺ isolées par fenêtrage (A). L'expression des marqueurs membranaires CD25, CD44, CD69 et CD124 est mesurée sur chacune des sous-populations (B). La prolifération des cellules CD3⁺, CD4⁺ et CD8⁺ est également étudiée après marquage des LT au carboxyfluorescein diacetate succimidyl ester (CFSE)(C). Les cytokines IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13 sécrétées par les LT en coculture avec les BMDC sont dosées dans le surnageant de culture (D). Chaque barre représente la moyenne ± SEM de 7 et 9 expériences indépendantes avec l'AHCP et le LPS, respectivement. Le test de Student a été utilisé pour les comparaisons entre le véhicule et les produits testés. * : p<0.05; ** : p<0.01; *** : p<0.001.

L'expression des marqueurs membranaires CD25, CD44, CD69 et CD124 ainsi que la prolifération ont été étudiées dans les sous-populations de LT. Pour ce faire, un fenêtrage sur les marqueurs CD3, CD4 et CD8 a été réalisé pour isoler les LT parmi les cellules vivantes et différencier les sous-populations CD4⁺ et CD8⁺ au sein des CD3⁺ (**Figure 47 A**). L'expression des marqueurs membranaires CD25, CD44, CD69 et CD124 ainsi que la prolifération ont été étudiées dans les sous-populations de LT (**Figure 47 B** et **Figure 48**). L'expression des quatre marqueurs membranaires est significativement augmentée sur les LT CD3⁺ après 72 h de coculture avec les BMDC pré-exposées 24 h au LPS ou à l'AHCP. L'étude de ces marqueurs dans les sous-populations CD4⁺ et CD8⁺ montre que la surexpression des trois marqueurs CD25, CD44 et CD69 est plus prononcée dans les LT CD8⁺ « exposés » que dans les LT CD4⁺ « exposés ». Il a été montré que les populations cellulaires CD4⁺ et CD8⁺ étaient impliquées dans la réponse de la DAC et les modèles actuels suggèrent que les LT CD8⁺ jouent un rôle majeur dans la phase de déclenchement de la HSRC chez la souris (Kimber *et al.*, 2012; Oakes *et al.*, 2017). La différence de réponse observée dans notre étude entre les deux sous-populations nous a conduits, pour les expérimentations suivantes, à étudier les réponses dans chacune des sous-populations séparément afin de ne pas manquer une réponse qui se développerait préférentiellement dans une de ces deux sous-populations.

L'analyse du marquage au CFSE montre que la prolifération des LT (CD3⁺, CD4⁺ et CD8⁺) cocultivés 72 h avec les BMDC pré-exposées au LPS et à l'AHCP est significativement plus importante que celle des LT cocultivés avec des BMDC exposées au véhicule HBSS (**Figure 47 C**). Ainsi, la prolifération cellulaire semble également un marqueur d'activation cellulaire pertinent à prendre en compte dans ce modèle.

Le dosage des cytokines montre une augmentation significative des concentrations en IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13 dans les surnageants de cocultures de LT et de BMDC pré-exposées au LPS et à l'AHCP. En revanche, aucune augmentation significative des concentrations en IL-10 et IL-17 n'est observée. Une augmentation significative de la

concentration d'IL-2 est observée en présence de BMDC pré-exposées au LPS, mais pas à l'AHCP. Ainsi, le dosage des cytokines sécrétées dans le milieu par les cellules en coculture permet également de rendre compte de l'activation des cellules.

L'ensemble de ces résultats montrent que les marqueurs membranaires CD25, CD44, CD69 et CD124, la prolifération des LT et la sécrétion de cytokines dans les surnageants de coculture sont des marqueurs pertinents pour l'étude de l'activation des LT cocultivés avec des BMDC.

Tableau 14. Rapports traités/témoins des pourcentages de cellules positives pour les marqueurs membranaires d'activation

| | | AHCP 100 µM | LPS 100 ng/mL |
|-----|-------|-------------|---------------|
| CD3 | CD25 | 1,7 | 1,6 |
| | CD44 | 1,4 | 1,6 |
| | CD69 | 1,5 | 1,9 |
| | CD124 | 3,2 | 3,6 |
| CD4 | CD25 | 1,6 | 1,4 |
| | CD44 | 1,4 | 1,4 |
| | CD69 | 1,4 | 1,3 |
| | CD124 | 3,9 | 4,5 |
| CD8 | CD25 | 2,7 | 3,6 |
| | CD44 | 2,1 | 2,0 |
| | CD69 | 2,3 | 2,4 |
| | CD124 | 2,9 | 3,2 |

Parmi les quatre marqueurs membranaires étudiés, le CD124 s'avère le plus sensible. Les rapports de pourcentages de cellules positives des LT « exposés » sur les pourcentages de cellules positives des LT « témoins » sont plus importants pour ce marqueur, quelles que soient les sous-populations de LT étudiées ou l'agent d'activation utilisé (AHCP ou LPS) ; la seule exception étant le marqueur CD25 surexprimé dans la sous-population des LT CD8 « exposés » au LPS (**Tableau 14**). En effet, pour le CD124, les valeurs du rapport exposé/témoin obtenues avec les LT exposés à l'AHCP et au LPS sont respectivement de 3,2 et 3,6 dans la population CD3⁺, 3,9 et 4,5 dans la population CD4⁺ et 2,9 et 3,2 dans la population CD8⁺. Ainsi, dans nos

conditions expérimentales, le marqueur CD124 semble le plus sensible pour analyser l'activation des LT par les BMDC pré-exposées au LPS et à l'AHCP. Cependant, les trois autres marqueurs, bien qu'apparemment moins sensibles, seront tout de même étudiés dans des travaux présentés par la suite.

2.3. Sélection du ratio BMDC/LT

Afin de déterminer le *ratio* BMDC/LT le plus approprié pour ce modèle de coculture, différentes quantités de chaque type cellulaire ont été déposées dans les puits de culture ; les cocultures obtenues ont été testées après pré-exposition des BMDC à l'AHCP. Des *ratios* BMDC/LT de 1/2, 1/10 et 1/50 ont été obtenus en déposant dans chaque puits les quantités de cellules indiquées dans le **Tableau 15**. Dans cet essai, seul l'expression du marqueur membranaire CD124 sur les LT a été étudiée.

Tableau 15. Nombre de BMDC et LT déposés dans chaque puits pour obtenir les différents *ratios* étudiés.

| Ratio cible BMDC/LT | Nombre réel de BMDC par puits | Nombre réel de LT par puits |
|---------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 1/2 | 90 000 | 180 000 |
| 1/10 | 30 000 | 270 000 |
| 1/50 | 6000 | 240 000 |

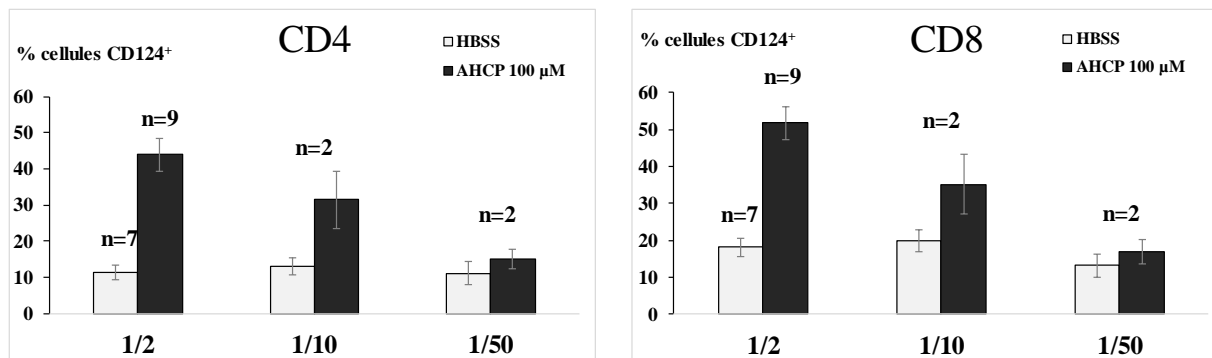


Figure 48. Influence des ratios BMDC/LT sur l'expression du marqueur d'activation membranaire CD124 dans les LT CD4⁺ et CD8⁺.

Chaque barre représente la moyenne de 2 duplicats \pm SEM. Du fait du faible nombre de données, une analyse statistique n'a pas été réalisée. n = nombre d'expérimentations indépendantes.

La surexpression du marqueur membranaire CD124 est la plus prononcée avec le *ratio* BMDC/LT de 1/2 ; cela est observé dans les populations CD4 et CD8 (Figure 48). Le choix s'est donc porté sur ce *ratio* BMDC/LT de 1/2 pour la suite de l'étude. Les modèles de coculture rapportés dans la littérature emploient un large éventail de ratio DC/LT de 1/1 (Huang *et al.*, 2011) à 1/100 (Okwor *et al.*, 2015). Dans l'ensemble, les études menées dans le cadre des allergies utilisent souvent un ratio de 1 DC pour 10 LT (Bellinghausen *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2011; Richter *et al.*, 2013; Zaslona *et al.*, 2014; Ashjaei *et al.*, 2015). Notre ratio de 1 BMDC pour 2 LT peut sembler élevé en comparaison ; en 2013, l'équipe de Periamasy *et al.* a comparé quatre ratios DC/LT (1/2 ; 1/5 ; 1/10, et 1/100) pour retenir le ratio 1/5 comme étant le plus sensible dans leur modèle (Periasamy *et al.*, 2013). En conclusion et au vu de la littérature, il semble important d'étudier lors du développement d'un modèle de coculture, les différents *ratios* entre DC et LT, afin de définir celui qui semble le plus pertinent en termes de résultats recherchés. Dans le cadre de ce modèle, nous avons choisi le ratio 1 DC pour 2 LT.

2.4. Essais de différentes durées d'exposition et de coculture

Les durées d'exposition des BMDC à l'AHCP et les durées de coculture permettant d'obtenir une réponse maximale ont été recherchées. Lors du développement du modèle BMDC par Battais et al. (2017) (annexe 1), une durée d'exposition des BMDC aux produits de 48 h avait été sélectionnée pour obtenir une activation optimale de ces dernières. Dans l'étude présente, deux durées d'exposition des BMDC à l'AHCP ont été étudiées, 24 et 48 h. Cette période d'exposition était suivie d'une coculture BMDC pré-exposées-LT de 72 h. Seuls les résultats de l'expression des marqueurs membranaires d'activation CD25, CD44, CD69 et CD124 sont présentés car ce sont les plus représentatifs de la différence observée dans la réponse des LT entre les deux conditions opératoires.

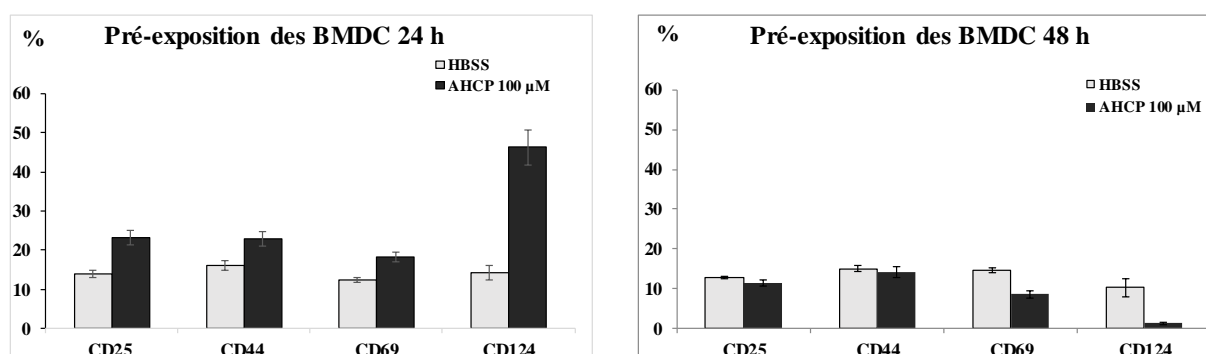


Figure 49. Influence de la durée d'exposition des BMDC à l'AHCP sur l'expression des marqueurs membranaires des LT CD25, CD44, CD69 et CD124.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules positives pour les 4 marqueurs étudiés. L'expression des marqueurs membranaires a été analysée après une coculture de 72 h des LT avec des BMDC préalablement exposées 24 h ou 48 h à 100 µM d'AHCP. À 24 h chaque barre représente la moyenne \pm SEM du pourcentage de cellules positives des duplicats de 7 expériences avec l'hexachloroplatinate d'ammonium et de 9 expériences avec l'HBSS. À 48 h, chaque barre représente la moyenne \pm SEM des duplicats de 2 expériences ; du fait du faible nombre de données, une analyse statistique n'a pas été réalisée.

Il apparaît que pour l'ensemble des marqueurs membranaires étudiés, la réponse des LT est plus importante lorsqu'ils sont cultivés avec des BMDC pré-exposées à 100 μ M d'AHCP pendant 24 h que lorsqu'ils sont cultivés avec des BMDC pré-exposées 48 h au même produit (**Figure 49**). La durée d'exposition des BMDC aux produits de 24 h a donc été sélectionnée pour l'établissement du modèle.

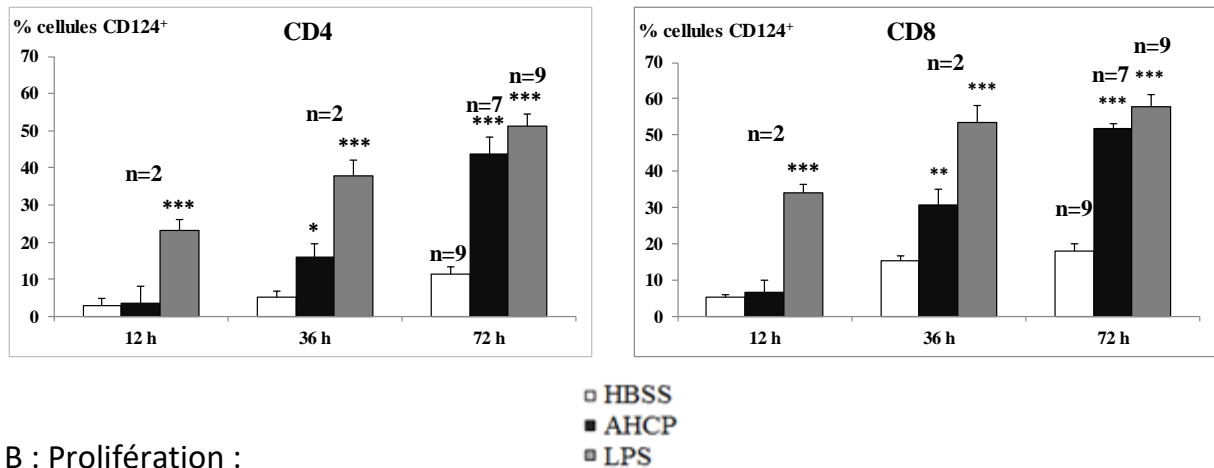
Tableau 16. Viabilité des LT exprimée en pourcentages de cellules vivantes en fonction de la durée de la coculture.

La moyenne et l'écart-type ont été calculés à partir des données de 2 expérimentations indépendantes à 12 h, 36 h, 96 h et 120 h de coculture et de 7 expérimentations à 72 h de coculture.

| | 12 h | 36 h | 72 h | 96 h | 120 h |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Moyenne | 85,2 | 87,3 | 90,0 | 74,3 | 53,4 |
| Ecart-type | 2,8 | 5,8 | 5,9 | 7,1 | 4,1 |

Une fois la durée d'exposition des BMDC établie, cinq durées de coculture ont été étudiées de façon à déterminer celle qui permettait d'obtenir la meilleure réponse des LT cultivés en présence de BMDC pré-exposées à 100 ng/mL de LPS ou à 100 μ M d'AHCP. La réponse des LT a été évaluée en mesurant l'expression du CD124 et la prolifération des LT. La viabilité des cellules a également été prise en compte pour déterminer la durée de coculture optimale.

A : Expression de CD124 :



B : Prolifération :

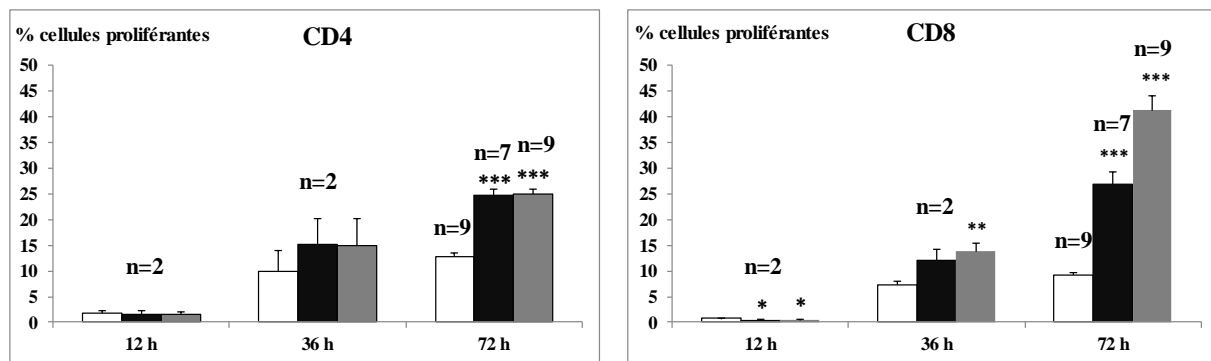


Figure 50. Expression du marqueur CD124 (A) et prolifération (B) des LT CD4⁺ et CD8⁺ en fonction de la durée de coculture.

Chaque barre représente la moyenne \pm SEM. Le test de Student a été utilisé pour les comparaisons entre le véhicule et les produits testés *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ n = nombre d'expérimentations indépendantes.

Des LT ont été mis en culture avec des BMDC pré-exposées au LPS et à l'AHCP pendant 12, 36, 72, 96 et 120 h. À 96 et 120 h, nous observons une mortalité importante des cellules (> à 20 %). Nous avons établi au laboratoire une limite de mortalité de 20 %, au-delà de laquelle, nous rejetons l'analyse, afin de ne pas interpréter des résultats aberrants dus à un excès de débris cellulaires (**Tableau 16**). Avec le LPS, l'augmentation de l'expression du CD124 est significative dès 12 h de coculture, à la fois sur les cellules CD4⁺ et CD8⁺. En présence d'AHCP, l'augmentation de l'expression du CD124 n'est significative qu'à partir de 36 h de coculture. Le rapport traité/témoin est maximal à 72 h de coculture avec les deux produits testés (**Figure 50 A**). Ainsi, la durée de

coculture de 72 h semble être la plus appropriée pour l'observation de l'expression du marqueur membranaire CD124.

L'augmentation de la prolifération est plus tardive que celle de l'expression du CD124. Elle est observée dans la sous-population CD8⁺ à partir de 36 h de coculture avec des BMDC pré-exposées au LPS. Une augmentation significative de la prolifération des LT CD4⁺ et CD8⁺ n'est observée qu'à partir de 72 h de coculture avec des BMDC pré-exposées au LPS et à l'AHCP (**Figure 50 B**). Ainsi, la durée de coculture de 72 h semble également être la plus appropriée pour l'étude de la prolifération des LT stimulés par les BMDC.

Compte tenu des résultats portant sur l'expression du CD124, la prolifération et la viabilité cellulaires, la durée de coculture BMDC-LT de 72 h a été retenue pour la suite de l'étude.

2.5. Influence de la concentration d'AHCP sur l'activation des LT.

Afin d'étudier l'influence de la concentration d'AHCP sur l'activation des LT, les BMDC étaient pré-exposées à une gamme de concentrations d'AHCP allant de 12,5 à 200 µM.

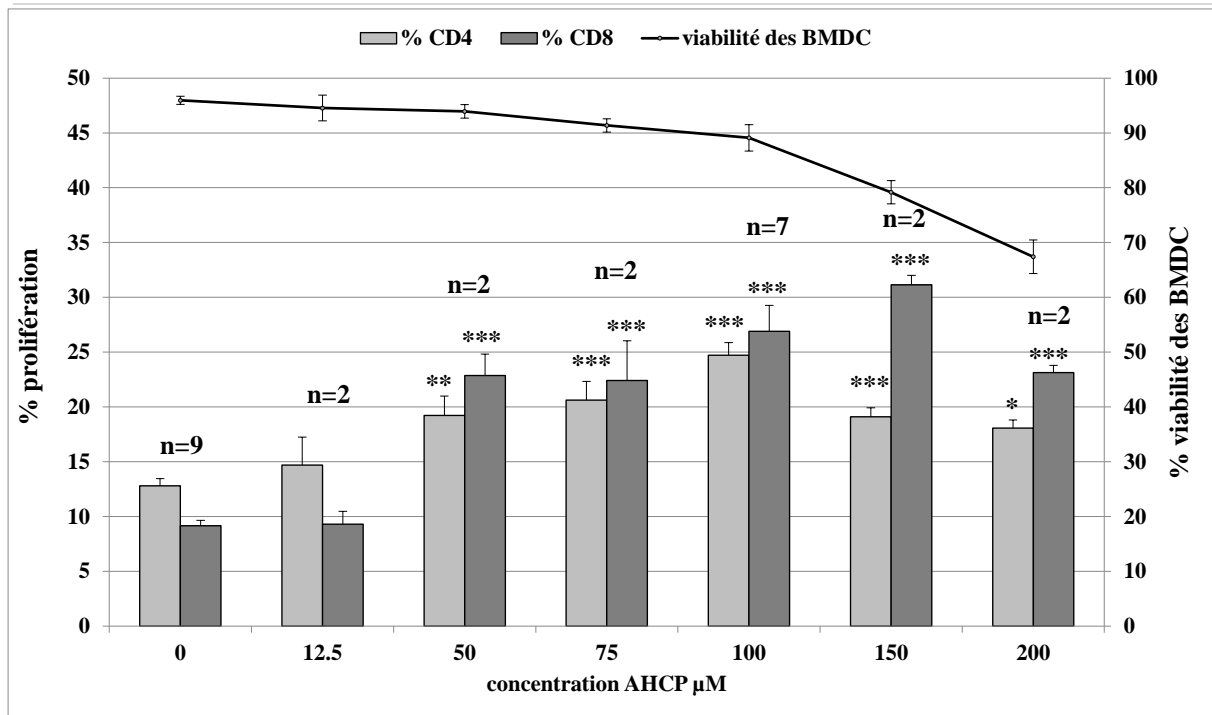


Figure 51. Influence de la concentration en hexachloroplatinate d'ammonium (AHCP) sur l'activation des lymphocytes T (LT).

Les LT ont été cocultivés pendant 72 h avec des BMDC préalablement exposées pendant 24 h à des concentrations croissantes d'AHCP (moyenne \pm SEM). La prolifération est mesurée par cytométrie en flux par la méthode de dilution du carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). La courbe en haut de la figure donne la moyenne et l'écart-type des valeurs de viabilité des BMDC (n=2). Une analyse de variance ANOVA suivie par un test multiparamétrique avec la correction de Bonferroni a été utilisée. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$. n = nombre d'expérimentations indépendantes.

Les résultats montrent une augmentation significative de la prolifération dans les populations CD4⁺ et CD8⁺ à partir de 50 µM d'AHCP (**Figure 51**). Cette augmentation est dépendante de la concentration d'AHCP. Le pourcentage de cellules CD4⁺ et CD8⁺ en prolifération est maximal respectivement, à 100 µM et 150 µM d'AHCP. Cependant, la viabilité des BMDC tombe sous le seuil de 80 % après 24 h d'exposition à 150 µM d'AHCP. L'activation des LT après coculture est concentration-dépendante, ce qui semble montrer une spécificité de réponses des LT au sensibilisant testé. Ces résultats sont encourageants et confirment que les BMDC sont capables d'activer de manière spécifique les LT (CD4 et CD8) *in vitro*, suite à une activation par un haptène.

2.6. Implication des différentes populations de LT dans la réponse aux BMDC pré-exposées à l'AHCP et au LPS

La population de LT CD3⁺ étant composée entre autres, de cellules naïves, mémoires et de cellules régulatrices, nous avons souhaité évaluer avec les outils disponibles, la contribution de ces sous-populations dans la réponse observée dans notre modèle de coculture. Ainsi, la contribution de différentes populations cellulaires dans la réponse à l'AHCP et au LPS a été étudiée. Parmi ces populations, l'influence des LT régulateurs (LTreg) et des LT naïfs et mémoires a été étudiée afin d'obtenir un modèle cellulaire sensible et de s'assurer que la réponse observée est bien le fait de LT naïfs, et non de LT mémoires.

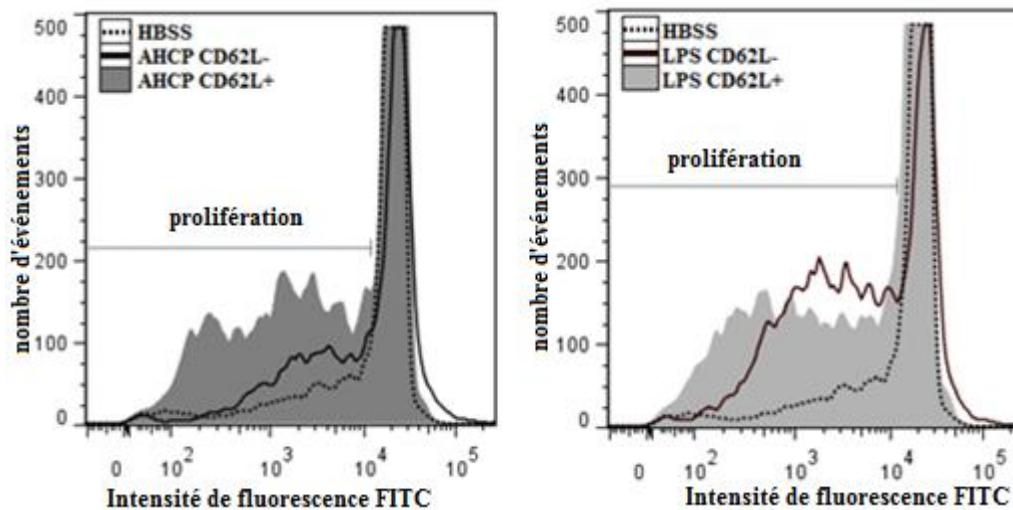


Figure 52. Prolifération des populations de LT CD62L⁺ et CD62L⁻.

La prolifération est étudiée sur des LT marqués au carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) et cultivés 72 h avec des BMDC pré-exposées à l'AHCP, au LPS ou au véhicule HBSS.

Les marqueurs CD44 et CD62L étant respectivement exprimés sur les cellules mémoires et naïves (Gerberick et al. 1997), la contribution des LT mémoires et naïfs a été étudiée après isolement des sous-populations CD44⁻, CD62L⁻ et CD62L⁺. Deux kits d'enrichissement ont été employés, l'un sélectionnant les cellules CD44⁺, l'autre séparant les cellules CD62L⁺ et CD62L⁻. L'étude de la prolifération des cellules CD62L⁺

et CD62L⁻ montre que le LPS active à la fois les cellules naïves et mémoires, tandis que la prolifération induite par l'AHCP se produit essentiellement dans la population des cellules naïves CD62L⁺ (**Figure 52**). L'effet observé sur les LT semble donc bien être dû à une activation des LT naïfs et non pas à la réactivation de cellules mémoires de la souris dont sont issues les cellules. Ces résultats confirment l'intérêt de ce modèle de coculture permettant de mesurer une activation spécifique des LT naïfs pour l'haptène testé, de manière rapide (dès 72 h) et sans restimulation, ce qui simplifie le protocole opératoire développé pour reproduire *in vitro* l'événement 4 de la phase de sensibilisation (Richter *et al.*, 2013; Vocanson *et al.*, 2013; van Vliet *et al.*, 2017). Nous avons étudié séparément la réponse de populations de LT enrichies en cellules naïves CD4⁺ CD44⁻ et CD8⁺ CD44⁻ lors de leur stimulation par des BMDC activées par du LPS et de l'AHCP (**Tableau 17**). En présence de BMDC pré-exposées au LPS et à l'AHCP, la prolifération des LT ainsi que l'expression du CD124 ne sont pas augmentées dans les populations enrichies en cellules CD4⁺ CD44⁻ par rapport à celles de la population LT totale (**Tableau 17**). Étant donné que le rendement du processus d'enrichissement en cellules CD4⁺ CD44⁻ est très inférieur à celui permettant de récupérer la population LT totale et que la sélection de la population de cellules CD4⁺ CD44⁻ n'améliore pas l'intensité de la réponse cellulaire, nous avons sélectionné la population LT totale pour le modèle de coculture. Quand les cellules enrichies en CD8⁺ CD44⁻ (en l'absence de CD4⁺) sont cultivées avec des BMDC pré-exposées à l'AHCP et au LPS, aucune activation des LT n'est observable. Ainsi, la présence des LT CD4⁺ apparaît indispensable à l'activation des CD8⁺; une telle observation a déjà été faite par ailleurs (Janeway *et al.*, 2009).

Certains auteurs ont observé que la présence de LT régulateurs (LTreg) pouvait diminuer la réponse des LT lors de leur stimulation par les DC, conduisant à l'obtention de résultats faux-négatifs (Vocanson *et al.*, 2009a). Afin d'évaluer dans notre modèle l'influence des LTreg sur la réponse des LT, nous avons sélectionné par tri cellulaire magnétique les LT CD25⁻. Nous avons étudié la prolifération lymphocytaire et l'expression du marqueur CD124 sur les LT CD3⁺ et sur la population de LT CD25⁻ après

coculture avec des BMDC pré-exposées au LPS ou à l'AHCP. La réponse observée (prolifération et expression du CD124) était plus importante dans la population des LT CD3⁺ que dans celle des CD3⁺ CD25⁻ (**Tableau 17**). De plus, les valeurs de SEM obtenues révèlent une plus grande variabilité des résultats dans la population des LT CD3⁺ CD25⁻ que dans la population des LT CD3⁺. L'activation des cellules enrichies en CD25⁻ (exprimée par la prolifération et l'expression du CD124) étant moins importante que celle des LT CD3⁺ totaux, il ne s'est pas avéré nécessaire de supprimer la population de LT CD25⁺ dans le modèle de coculture. En effet, cela aurait nécessité une étape supplémentaire, sans améliorer l'efficacité de l'essai.

Tableau 17. Activation de différentes sous-populations de LT par les BMDC pré-exposées à l'AHCP et au LPS.

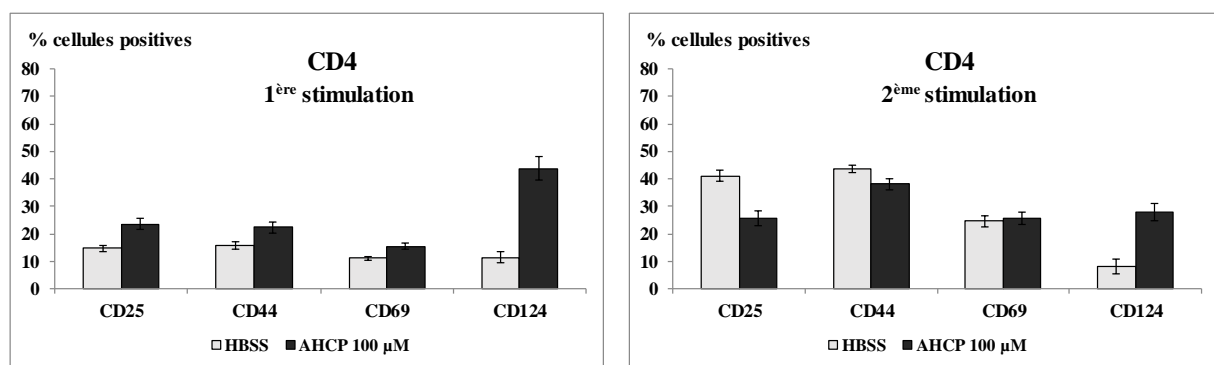
Les pourcentages (moyenne \pm SEM) de cellules en prolifération et de cellules exprimant le CD124 sont donnés pour les cellules CD3⁺, CD25⁻, CD4⁺ CD44⁻ et CD8⁺ CD44⁻ cocultivées avec des BMDC pré-exposées à l'AHCP, au LPS ou au véhicule HBSS (témoins). Le test de Student a été utilisé pour les comparaisons entre « témoins » exposés au véhicule et « exposés » aux produits testés. NS : non significatif. n = nombre d'expérimentations indépendantes.

| | | CD3 ⁺ | | CD3 ⁺ CD25 ⁻ | | CD4 ⁺ CD44 ⁻ | | CD8 ⁺ CD44 ⁻ | |
|------|-------------------|--------------------------|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| | | % cellules proliférantes | % cellules CD124 ⁺ | % cellules proliférantes | % cellules CD124 ⁺ | % cellules proliférantes | % cellules CD124 ⁺ | % cellules proliférantes | % cellules CD124 ⁺ |
| HBSS | Moyenne \pm SEM | 12,9 \pm 0.6 (n=9) | 14,3 \pm 1.8 (n=9) | 20 \pm 6.8 (n=3) | 14,5 \pm 4 (n=3) | 7,4 \pm 1.5 (n=3) | 23,1 \pm 7.2 (n=3) | 8,3 \pm 1.3 (n=3) | 3,9 \pm 0.8 (n=3) |
| | | | | | | | | | |
| AHCP | Moyenne \pm SEM | 26,1 \pm 1.4 (n=7) | 46,3 \pm 4.5 (n=7) | 28,2 \pm 5.4 (n=3) | 33,3 \pm 7 (n=3) | 21,5 \pm 3 (n=3) | 55,4 \pm 5.1 (n=3) | 6 \pm 1 (n=3) | 4,1 \pm 0.5 (n=3) |
| | p-value | 3.10 ⁻⁸ | 1,6.10 ⁻⁵ | NS | NS | 3,9.10 ⁻⁴ | 4,2.10 ⁻³ | NS | NS |
| LPS | Moyenne \pm SEM | 32,7 \pm 1.7 (n=9) | 51 \pm 3.8 (n=9) | 35 \pm 4.9 (n=3) | 48,9 \pm 7.3 (n=3) | 15,8 \pm 2.8 (n=3) | 38,7 \pm 5.8 (n=3) | 9,5 \pm 1.4 (n=3) | 8,6 \pm 3.1 (n=3) |
| | p-value | 2.10 ⁻¹⁰ | 7.10 ⁻⁹ | NS | 6.10 ⁻³ | 8,2.10 ⁻³ | NS | NS | NS |

2.7. Essai de restimulation homologue

Parmi les approches choisies par d'autres équipes, la restimulation des LT par des DC activées a été présentée comme une méthode efficace pour amplifier la réponse obtenue (Vocanson *et al.*, 2013). Ainsi, nous avons choisi de réaliser une restimulation des LT. Le protocole utilisé pour effectuer l'étape de restimulation est le suivant : après 72 h de coculture avec des BMDC pré-exposées au HBSS (témoins) ou à l'AHCP, les cellules ont été récoltées, rincées, puis remises en culture avec des BMDC « fraîches » pré-exposées 24 h au HBSS ou à l'AHCP. L'activation des LT après la deuxième stimulation a été analysée après 72 h de coculture.

A



B

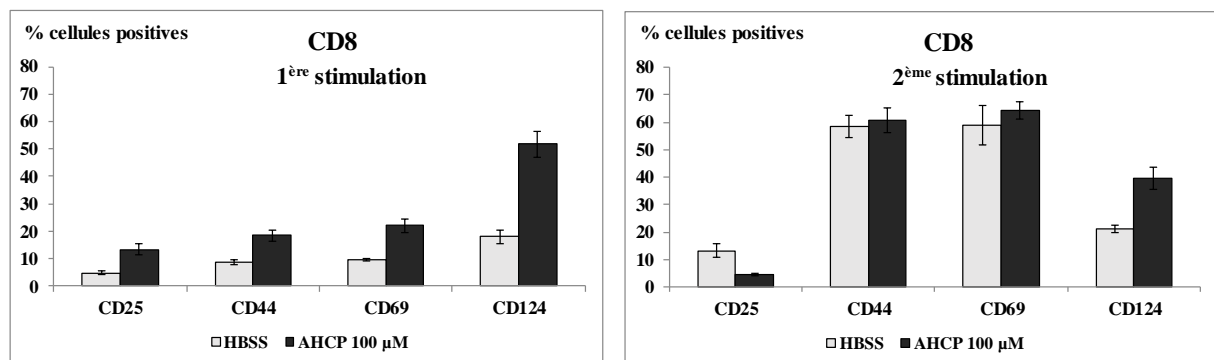


Figure 53. Activation des LT après une ou deux stimulations par des BMDC pré-exposées à l'AHCP.

Les expérimentations ont été conduites sur des populations enrichies en LT CD4 (A) ou en LT CD8 (B). Chaque barre représente la moyenne et l'écart-type de duplicats obtenus au cours d'une expérimentation.

La deuxième stimulation des LT par des BMDC pré-exposées au HBSS ou à l'AHCP induit une augmentation de l'expression des marqueurs CD69 et CD44 supérieure à celle obtenue lors de la première stimulation ; cependant, cette augmentation de la réponse est identique chez les LT « témoins » et les LT « exposés ». L'expression du CD124 n'est pas modifiée par la deuxième stimulation chez les LT « témoins » et légèrement diminuée chez les LT « exposés ». Enfin, si la deuxième stimulation provoque une augmentation marquée de l'expression du CD25 chez les LT « témoins », elle ne modifie pas, voire diminue l'expression de ce marqueur chez les LT « exposés ». Ainsi, dans notre modèle de coculture, la deuxième stimulation n'améliorant pas la réponse des LT « exposés », les expérimentations suivantes ont été conduites avec une seule stimulation.

2.8. Bilan des expérimentations de mise au point du modèle de coculture

Au cours de cette première phase consacrée à la mise au point du modèle de coculture, un certain nombre de paramètres ont pu être arrêtés :

- une durée d'exposition des BMDC aux produits de 24 h,
- un *ratio* BMDC/LT de 1/2,
- l'utilisation de la population totale des LT isolés à partir de splénocytes de souris,
- une durée de de coculture BMDC-LT de 72 h.
- L'analyse des marqueurs d'activation des LT suivants :
 - Marqueurs membranaires CD25, CD44, CD69 et CD124,
 - Prolifération de LT et
 - Sécrétion des cytokines IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 et IL-17 dans le surnageant de coculture*.

Une fois établi avec un sensibilisant de référence, ce modèle a été testé avec d'autres produits de référence afin d'évaluer sa pertinence comme modèle d'évaluation du potentiel sensibilisant des haptènes.

*Concernant l'IL-10 et l'IL-17, les résultats obtenus sont négatifs. Nous avons néanmoins poursuivi l'étude de ces deux cytokines afin de vérifier si la sécrétion de ces deux cytokines augmentait lorsque les cellules étaient exposées à d'autres produits.

3. Partie III : Évaluation du modèle développé à l'aide d'autres produits chimiques de référence, sensibilisants et non sensibilisants

Après avoir développé ce modèle de coculture BMDC-LT avec l'AHCP reconnu comme sensibilisant respiratoire, il était important d'étudier la réactivité de ce modèle à l'aide d'une gamme élargie de composés de référence reconnus comme sensibilisants (cutanés et respiratoires), irritants et non sensibilisants-non irritants.

3.1. Essai des différents produits sur le modèle de coculture

Quatorze produits chimiques de référence présentés dans le **Tableau 18**, ont été testés sur le modèle aux concentrations indiquées.

Tableau 18. Produits de référence testés sur le modèle de coculture BMDC-LT.

NS : non sensibilisant. - : produit non catégorisé par le LLNA.

| Produit | Abréviation | Catégorie | Puissance | Véhicule | Concentrations testées (µM) |
|-----------------------------------|-------------------|--------------------------------------|-----------|----------|---|
| Dinitrofluorobenzène | DNFB | Sensibilisant cutané | Extrême | DMSO | 5 ;10 ;15 |
| Base de Bandrowski | BB | Sensibilisant cutané | Extrême | DMSO | 5 ;10 ;20 |
| <i>para</i> -Phénylènediamine | pPD | Sensibilisant cutané | Fort | HBSS | 50 ;100 ;200 ;300 |
| Cinnamaldéhyde | Cinn | Sensibilisant cutané | Modéré | DMSO | 100 |
| Sulfate de nickel | NiSO ₄ | Sensibilisant cutané | Modéré | HBSS | 300 |
| Chlorure de cobalt | CoCl ₂ | Sensibilisant cutané | Modéré | HBSS | 300 |
| Eugénol | Eug | Sensibilisant cutané | Faible | DMSO | 500 ; 750 ; 1000 |
| Hexachloroplatinate d'ammonium | AHCP | Sensibilisant respiratoire | - | HBSS | 12,5 ; 50 ; 75 ; 100 ; 125 ; 150 ; 200 |
| <i>para</i> -Tolyl isocyanate | TMI | Sensibilisant respiratoire | - | DMSO | 300 ; 400 |
| Glutaraldéhyde | Gluta | Sensibilisant respiratoire et cutané | - | HBSS | 20 |
| Sodium dodécyl sulfate | SDS | Irritant | NS | HBSS | 100 ; 200 |
| Acide <i>para</i> -aminobenzoïque | pABA | Irritant | NS | HBSS | 2,5.10 ³ ; 5.10 ³ ; 10.10 ³ |
| Sulfate de zinc | ZnSO ₄ | Contrôle négatif | NS | HBSS | 50 ; 100 ; 200 |
| Isopropanol | IsoP | Contrôle négatif | NS | HBSS | 25.10 ³ ; 50.10 ³ ; 100.10 ³ |

Parmi ces 14 substances, nous avons étudié 7 sensibilisants cutanés, 3 sensibilisants respiratoires et 4 substances non sensibilisantes. Les concentrations testées ont été choisies sur la base des résultats du modèle BMDC (Battais *et al.* 2017).

Le **Tableau 19** présente les résultats chiffrés de prolifération de la sous-population des LT CD8⁺ obtenus avec chaque concentration de produits testés.

Tableau 19. Activation des LT CD8⁺ mis en coculture avec des BMDC pré-exposées à des sensibilisants cutanés et respiratoires et un non sensibilisant.

Les valeurs entre parenthèses représentent les valeurs minimales et maximales de plusieurs expérimentations. La prolifération des CD8 "exposés" a été comparée à celle des cultures témoins (DMSO ou HBSS). Une analyse de variance ANOVA suivie par un test multiparamétrique avec la correction de Bonferroni a été utilisée.

| Agent étudié | Concentrations testées (µM) | % de CD8 proliférants | Valeur de p |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-------------|
| HBSS | | (4,4 - 15,1) | |
| DMSO | | (6,8 - 13,1) | |
| Dinitrofluorobenzène | 5 | 18,8 (12,6 - 30,8) | < 0,001 |
| | 10 | 28,2 (20,1 - 42,1) | < 0,001 |
| | 15 | 33,4 (25,4 - 44,5) | < 0,001 |
| Base de Bandrowski | 5 | 16,9 (9,9 - 27) | < 0,001 |
| | 10 | 24 (12,9 - 41,2) | < 0,001 |
| | 20 | 37,1 (17,1 - 61,2) | < 0,001 |
| <i>para</i> -Phénylènediamine | 50 | 11,8 (6,4 - 17,3) | 0,057 |
| | 100 | 14,8 (12,1 - 18,5) | < 0,001 |
| | 200 | 13,3 (9,5 - 20,1) | < 0,001 |
| | 300 | 12,9 (11,1 - 14,7) | 0,001 |
| Cinnamaldéhyde | 100 | 9,3 (5,6 - 11,8) | 0,486 |
| Sulfate de nickel | 300 | 9,6 (7,8 - 12,1) | 0,84 |
| Chlorure de cobalt | 300 | 11,8 (7,9 - 14,6) | 0,001 |
| Eugénol | 500 | 12,1 (6,1 - 24,3) | 0,531 |
| | 750 | 15,8 (10,2 - 22,1) | 0,004 |
| | 1000 | 17,1 (14,3 - 20,6) | 0,032 |
| Hexachloroplatinate d'ammonium | 12,5 | 11,9 (8,1 - 16,8) | < 0,001 |
| | 50 | 20,8 (12,8 - 28,8) | < 0,001 |
| | 75 | 25,3 (17,3 - 32,8) | < 0,001 |
| | 100 | 30,1 (15,5 - 44,8) | < 0,001 |
| | 125 | 30,2 (11,4 - 44,1) | < 0,001 |
| | 150 | 28,5 (20,4 - 33,2) | < 0,001 |
| <i>para</i> -Tolyl isocyanate | 300 | 12,7 (6,6 - 21,3) | 0,028 |
| | 400 | 15,1 (12,7 - 17,6) | 0,001 |
| Glutaraldéhyde | 20 | 11,3 (7,8 - 14,1) | 0,005 |
| Sodium dodécyl sulfate | 100 | 7,6 (4,6 - 10,9) | 0,12 |
| | 200 | 9,7 (7,7 - 13,6) | 1 |
| Acide <i>para</i> -aminobenzoïque | 2,5.10 ³ | 9,9 (8,1 - 13,1) | 1 |
| | 5.10 ³ | 11,3 (7,5 - 15,7) | 0,693 |
| | 10.10 ³ | 19,1 (7,7 - 36,4) | < 0,001 |
| Sulfate de zinc | 50 | 11,2 (5,4 - 19,9) | 0,933 |
| | 100 | 11,4 (5,5 - 20,5) | 0,985 |
| | 200 | 9 (5,4 - 15,1) | 1 |
| Isopropanol | 25.10 ³ | 12,5 (7,2 - 20,4) | 0,186 |
| | 50.10 ³ | 12,8 (7,7 - 22,6) | 0,259 |
| | 100.10 ³ | 10 (7,4 - 13,5) | 1 |

Le **Tableau 19** présente les moyennes des pourcentages de cellules T CD8⁺ proliférantes. Excepté pour le *p*ABA à la plus forte concentration testée, aucune substance non sensibilisante ne présente des valeurs de prolifération significativement différentes de celles des cellules témoins. Pour ce paramètre, nous observons que 8 sensibilisants sur 10 présentent des résultats positifs.

Les résultats obtenus avec les autres paramètres sont présentés dans le tableau suivant. Un bilan de l'activation des LT de souris BALB/c marqueur par marqueur est présenté dans le **Tableau 20 A et B**.

Tableau 20. Bilan de l'activation des LT de souris BALB/c mis en coculture avec des BMDC pré-exposées à des produits sensibilisants, non sensibilisants et irritants.

A : Un signe + indique une différence significative entre les LT « exposés » et les LT « témoins » pour au moins une des concentrations testées. B : Un signe + indique une différence significative entre les LT « exposés » et les LT « témoins » pour au moins une des concentrations testées et un des marqueurs étudiés. Les valeurs de concentration des cytokines indiquées en vert ont été obtenues par extrapolation de la gamme étalon. Une analyse de variance ANOVA suivie par un test multiparamétrique avec la correction de Bonferroni a été utilisée.

A

| BALB/c | | | | | | | | | |
|-------------------|---------------|-----|------------------------|-----|-----|---------------|---|-------|---|
| Produits | Prolifération | | Marqueurs membranaires | | | Cytokines | | | |
| | CD4 | CD8 | | CD4 | CD8 | | | | |
| DNFB | + | + | CD25 | + | + | IFN- γ | + | IL-9 | + |
| | | | CD44 | + | + | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | + | IL-4 | + | IL-13 | + |
| | | | CD124 | + | + | IL-5 | + | IL-17 | + |
| BB | + | + | CD25 | + | + | IFN- γ | + | IL-9 | + |
| | | | CD44 | + | + | IL-2 | + | IL-10 | + |
| | | | CD69 | + | + | IL-4 | + | IL-13 | + |
| | | | CD124 | + | + | IL-5 | + | IL-17 | - |
| pPD | - | + | CD25 | - | - | IFN- γ | + | IL-9 | + |
| | | | CD44 | - | - | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | - | IL-4 | + | IL-13 | + |
| | | | CD124 | - | + | IL-5 | - | IL-17 | + |
| Cinn | - | - | CD25 | - | - | IFN- γ | - | IL-9 | - |
| | | | CD44 | - | - | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | - | IL-4 | - | IL-13 | - |
| | | | CD124 | - | - | IL-5 | - | IL-17 | - |
| CoCl ₂ | - | + | CD25 | - | - | IFN- γ | - | IL-9 | + |
| | | | CD44 | - | - | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | - | IL-4 | + | IL-13 | - |
| | | | CD124 | - | - | IL-5 | - | IL-17 | - |
| NiSO ₄ | - | - | CD25 | + | - | IFN- γ | - | IL-9 | + |
| | | | CD44 | + | - | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | - | IL-4 | + | IL-13 | + |
| | | | CD124 | - | - | IL-5 | - | IL-17 | + |
| Eug | - | + | CD25 | - | - | IFN- γ | - | IL-9 | - |
| | | | CD44 | - | - | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | - | IL-4 | + | IL-13 | - |
| | | | CD124 | - | - | IL-5 | + | IL-17 | - |
| AHCP | + | + | CD25 | + | + | IFN- γ | + | IL-9 | + |
| | | | CD44 | + | + | IL-2 | - | IL-10 | + |
| | | | CD69 | + | + | IL-4 | + | IL-13 | + |
| | | | CD124 | + | + | IL-5 | + | IL-17 | + |
| TMI | + | + | CD25 | - | - | IFN- γ | - | IL-9 | - |
| | | | CD44 | + | - | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | - | IL-4 | + | IL-13 | - |
| | | | CD124 | - | - | IL-5 | - | IL-17 | + |
| Gluta | + | + | CD25 | - | - | IFN- γ | - | IL-9 | - |
| | | | CD44 | - | - | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | - | IL-4 | - | IL-13 | - |
| | | | CD124 | - | - | IL-5 | - | IL-17 | + |
| SDS | - | - | CD25 | - | - | IFN- γ | - | IL-9 | - |
| | | | CD44 | - | - | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | - | IL-4 | - | IL-13 | - |
| | | | CD124 | - | - | IL-5 | - | IL-17 | - |
| pABA | - | + | CD25 | - | - | IFN- γ | - | IL-9 | - |
| | | | CD44 | - | - | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | - | IL-4 | - | IL-13 | - |
| | | | CD124 | - | - | IL-5 | - | IL-17 | - |
| ZnSO ₄ | - | - | CD25 | - | - | IFN- γ | - | IL-9 | - |
| | | | CD44 | - | - | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | - | IL-4 | - | IL-13 | - |
| | | | CD124 | - | - | IL-5 | - | IL-17 | - |
| Isop | - | - | CD25 | - | - | IFN- γ | - | IL-9 | - |
| | | | CD44 | - | - | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | - | IL-4 | - | IL-13 | - |
| | | | CD124 | - | - | IL-5 | - | IL-17 | - |

B

| | CD4 | | CD8 | | Cytokines |
|-------------------|----------|-------------|----------|-------------|-----------|
| DNFB | Prolif + | Marqueurs + | Prolif + | Marqueurs + | + |
| BB | Prolif + | Marqueurs + | Prolif + | Marqueurs + | + |
| pPD | Prolif | Marqueurs | Prolif + | Marqueurs + | + |
| Cinn | Prolif | Marqueurs | Prolif | Marqueurs | |
| CoCl ₂ | Prolif | Marqueurs | Prolif | Marqueurs | + |
| NiSO ₄ | Prolif | Marqueurs + | Prolif | Marqueurs | + |
| Eug | Prolif | Marqueurs | Prolif + | Marqueurs | + |
| AHCP | Prolif + | Marqueurs + | Prolif + | Marqueurs + | + |
| TMI | Prolif + | Marqueurs + | Prolif + | Marqueurs | + |
| Gluta | Prolif + | Marqueurs | Prolif + | Marqueurs | + |
| SDS | Prolif | Marqueurs | Prolif | Marqueurs | |
| pABA | Prolif | Marqueurs | Prolif + | Marqueurs | |
| ZnSO ₄ | Prolif | Marqueurs | Prolif | Marqueurs | |
| Isop | Prolif | Marqueurs | Prolif | Marqueurs | |

Les résultats présentés dans le tableau 20 A. montrent que le paramètre de prolifération cellulaire, observé dans les populations CD8⁺ ou CD4⁺, est positif pour 8 des 10 sensibilisants testés, mais également positif pour un produit non-sensibilisant, le *pABA*. Les marqueurs membranaires étudiés sont eux positifs avec 6 des 10 produits sensibilisants testés et aucun des non-sensibilisants. Concernant le dosage des cytokines, l'IFN- γ donne des résultats positifs avec 4 des 10 sensibilisants, l'IL-2 n'est positif qu'avec la BB, l'IL-9 est positif avec 5 des 10 sensibilisants. Les cytokines dont les dosages ont été obtenus par extrapolation de la courbe de la gamme étalon ont donné des résultats positifs avec 8 des 10 produits sensibilisants pour l'IL-4, 4 des 10 sensibilisants pour l'IL-5, 2 sensibilisants pour l'IL-10 et 6 sensibilisants pour l'IL-17. Aucune des cytokines dosées ne présente de résultat positif avec les produits non-sensibilisants.

En considérant qu'un paramètre positif (*ie* : significativement augmenté par rapport au témoin véhicule) sur les 18 testés permet de caractériser l'activation des LT, il apparaît que 9 des 10 produits sensibilisants testés sur ce modèle induisent une activation des LT, soit une sensibilité du modèle de 90 %.

Il apparaît qu'à l'exception du cinnamaldéhyde, tous les sensibilisants testés provoquent au minimum, l'augmentation d'un marqueur d'activation. Parmi les 4 produits non sensibilisants, (SDS, *p*-ABA, ZnSO₄ et isopropanol), seul l'acide *para*-aminobenzoïque (un irritant) engendre une augmentation significative de la

prolifération des CD8 à la concentration la plus importante que nous avons testée (10 μ M). De plus, un seul des trois essais réalisés a montré une positivité, néanmoins nous le considérons comme positif. Les deux autres concentrations de *p*ABA (2,5 et 5 mM) n'ont pas entraîné d'activation des LT. Le modèle présente une spécificité de 75 %. Ces données permettent de calculer l'exactitude du modèle. L'exactitude du modèle de coculture testé sur 10 produits sensibilisants cutanés et respiratoires et 4 produits non sensibilisants de référence est de 83 %.

Bien que la majorité des produits sensibilisants induisent une activation des LT, le profil de la réponse est différent en fonction des produits. Certains, catégorisés comme sensibilisants forts ou extrêmes comme la BB ou le DNFB, engendrent une activation observable pour chaque type de marqueurs, tandis que d'autres sensibilisants comme le TMI, ne provoquent qu'une activation « partielle » des LT alors qu'ils activaient significativement les BMDC dans l'étude présentée en annexe 1.

Au cours de l'activation des LT par les BMDC pré-exposées au TMI, le seul marqueur membranaire présentant une augmentation significative est le CD44 dans la sous-population CD4⁺ (**Tableau 20 A**). Ce résultat nous a amenés à étudier la contribution de la sous-population de LT CD4⁺ naïfs dans la réponse au TMI. Les LT ont été sélectionnés à l'aide du tri magnétique pour enrichir la population en T CD4⁺ CD44⁻ seuls. L'étude des marqueurs membranaires exprimés après 72 h de coculture avec des BMDC pré-exposées à 300 μ M de TMI (**Figure 54**), montre que l'activation de la population CD4⁺ seule est différente de celle des LT totaux (**Tableau 20 A**); elle présente une augmentation significative de l'expression du CD25 et du CD124 (**Figure 54**).

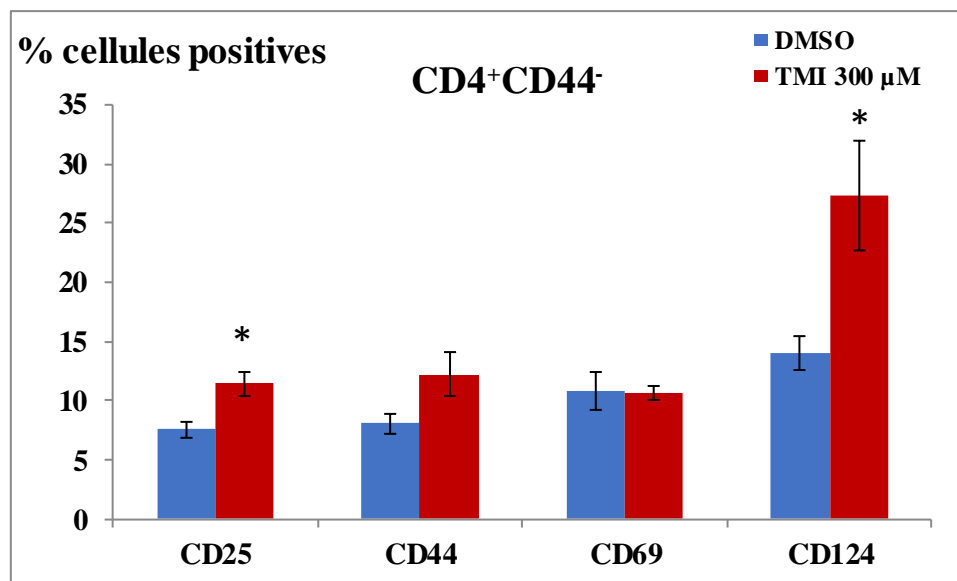


Figure 54. Activation des cellules CD4⁺ CD44⁻ en coculture avec des BMDC pré-exposées au TMI.

L'activation cellulaire est évaluée en mesurant l'expression des quatre marqueurs membranaires CD25, CD44, CD69 et CD124. Chaque barre représente la moyenne \pm l'écart-type de deux expériences indépendantes. Le test de Student a été utilisé pour les comparaisons entre le véhicule et les produits testés *: $p < 0.05$

Il apparaît néanmoins que l'activation des LT CD4⁺ CD44⁻ stimulés par des BMDC pré-exposées au TMI est caractérisée par l'expression significative de marqueurs membranaires différents de ceux exprimés par les LT totaux (surexpression des marqueurs CD25 et CD124 sur les LT CD4⁺ CD44⁻ et du marqueur CD44 sur la sous-population CD4⁺ des LT totaux). Ainsi, il semble pertinent d'analyser les différentes sous-populations de LT exposées aux produits testés afin d'obtenir des résultats complémentaires à ceux obtenus avec les LT totaux. Cela permettrait d'éviter d'obtenir des résultats faux-négatifs comme ceux observés avec le cinnamaldéhyde.

Les essais réalisés sur des cocultures de BMDC/LT de souris BALB/c ont montré que des BMDC activées par des produits sensibilisants de référence étaient capables de stimuler des LT. Néanmoins cette souche est connue pour développer une réponse de type TH2 et est préférentiellement utilisée pour les études relatives aux asthmes allergiques (Whitehead *et al.*, 2003; Bessot *et al.*, 2012). Dans la suite de ce travail,

nous avons voulu transposer notre modèle de coculture à une autre souche présentant un profil différent (Whitehead *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; De Vooght *et al.*, 2010). Des cellules de souris C57BL6J ont donc été utilisées afin d'étudier la réponse des LT de cette souche et de la comparer à celle des LT de souris BALB/c.

3.2. Activation des LT de souris C57/BL6J dans les conditions de coculture précédemment définies

Des essais de coculture ont été réalisés sur des cellules de souris C57BL6/J dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

Tableau 21. Bilan de l'activation des LT de souris C57/BL6J mis en coculture avec des BMDC pré-exposées à des produits sensibilisants, non sensibilisants et irritants.

A : Un signe + indique une différence significative entre les LT « exposés » et les LT « témoins » pour au moins une des concentrations testées. B : Un signe + indique une différence significative entre les LT « exposés » et les LT « témoins » pour au moins une des concentrations testées et un des marqueurs étudiés. Les valeurs de concentration des cytokines indiquées en vert ont été obtenues par extrapolation de la gamme étalon. Une analyse de variance ANOVA suivie par un test multiparamétrique avec la correction de Bonferroni a été utilisée.

A

| C57BL/6 | | | | | | | | | |
|----------|---------------|-----|------------------------|-----|-----|---------------|---|-------|---|
| Produits | Prolifération | | Marqueurs membranaires | | | Cytokines | | | |
| | CD4 | CD8 | | CD4 | CD8 | | | | |
| LPS | - | - | CD25 | - | + | IFN- γ | + | IL-9 | + |
| | | | CD44 | - | + | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | + | IL-4 | - | IL-13 | + |
| | | | CD124 | - | - | IL-5 | + | IL-17 | + |
| DNFB | + | + | CD25 | - | + | IFN- γ | + | IL-9 | + |
| | | | CD44 | - | + | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | + | IL-4 | + | IL-13 | + |
| | | | CD124 | + | + | IL-5 | + | IL-17 | + |
| BB | + | + | CD25 | + | + | IFN- γ | + | IL-9 | + |
| | | | CD44 | + | - | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | + | + | IL-4 | + | IL-13 | + |
| | | | CD124 | + | + | IL-5 | + | IL-17 | - |
| pPD | + | + | CD25 | - | - | IFN- γ | - | IL-9 | - |
| | | | CD44 | - | + | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | + | IL-4 | - | IL-13 | + |
| | | | CD124 | + | + | IL-5 | - | IL-17 | - |
| Cinn | - | - | CD25 | - | - | IFN- γ | - | IL-9 | - |
| | | | CD44 | - | - | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | - | IL-4 | - | IL-13 | - |
| | | | CD124 | - | - | IL-5 | - | IL-17 | - |
| AHCP | + | + | CD25 | - | + | IFN- γ | - | IL-9 | + |
| | | | CD44 | + | + | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | + | IL-4 | - | IL-13 | + |
| | | | CD124 | + | + | IL-5 | - | IL-17 | + |
| TMI | + | + | CD25 | - | - | IFN- γ | - | IL-9 | - |
| | | | CD44 | - | - | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | - | IL-4 | - | IL-13 | - |
| | | | CD124 | - | - | IL-5 | - | IL-17 | - |
| SDS | - | - | CD25 | - | - | IFN- γ | - | IL-9 | - |
| | | | CD44 | - | - | IL-2 | - | IL-10 | - |
| | | | CD69 | - | - | IL-4 | - | IL-13 | - |
| | | | CD124 | - | - | IL-5 | - | IL-17 | - |

B

| | CD4 | | CD8 | | |
|------|----------|-------------|----------|-------------|-------------|
| LPS | Prolif | Marqueurs | Prolif | Marqueurs + | cytokines + |
| DNFB | Prolif + | Marqueurs + | Prolif + | Marqueurs + | cytokines + |
| BB | Prolif + | Marqueurs + | Prolif + | Marqueurs + | cytokines + |
| pPD | Prolif + | Marqueurs + | Prolif + | Marqueurs + | cytokines + |
| Cinn | Prolif | Marqueurs | Prolif | Marqueurs | cytokines |
| AHCP | Prolif + | Marqueurs + | Prolif + | Marqueurs + | cytokines + |
| TMI | Prolif + | Marqueurs | Prolif + | Marqueurs | cytokines |
| SDS | Prolif | Marqueurs | Prolif | Marqueurs | cytokines |

Les BMDC de chaque souche de souris ont été exposées pendant 24 h à différents produits (4 sensibilisants cutanés, 2 sensibilisants respiratoires et un produit non sensibilisant) avant d'être mises en coculture avec des LT issus de la même souche de souris.

Le modèle appliqué à des cellules de souris C57BL/6 montre que les LT CD4⁺ et CD8⁺ de cette souche peuvent aussi être activés par des BMDC pré-exposées à des produits sensibilisants (**Tableau 21 A** et **B**). En revanche, aucune des deux souches ne montre d'activation des LT par les BMDC pré-exposées au cinnamaldéhyde. En détaillant les marqueurs d'activation, il apparaît que les réponses diffèrent légèrement entre les deux souches : Les LT issus de souris BALB/c exposés au DNFB, à l'AHCP et à la BB présentent une réponse plus importante en termes de nombre de marqueurs membranaires « positifs » et de nombre de cytokines surproduites (**Tableau 20 A** et **Tableau 21 A**). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les souches BALB/c et C57BL/6 présentent une orientation différente. Néanmoins, quelle que soit la souche utilisée, le modèle développé dans la partie I permet d'observer l'activation des LT mis en coculture avec des BMDC pré-exposées à des produits sensibilisants.

DISCUSSION

Discussion

Les allergies représentent un problème majeur dans le domaine des maladies professionnelles et ont un impact sérieux sur la vie des travailleurs (Renaudin, 2011; Peiser *et al.*, 2012). Il est donc essentiel de pouvoir identifier les produits susceptibles d'entraîner des allergies chez les personnes qui y sont exposées afin de mettre en place des mesures de prévention adaptées. Historiquement, les tests d'évaluation du potentiel sensibilisant des substances étaient réalisés sur l'animal. Depuis le début des années 2000, la législation européenne qui encadre la mise sur le marché des substances ou mélanges dangereux a évolué, notamment avec la réglementation REACH et le règlement CLP (European and Commission, 2006, 2008). Elle s'engage à limiter le recours à l'expérimentation animale pour évaluer le pouvoir sensibilisant des substances chimiques mises sur le marché européen. Il en résulte que le développement et l'amélioration de méthodes alternatives pour la détection d'allergènes sont devenus un enjeu majeur.

Les allergies sont des réactions d'hypersensibilité du système immunitaire survenant à la suite d'expositions répétées à une molécule allergisante et au cours desquelles les DC jouent un rôle essentiel (Toebak *et al.*, 2009; Martin, 2012; Deckers *et al.*, 2017). Les réactions allergiques sont composées de deux phases : une phase de sensibilisation et une phase de déclenchement. Au cours de la phase de sensibilisation, les DC activées par une substance allergisante migrent vers les ganglions lymphatiques où elles vont activer les LT et générer une réponse immunitaire primaire spécifique de l'haptène (Kaplan *et al.*, 2012; Mbongue *et al.*, 2017). Les principales étapes du processus biologique conduisant à l'allergie cutanée font l'objet d'un consensus général. Les connaissances actuelles sur les mécanismes chimiques et biologiques associés à cette pathologie sont résumées sous la forme d'une voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables (AOP). Cette AOP décrit les différentes étapes allant de l'évènement

moléculaire initiateur jusqu'aux effets indésirables sur la santé que sont la DAC chez l'homme ou l'HSRC chez les rongeurs (Adler *et al.*, 2011; OECD., 2014).

C'est dans ce contexte que ces dernières années, ont été développés des tests *in vitro* reproduisant l'une ou l'autre des étapes clés de la phase de sensibilisation des réactions allergiques (dos Santos *et al.*, 2009; Vukmanovic and Sadrieh, 2017).

Notre laboratoire a développé un modèle de culture de cellules dendritiques issues de moelle osseuse de souris (BMDC) permettant de mesurer l'expression de marqueurs d'activation de ces cellules exposées à des agents sensibilisants (Pepin *et al.*, 2007; Battais *et al.*, 2017). Cette activation des DC correspond au troisième évènement clé (KE3, **Figure 34**) de la phase de sensibilisation (MacKay *et al.*, 2013; OECD., 2014; Strickland *et al.*, 2016).

Ces cellules présentent les avantages de pouvoir s'obtenir facilement, de façon homogène, en grande quantité et de conduire à des résultats reproductibles. Ce modèle est capable d'identifier des sensibilisants cutanés et de les catégoriser selon leur puissance sensibilisante. De plus, le modèle BMDC testé avec 20 produits de référence présente des performances comparables à celles des modèles alternatifs réglementaires décrits dans les lignes directrices de l'OCDE (**Tableau 22**).

Tableau 22. Performances du modèle BMDC et des tests *in vitro* et *in chemico* édités par l'OCDE pour l'évaluation du potentiel sensibilisant de substances chimiques.

| | BMDC | hCLAT | KeratiNoSens™ | DPRA |
|----------------------|-------------|--------------|----------------------|-------------|
| Nb substances | 20 | 142 | 201 | 157 |
| Sensibilité | 69% | 93% | 78% | 80% |
| Spécificité | 100% | 66% | 76% | 77% |
| Exactitude | 75% | 85% | 77% | 80% |

Modèle BMDC (Battais et al., 2017)
TG442E OCDE 2016 (OECD, 2016)
TG442D, OCDE 2015 (OECD., 2015)
TG442C, OCDE 2015 (OECD, 2015)

Ce modèle semble prometteur pour l'identification de produits sensibilisants. Il est en cours d'évaluation au laboratoire sur plus de cent substances (sensibilisantes, non sensibilisantes, pré-/pro-haptènes) afin d'évaluer ses performances et de le proposer comme modèle alternatif auprès de l'ECVAM. Néanmoins, ce modèle a montré certaines limites. Tout d'abord, il ne permet pas d'évaluer la fonctionnalité des DC activées, c'est-à-dire de savoir si ces DC sont capables d'activer les LT comme cela est observé *in vivo* (KE4). En effet, les DC ne peuvent être pleinement activées par un antigène et devenir fonctionnelles qu'en présence de signaux de danger (Matzinger, 1994; Martin, 2012). Une autre limite du modèle BMDC porte sur sa capacité à distinguer un sensibilisant cutané d'un sensibilisant respiratoire. En effet, les résultats obtenus dans la partie 1 sur les sensibilisants testés, ne permettent pas de distinguer ces deux classes de sensibilisants pour lesquels un étiquetage différent est obligatoire (Battais *et al.*, 2017; European and Commission, 2008).

L'objectif principal de mon travail de thèse a été de mettre au point un modèle de co-culture BMDC-LT permettant de mesurer l'activation des LT après culture avec des BMDC préalablement exposées à des substances sensibilisantes. Ce travail de thèse s'articule autour de trois axes de recherche qui sont :

1. Vérifier que les substances allergisantes étaient capables de « mimer » des signaux de danger et d'activer ainsi pleinement les BMDC.

2. Étudier lors de la mise au point du modèle de co-culture, le rôle des sous-populations lymphocytaires (LT naïfs, mémoires, Treg, CD4⁺/CD8⁺) impliquées dans la réponse des LT en contact avec des BMDC pré-stimulées *in vitro*.
3. Étudier une polarisation éventuelle des LT activés en testant un nombre plus important de substances sensibilisantes, ou en réalisant un modèle BMDC-LT à partir d'une autre souche de souris, afin d'identifier des marqueurs permettant de discriminer une réponse de type Th1 ou Th2.

Ces trois axes de recherche constitueront les 3 parties de cette discussion.

1- La voie Nrf2/Keap1 est-elle activée dans les BMDC exposées à des haptènes ?

Selon l'hypothèse actuelle en immunotoxicologie, les molécules allergisantes peuvent « mimer » les signaux de danger. En effet, tout comme les signaux de danger « classiques », les haptènes activent la voie des MAPK et la voie NF-κB qui contrôlent l'activation des DC en réponse à ces haptènes (Neves *et al.*, 2011). Ils peuvent générer un stress oxydant et/ou électrophile, participant au processus de maturation des DC via l'activation de ces voies (Byamba *et al.*, 2010; El Ali *et al.*, 2017a). Ce sont des molécules intrinsèquement réactives ou qui, après métabolisation ou oxydation, sont capables d'induire un stress chimique. Parmi les voies de détoxification des xénobiotiques, la voie Nrf2/Keap1 est essentielle ; elle permet à la cellule de détecter les composés électrophiles endogènes et exogènes et d'activer des gènes cytoprotecteurs (Kensler *et al.*, 2007; Baird and Dinkova-Kostova, 2011). Ces dernières années, plusieurs études ont démontré le rôle clé du facteur de transcription Nrf2 dans le contrôle des réactions inflammatoires médiées par le stress oxydant (Cai *et al.*, 2011; Ma and He, 2012; Ruiz *et al.*, 2013).

La première partie de mon travail a consisté à vérifier que la voie de signalisation Nrf2/Keap1 était bien activée dans notre modèle de BMDC lors d'une exposition à des substances sensibilisantes. Pour cela, nous avons utilisé 3 substances sensibilisantes de référence (DNFB, AHCP et TMI) ainsi qu'une substance non sensibilisante (SDS). Nous avons réalisé une étude de la transcription de 6 gènes régulés par Nrf2. Les résultats présentés dans la partie I du chapitre « Résultats », montrent une augmentation concentration dépendante de la transcription de ces 6 gènes (**Figure 43, 44 et 45**) chez les BMDC exposées au DNFB et à l'AHCP. Ces résultats sont en accord avec ceux observés sur des DC issues de donneurs ou des DC dérivées de cellules de la lignée THP-1 (Ade *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2018). Nos résultats, obtenus avec 2 sensibilisants, montrent que la voie Nrf2/Keap1 semble bien être activée dans la réponse de notre modèle BMDC aux haptènes. De plus, nous n'observons aucune augmentation de la transcription de ces mêmes gènes lors d'une exposition avec le SDS, ce qui suggère une potentielle spécificité vis-à-vis des sensibilisants vs irritants. Afin de confirmer ces premiers résultats, il faudrait augmenter le nombre de substances testées. Cette confirmation pourra éventuellement être faite à la suite des travaux conduits actuellement au laboratoire sur le modèle BMDC. Les deux sensibilisants testés qui induisent une activation de la voie Nrf2/Keap1 sont un sensibilisant cutané (DNFB) et un sensibilisant respiratoire (AHCP). De nombreuses études réalisées sur les allergies cutanées (Ade *et al.*, 2009; Mussotter *et al.*, 2016; El Ali *et al.*, 2017a) et respiratoires (Li *et al.*, 2010; Remy *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2018) ont confirmé que les haptènes pouvaient activer des gènes sous contrôle de la voie Nrf2/Keap1. Dans le domaine de l'allergie, la plupart des études sur l'activation de la voie Nrf2 ont porté sur la sensibilisation cutanée. Dans le domaine de l'allergie, la plupart des études sur l'activation de la voie Nrf2 ont porté sur la sensibilisation cutanée ; la majorité des travaux ont en effet été conduits sur des kératinocytes au cours du développement d'un modèle d'évaluation du pouvoir sensibilisant de composés chimiques, le KeratinoSens®. L'implication de la voie Nrf2/Keap1 a été moins étudiée avec des sensibilisants respiratoires ; de plus, les résultats obtenus peuvent parfois être

contradictoires quant à la variation d'expression de certains gènes régulés par Nrf2 (Silva *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2018). Dans le cadre de ma thèse, nous montrons pour la première fois l'implication de la voie Nrf2/Keap1 dans l'activation de BMDC de souris par le sensibilisant respiratoire AHCP. Par la suite, il serait intéressant d'étudier l'implication de la voie de signalisation Nrf2/Keap1 avec d'autres sensibilisants respiratoires de référence, tels que les diisocyanates ou les anhydrides d'acides, connus pour produire également des réactions de type Th2 mais qui ne modifient pas l'expression des marqueurs membranaires testés dans notre modèle BMDC (Ban *et al.*, 2010; Goutet *et al.*, 2012; Kimber *et al.*, 2014a; Battais *et al.*, 2017). En ce qui concerne le TMI, un monoisocyanate sensibilisant respiratoire qui induit une forte activation des marqueurs membranaires des BMDC (Battais *et al.*, 2017), nous observons une augmentation de la transcription de 2 gènes sur les 6 étudiés. Du fait des réserves déjà énoncées dans la partie « Résultats », nous ne pouvons pas conclure avec certitude que la voie Nrf2 soit impliquée dans la réponse de notre modèle au TMI de la même manière que dans celle obtenue avec le DNFB ou l'AHCP. Dans tous les cas, il est important de prendre en considération la réactivité des produits sensibilisants lorsqu'elle est connue. En effet, il a été montré que les sensibilisants réagissant avec les résidus lysine des protéines n'induisaient pas l'activation de la voie Nrf2/Keap1 (Natsch, 2010). En revanche, les sensibilisants réagissant avec des résidus cystéine et présentant également une forte affinité pour les résidus lysine n'activent la voie Nrf2/Keap1 qu'à de fortes concentrations (Natsch, 2010). Or, les isocyanates comme le TMI réagissent rapidement et réversiblement avec les résidus cystéine et plus lentement et irréversiblement avec les résidus lysine ; cela pourrait expliquer que la voie Nrf2/Keap1 ne soit pas activée en réponse à l'exposition des DC au TMI dans les conditions testées (Nakamura *et al.*, 2009; Mekenyan *et al.*, 2014; Natsch and Emter, 2016). Il faudrait tester des concentrations supérieures et/ou varier les durées d'exposition au TMI avant de conclure sur ces résultats. Nos travaux confirment ceux obtenus par d'autres équipes montrant que les paramètres tels que la concentration et la durée d'exposition sont importants dans l'étude des mécanismes intracellulaires

précoces tels que les voies de signalisation induites par les sensibilisants (Ade *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2018).

Si l'activation de la voie Nrf2/Keap1 est essentielle dans la phase de sensibilisation par de nombreux agents chimiques, il existe d'autres voies de signalisation dont l'étude permettrait d'approfondir la connaissance des mécanismes cellulaires impliqués lors de l'exposition à des sensibilisants. Parmi ces voies, on peut citer par exemple les voies des MAPK, dont les voies JNK (*C-jun N terminal kinases*), p38 MAPK, ERK1/2 MAPK ou JAK/STAT (*Janus Kinase / Signal Transducers and Activator of Transcription*). L'étude de ces voies de signalisation dans notre modèle BMDC pourrait apporter des connaissances supplémentaires dans la compréhension des mécanismes d'activation de ces cellules par les haptènes.

2- Mise au point du modèle BMDC-LT et identification des sous-populations T impliquées.

Les modèles de substitution validés pour évaluer le potentiel sensibilisant de substances chimiques couvrent les événements clés 1 à 3 de la phase de sensibilisation décrits dans l'AOP sur la sensibilisation cutanée (OECD., 2014). De nombreux modèles *in vitro* cherchant à reproduire l'évènement clé 4 de la phase de sensibilisation, c'est-à-dire la phase d'activation lymphocytaire, ont été proposés depuis le début des années 1990 (Martin *et al.*, 2010). Cependant, le développement de ces modèles a été freiné par différents problèmes techniques, tels que la variabilité inter-donneurs, une faible sensibilité des tests, des protocoles lourds et coûteux, et une absence d'évaluation de la puissance sensibilisante des substances étudiées (Martin *et al.*, 2010; Vocanson *et al.*, 2017; Vukmanovic and Sadrieh, 2017). C'est dans ce contexte que s'inscrit le développement du modèle de coculture DC-LT basé sur le modèle BMDC murin précédemment décrit.

Les premières expériences ont été menées afin de mettre au point les conditions expérimentales de coculture entre les BMDC et les LT. Ces essais ont été réalisés avec des DC exposées à un sensibilisant de référence, l'AHCP ou au LPS. Ces essais ont permis d'évaluer la pertinence des outils d'analyse de la réponse lymphocytaire obtenue après coculture de LT avec des DC préalablement activées. Ainsi, l'expression des marqueurs membranaires CD25, CD44, CD69 et CD124 est augmentée à la fois chez les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺ (**Figure 47**). L'analyse du marquage au CFSE montre que la prolifération cellulaire est également accrue lorsque les LT sont mis en présence de DC activées. Enfin, les dosages d'IFN- γ , d'IL-2, d'IL-4, d'IL-5, d'IL-9 et d'IL-13 montrent une augmentation de sécrétion de ces cytokines dans les surnageants des cultures exposées au sensibilisant ou au LPS.

Dans les modèles d'activation des LT proposés, la mesure de la prolifération lymphocytaire ou la production de cytokines sont des outils de suivi de l'activation des LT les plus couramment utilisés (Vocanson *et al.*, 2008; Dietz *et al.*, 2010; Richter *et al.*, 2013; Vocanson *et al.*, 2014; Frombach *et al.*, 2018). Les résultats obtenus lors de la mise au point de ce modèle sont en accord avec ceux de ces études. Nous observons une prolifération des LT suite à leur interaction avec des BMDC pré-exposées à l'AHCP. Cette prolifération peut être mesurée à la fois sur les LT CD3⁺ mais également sur les différentes sous-populations de LT comme les CD4⁺ et CD8⁺. Ainsi, nous observons que le nombre de divisions est différent dans les sous-populations CD4⁺ et CD8⁺ cultivées en présence de DC pré-exposées à l'AHCP. La prolifération cellulaire des LT CD8⁺ est plus rapide que celle des LT CD4⁺ (**Figure 47**). La compréhension des mécanismes permettant d'expliquer cette différence de réponse des sous-populations LT CD4⁺ et LT CD8⁺ nécessiterait des travaux supplémentaires. En effet, ces résultats permettent d'envisager de discriminer les sensibilisants des non sensibilisants, ou de classer les sensibilisants selon leur puissance. Cette observation mérite d'être vérifiée avec un plus grand nombre de substances.

La mesure des concentrations de cytokines dans les surnageants de cocultures lors d'une activation des LT stimulés par des BMDC pré-exposées à l'AHCP, indique un profil cytokinique à la fois de type Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) et Th9 (IL-9). Cette observation nécessiterait d'être confirmée en exposant les DC à d'autres substances sensibilisantes (sensibilisants cutanés et respiratoires) afin de dégager un éventuel profil de sécrétion cytokinique dépendant du type d'agent sensibilisant testé.

Le choix des marqueurs membranaires (CD25, CD44, CD69 et CD124) semble pertinent au vu des résultats obtenus. Les marqueurs CD44 et CD69 sont couramment utilisés pour le suivi de l'activation des LT. En effet, une forte expression du CD44 est associée à la présence de LT activés ou mémoires alors que les LT naïfs expriment peu le CD44 (Dutton *et al.*, 1998; Mueller *et al.*, 2013). Pour cette raison, le CD44 est considéré comme un marqueur tardif d'activation des LT. À l'inverse, le CD69 est une des premières molécules d'activation exprimées à la surface des LT ; pour cette raison, il est considéré plutôt comme un marqueur précoce d'activation (Cosulich *et al.*, 1987; Yokoyama *et al.*, 1988; Janeway *et al.*, 2009). Le CD69, une fois exprimé à la surface cellulaire, agit comme une molécule de costimulation pour l'activation et la prolifération des LT (Ziegler *et al.*, 1994). Nos résultats ne montrent pas de différence dans la cinétique de l'expression de ces deux marqueurs. Le marqueur CD25 est couramment utilisé dans les modèles d'activation des LT, notamment dans le suivi des populations régulatrices (Martin *et al.*, 2010). Enfin, le CD124 est un marqueur qui a peu été utilisé dans le cadre de ces études. Récemment, ce marqueur a été utilisé comme marqueur d'activation des LT dans un modèle de cocultures des cellules d'origine humaine (Frombach *et al.*, 2018). Au laboratoire, nous avons déjà utilisé ce marqueur dans le cadre d'études sur des modèles animaux (Goutet *et al.*, 2005, 2012). Les résultats obtenus au cours de ces études nous ont confirmé que ce marqueur sensible pouvait être un outil approprié de mesure de l'activation des LT. Les résultats obtenus récemment par l'équipe de Frombach *et al.*, sur un modèle *in vitro* ont confirmé nos résultats obtenus lors de cette thèse (Frombach *et al.*, 2018).

Lors de cette mise au point, nous avons également étudié différentes durées de cocultures (12 h, 36 h, 72 h, 96 h et 120 h). Nos résultats ont permis de définir une durée optimale de coculture de 72 h. Cette durée est relativement courte comparée à celles d'autres modèles ; ces durées de coculture peuvent aller jusqu'à 5 à 7 jours. Certains modèles nécessitent une restimulation en cours de culture pour amplifier la réponse des LT (Dietz *et al.*, 2010; Richter *et al.*, 2013; Vocanson, 2014). Notre modèle permet ainsi une réalisation simple et rapide.

Le rapport entre le nombre de DC et de LT lors de la coculture représente un autre paramètre pouvant influencer l'activation et la polarisation des LT stimulés par des DC *in vitro* (Tanaka *et al.*, 2000; Hopken *et al.*, 2005). En effet, les travaux de ces auteurs ont montré que selon le ratio retenu, la réponse des LT pouvait être orientée en Th2 ou Th1/Th2 ; de plus la prolifération des LT naïfs était réduite lorsqu'il y avait peu de LT par rapport aux BMDC. Bien que ces résultats aient été observés dans un contexte différent de celui de l'allergie aux haptènes et qu'il y ait peu de publications sur le sujet, ce paramètre a été étudié lors de ma thèse. Nos résultats ont montré que, lors d'une activation des LT par des DC pré-exposées à de l'AHCP, le ratio le plus pertinent pour le développement d'un modèle de coculture BMDC-LT était de 1 BMDC pour 2 LT.

Les expériences de cocultures ont été menées entre des DC pré-activées et différentes sous-population de LT (CD25⁻ ; CD62L⁻ / CD62L⁺ ; CD44⁻ / CD44⁺).

Les résultats obtenus montrent que l'élimination des Treg CD25⁺ n'augmente pas la réponse lymphocytaire. Un des handicaps rencontrés lors du développement de modèles de coculture DC-LT, notamment à partir de LT humains, est une faible sensibilité vis-à-vis des haptènes faibles et modérés (Martin *et al.*, 2010; Vocanson, 2014). Une des hypothèses pour expliquer ces résultats repose sur la possibilité que les populations de LT régulateurs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ inhibent la prolifération des LT naïfs (Ohkura and Sakaguchi, 2010). Pour augmenter la sensibilité de ces modèles, Vocanson *et al.*, ont proposé de retirer les populations Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ et les

cellules CD56⁺ (comprenant des cellules NK et des LT) dans un modèle de coculture DC-LT. Cela leur a permis d'observer une amélioration importante des réponses de ces modèles basés sur l'activation de LT humains par des DC pré-exposées à des haptènes (Vocanson *et al.*, 2008; Vocanson *et al.*, 2010; Vocanson *et al.*, 2014). Dans notre modèle murin, nous n'observons pas d'amélioration de la sensibilité après déplétion en LT CD25⁺. Néanmoins, ces cellules ne représentent pas l'intégralité des LT régulateurs. Il semblerait ainsi pertinent d'évaluer l'effet de la déplétion de la population LT régulatrice FoxP3⁺ (CD56 n'ayant pas encore d'homologue identifié chez la souris (Van Acker *et al.*, 2017)) sur la sensibilité de notre modèle.

De même, le blocage des voies inhibitrices de l'activation des LT (B7/CTLA-4 ou B7-H1/PD-1) pourrait être un moyen d'amplifier l'activation des LT par des haptènes modérés ou faibles (Peiser *et al.*, 2014). Ainsi, l'utilisation d'anticorps bloquants les molécules co-inhibitrices dans des modèles d'allergie de contact chez la souris induit une augmentation de la réponse aux haptènes testés (Tang *et al.*, 1996; Nuriya *et al.*, 2001; Witsch *et al.*, 2002; Tsushima *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006; Pena-Cruz *et al.*, 2010; Peiser *et al.*, 2014). Ce blocage des voies inhibitrices pourrait être également une piste d'amélioration de notre modèle BMDC-LT afin d'augmenter sa sensibilité. Cependant, toutes ces modifications augmentent le temps et le coût de ces tests. De plus, on ne peut exclure que ces modifications risquent également d'augmenter le bruit de fond des signaux mesurés, ce qui irait, dans ce cas, à l'encontre d'une augmentation de la sensibilité (Vocanson *et al.*, 2017).

Enfin, l'analyse de l'expression de CD124 et la prolifération lymphocytaire montrent que l'activation des LT, observée dès 36 h et optimale à 72 h, est majoritairement le fait de la population naïve (CD62L⁺ CD44⁻) plutôt que mémoire (CD62L⁻ CD44⁺). Ces résultats, attendus étant donné que les cellules sont issues de souris qui n'ont pas été exposées à l'AHCP, confortent ainsi l'intérêt de notre modèle BMDC-LT.

L'ensemble de ces résultats confirme que ce modèle pourrait être pertinent pour évaluer le potentiel sensibilisant des substances chimiques. Dans la partie suivante de ma thèse, je me suis consacrée à évaluer ses performances en testant un nombre plus important de substances.

3- Pertinence du modèle BMDC-LT pour l'identification des substances sensibilisantes

La seconde partie de ce travail a permis de mettre au point les conditions de coculture du modèle BMDC-LT. Ceci a conduit à un modèle facile et relativement rapide à mettre en œuvre en laboratoire. Dans cette 3^{ème} partie de mon travail, nous avons cherché à évaluer les performances du modèle en termes de sensibilité, spécificité et exactitude, en élargissant la gamme des produits de référence testés (sensibilisants cutanés, sensibilisants respiratoires, irritants, non sensibilisants-non irritants). Au cours de cette phase, nous avons aussi cherché à voir si un profil particulier se dégageait dans la réponse des LT en fonction de la nature des sensibilisants utilisés (sensibilisants cutanés *versus* sensibilisants respiratoires, sensibilisants forts *versus* sensibilisants faibles).

Nous avons testé 14 substances (10 sensibilisantes et 4 non sensibilisantes) sur notre modèle BMDC-LT et analysé plusieurs paramètres différents pour mesurer l'activation des LT à savoir :

- la prolifération lymphocytaire par le CFSE
- le phénotypage : CD25, CD44, CD69, CD124

Ces cinq paramètres sont mesurés à la fois sur la population T CD4⁺ et TCD8⁺.

- le dosage de huit cytokines : IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17

Le tableau 19 de la partie résultats montre un exemple pour les 14 substances testées de la réponse obtenue par la mesure de la prolifération lymphocytaire des LT CD8⁺.

Dans ce tableau, nous avons indiqué la variabilité des réponses obtenues par substance. Bien que ces valeurs varient entre les différentes cocultures, elles restent dans une gamme de valeurs proches pour une même concentration sans changer l'interprétation du résultat. Ces données permettent de montrer la robustesse de ces analyses et de ce modèle, permettant de limiter le nombre d'analyses pour une même substance, contrairement aux modèles proposés sur cellules humaines où, dans certains cas il faut un nombre important de donneurs afin de valider les résultats du fait de la grande variabilité des réponses observées (Martin *et al.*, 2010; Vocanson *et al.*, 2017).

Le tableau 20 présente l'ensemble des résultats pour les 14 substances et les 18 paramètres étudiés. Ce tableau de synthèse indique si les valeurs obtenues sur les différentes cocultures pour chaque substance sont significativement supérieures, ou non, à celles du véhicule.

Plusieurs paramètres permettent de discriminer les produits sensibilisants des non sensibilisants. Le tableau 20 montre que les sensibilisants extrêmes sont positifs pour plusieurs d'entre eux, tels que des marqueurs membranaires, la prolifération cellulaire ou la production de cytokines dans le milieu de culture. L'AHCP ou la BB présentent 17 paramètres positifs sur les 18 testés et le DNFB 15 marqueurs positifs. Ces résultats, pour les deux sensibilisants cutanés, sont en accord avec ceux observés dans d'autres études (Dietz *et al.*, 2010; Richter *et al.*, 2013; Vocanson *et al.*, 2014; Gibson *et al.*, 2015). En effet, les sensibilisants extrêmes ou forts sont fréquemment identifiés dans les modèles mesurant l'activation des LT.

Le tableau 20 indique que les sensibilisants modérés ou faibles sont identifiés par moins de paramètres (CoCl₂ : 3, NiSO₄ : 6 et Eug : 3). Enfin, le cinnamaldéhyde, ne présente aucun paramètre positif. Il s'agit du seul sensibilisant « faux négatif » dans cette étude. Curieusement, il s'agit d'un sensibilisant modéré, alors que l'eugénol, qui est un sensibilisant faible, présente trois paramètres positifs. Ces résultats sont prometteurs pour le développement de ce modèle BMDC-LT car il s'agit d'une première étude qui identifie des sensibilisants modérés ou faibles par un modèle

d'activation des LT. De plus, nos résultats sont en accord avec la classification des sensibilisants cutanés en fonction de leur puissance sensibilisante établie par le test LLNA (OECD 2010). Les sensibilisants DNFB et BB (extrêmes) présentent respectivement 15 et 17 paramètres positifs, la pPD (fort) 7 paramètres positifs, le CoCl₂, le NiSO₄ et l'eugénol (modérés et faibles), respectivement 3, 6 et 3 paramètres positifs. Ces résultats très encourageants devront être validés avec un plus grand nombre de substances et de concentrations pour chaque substance afin d'établir une échelle permettant de catégoriser les sensibilisants selon leur puissance comme nous l'avons proposé pour le modèle BMDC (Battais *et al.*, 2017). Un des objectifs recherchés lors du développement des modèles basés sur l'activation des LT est d'évaluer la puissance des sensibilisants comme peut le faire le test LLNA (Loveless *et al.*, 2010; Kimber *et al.*, 2012; Nukada *et al.*, 2012; Esser *et al.*, 2014). L'élargissement de la gamme des produits étudiés incluant des sensibilisants de puissances variées sera nécessaire pour confirmer les premiers résultats prometteurs concernant la capacité de ce modèle BMDC-LT à classer les sensibilisants en fonction de leur puissance.

Le cinnamaldéhyde (sensibilisant modéré) qui n'a présenté aucun paramètre positif dans notre modèle BMDC-LT se révèle pourtant positif avec le modèle BMDC (Battais *et al.*, 2017). De plus, il a été montré au laboratoire que ce sensibilisant est capable d'activer la voie Nrf2/Keap1 des BMDC (résultats non montrés dans la thèse); cette même observation a été faite par d'autres équipes (Mussotter *et al.*, 2016; El Ali *et al.*, 2017a). Des travaux supplémentaires seraient nécessaires afin de vérifier si cette absence d'activation est due à une faiblesse des signaux 1 (présentation par les BMDC du peptide antigénique au TCR des lymphocytes T) ou 2 (signal de costimulation par les CD80 et CD86 des BMDC interagissant avec le CD 28 des LT). Il faudrait également vérifier si la réponse lymphocytaire est amplifiée après élimination de certaines populations, les LTreg par exemple, comme cela a été fait dans d'autres modèles (Vocanson *et al.*, 2014).

Les résultats obtenus avec les substances non sensibilisantes sont négatifs excepté ceux obtenus avec le pABA, un irritant non sensibilisant. Ce composé présente un

paramètre positif parmi les 18 étudiés. Ce résultat faux-positif montre que nous devons étudier un nombre plus important de substances, y compris des substances non sensibilisantes, afin de valider ce modèle et déterminer ses performances pour évaluer les substances sensibilisantes.

L'exposition aux sensibilisants cutanés de profil Th1 (DNFB, BB) a entraîné une production de cytokines caractérisant une réponse de type Th2 et Th9 (IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13) dans les surnageants de culture. Cette production inattendue de cytokines de type Th2 dans des cocultures DC-LT après exposition des DC à des sensibilisants de contact a également été observée dans l'étude de Frombach et al., avec le DNCB et la pPD (Frombach *et al.*, 2018).

L'utilisation d'une souche de souris BALB/c reconnue comme ayant une prédisposition à développer des réponses allergiques de type Th2 pourrait expliquer ces résultats (Bessot *et al.*, 2012). Afin de répondre à cette hypothèse, nous avons utilisé notre modèle BMDC-LT avec des cellules issues de souris de souche C57/BL6J reconnues pour développer un profil de réponses plutôt Th1 (Bessot *et al.*, 2012). Nous avons testé un nombre plus restreint de substances ; les résultats sont présentés dans le tableau 21. Si on observe, pour une même substance, de légères variations des réponses obtenues entre les deux souches de souris, on n'observe pas de différence notable des profils cytokiniques pouvant expliquer nos résultats précédents. Notamment, les sensibilisants cutanés (DNFB ou BB) produisent des cytokines de type Th1, Th2 et Th9. Ces résultats indiquent que les réponses obtenues ne semblent pas dépendre de la souche de souris. Ils confirment l'intérêt du modèle qui pourrait ainsi être développé à partir de différentes souches de souris.

Un axe de recherche, qui n'a pas pu être développé dans ce travail, est l'étude des voies de signalisation des LT en réponse à une stimulation par des BMDC pré-exposées à des sensibilisants. En effet, il a été démontré que certaines voies de signalisation étaient impliquées spécifiquement dans les populations Th1 ou Th2 (Sun and Zhang,

2014). Le facteur de transcription T-bet serait impliqué dans les mécanismes de la polarisation des cellules Th1 (Delgoffe *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014b), alors que les facteurs de transcription GATA3, STAT5 et IRF4 seraient impliqués dans la différenciation et la polarisation de la réponse Th2 (Rengarajan *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2014a; Zhang *et al.*, 2014b). Ainsi, il serait intéressant d'étudier ces différents facteurs de transcription afin de déterminer s'ils permettraient de discriminer les sensibilisants cutanés des sensibilisants respiratoires. Ce champ d'étude, bien que peu abordé dans les études sur le développement des modèles d'activation des LT, est néanmoins important dans le cadre de la mise sur le marché de substances nouvelles. En effet, le règlement CLP impose aux industriels de connaître le risque pour la santé des substances produites afin notamment de proposer une classification et un étiquetage adapté (European and Commission, 2011).

En conclusion, nous avons au cours de ce travail montré que le modèle BMDC développé au laboratoire était un modèle pertinent pour détecter les sensibilisants. Les BMDC exposées à des sensibilisants sont fonctionnelles et capables d'activer *in vitro* des LT. De plus, nous avons mis au point un modèle de coculture de BMDC et de LT. Nous avons observé qu'avec ce modèle nous pouvions activer des LT naïfs et également discriminer des substances sensibilisantes de substances non sensibilisantes. Les performances obtenues avec les 14 substances testées sont encourageantes. Cette discrimination peut être réalisée avec une exactitude de 83 %, une spécificité de 75 % et une sensibilité de 90 % en étudiant seulement 2 paramètres d'activation des LT (le dosage de l'IL-9 et la prolifération des LT CD8⁺). Toutefois, dans un contexte d'évaluation du danger, il est essentiel d'aller au-delà et de discriminer les sensibilisants cutanés des sensibilisants respiratoires, mais également de catégoriser les sensibilisants selon leur puissance. Concernant le premier objectif, la procédure mise en place et les paramètres étudiés au cours de cette étude ne permettent pas de discriminer les sensibilisants cutanés des sensibilisants respiratoires. En ce qui concerne le second objectif, la catégorisation des sensibilisants selon leur puissance

définie par la valeur de l'EC3 du LLNA n'est pas permise par les modèles DC-LT actuellement développés (van Vliet *et al.*, 2017). Au vu des premiers résultats obtenus dans cette étude il est possible de corrélérer le nombre de paramètre positifs avec la puissance des sensibilisants testés. Pour valider ce modèle et conforter ces premiers résultats, il faudrait tester un plus grand nombre de substances sensibilisantes (cutanées et respiratoires) et non sensibilisantes. L'étude de paramètres supplémentaires (facteurs de transcription par exemple) et des modifications des conditions de coculture (déplétion en LTreg FoxP3⁺, blocage des voies inhibitrices) pourraient améliorer la sensibilité du modèle, et peut être aussi, permettre de discriminer les sensibilisants cutanés des sensibilisants respiratoires.

RÉFÉRENCES

Références

- Ade, N., et al.** (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(2): 488-501.
- Ade, N., et al.** (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(2): 451-460.
- Ade, N., S. Martinozzi-Teissier, M. Pallardy and F. Rousset** (2006). "Activation of U937 cells by contact sensitizers: CD86 expression is independent of apoptosis." *J Immunotoxicol* 3(4): 189-197.
- Adler, S., et al.** (2011). "Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010." *Arch Toxicol* 85(5): 367-485.
- Aeby, P., et al.** (2010). "Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa's research and method development program." *Toxicol In Vitro* 24(6): 1465-1473.
- Aiba, S., et al.** (2003). "p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and 2,4-dinitrochlorobenzene." *J Invest Dermatol* 120(3): 390-399.
- Aiba, S., A. Terunuma, H. Manome and H. Tagami** (1997). "Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules." *Eur J Immunol* 27(11): 3031-3038.
- Akdis, C. A., et al.** (2000). "A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding." *FASEB J* 14(12): 1666-1668.
- Akdis, M., et al.** (2012). "TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection." *J Allergy Clin Immunol* 129(6): 1438-1449; quiz1450-1431.
- Akdis, M., et al.** (2004). "Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells." *J Exp Med* 199(11): 1567-1575.
- Annunziato, F., C. Romagnani and S. Romagnani** (2015). "The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity." *J Allergy Clin Immunol* 135(3): 626-635.
- Antonios, D., et al.** (2009). "Metallic haptens induce differential phenotype of human dendritic cells through activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways." *Toxicol In Vitro* 23(2): 227-234.
- Aptula, A. O., D. W. Roberts and C. K. Pease** (2007). "Haptens, prohaptens and prehaptens, or electrophiles and proelectrophiles." *Contact Dermatitis* 56(1): 54-56.
- Arens, R. and S. P. Schoenberger** (2010). "Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation." *Immunol Rev* 235(1): 190-205.
- Arthur, J. C., et al.** (2010). "Cutting edge: NLRP12 controls dendritic and myeloid cell migration to affect contact hypersensitivity." *J Immunol* 185(8): 4515-4519.
- Aruffo, A., et al.** (1990). "CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate." *Cell* 61(7): 1303-1313.
- Asher, M. I. and S. K. Weiland** (1998). "The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). ISAAC Steering Committee." *Clinical and Experimental Allergy* 28 Suppl 5: 52-66; discussion 90-51.
- Ashikaga, T., et al.** (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)." *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* 38(4): 275-284.

- Ashjaei, K., et al.** (2015). "Differential T-helper cell polarization after allergen-specific stimulation of autologous dendritic cells in polysensitized allergic patients." *International Archives of Allergy and Immunology* 166(2): 97-106.
- Asselin-Paturel, C., et al.** (2001). "Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology." *Nat Immunol* 2(12): 1144-1150.
- Awad, F., et al.** (2018). "Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications." *Pharmacol Ther.*
- Bachmann, M. F., M. Kopf and B. J. Marsland** (2006). "Chemokines: more than just road signs." *Nat Rev Immunol* 6(2): 159-164.
- Badovinac, V. P. and J. T. Harty** (2006). "Programming, demarcating, and manipulating CD8+ T-cell memory." *Immunol Rev* 211: 67-80.
- Baird, L. and A. T. Dinkova-Kostova** (2011). "The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway." *Arch Toxicol* 85(4): 241-272.
- Bajenoff, M., S. Granjeaud and S. Guerder** (2003). "The strategy of T cell antigen-presenting cell encounter in antigen-draining lymph nodes revealed by imaging of initial T cell activation." *J Exp Med* 198(5): 715-724.
- Bakdash, G., et al.** (2013). "The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II." *Front Immunol* 4: 53.
- Ban, M., et al.** (2010). "Simultaneous analysis of the local and systemic immune responses in mice to study the occupational asthma mechanisms induced by chromium and platinum." *Toxicology* 277(1-3): 29-37.
- Banchereau, J., et al.** (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 18: 767-811.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman** (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* 392(6673): 245-252.
- Barton, G. M. and J. C. Kagan** (2009). "A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization." *Nat Rev Immunol* 9(8): 535-542.
- Basketter, D. A., et al.** (2002). "Local lymph node assay - validation, conduct and use in practice." *Food Chem Toxicol* 40(5): 593-598.
- Basketter, D. A., et al.** (1999). "Threshold for classification as a skin sensitizer in the local lymph node assay: a statistical evaluation." *Food Chem Toxicol* 37(12): 1167-1174.
- Basketter, D. A., et al.** (2009). "Nothing is perfect, not even the local lymph node assay: a commentary and the implications for REACH." *Contact Dermatitis* 60(2): 65-69.
- Basu, R., et al.** (2012). "Th22 cells are an important source of IL-22 for host protection against enteropathogenic bacteria." *Immunity* 37(6): 1061-1075.
- Battais, F., et al.** (2017). "In vitro detection of chemical allergens: an optimized assay using mouse bone marrow-derived dendritic cells." *Contact Dermatitis* 77(5): 311-322.
- Bellinghausen, I., et al.** (2004). "Importance of the inducible costimulator molecule for the induction of allergic immune responses and its decreased expression on T helper cells after venom immunotherapy." *Immunology* 112(1): 80-86.
- Bellinghausen, I., et al.** (2005). "Regulatory activity of human CD4 CD25 T cells depends on allergen concentration, type of allergen and atopy status of the donor." *Immunology* 116(1): 103-111.
- Benezra, C., et al.** (1985). "A systematic search for structure-activity relationships of skin contact sensitizers: methodology." *J Invest Dermatol* 85(4): 351-356.
- Berard, F., J. P. Marty and J. F. Nicolas** (2003). "Allergen penetration through the skin." *Eur J Dermatol* 13(4): 324-330.
- Bessot, J. C., G. Pauli and O. Vandenplas** (2012). *L'Asthme Professionnel*. Paris.
- Bloom, D. A. and A. K. Jaiswal** (2003). "Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression." *J Biol Chem* 278(45): 44675-44682.

- Boisleve, F., S. Kerdine-Romer and M. Pallardy** (2005). "Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha." *Toxicology* 206(2): 233-244.
- Boisleve, F., S. Kerdine-Romer, N. Rougier-Larzat and M. Pallardy** (2004). "Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF-alpha and MAPK." *J Invest Dermatol* 123(3): 494-502.
- Bonmort, M., et al.** (2008). "Killer dendritic cells: IKDC and the others." *Curr Opin Immunol* 20(5): 558-565.
- Boyman, O., S. Letourneau, C. Krieg and J. Sprent** (2009). "Homeostatic proliferation and survival of naive and memory T cells." *Eur J Immunol* 39(8): 2088-2094.
- Breitfeld, D., et al.** (2000). "Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production." *J Exp Med* 192(11): 1545-1552.
- Breloer, M. and B. Fleischer** (2008). "CD83 regulates lymphocyte maturation, activation and homeostasis." *Trends Immunol* 29(4): 186-194.
- Brigelius-Flohe, R. and L. Flohe** (2011). "Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors." *Antioxid Redox Signal* 15(8): 2335-2381.
- Bryan, H. K., A. Olayanju, C. E. Goldring and B. K. Park** (2013). "The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation." *Biochem Pharmacol* 85(6): 705-717.
- Buehler, E. V.** (1965). "Delayed Contact Hypersensitivity in the Guinea Pig." *Arch Dermatol* 91: 171-177.
- Byamba, D., et al.** (2010). "The Roles of Reactive Oxygen Species Produced by Contact Allergens and Irritants in Monocyte-derived Dendritic Cells." *Ann Dermatol* 22(3): 269-278.
- Cai, Y., et al.** (2011). "Pivotal role of dermal IL-17-producing gammadelta T cells in skin inflammation." *Immunity* 35(4): 596-610.
- Cao, X., et al.** (2002). "CD1 molecules efficiently present antigen in immature dendritic cells and traffic independently of MHC class II during dendritic cell maturation." *J Immunol* 169(9): 4770-4777.
- Caruso, A., et al.** (1997). "Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation." *Cytometry* 27(1): 71-76.
- Casati, S.** (2018). "Integrated Approaches to Testing and Assessment." *Basic Clin Pharmacol Toxicol*.
- Casati, S., et al.** (2009). "Selection of chemicals for the development and evaluation of in vitro methods for skin sensitisation testing." *Altern Lab Anim* 37(3): 305-312.
- Casati, S., A. Worth, P. Amcoff Sven and M. Whelan** (2013). "EURL ECVAM Strategy for Replacement of Animal Testing for Skin Sensitisation Hazard Identification and Classification." Publications Office of the European Union.
- Cebrian, M., et al.** (1988). "Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes." *J Exp Med* 168(5): 1621-1637.
- Cella, M., et al.** (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." *Nat Med* 5(8): 919-923.
- Chan, K. and Y. W. Kan** (1999). "Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12731-12736.
- Chary, A., et al.** (2018). "Respiratory sensitization: toxicological point of view on the available assays." *Arch Toxicol* 92(2): 803-822.
- Chen, A. I., et al.** (1999). "Ox40-ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell:T cell interactions." *Immunity* 11(6): 689-698.
- Chen, L. and D. B. Flies** (2013). "Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition." *Nat Rev Immunol* 13(4): 227-242.
- Chen, X., J. J. Oppenheim and O. M. Z. Howard** (2005). "BALB/c mice have more CD4+CD25+ T regulatory cells and show greater susceptibility to suppression of their CD4+CD25- responder T cells than C57BL/6 mice." *Journal of Leukocyte Biology* 78(1): 114-121.
- Cheong, C., et al.** (2010). "Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas." *Cell* 143(3): 416-429.

- Chipinda, I., F. M. Blachere, S. E. Anderson and P. D. Siegel** (2011). "Discrimination of haptens from prohaptens using the metabolically deficient Cpr(low/low) mouse." *Toxicol Appl Pharmacol* 252(3): 268-272.
- Cohen, D. E. and N. Heidary** (2004). "Treatment of irritant and allergic contact dermatitis." *Dermatol Ther* 17(4): 334-340.
- Collin, M., V. Bigley, M. Haniffa and S. Hambleton** (2011). "Human dendritic cell deficiency: the missing ID?" *Nat Rev Immunol* 11(9): 575-583.
- Collison, L. W., et al.** (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." *Nature* 450(7169): 566-569.
- Cosulich, M. E., et al.** (1987). "Functional characterization of an antigen involved in an early step of T-cell activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(12): 4205-4209.
- Cottrez, F., 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.
- Crepy, M. N.** (2013). "Dermatite de contact d'origine professionnelle: conduite à tenir." *Références en Santé au Travail*(133): 109-122.
- Critchley-Thorne, R. J., et al.** (2007). "Down-regulation of the interferon signaling pathway in T lymphocytes from patients with metastatic melanoma." *PLoS Med* 4(5): e176.
- Crotty, S.** (2014). "T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease." *Immunity* 41(4): 529-542.
- Crozat, K., et al.** (2010). "The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells." *J Exp Med* 207(6): 1283-1292.
- Cummings, R. D. and R. P. McEver** (2009). C-type Lectins. *Essentials of Glycobiology*. nd, A. Varki, R. D. Cummings et al. Cold Spring Harbor (NY).
- Dausset, J.** (1958). "[Platelet antibodies]." *Acta Haematol* 20(1-4): 185-194.
- De Vooght, V., et al.** (2010). "Choice of mouse strain influences the outcome in a mouse model of chemical-induced asthma." *PloS One* 5(9): e12581.
- Deaglio, S., et al.** (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." *J Exp Med* 204(6): 1257-1265.
- Deckers, J., K. De Bosscher, B. N. Lambrecht and H. Hammad** (2017). "Interplay between barrier epithelial cells and dendritic cells in allergic sensitization through the lung and the skin." *Immunol Rev* 278(1): 131-144.
- Delgoffe, G. M., et al.** (2011). "The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2." *Nat Immunol* 12(4): 295-303.
- Demange, V.** (2013). "Quelques données épidémiologiques sur les allergies professionnelles." *Hygiène et Sécurité du Travail HST n°233*: 20-22.
- Dietz, L., et al.** (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(2): 336-347.
- Dinkova-Kostova, A. T. and P. Talalay** (2008). "Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins." *Mol Nutr Food Res* 52 Suppl 1: S128-138.
- dos Santos, G. G., et al.** (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(3): 372-382.
- Duhen, T., et al.** (2009). "Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells." *Nat Immunol* 10(8): 857-863.
- Dutton, R. W., L. M. Bradley and S. L. Swain** (1998). "T cell memory." *Annu Rev Immunol* 16: 201-223.
- El Ali, Z., et al.** (2017a). "Dendritic cells' death induced by contact sensitizers is controlled by Nrf2 and depends on glutathione levels." *Toxicol Appl Pharmacol* 322: 41-50.
- El Ali, Z., et al.** (2017b). "Dendritic cells' death induced by contact sensitizers is controlled by Nrf2 and depends on glutathione levels." *Toxicology and Applied Pharmacology* 322: 41-50.

- Emter, R., G. Ellis and A. Natsch** (2010). "Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro." *Toxicol Appl Pharmacol* 245(3): 281-290.
- Emter, R., et al.** (2013). "Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events." *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 27(8): 2225-2232.
- Enomoto, A., et al.** (2001). "High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes." *Toxicol Sci* 59(1): 169-177.
- Enslein, K., et al.** (1997). "A quantitative structure-toxicity relationships model for the dermal sensitization guinea pig maximization assay." *Food Chem Toxicol* 35(10-11): 1091-1098.
- Esche, C., A. de Benedetto and L. A. Beck** (2004). "Keratinocytes in atopic dermatitis: inflammatory signals." *Curr Allergy Asthma Rep* 4(4): 276-284.
- Esser, P. R., I. Kimber and S. F. Martin** (2014). "Correlation of contact sensitizer potency with T cell frequency and TCR repertoire diversity." *EXS* 104: 101-114.
- Esser, P. R. and S. F. Martin** (2017). "Pathomechanisms of Contact Sensitization." *Curr Allergy Asthma Rep* 17(12): 83.
- Esser, P. R., et al.** (2012). "Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation." *PLoS One* 7(7): e41340.
- European and Commission** (1967). "Directive 67/548/EEC of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances " *Official Journal of the European Union* 196(16).
- European and Commission** (1999). "Directive 1999/45/EC of the European Parliament and of the Council of 31 May 1999 concerning the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to the classification, packaging and labelling of dangerous preparations." *Official Journal of the European Union* L200: 1-68.
- European and Commission** (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." *Official Journal of the European Union* L66: 26-35.
- European and Commission** (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 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC." *Official Journal of the European Union* L: 136/133.
- European and Commission** (2008). "Regulation (EC) No 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 1907/2006. ." *Official Journal of the European Union* L: 353.
- European and Commission** (2011). "Commission Regulation (EU) No 286/2011 of 10 March 2011 amending, for the purposes of its adaptation to technical and scientific progress, Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures Text with EEA relevance." *Official Journal of the European Union* L: 83.
- Eyerich, S., et al.** (2009). "Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling." *J Clin Invest* 119(12): 3573-3585.
- Eyerich, S., K. Eyerich, C. Traidl-Hoffmann and T. Biedermann** (2018). "Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network." *Trends Immunol.*
- Fehres, C. M., et al.** (2015). "Cross-presentation through langerin and DC-SIGN targeting requires different formulations of glycan-modified antigens." *J Control Release* 203: 67-76.

- Ferreira, I., et al.** (2018). "Nature and kinetics of redox imbalance triggered by respiratory and skin chemical sensitizers on the human monocytic cell line THP-1." *Redox Biol* 16: 75-86.
- Finger, V., I. Sari-Minodier and D. Charpin** (2012). *Epidémiologie. L'asthme Professionnel*. M. Orange. Paris: 13-30.
- Fletcher, J. M., et al.** (2005). "Cytomegalovirus-specific CD4+ T cells in healthy carriers are continuously driven to replicative exhaustion." *J Immunol* 175(12): 8218-8225.
- Forster, R., A. Braun and T. Worbs** (2012). "Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics." *Trends Immunol* 33(6): 271-280.
- Franchi, L., N. Warner, K. Viani and G. Nunez** (2009). "Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense." *Immunol Rev* 227(1): 106-128.
- Frombach, J., et al.** (2018). "Lymphocyte surface markers and cytokines are suitable for detection and potency assessment of skin-sensitizing chemicals in an in vitro model of allergic contact dermatitis: the LCSA-ly." *Arch Toxicol* 92(4): 1495-1505.
- Fruge, R. E., et al.** (2012). "Real-time visualization of macromolecule uptake by epidermal Langerhans cells in living animals." *J Invest Dermatol* 132(3 Pt 1): 609-614.
- Fujita, M., et al.** (2014). "Development of a prediction method for skin sensitization using novel cysteine and lysine derivatives." *J Pharmacol Toxicol Methods* 70(1): 94-105.
- Gamerding, K., et al.** (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(10): 1345-1353.
- Garcia-Vallejo, J. J. and Y. van Kooyk** (2013). "The physiological role of DC-SIGN: a tale of mice and men." *Trends Immunol* 34(10): 482-486.
- Geissmann, F., et al.** (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." *Science* 327(5966): 656-661.
- Gerberick, G.F. et al.** (1997). "Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells following allergen and irritant treatment." *Toxicol Appl Pharmacol*. 146(1):1-10.
- Gerberick, F., et al.** (2008). "Chemical reactivity measurement and the predictive identification of skin sensitizers. The report and recommendations of ECVAM Workshop 64." *Altern Lab Anim* 36(2): 215-242.
- Gerberick, G. F.** (2016). "The use of peptide reactivity assays for skin sensitisation hazard identification and risk assessment." *Altern Lab Anim* 44(5): 437-442.
- Gerberick, G. F., et al.** (2004a). "A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing." *Contact Dermatitis* 50(5): 274-288.
- Gerberick, G. F., et al.** (2009). "Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system." *Toxicol Sci* 112(1): 164-174.
- Gerberick, G. F., et al.** (2004b). "Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens." *Toxicol Sci* 81(2): 332-343.
- Gerberick, G. F., et al.** (2007). "Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach." *Toxicol Sci* 97(2): 417-427.
- Gerritsen, B. and A. Pandit** (2016). "The memory of a killer T cell: models of CD8(+) T cell differentiation." *Immunol Cell Biol* 94(3): 236-241.
- Gibson, A., et al.** (2015). "In Vitro Priming of Naive T-cells with p-Phenylenediamine and Bandrowski's Base." *Chem Res Toxicol* 28(10): 2069-2077.
- Goldring, C. E., et al.** (2004). "Activation of hepatic Nrf2 in vivo by acetaminophen in CD-1 mice." *Hepatology* 39(5): 1267-1276.
- Goossens, A. and J. P. Lepoittevin** (2003). "Contact allergy to cosmetics and their perfume components: new clinical, chemical and diagnostic aspects." *Revue Francaise D'Allergologie* 43(5): 294-300.
- Gorbachev, A. V. and R. L. Fairchild** (2001). "Induction and regulation of T-cell priming for contact hypersensitivity." *Crit Rev Immunol* 21(5): 451-472.

- Goutet, M., et al.** (2005). "Identification of contact and respiratory sensitizers using flow cytometry." *Toxicol Appl Pharmacol* 205(3): 259-270.
- Goutet, M., et al.** (2012). "Identification of contact and respiratory sensitizers according to IL-4 receptor alpha expression and IL-2 production." *Toxicol Appl Pharmacol* 260(2): 95-104.
- Gros, E. and N. Novak** (2012). "Cutaneous dendritic cells in allergic inflammation." *Clinical and Experimental Allergy* 42(8): 1161-1175.
- Grouard, G., et al.** (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." *J Exp Med* 185(6): 1101-1111.
- Hadeiba, H., et al.** (2008). "CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease." *Nat Immunol* 9(11): 1253-1260.
- Hammad, H. and B. N. Lambrecht** (2008). "Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma." *Nat Rev Immunol* 8(3): 193-204.
- Hammad, H. and B. N. Lambrecht** (2011). "Dendritic cells and airway epithelial cells at the interface between innate and adaptive immune responses." *Allergy* 66(5): 579-587.
- Hancock, W. W., R. Buelow, M. H. Sayegh and L. A. Turka** (1998). "Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes." *Nat Med* 4(12): 1392-1396.
- Hardison, S. E. and G. D. Brown** (2012). "C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity." *Nat Immunol* 13(9): 817-822.
- Harrington, L. E., et al.** (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol* 6(11): 1123-1132.
- Harshyne, L. A., S. C. Watkins, A. Gambotto and S. M. Barratt-Boyes** (2001). "Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL." *J Immunol* 166(6): 3717-3723.
- Harty, J. T. and V. P. Badovinac** (2008). "Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory." *Nat Rev Immunol* 8(2): 107-119.
- Hausmann, O., B. Schnyder and W. J. Pichler** (2012). "Etiology and pathogenesis of adverse drug reactions." *Chem Immunol Allergy* 97: 32-46.
- Haynes, B. F., et al.** (1989). "CD44 a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation." *Immunol Today*. 10(12):423-8
- Henri, S., et al.** (2001). "The dendritic cell populations of mouse lymph nodes." *J Immunol* 167(2): 741-748.
- Henrickson, S. E., et al.** (2008). "T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation." *Nat Immunol* 9(3): 282-291.
- Holgate, S. T.** (2011). "The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis." *Immunol Rev* 242(1): 205-219.
- Holgate, S. T.** (2012). "Innate and adaptive immune responses in asthma." *Nat Med* 18(5): 673-683.
- Hopken, U. E., et al.** (2005). "The ratio between dendritic cells and T cells determines the outcome of their encounter: proliferation versus deletion." *Eur J Immunol* 35(10): 2851-2863.
- Hosken, N. A., et al.** (1995). "The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model." *J Exp Med* 182(5): 1579-1584.
- Huang, H.-J., et al.** (2011). "Mite allergen decreases DC-SIGN expression and modulates human dendritic cell differentiation and function in allergic asthma." *Mucosal Immunology* 4(5): 519-527.
- Huang, H. C., T. Nguyen and C. B. Pickett** (2002). "Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription." *J Biol Chem* 277(45): 42769-42774.
- Huber, M. and M. Lohoff** (2015). "Change of paradigm: CD8+ T cells as important helper for CD4+ T cells during asthma and autoimmune encephalomyelitis." *Allergo J Int* 24(1): 8-15.
- Huppa, J. B. and M. M. Davis** (2003). "T-cell-antigen recognition and the immunological synapse." *Nat Rev Immunol* 3(12): 973-983.
- Huster, K. M., et al.** (2006). "Unidirectional development of CD8+ central memory T cells into protective Listeria-specific effector memory T cells." *Eur J Immunol* 36(6): 1453-1464.

- Illing, P. T., et al.** (2012). "Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire." *Nature* 486(7404): 554-558.
- Inaba, K., et al.** (1992). "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." *J Exp Med* 176(6): 1693-1702.
- Inaba, K., et al.** (1994). "The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro." *J Exp Med* 180(5): 1849-1860.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov** (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." *Nat Immunol* 5(10): 987-995.
- Janeway, C., et al.** (2009). *Immunobiologie*. Bruxelles, De Boeck.
- Jia, L. and C. Wu** (2014a). "The biology and functions of Th22 cells." *Adv Exp Med Biol* 841: 209-230.
- Jia, L. and C. Wu** (2014b). "Differentiation, regulation and function of Th9 cells." *Adv Exp Med Biol* 841: 181-207.
- Johansen, J. D. and T. Menne** (1995). "The fragrance mix and its constituents: a 14-year material." *Contact Dermatitis* 32(1): 18-23.
- Johansson, H., A. S. Albrekt, C. A. Borrebaeck and M. Lindstedt** (2013). "The GARD assay for assessment of chemical skin sensitizers." *Toxicol In Vitro* 27(3): 1163-1169.
- Johansson, S. G., et al.** (2001). "A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force." *Allergy* 56(9): 813-824.
- Kaech, S. M., E. J. Wherry and R. Ahmed** (2002). "Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development." *Nat Rev Immunol* 2(4): 251-262.
- Kamath, A. T., et al.** (2000). "The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations." *J Immunol* 165(12): 6762-6770.
- Kaplan, D. H., B. Z. Igyarto and A. A. Gaspari** (2012). "Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis." *Nat Rev Immunol* 12(2): 114-124.
- Karlberg, A. T., et al.** (2008). "Allergic contact dermatitis--formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers." *Chem Res Toxicol* 21(1): 53-69.
- Karlberg, A. T., et al.** (2013). "Activation of non-sensitizing or low-sensitizing fragrance substances into potent sensitizers - prehapten and prohaptens." *Contact Dermatitis* 69(6): 323-334.
- Kawai, T. and S. Akira** (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol* 11(5): 373-384.
- Kensler, T. W., N. Wakabayashi and S. Biswal** (2007). "Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 89-116.
- Kim, D. H., et al.** (2012). "Different characteristics of reactive oxygen species production by human keratinocyte cell line cells in response to allergens and irritants." *Exp Dermatol* 21(2): 99-103.
- Kim, D. S., et al.** (2011). "Immunotherapy of malignant melanoma with tumor lysate-pulsed autologous monocyte-derived dendritic cells." *Yonsei Med J* 52(6): 990-998.
- Kim, H. K., et al.** (2006). "High-level expression of B7-H1 molecules by dendritic cells suppresses the function of activated T cells and desensitizes allergen-primed animals." *J Leukoc Biol* 79(4): 686-695.
- Kimber, I., R. J. Dearman and D. A. Basketter** (2014a). "Diisocyanates, occupational asthma and IgE antibody: implications for hazard characterization." *J Appl Toxicol* 34(10): 1073-1077.
- Kimber, I., R. J. Dearman, D. A. Basketter and D. R. Boverhof** (2014b). "Chemical respiratory allergy: reverse engineering an adverse outcome pathway." *Toxicology* 318: 32-39.
- Kimber, I., et al.** (2002). "The local lymph node assay: past, present and future." *Contact Dermatitis* 47(6): 315-328.
- Kimber, I., et al.** (2012). "Allergic contact dermatitis: a commentary on the relationship between T lymphocytes and skin sensitising potency." *Toxicology* 291(1-3): 18-24.
- Kimber, I. and M. Pallardy** (2014). "The use of T cells in hazard characterization of chemical and drug allergens and integration in testin strategies." *EXS* 104: 1-9.
- King, C.** (2009). "New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells." *Nat Rev Immunol* 9(11): 757-766.

- Kitagawa, Y. and S. Sakaguchi** (2017). "Molecular control of regulatory T cell development and function." *Curr Opin Immunol* 49: 64-70.
- Kryczek, I., et al.** (2009). "FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease." *Cancer Res* 69(9): 3995-4000.
- Kulpa, D. A., et al.** (2013). "The immunological synapse: the gateway to the HIV reservoir." *Immunol Rev* 254(1): 305-325.
- Lahoute, C., O. Herbin, Z. Mallat and A. Tedgui** (2011). "Adaptive immunity in atherosclerosis: mechanisms and future therapeutic targets." *Nat Rev Cardiol* 8(6): 348-358.
- Lalko, J. F., et al.** (2013). "Reactivity of chemical respiratory allergens in the Peroxidase Peptide Reactivity Assay." *Toxicol In Vitro* 27(2): 651-661.
- Lambrecht, B. N. and H. Hammad** (2010). "The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation." *Lancet* 376(9743): 835-843.
- Landsteiner, K. and J. Jacobs** (1935). "Studies on the Sensitization of Animals with Simple Chemical Compounds." *J Exp Med* 61(5): 643-656.
- Landsteiner, K. and J. Jacobs** (1936). "Studies on the Sensitization of Animals with Simple Chemical Compounds. II." *J Exp Med* 64(4): 625-639.
- Lanzavecchia, A.** (1996). "Mechanisms of antigen uptake for presentation." *Curr Opin Immunol* 8(3): 348-354.
- Lepoittevin, J. P.** (1999). "Development of structure-activity relationships (SARs) in allergic contact dermatitis." *Cell Biol Toxicol* 15(1): 47-55.
- Lepoittevin, J. P.** (2006). "Metabolism versus chemical transformation or pro- versus prehapten?" *Contact Dermatitis* 54(2): 73-74.
- Lepoittevin, J. P.** (2011). "Les bases chimiques de l'allergie de contact." *Revue Française d'Allergologie* 51: 208-211.
- Leynaert, B., F. Neukirch, P. Demoly and J. Bousquet** (2000). "Epidemiologic evidence for asthma and rhinitis comorbidity." *J Allergy Clin Immunol* 106(5 Suppl): S201-205.
- Li, Y. J., et al.** (2010). "Nrf2 is closely related to allergic airway inflammatory responses induced by low-dose diesel exhaust particles in mice." *Clin Immunol* 137(2): 234-241.
- Louis-Dit-Sully, C., et al.** (2014). "Activation of the TCR complex by peptide-MHC and superantigens." *EXS* 104: 9-23.
- Loveless, S. E., et al.** (2010). "Potency values from the local lymph node assay: application to classification, labelling and risk assessment." *Regul Toxicol Pharmacol* 56(1): 54-66.
- Luckey, U., et al.** (2011). "T cell killing by tolerogenic dendritic cells protects mice from allergy." *J Clin Invest* 121(10): 3860-3871.
- Lyons, A. B., S. J. Blake and K. V. Doherty** (2001). *Flow Cytometric Analysis of Cell Division by Dilution of CFSE and Related Dyes*. Current Protocols in Cytometry, John Wiley & Sons, Inc.
- Ma, Q. and X. He** (2012). "Molecular basis of electrophilic and oxidative defense: promises and perils of Nrf2." *Pharmacol Rev* 64(4): 1055-1081.
- MacKay, C., M. Davies, V. Summerfield and G. Maxwell** (2013). "From pathways to people: applying the adverse outcome pathway (AOP) for skin sensitization to risk assessment." *ALTEX* 30(4): 473-486.
- Macri, C., E. S. Pang, T. Patton and M. O'Keeffe** (2017). "Dendritic cell subsets." *Semin Cell Dev Biol*.
- Madden, D. R.** (1995). "The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes." *Annu Rev Immunol* 13: 587-622.
- Magnusson, B. and A. M. Kligman** (1969). "The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test." *J Invest Dermatol* 52(3): 268-276.
- Malavasi, F., et al.** (2008). "Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology." *Physiol Rev* 88(3): 841-886.
- Malo, J. L. and O. Vandenplas** (2011). "Definitions and classification of work-related asthma." *Immunol Allergy Clin North Am* 31(4): 645-662, v.

- Martin, E., B. O'Sullivan, P. Low and R. Thomas** (2003). "Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10." *Immunity* 18(1): 155-167.
- Martin, S. F.** (2012). "Allergic contact dermatitis: xenoinflammation of the skin." *Curr Opin Immunol* 24(6): 720-729.
- Martin, S. F.** (2015a). "Immunological mechanisms in allergic contact dermatitis." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 15(2): 124-130.
- Martin, S. F.** (2015b). "New concepts in cutaneous allergy." *Contact Dermatitis* 72(1): 2-10.
- Martin, S. F., et al.** (2010). "T-cell recognition of chemicals, protein allergens and drugs: towards the development of in vitro assays." *Cell Mol Life Sci* 67(24): 4171-4184.
- Martin, S. F. and T. Jakob** (2008). "From innate to adaptive immune responses in contact hypersensitivity." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8(4): 289-293.
- Martinez-Pomares, L.** (2012). "The mannose receptor." *J Leukoc Biol* 92(6): 1177-1186.
- Martinon, F.** (2010). "Signaling by ROS drives inflammasome activation." *Eur J Immunol* 40(3): 616-619.
- Matzinger, P.** (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." *Annu Rev Immunol* 12: 991-1045.
- Mbongue, J. C., H. A. Nieves, T. W. Torrez and W. H. Langridge** (2017). "The Role of Dendritic Cell Maturation in the Induction of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus." *Front Immunol* 8: 327.
- McClure, R. and P. Massari** (2014). "TLRDependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens." *Front Immunol* 5: 386.
- Mekenyan, O., et al.** (2014). "A mechanistic approach to modeling respiratory sensitization." *Chem Res Toxicol* 27(2): 219-239.
- Mempel, T. R., S. E. Henrickson and U. H. Von Andrian** (2004). "T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases." *Nature* 427(6970): 154-159.
- Merad, M., F. Ginhoux and M. Collin** (2008). "Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells." *Nat Rev Immunol* 8(12): 935-947.
- Merad, M., et al.** (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.
- Merckel, F., E. Gimenez-Arnau, G. F. Gerberick and J. P. Lepoittevin** (2013). "In chemico evaluation of prohaptens skin sensitizers: behavior of 2-methoxy-4-((1)(3)C)methylphenol in the peroxidase peptide reactivity assay (PPRA) as an alternative to animal testing." *Toxicol Lett* 218(3): 266-272.
- Migdal, C., et al.** (2013). "Reactivity of chemical sensitizers toward amino acids in cellulo plays a role in the activation of the Nrf2-ARE pathway in human monocyte dendritic cells and the THP-1 cell line." *Toxicol Sci*.
- Mittrucker, H. W., A. Visekruna and M. Huber** (2014). "Heterogeneity in the differentiation and function of CD8(+) T cells." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 62(6): 449-458.
- Moi, P., et al.** (1994). "Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(21): 9926-9930.
- Monzon, M. E., et al.** (2010). "Reactive oxygen species and hyaluronidase 2 regulate airway epithelial hyaluronan fragmentation." *J Biol Chem* 285(34): 26126-26134.
- Moscato, G., et al.** (2009). "EAACI position paper on occupational rhinitis." *Respir Res* 10: 16.
- Mueller, S. N., T. Gebhardt, F. R. Carbone and W. R. Heath** (2013). "Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence." *Annu Rev Immunol* 31: 137-161.
- Mussotter, F., et al.** (2016). "Proteomics analysis of dendritic cell activation by contact allergens reveals possible biomarkers regulated by Nrf2." *Toxicol Appl Pharmacol* 313: 170-179.
- Muto, J., et al.** (2014). "Hyaluronan digestion controls DC migration from the skin." *J Clin Invest* 124(3): 1309-1319.
- Nace, G., J. Evankovich, R. Eid and A. Tsung** (2012). "Dendritic cells and damage-associated molecular patterns: endogenous danger signals linking innate and adaptive immunity." *J Innate Immun* 4(1): 6-15.

- Naik, S. H., L. M. Corcoran and L. Wu** (2005). "Development of murine plasmacytoid dendritic cell subsets." *Immunol Cell Biol* 83(5): 563-570.
- Naik, S. H., et al.** (2006). "Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes." *Nat Immunol* 7(6): 663-671.
- Naik, S. H., et al.** (2010). "CD8+, CD8-, and plasmacytoid dendritic cell generation in vitro using flt3 ligand." *Methods Mol Biol* 595: 167-176.
- Nakamura, T., et al.** (2009). "Covalent modification of lysine residues by allyl isothiocyanate in physiological conditions: plausible transformation of isothiocyanate from thiol to amine." *Chem Res Toxicol* 22(3): 536-542.
- Nakano, H., et al.** (2009). "Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses." *Nat Immunol* 10(4): 394-402.
- Nakayama, M.** (2014). "Antigen Presentation by MHC-Dressed Cells." *Front Immunol* 5: 672.
- Narita, K., et al.** (2018). "Improvement of human cell line activation test (h-CLAT) using short-time exposure methods for prevention of false-negative results." *The Journal of Toxicological Sciences* 43(3): 229-240.
- Natsch, A.** (2010). "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(2): 284-292.
- Natsch, A., et al.** (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 In Vitro* 25(3): 733-744.
- Natsch, A. and R. Emter** (2008). "Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the in vitro testing of the sensitization potential of chemicals." *Toxicol Sci* 102(1): 110-119.
- Natsch, A. and R. Emter** (2016). "Nrf2 activation as a key event triggered by skin sensitizers: The development of the stable KeratinoSens reporter gene assay." *Altern Lab Anim* 44(5): 443-451.
- Neefjes, J., M. L. Jongstra, P. Paul and O. Bakke** (2011). "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation." *Nat Rev Immunol* 11(12): 823-836.
- Nestle, F. O., P. Di Meglio, J. Z. Qin and B. J. Nickoloff** (2009). "Skin immune sentinels in health and disease." *Nat Rev Immunol* 9(10): 679-691.
- Neves, B. M., et al.** (2011). "Signal transduction profile of chemical sensitizers in dendritic cells: an endpoint to be included in a cell-based in vitro alternative approach to hazard identification?" *Toxicol Appl Pharmacol* 250(2): 87-95.
- Newton, K. and V. M. Dixit** (2012). "Signaling in innate immunity and inflammation." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(3).
- Nikolova-Pavageau, N.** (2013). "Les manifestations et mécanismes des allergies professionnelles." *Hygiène et Sécurité du Travail HST n°233*: 23-25.
- Norcross, M. A., et al.** (2012). "Abacavir induces loading of novel self-peptides into HLA-B*57: 01: an autoimmune model for HLA-associated drug hypersensitivity." *AIDS* 26(11): F21-29.
- Nukada, Y., et al.** (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(7): 1150-1160.
- Nuriya, S., S. Enomoto and M. Azuma** (2001). "The role of CTLA-4 in murine contact hypersensitivity." *J Invest Dermatol* 116(5): 764-768.
- O'Keefe, M., et al.** (2002). "Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus." *J Exp Med* 196(10): 1307-1319.
- Oakes, T., et al.** (2017). "The T Cell Response to the Contact Sensitizer Paraphenylenediamine Is Characterized by a Polyclonal Diverse Repertoire of Antigen-Specific Receptors." *Frontiers in Immunology* 8: 162.
- OECD** (1992). "Guidelines for Testing of Chemicals. Guideline No.406. Skin sensitisation."

- OECD** (2001). "Guidelines for Testing of Chemicals. Draft Guideline No. 429. Skin sensitisation: The Local Lymph Node Assay."
- OECD** (2015). Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA), OECD Publishing, Paris.
- OECD** (2016). Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT), OECD Publishing, Paris.
- OECD** (2017). Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation, OECD Publishing.
- OECD**. (2010a). Test No. 442A: Skin Sensitization: local lymph node assay, OECD Publishing, Paris.
- OECD**. (2010b). Test No. 442B: Skin Sensitization: local lymph node assay: BrdU-ELISA, OECD Publishing, Paris.
- OECD**. (2014). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, OECD Publishing, Paris.
- OECD**. (2015). Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase test method, OECD Publishing, Paris.
- Ohkura, N. and S. Sakaguchi** (2010). "Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function." *Semin Immunopathol* 32(2): 95-106.
- Okwor, I., P. Jia and J. E. Uzonna** (2015). "Interaction of Macrophage Antigen 1 and CD40 Ligand Leads to IL-12 Production and Resistance in CD40-Deficient Mice Infected with *Leishmania major*." *The Journal of Immunology* 195(7): 3218-3226.
- Olasz, E. B., J. Linton and S. I. Katz** (2002). "Soluble proteins and haptens on bone marrow-derived dendritic cells are presented to host CD4 T cells in an MHC-restricted manner." *Int Immunol* 14(5): 493-502.
- ONU** (2013). "Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). ." 5 ème édition révisée Nations Unies New York et Genève
- Oppmann, B., et al.** (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." *Immunity* 13(5): 715-725.
- Oria, M. P. and V. A. Stallings** (2016). *Finding a Path to Safety in Food Allergy: Assessment of the Global Burden, Causes, Prevention, Management, and Public Policy*. W. D. N. A. P. (US). Washington (DC).
- Osburn, W. O., et al.** (2007). "Increased colonic inflammatory injury and formation of aberrant crypt foci in Nrf2-deficient mice upon dextran sulfate treatment." *Int J Cancer* 121(9): 1883-1891.
- Ostrov, D. A., et al.** (2012). "Drug hypersensitivity caused by alteration of the MHC-presented self-peptide repertoire." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(25): 9959-9964.
- Paris, C., et al.** (2012). "Work-related asthma in France: recent trends for the period 2001-2009." *Occupational and Environmental Medicine* 69(6): 391-397.
- Park, H., et al.** (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." *Nat Immunol* 6(11): 1133-1141.
- Patel, S.** (2017). "Inflammasomes, the cardinal pathology mediators are activated by pathogens, allergens and mutagens: A critical review with focus on NLRP3." *Biomed Pharmacother* 92: 819-825.
- Patlewicz, G., et al.** (2016). "Can currently available non-animal methods detect pre and pro-haptens relevant for skin sensitization?" *Regul Toxicol Pharmacol* 82: 147-155.
- Patlewicz, G., 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(2): 225-239.
- Pavlos, R., et al.** (2015). "T cell-mediated hypersensitivity reactions to drugs." *Annu Rev Med* 66: 439-454.
- Peiser, M., M. Hitzler and A. Luch** (2014). "On the role of co-inhibitory molecules in dendritic cell: T helper cell coculture assays aimed to detect chemical-induced contact allergy." *EXS* 104: 115-135.

- Peiser, M., et al.** (2012). "Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany." *Cellular and Molecular Life Sciences* 69(5): 763-781.
- Pena-Cruz, V., et al.** (2010). "PD-1 on immature and PD-1 ligands on migratory human Langerhans cells regulate antigen-presenting cell activity." *J Invest Dermatol* 130(9): 2222-2230.
- Pepin, E., M. Goutet and M. Ban** (2007). "Murine bone marrow-derived dendritic cells as a potential in vitro model for predictive identification of chemical sensitizers." *Toxicol Lett* 175(1-3): 89-101.
- Periasamy, P., J. K. H. Tan and H. C. O'Neill** (2013). "Novel splenic antigen-presenting cells derive from a Lin(-) c-kit(lo) progenitor." *Journal of Leukocyte Biology* 93(1): 63-69.
- Piccioni, M., Z. Chen, A. Tsun and B. Li** (2014). "Regulatory T-cell differentiation and their function in immune regulation." *Adv Exp Med Biol* 841: 67-97.
- Pichler, W. J.** (2008). "The p-i Concept: Pharmacological Interaction of Drugs With Immune Receptors." *World Allergy Organ J* 1(6): 96-102.
- Pichler, W. J., et al.** (2015). "Drug Hypersensitivity: How Drugs Stimulate T Cells via Pharmacological Interaction with Immune Receptors." *Int Arch Allergy Immunol* 168(1): 13-24.
- Pichler, W. J., et al.** (2006). "Pharmacological interaction of drugs with immune receptors: the p-i concept." *Allergol Int* 55(1): 17-25.
- Pols, D. H., et al.** (2016). "Atopic dermatitis, asthma and allergic rhinitis in general practice and the open population: a systematic review." *Scand J Prim Health Care* 34(2): 143-150.
- Portnoy, J. M., P. B. Williams and C. S. Barnes** (2016). "Innate Immune Responses to Fungal Allergens." *Curr Allergy Asthma Rep* 16(9): 62.
- Probst, H. C., S. Muth and H. Schild** (2014). "Regulation of the tolerogenic function of steady-state DCs." *Eur J Immunol* 44(4): 927-933.
- Pulendran, B., et al.** (2000). "Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo." *J Immunol* 165(1): 566-572.
- Python, F., C. Goebel and P. Aeby** (2007). "Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens." *Toxicol Appl Pharmacol* 220(2): 113-124.
- Qi, H., et al.** (2014). "Tfh cell differentiation and their function in promoting B-cell responses." *Adv Exp Med Biol* 841: 153-180.
- Raffalli, C., et al.** (2018). "Editor's Highlight: Fragrance Allergens Linalool and Limonene Allylic Hydroperoxides in Skin Allergy: Mechanisms of Action Focusing on Transcription Factor Nrf2." *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 161(1): 139-148.
- Rajan, T. V.** (2003). "The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation." *Trends Immunol* 24(7): 376-379.
- Ramos-Gomez, M., et al.** (2001). "Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3410-3415.
- Reizis, B., et al.** (2011). "Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions." *Annu Rev Immunol* 29: 163-183.
- Remy, S., et al.** (2014). "Gene expressions changes in bronchial epithelial cells: markers for respiratory sensitizers and exploration of the NRF2 pathway." *Toxicol In Vitro* 28(2): 209-217.
- Renaudin, J.** (2011). "Occupational allergy news." *Revue Française d'Allergologie* 51(3): 265-268.
- Rengarajan, J., et al.** (2002). "Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression." *J Exp Med* 195(8): 1003-1012.
- Richter, A., et al.** (2013). "Human T cell priming assay (hTCPA) for the identification of contact allergens based on naive T cells and DC-IFN-gamma and TNF-alpha readout." *Toxicol In Vitro* 27(3): 1180-1185.
- RNV3P, A.** (2011). "Réseau national des pathologies professionnelles. Rapport scientifique." ANSES éditions.(octobre): 279.

- Roberts, D. W., R. Fragnals, J. P. Lepoittevin and C. Benezra** (1991). "Refinement of the relative alkylation index (RAI) model for skin sensitization and application to mouse and guinea-pig test data for alkyl alkanesulphonates." *Arch Dermatol Res* 283(6): 387-394.
- Roberts, D. W. and D. L. Williams** (1982). "The derivation of quantitative correlations between skin sensitisation and physio-chemical parameters for alkylating agents, and their application to experimental data for sultones." *J Theor Biol* 99(4): 807-825.
- Roche, P. A. and K. Furuta** (2015). "The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation." *Nat Rev Immunol* 15(4): 203-216.
- Roggen, E. L.** (2014). "In vitro approaches for detection of chemical sensitization." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 115(1): 32-40.
- Rovida, C., et al.** (2007). "Management of an integrated project (Sens-it-iv) to develop in vitro tests to assess sensitisation." *Altern Lab Anim* 35(3): 317-322.
- Ruiz, S., P. E. Pergola, R. A. Zager and N. D. Vaziri** (2013). "Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease." *Kidney Int* 83(6): 1029-1041.
- Russell, W. F., Jr., et al.** (1959). "Combined drug treatment of tuberculosis. III. Clinical application of the principles of appropriate and adequate chemotherapy to the treatment of pulmonary tuberculosis." *J Clin Invest* 38(8): 1366-1375.
- Saalbach, A., et al.** (2015). "Fibroblasts support migration of monocyte-derived dendritic cells by secretion of PGE2 and MMP-1." *Exp Dermatol* 24(8): 598-604.
- Saei, A. and J. Hadjati** (2013). "Tolerogenic dendritic cells: key regulators of peripheral tolerance in health and disease." *Int Arch Allergy Immunol* 161(4): 293-303.
- Saint-Mezard, P., et al.** (2004). "Allergic contact dermatitis." *Eur J Dermatol* 14(5): 284-295.
- Sakaguchi, H., et al.** (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(2): 109-126.
- Sakaguchi, H., et al.** (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(5): 774-784.
- Sakaguchi, S., et al.** (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* 155(3): 1151-1164.
- Salazar, F., H. F. Sewell, F. Shakib and A. M. Ghaemmaghami** (2013). "The role of lectins in allergic sensitization and allergic disease." *J Allergy Clin Immunol* 132(1): 27-36.
- Sallusto, F., J. Geginat and A. Lanzavecchia** (2004). "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance." *Annu Rev Immunol* 22: 745-763.
- Sallusto, F., et al.** (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." *Nature* 401(6754): 708-712.
- Sanderson, D. M. and C. G. Earnshaw** (1991). "Computer prediction of possible toxic action from chemical structure; the DEREK system." *Hum Exp Toxicol* 10(4): 261-273.
- Sandquist, I. and J. Kolls** (2018). "Update on regulation and effector functions of Th17 cells." *F1000Res* 7: 205.
- Santamaria-Babi, L. F.** (2004). "CLA(+) T cells in cutaneous diseases." *Eur J Dermatol* 14(1): 13-18.
- Savarino, A., F. Bottarel, F. Malavasi and U. Dianzani** (2000). "Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions?" *AIDS* 14(9): 1079-1089.
- Schaefer, L.** (2014). "Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns." *J Biol Chem* 289(51): 35237-35245.
- Schlitzer, A. and F. Ginhoux** (2014). "Organization of the mouse and human DC network." *Curr Opin Immunol* 26: 90-99.
- Schlitzer, A., N. McGovern and F. Ginhoux** (2015). "Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems." *Semin Cell Dev Biol* 41: 9-22.

- Scholzen, T. and J. Gerdes** (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." *J Cell Physiol* 182(3): 311-322.
- Schott, M.** (2006). "Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers." *Endocr Relat Cancer* 13(3): 779-795.
- Schulke, S.** (2018). "Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses." *Front Immunol* 9: 455.
- Schuurhuis, D. H., N. Fu, F. Ossendorp and C. J. M. Melief** (2006). "Ins and outs of dendritic cells." *International Archives of Allergy and Immunology* 140(1): 53-72.
- Serbina, N. V., et al.** (2003). "TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection." *Immunity* 19(1): 59-70.
- Sharpe, A. H. and G. J. Freeman** (2002). "The B7-CD28 superfamily." *Nat Rev Immunol* 2(2): 116-126.
- Shik, D., et al.** (2017). "IL-9-producing cells in the development of IgE-mediated food allergy." *Semin Immunopathol* 39(1): 69-77.
- Shortman, K.** (2000). "Burnet oration: dendritic cells: multiple subtypes, multiple origins, multiple functions." *Immunol Cell Biol* 78(2): 161-165.
- Sichien, D., B. N. Lambrecht, M. Guilliams and C. L. Scott** (2017). "Development of conventional dendritic cells: from common bone marrow progenitors to multiple subsets in peripheral tissues." *Mucosal Immunol* 10(4): 831-844.
- Siegal, F. P., et al.** (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." *Science* 284(5421): 1835-1837.
- Silva, A., et al.** (2014). "Respiratory sensitizer hexamethylene diisocyanate inhibits SOD 1 and induces ERK-dependent detoxifying and maturation pathways in dendritic-like cells." *Free Radic Biol Med* 72: 238-246.
- Silvia, C. and G. Claudius** (2013). "EURL ECVAM Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for Skin Sensitisation Testing." Publications Office of the European Union: 1-36.
- Smith, B. J., J. F. Curtis and T. E. Eling** (1991). "Bioactivation of xenobiotics by prostaglandin H synthase." *Chem Biol Interact* 79(3): 245-264.
- Smith, C. K., et al.** (2000). "Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde, and cinnamic alcohol." *Toxicol Appl Pharmacol* 168(3): 189-199.
- Smith Pease, C. K., D. A. Basketter and G. Y. Patlewicz** (2003). "Contact allergy: the role of skin chemistry and metabolism." *Clin Exp Dermatol* 28(2): 177-183.
- Sozzani, S.** (2005). "Dendritic cell trafficking: more than just chemokines." *Cytokine Growth Factor Rev* 16(6): 581-592.
- Steinman, R. M.** (1991). "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." *Annu Rev Immunol* 9: 271-296.
- Steinman, R. M., J. C. Adams and Z. A. Cohn** (1975). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen." *J Exp Med* 141(4): 804-820.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn** (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." *J Exp Med* 137(5): 1142-1162.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn** (1974). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro." *J Exp Med* 139(2): 380-397.
- Steinman, R. M. and K. Inaba** (1999). "Myeloid dendritic cells." *J Leukoc Biol* 66(2): 205-208.
- Steinman, R. M. and M. C. Nussenzweig** (2002). "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(1): 351-358.
- Steinman, R. M., M. Pack and K. Inaba** (1997). "Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs." *Immunol Rev* 156: 25-37.
- Steinman, R. M. and J. Swanson** (1995). "The endocytic activity of dendritic cells." *J Exp Med* 182(2): 283-288.
- Stoop, R. et al.** (2002). " Trafficking of CD44-deficient murine lymphocytes under normal and inflammatory conditions." *Eur J Immunol* 32(9):2532-42.

- Strickland, J., et al.** (2016). "Integrated decision strategies for skin sensitization hazard." *J Appl Toxicol* 36(9): 1150-1162.
- Summers deLuca, L. and J. L. Gommerman** (2012). "Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily." *Nat Rev Immunol* 12(5): 339-351.
- Sun, B. and Y. Zhang** (2014). "Overview of orchestration of CD4+ T cell subsets in immune responses." *Adv Exp Med Biol* 841: 1-13.
- Swain, S. L., K. K. McKinstry and T. M. Strutt** (2012). "Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses." *Nat Rev Immunol* 12(2): 136-148.
- Tanaka, H., et al.** (2000). "Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio." *J Exp Med* 192(3): 405-412.
- Tang, A., T. A. Judge, B. J. Nickoloff and L. A. Turka** (1996). "Suppression of murine allergic contact dermatitis by CTLA4Ig. Tolerance induction of Th2 responses requires additional blockade of CD40-ligand." *J Immunol* 157(1): 117-125.
- Testi, R., J. H. Phillips and L. L. Lanier** (1989). "T cell activation via Leu-23 (CD69)." *J Immunol* 143(4): 1123-1128.
- Thierse, H. J., et al.** (2005). "T cell receptor (TCR) interaction with haptens: metal ions as non-classical haptens." *Toxicology* 209(2): 101-107.
- Thimmulappa, R. K., et al.** (2006). "Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis." *J Clin Invest* 116(4): 984-995.
- Tiberio, L., et al.** (2018). "Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration." *Cell Mol Immunol*.
- Toebak, M. J., et al.** (2009). "Dendritic cells: biology of the skin." *Contact Dermatitis* 60(1): 2-20.
- Trifari, S., et al.** (2009). "Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells." *Nat Immunol* 10(8): 864-871.
- Troutman, J. A., et al.** (2011). "The incorporation of lysine into the peroxidase peptide reactivity assay for skin sensitization assessments." *Toxicol Sci* 122(2): 422-436.
- Tsushima, F., et al.** (2003). "Preferential contribution of B7-H1 to programmed death-1-mediated regulation of hapten-specific allergic inflammatory responses." *Eur J Immunol* 33(10): 2773-2782.
- Tumes, D. J., et al.** (2017). "Epigenetic regulation of T-helper cell differentiation, memory, and plasticity in allergic asthma." *Immunol Rev* 278(1): 8-19.
- Urbisch, D., et al.** (2016). "Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Nonanimal Test Methods for Skin Sensitization." *Chem Res Toxicol* 29(5): 901-913.
- Van Acker, H. H., A. Capsomidis, E. L. Smits and V. F. Van Tendeloo** (2017). "CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity?" *Front Immunol* 8: 892.
- Van Den Broeke, L. T., et al.** (1999). "Direct Ni²⁺ antigen formation on cultured human dendritic cells." *Immunology* 96(4): 578-585.
- van der Veen, J. W., et al.** (2016). "The involvement of the Toll-like receptor signaling and Nrf2-Keap1 pathways in the in vitro regulation of IL-8 and HMOX1 for skin sensitization." *Journal of Immunotoxicology* 13(1): 1-6.
- van Vliet, E., et al.** (2017). "State-of-the-art and new options to assess T cell activation by skin sensitizers: Cosmetics Europe Workshop." *ALTEX*.
- Vandebriel, R. J. and H. van Loveren** (2010). "Non-animal sensitization testing: state-of-the-art." *Crit Rev Toxicol* 40(5): 389-404.
- Vigan, M.** (2009). "Clinical patterns of allergic contact dermatitis to fragrances." *Revue Francaise D'Allergologie* 49(4): 356-359.
- Vocanson, M.** (2014). "In vitro sensitization and primary T cell responses to contact allergens: Towards the development of human T cell priming assays." *Toxicology Letters* 229: S28-S29.

- Vocanson, M., et al.** (2014). "Human T cell priming assay: depletion of peripheral blood lymphocytes in CD25(+) cells improves the in vitro detection of weak allergen-specific T cells." *EXS* 104: 89-100.
- Vocanson, M., et al.** (2008). "Depletion of human peripheral blood lymphocytes in CD25+ cells allows for the sensitive in vitro screening of contact allergens." *J Invest Dermatol* 128(8): 2119-2122.
- Vocanson, M., et al.** (2009a). "Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis." *Allergy* 64(12): 1699-1714.
- Vocanson, M., et al.** (2009b). "Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis." *Allergy* 64(12): 1699-1714.
- Vocanson, M., et al.** (2017). "Contact hypersensitivity: T-cell based assay." *Curr Opin in Toxicology* 5: 39-45.
- Vocanson, M., J.-F. Nicolas and D. Basketter** (2013). "In vitro approaches to the identification and characterization of skin sensitizers." *Expert Review of Dermatology* 8(4): 395-405.
- Vocanson, M., et al.** (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(2): 280-289, 289 e281-287.
- Vremec, D., et al.** (2000). "CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen." *J Immunol* 164(6): 2978-2986.
- Vukmanovic, S. and N. Sadrieh** (2017). "Skin sensitizers in cosmetics and beyond: potential multiple mechanisms of action and importance of T-cell assays for in vitro screening." *Crit Rev Toxicol* 47(5): 415-432.
- Walzer, T., et al.** (2003). "Cutting edge: immediate RANTES secretion by resting memory CD8 T cells following antigenic stimulation." *J Immunol* 170(4): 1615-1619.
- Watanabe, H., et al.** (2007). "Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity." *J Invest Dermatol* 127(8): 1956-1963.
- Welner, R. S., et al.** (2007). "Interferon-producing killer dendritic cells (IKDCs) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kit⁺CD62L⁺ lymphoid progenitors." *Blood* 109(11): 4825-4931.
- Whitehead, G. S., et al.** (2003). "Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent." *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 285(1): L32-42.
- WHO** (2017). "Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016." *Lancet* 390(10100): 1345-1422.
- Willart, M. A. and B. N. Lambrecht** (2009). "The danger within: endogenous danger signals, atopy and asthma." *Clinical and Experimental Allergy* 39(1): 12-19.
- Williams, M. A. and M. J. Bevan** (2007). "Effector and memory CTL differentiation." *Annu Rev Immunol* 25: 171-192.
- Witsch, E. J., et al.** (2002). "ICOS and CD28 reversely regulate IL-10 on re-activation of human effector T cells with mature dendritic cells." *Eur J Immunol* 32(9): 2680-2686.
- Wong, C. L., S. Ghassabian, M. T. Smith and A. L. Lam** (2015). "In vitro methods for hazard assessment of industrial chemicals - opportunities and challenges." *Front Pharmacol* 6: 94.
- Yang, C., P. et al.** (2006). "The phenotype and survival of antigen-stimulated transgenic CD4 T cells *in vivo*: the influence of persisting antigen". *Int Immunol*. 18(4):515-23
- Yang, B., B. K. Sundquist and M. A. Pasha** (2018). "Determining the clinical relevance of positive patch testing to gold in evaluation of contact dermatitis." *J Allergy Clin Immunol Pract*.
- Yokosuka, T. and T. Saito** (2010). "The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation." *Curr Top Microbiol Immunol* 340: 81-107.
- Yokoyama, W. M., et al.** (1988). "Characterization of a cell surface-expressed disulfide-linked dimer involved in murine T cell activation." *J Immunol* 141(2): 369-376.

- Yoshida, Y., et al.** (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 In Vitro* 17(2): 221-228.
- Yun, J., J. Adam, D. Yerly and W. J. Pichler** (2012). "Human leukocyte antigens (HLA) associated drug hypersensitivity: consequences of drug binding to HLA." *Allergy* 67(11): 1338-1346.
- Zasłona, Z., et al.** (2014). "Prostaglandin E₂ suppresses allergic sensitization and lung inflammation by targeting the E prostanoid 2 receptor on T cells." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133(2): 379-387.
- Zhang, Y., W. Gu, L. He and B. Sun** (2014a). "Th1/Th2 cell's function in immune system." *Adv Exp Med Biol* 841: 45-65.
- Zhang, Y., W. Gu and B. Sun** (2014b). "TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals." *Adv Exp Med Biol* 841: 15-44.
- Zhou, L. J. and T. F. Tedder** (1995). "Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily." *J Immunol* 154(8): 3821-3835.
- Ziegler-Heitbrock, L. and T. P. Hofer** (2013). "Toward a refined definition of monocyte subsets." *Front Immunol* 4: 23.
- Ziegler, S. F., F. Ramsdell and M. R. Alderson** (1994). "The activation antigen CD69." *Stem Cells* 12(5): 456-465.

ANNEXES

**Annexe 1 : Article "In vitro
detection of chemical
allergens: an optimized assay
using mouse bone marrow-derived
dendritic cells"**

In vitro detection of chemical allergens: an optimized assay using mouse bone marrow-derived dendritic cells

Fabrice Battais¹, Cécile Huppert, Isabelle Langonné, Samuel Muller and Isabelle Sponne

Department of Toxicology and Biometry, National Institute for Research and Safety (INRS), 54019 Vandoeuvre cedex, France

doi:10.1111/cod.12829

Summary

Background. Identification of the allergenic potency of chemicals is a key step in the safety assessment process. Predictive assays that require no or few animals are needed.

Objectives. To develop an alternative *in vitro* mouse bone marrow-derived dendritic cell (BMDC) assay to determine the allergenic potential of chemicals.

Methods. BMDCs were exposed to well-known allergens and to non-allergenic chemicals. Surface marker expression and cytokine release of BMDCs were analysed after treatment.

Results. Eleven tested chemicals showed a significant stimulation index (SI) of >1.5 (accuracy, 75%; sensitivity, 69%). The four non-allergens all showed a SI of <1.5. Eight contact allergens tested showed a significant SI of >1.5 (accuracy, 92%; sensitivity, 89%), whereas only two respiratory allergens showed a significant SI of >1.5 (accuracy, 60%; sensitivity, 33%).

Conclusions. The results indicate that the BMDC assay could become a reliable test for assessment of the allergenic potential of chemicals. The next step should include the testing of further chemicals, with the aim of integrating this assay into the toolbox of *in vitro* methods for the evaluation of the allergenic potential of chemicals.

Key words: bone marrow-derived dendritic cells; chemical allergens; *in vitro* assay; local lymph node assay.

The two most frequent manifestations of chemical-induced allergy are contact hypersensitivity and respiratory sensitization, both of which can have a serious impact on the quality of life and represent a common health problem. People are constantly exposed to chemical allergens through the use of everyday products such as cosmetics, hair or textile dyes, and household cleaning agents. Evidence on the sensitizing potential of these chemicals is therefore important.

Exposure to low molecular weight chemicals in the workplace is an important cause of hypersensitivity (1). A wide range of substances found in industry, including metal salts, fragrance ingredients, and halogenated aromatic compounds, can induce allergic contact dermatitis (ACD), a T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reaction (2–5). To date, >4000 chemical substances have been linked to ACD in humans (6). As compared with the number of known contact sensitizers, few chemicals are known to induce respiratory allergy, generally an IgE Th2-mediated response. In industrialized countries, however, low molecular weight chemicals such as acid anhydrides and diisocyanates are important respiratory allergens in terms of occupational asthma (7, 8). Clear identification and characterization of chemicals capable of eliciting respiratory or contact allergies is therefore an important issue in industrial safety. Newly synthesized molecules must be assessed before being handled or

Correspondence: Fabrice Battais, Department of Toxicology and Biometry, National Institute for Research and Safety (INRS), Rue du Morvan, CS 60027, 54019 Vandoeuvre cedex, France. Tel: 33 383 50 20 00; Fax: +33 383 50 20 96. E-mail: fabrice.battais@inrs.fr

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest.

Accepted for publication 11 April 2017

inhaled, in order to identify appropriate preventive measures.

The identification of potential allergens was based entirely on animal testing. The murine local lymph node assay (LLNA) was the 'gold standard' for assessing the sensitization potential of chemical allergens (LLNA guideline OECD-TG429) (9). However, new chemical legislation, for example the amendment to the Regulation under the United Nations Globally Harmonized System for Classification, Labeling and Packaging of substances and mixtures [GHS/CLP: Regulation (EC) No. 1272/2008] (10, 11) and the European regulation on Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemical substances (REACH) (12), and increasing pressure from animal welfare groups, public opinion, and ethical debate, have provided the impetus for developing alternatives to animal testing (13, 14). Moreover, the concentration needed for the induction of a certain response, translated to a chemical's sensitization potency, is of utmost importance for quantitative risk assessment (15). To reduce the need for animal testing, a thorough analysis of *in vitro* methods, in terms of not only hazard prediction but also the potential to facilitate potency categorization, is crucial (1, 14, 16).

Various alternative methods have been developed and optimized for the detection of contact allergens (1, 13, 17). These non-animal test methods address one of the key events (KEs) of the adverse outcome pathway (AOP) of skin sensitization, developed by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (14, 18, 19). An AOP describes a sequence of KEs triggered by a chemical. Each AOP starts with a molecular initiating event, which is the first KE, representing the event that initiates the perturbation caused by the chemical; this is followed by several KEs at the cellular, organ or organism level, eventually resulting in the adverse outcome (14, 18). Some of these *in vitro* methods concerned the cellular response level of the AOP (KE2 to KE4) involved in the sensitization phase of contact allergy [keratinocytes, dendritic cells (DCs), and T cells], and include the *in vitro* culture of DC-like cells (17). DCs play a central role in the induction of skin sensitization through their ability to take up, process and present haptenated self-proteins to T cells, and they represent the most abundant antigen-presenting cell population in the skin (20, 21). To assess the skin-sensitizing potential of contact allergens, several *in vitro* model systems using human myeloid cell lines have been developed, including U937, THP-1, MUTZ-3, and KG-1, which have the ability to differentiate into cells with DC-like characteristics [reviewed in dos Santos et al. (13)]. In the development of assays based on these cells, much attention has been focused on

allergen-induced changes in cytokine production [interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, tumour necrosis factor (TNF)- α , etc.] and/or altered expression of membrane phenotypic markers [often CD54, CD86, and major histocompatibility complex (MHC) class II]. So far, one *in chemico* [direct peptide reactivity assay (DPRA)] and two *in vitro* cell-based assays, the ARE-Nrf2 Luciferase Test method (KeratinoSens™), and the human cell line activation test (h-CLAT), have been accepted as test guidelines by the OECD [DPRA (TG442C), KeratinoSens™ (TG442D), and h-CLAT (TG442E)] for the prediction of skin sensitization potential (1, 17, 22–25). Besides these regulatory accepted methods, many other tests are under development. Some are still at an early stage of development, whereas others are being validated in interlaboratory tests and/or have entered the peer-review process at the European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL-ECVAM) (26).

In this study, we evaluated an *in vitro* model based on mouse bone marrow-derived DCs (BMDCs), because of the difficulties typically associated with the use of cell lines, for example altered genomes, genomic instability, metabolic deficiencies, and limited functional properties. This model could provide additional information, supplementing human cell line-based assays. With the aim of developing an alternative *in vitro* assay for determining the allergenic potential of chemicals, we reinvestigated and optimized an existing *in vitro* approach based on BMDCs (27), and were able to establish an improved and stable protocol that yielded reproducible results.

Materials and Methods

Chemicals

Chemicals were selected from sets proposed by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), the European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC), and the EU integrated project Sens-it-iv, to give a relevant and representative set of irritants, non-allergens, and respiratory and contact allergens (Table 1) (28–30). In this study, we chose to use chemicals as potential allergens on the basis of their clinical effects. The following reagents were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (Saint Quentin Fallavier, France): ammonium hexachloroplatinate (AHCP), benzocaine (Bzc), benzalkonium chloride (BC), cinnamal (Cinn), dinitrochlorobenzene (DNCB), dinitrofluorobenzene (DNFB), diphenylmethane diisocyanate (MDI), eugenol (Eug), isopropanol (IsoP), lipopolysaccharide (LPS), nickel sulfate (NiSO₄), oxazolone (Oxa), phthalic anhydride (PA), *p*-aminobenzoic acid (pABA),

Table 1. Concentrations of selected chemicals that induced 80% viability (CV_{80}) in bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs)

| Chemical | CAS no. | Clinical class | μM | $\mu\text{g/ml}$ | Vehicles |
|------------------------------|------------|---------------------|---------------|------------------|---------------|
| Oxazolone | 15646-46-5 | Contact | 100 | 22 | DMSO (0.3%) |
| Dinitrofluorobenzene | 70-34-8 | Contact | 5 | 0.9 | DMSO (0.006%) |
| Dinitrochlorobenzene | 97-00-7 | Contact | 5 | 1 | DMSO (0.02%) |
| Brandrowski's base | 20048-27-5 | Contact | 10 | 3.2 | DMSO (0.025%) |
| <i>p</i> -Phenylenediamine | 106-50-3 | Contact | 50 | 5.4 | HBSS |
| Cinnamal (cinnamic aldehyde) | 104-55-2 | Contact | 50 | 6.6 | DMSO (0.025%) |
| Nickel sulfate | 10101-97-0 | Contact | 300 | 80 | HBSS |
| Eugenol | 97-53-0 | Contact | 750 | 123 | DMSO (0.4%) |
| Benzocaine | 94-09-7 | Contact | 1000 | 165 | DMSO (0.25%) |
| Ammonium hexachloroplatinate | 16919-58-7 | Respiratory | 100 | 44 | HBSS |
| Phthalic anhydride | 85-44-9 | Respiratory | 1000 | 148 | DMSO (0.02%) |
| Trimellitic anhydride | 552-30-7 | Respiratory | 1000 | 192 | DMSO (0.02%) |
| Toluene diisocyanate | 584-84-9 | Respiratory | 500 | 87 | DMSO (0.15%) |
| Diphenylmethane diisocyanate | 101-68-8 | Respiratory | 300 | 75 | DMSO (0.1%) |
| <i>p</i> -Tolyl isocyanate | 622-58-2 | Respiratory | 300 | 40 | DMSO (0.3%) |
| Benzalkonium chloride | 63449-41-2 | Respiratory/contact | 4.8 | 1.5 | HBSS |
| Sodium dodecyl sulfate | 151-21-3 | Irritant | 200 | 58 | HBSS |
| <i>p</i> -Aminobenzoic acid | 150-13-0 | Irritant | 10000 | 1400 | HBSS |
| Zinc sulfate | 7446-20-0 | Non-sensitizer | 200 | 58 | HBSS |
| Isopropanol | 67-63-0 | Non-sensitizer | 100000 | 6000 | HBSS |

DMSO, dimethyl sulfoxide; HBSS, Hanks' balanced salt solution.

BMDCs were treated for 48 h with increasing concentrations of the selected chemicals or DMSO as the vehicle control (final concentration of DMSO in culture medium: $\leq 0.4\%$). Cell viability was assessed by flow cytometry with propidium iodide staining, as described in Materials and Methods.

p-phenylenediamine (PPD), *p*-tolyl isocyanate (TMI), sodium dodecyl sulfate (SDS), and trimellitic anhydride (TMA). Toluene diisocyanate (TDI) was purchased from Merck Millipore (Merck, Darmstadt, Germany), Brandrowski's base (BB) was purchased from MP Biomedicals (Illkirch, France), and zinc sulfate (ZnSO_4) was purchased from Acros Organics (Halluin, France). All chemicals were of the highest purity available. Chemicals were prepared in Hanks' balanced salt solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) or dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). The final concentrations of DMSO in the culture medium were adjusted according to the chemical's solubility (Table 1). The final concentration of DMSO in the culture medium did not exceed 0.4%. No effect on the viability or on the expression of surface markers was observed with a final DMSO concentration of up to 0.6% (data not shown). Fresh solutions were prepared for each experiment.

Generation of immature DCs from bone marrow

Mouse BMDCs were generated as described previously (27, 31). Cells were cultured in 150-mm Petri dishes in Iscove's modified Dulbecco's medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, 50 μM 2-mercaptoethanol (all from Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), 10%

heat-inactivated fetal bovine serum (BioWest, Nuaille, France), and 15% culture supernatant from mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing J558 cells (donated by D. Gray, University of Edinburgh). The concentration of GM-CSF added to the culture during differentiation (and stimulation) was 90 ng/ml. On day 7, the cells were briefly trypsinized (0.05% Trypsin/0.02% EDTA; Sigma), centrifuged (370g, 6 min), and then resuspended in fresh medium in new dishes. On day 9, ~90% of the cells were CD11c^+ , with an immature phenotype.

Treatment of cultured BMDCs

BMDCs were collected on day 7, and washed, counted, and plated in 60-mm Petri dishes in complete medium. Chemicals were added for 48 h. Chemicals were used at the highest concentrations leading to at least 80% viability (CV_{80}), as assessed by propidium iodide (PI) staining (Table 1). None of the CV_{80} chemicals affected the pH of the culture medium (data not shown). Control samples were treated with the vehicle for 48 h. LPS was used as a BMDC-activating positive control at 50 ng/ml.

Flow cytometric analysis of surface antigen expression

Treated BMDCs were analysed by two-colour immunofluorescence staining with R-phycoerythrin-conjugated

monoclonal antibody against CD11c (clone HL3) and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated monoclonal antibodies against MHC II (IAd, clone AMS-32.1), CD40 (clone 3/23), CD54 (clone 3E2), and CD86 (clone GL1), or isotype-matched control monoclonal antibodies. All antibodies were purchased from Pharmingen (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and used at saturating concentration. Cells were harvested on day 9. Surface staining was performed on fresh cells (27), and immediately analysed on a FACSCanto™ II flow cytometer with DIVA software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Debris and dead cells were eliminated from the analysis by use of a gate based on forward and side scatters and by PI staining, respectively. Only CD11c⁺ cells were analysed for FITC marker expression. At least 30 000 cells were analysed for each sample.

The mean fluorescence intensity (MFI) and the percentage of highly positive cells (% cell+) were measured as described previously (27). The MFI values corresponded to the MFI of each marker for chemical-treated cells minus the MFI of the corresponding control isotype.

Where indicated, the results are expressed as fold change over control cells (vehicle-treated cells). These two methods typically yield the same results (27), so only percentages of positive cells are reported here.

Changes in MHC II, CD40, CD54 and CD86 expression are reported as the stimulation index (SI), calculated with the formula:

$$SI = \text{mean} \left(\left(\frac{\% \text{ cells} + \text{TMHCII}}{\% \text{ cells} + \text{cMHCII}} \right); \left(\frac{\% \text{ cells} + \text{TCD40}}{\% \text{ cells} + \text{cCD40}} \right); \left(\frac{\% \text{ cells} + \text{TCD54}}{\% \text{ cells} + \text{cCD54}} \right); \left(\frac{\% \text{ cells} + \text{TCD86}}{\% \text{ cells} + \text{cCD86}} \right) \right)$$

where % cells + T is the percentage of positive chemical-treated cells, and % cells + c is the percentage of positive control cells.

The threshold (SI ≥ 1.5) used to define a positive response of a chemical in the BMDC model was determined empirically. A chemical was classified as an allergen if the fold increases in the calculated SI were ≥ 1.5 and this difference was statistically significant from the vehicle-treated cells. If the fold increase in the calculated SI was < 1.5 or not statistically significant, the chemical was classified as a non-allergen.

Comparison of the BMDC model with the LLNA according to effective concentration (EC) 3 values

EC values allow chemical allergens to be categorized, and in this study they were extrapolated for each compound from the concentration–response experiments (Fig. 3). The EC was defined as the extrapolated concentration at

which cells started to give a strong signal (in this case, SI = 3), as described by Azam et al. (32). The EC3 value (in μM) was calculated by linear extrapolation with the formula:

$$EC3 = c - \left[\frac{(d - 3)}{(d - b)} \times (c - a) \right]$$

where (a, b) and (c, d) are the coordinates (concentration, SI) of the lowest and highest concentrations, respectively.

Cytokine release

For cytokine production, cells were incubated with the highest CV₈₀ concentrations of a set of nine chemicals (DNFB, DNCB, NiSO₄, Cinn, AHCP, TMA, TMI, BC, and ZnSO₄). LPS was used as a positive control. Cytokine release was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, and BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) for interleukin (IL)-6, IL-10, and macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2), or by cytometric bead array (BD Biosciences) for monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), regulated on activation, normal T cell expressed and secreted protein (RANTES), and TNF-α, according to the manufacturer's instructions. For each cytokine, the positive threshold was calculated from the means of untreated cells + 3 standard errors of the mean (SEMs) (black horizontal line in Fig. 4), and the limit of detection is represented by the dashed horizontal line in Fig. 4. The results are expressed in pg/ml.

Data analysis

All experiments were performed at least three times. Representative results are shown. Data are expressed as the mean ± SEM. 'Accuracy' was defined as the relative frequency of the sum of true positive (TP) and true negative (TN) results among all tests [TP + TN + false positive (FP) + false negative (FN)]. Statistical significance was determined with Student's *t*-test as reported in the figure legends. Differences were considered to be significant at *p* ≤ 0.05.

Results

Phenotypic characterization of BMDCs and effect of chemicals on surface antigen expression

After 9 days of incubation with GM-CSF, >90% of the BMDCs expressed the CD11c marker and showed an immature phenotype. To evaluate the capacity of our cultured BMDCs to respond *in vitro* to a stimulus known to induce maturation, LPS (50 ng/ml) was applied to cells during the last 48 h of culture. After LPS addition, the

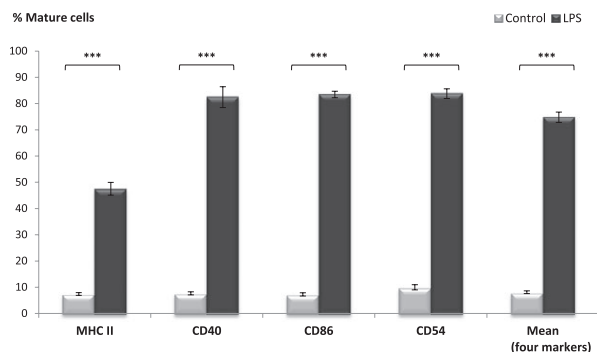


Fig. 1. Effects of lipopolysaccharide (LPS) on the expression of major histocompatibility complex (MHC) II, CD40, CD86 and CD54 on the cell surface of bone marrow-derived dendritic cells. Cells were cultured for 48 h with LPS (50 ng/ml, and the expression of the cell surface markers on viable cells was then analysed by flow cytometry. The percentage of highly positive cells was calculated for each marker [mean \pm standard error of the mean (SEM)] from at least three independent experiments. The final two bars represent the percentages of mature cells, and were obtained by calculating the mean \pm SEM of the percentage of cells highly positive for the four markers analysed. Black bars: cells treated with LPS. Grey bars: respective control cells. Asterisks indicate significant differences between treated and control cells (***) $p < 0.001$.

cells acquired the phenotype of mature DCs, as shown by strong upregulation of MHC II, CD40, CD54 and CD86 expression (SI = 9.2; Fig. 1). The concentration that resulted in 80% viability (CV_{80}) as compared with control cells 48 h after treatment was calculated for all chemicals (Table 1). CV_{80} represented the highest concentration tested for all chemicals.

Immature BMDCs were treated for 48 h with nine contact allergens, six respiratory allergens, one contact and/or respiratory allergen, and four non-allergens. The expression of MHC II, CD40, CD54 and CD86 on viable cells was determined by flow cytometry. Eight of the nine contact allergens induced cell maturation characterized by significant upregulation of at least one of the four membrane markers (Fig. 2). Only Oxa did not induce upregulation of any of the four markers. Among the respiratory allergens, AHCP and TMI induced significant upregulation of the maturation markers. PA, TMA, TDI and MDI did not induce upregulation of the maturation markers. BC induced significant upregulation of the four markers. The four negative chemicals did not induce upregulation of any maturation marker.

Analysis of phenotypic response of the BMDC model based on the SI

Changes in MHC II, CD40, CD54 and CD86 expression are reported as the SI (see Materials and Methods). Figure 3

shows the concentration–response relationships of 20 chemicals for the phenotypic response of the BMDCs. Eleven of the 16 allergens showed a significant SI of >1.5 (accuracy, 75%; sensitivity, 69%). PA showed a SI of 1.51, but the value was not significantly different from that of the control. The four non-allergens all showed SIs of <1.5 . Eight of the nine contact allergens showed a significant SI of >1.5 (accuracy, 92%; sensitivity, 89%), whereas only two of the six respiratory allergens showed a significant SI of >1.5 (accuracy, 60%; sensitivity, 33%).

Cytokine release following chemical treatment

Cytokine production in the supernatant of BMDCs was analysed after treatment with a set of nine chemicals (Fig. 4). LPS induced a strong and significant increase as compared with control cells for all of the analysed cytokines. This is consistent with the phenotypic changes observed for the four membrane markers, and confirms the strong maturation state of the BMDCs after LPS exposure. Treatment of BMDCs with DNFB, DNCB and AHCP induced significant strong increases in IL-6, MIP-2, MCP-1, RANTES and TNF- α production. TMI treatment induced significant increases in MIP-2, RANTES and TNF- α production. In contrast, like treatment with the non-allergen $ZnSO_4$, treatment with $NiSO_4$, Cinn, TMA and BC failed to induce significant increases in the production of the six cytokines analysed.

Discussion

The present article describes the use of a BMDC model to detect chemical allergens. Until now, most results have been obtained from human DC models and human monocytic cell lines (1, 13). BMDCs offer many advantages over human cells: BMDCs are primary mouse cells that, unlike cell lines such as THP-1 or MUTZ-3, do not undergo degeneration through the aberrant expression of oncogenes or modified signalling pathways (17); and BMDCs are derived from congenic mice, and interdonor variability is therefore limited. In addition, as the LLNA, the ‘gold standard’ assay used to assess the allergenic potency of chemicals, is conducted on mice, results obtained with mouse cells should be easier to compare with those obtained with the LLNA. The establishment of *in vitro* allergenic detection methods for the screening of new industrial chemicals is important in terms of both reducing animal testing and ensuring product safety. Because of their critical role in inducing the first stages of allergic sensitization (KE3 of AOP), DCs have become the focus of efforts to develop *in vitro* sensitization assays. DC maturation upon exposure to a chemical allergen

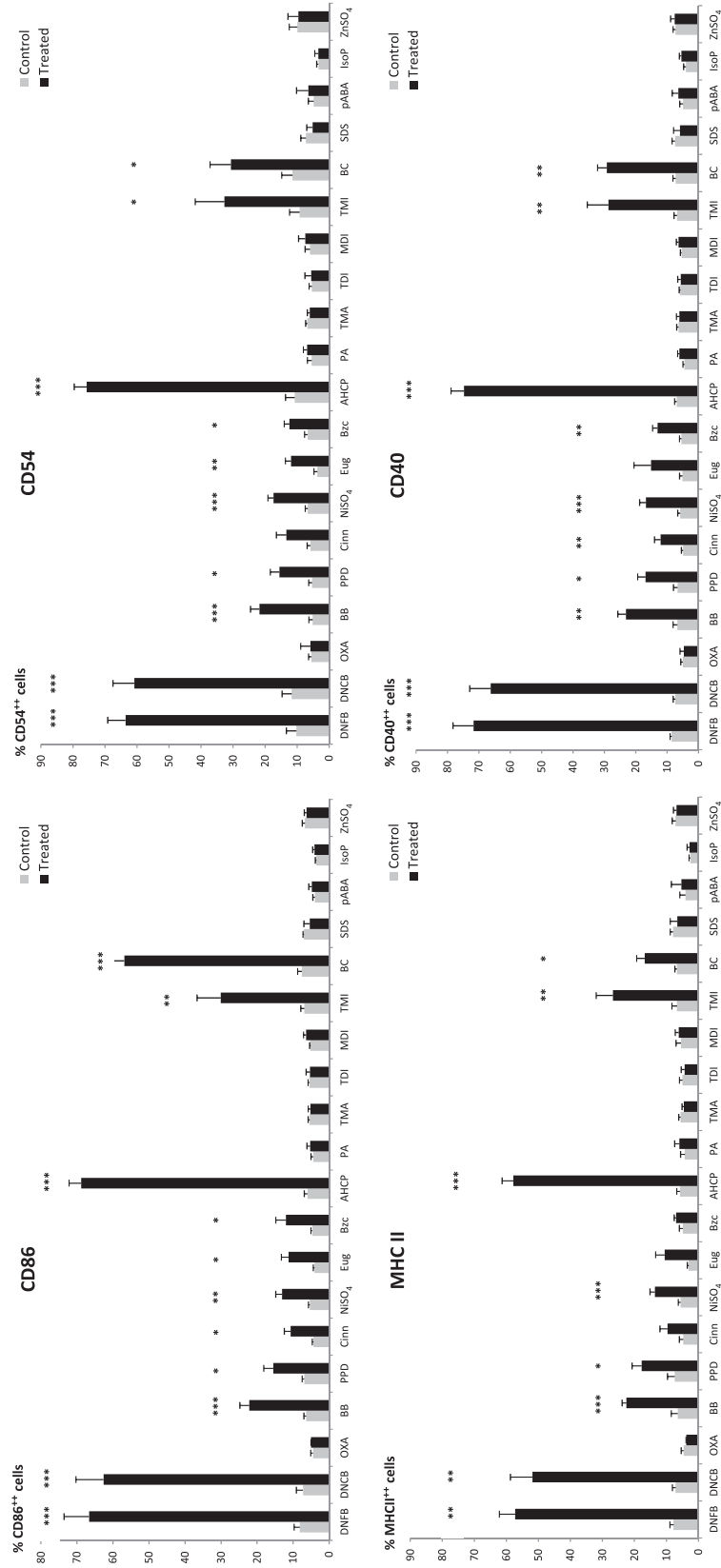


Fig. 2. Surface expression of CD86, CD54, major histocompatibility complex II (MHC II) and CD40 on bone marrow-derived dendritic cells after 48 h of treatment with selected chemicals. Expression of these markers on viable cells was determined by flow cytometry. The percentage of highly positive cells was obtained by calculating the mean \pm standard error of the mean from at least three independent experiments for each marker. Black bars: treated cells; grey bars: respective control cells. Asterisks indicate significant differences between treated and control cells (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

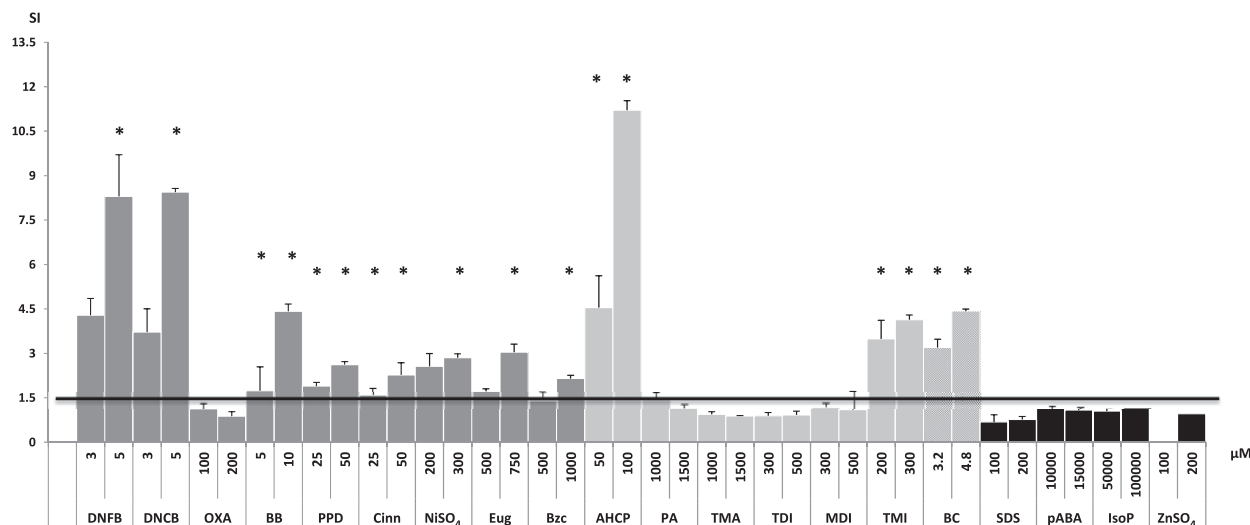


Fig. 3. Concentration–response effects of selected chemicals on the phenotypic response of the bone marrow-derived dendritic cells. Expression of the four markers was monitored by flow cytometry. The percentage of mature cells was obtained by calculating the mean \pm standard error of the mean of the percentage of cells highly positive for the four markers analysed, and results are expressed as the stimulation index (SI), as described in Materials and Methods. Asterisks indicate significant differences between treated and control cells ($*p < 0.05$).

is accompanied by changes in the expression of surface markers. These are therefore potential biomarkers for an *in vitro* assay. Another advantage of the LLNA is that it generates dose–response data on lymphocyte proliferation. These quantitative data are used to derive the EC₃, which is the effective concentration that induces a threefold increase in lymphocyte proliferation (20, 33). The EC₃ correlates relatively well with known human thresholds for contact allergy (34–36). The LLNA EC₃ is used for subcategorization of skin sensitizers, for example in the CLP subcategories 1A (EC₃ \leq 2%; strong skin sensitizers) and 1B (EC₃ > 2%; other skin sensitizers) (14). Clearly, novel predictive test methods or strategies for skin sensitization need to provide information that allow both hazard identification and potency subcategorization of contact allergens.

In this study, we attempted to develop a novel *in vitro* assay based on BMDC maturation to detect the allergenic potential of chemicals. Activation/maturation of immature BMDCs was assessed by analysing the expression of the MHC II, CD40, CD54 and CD86 phenotypic markers, and by investigating cytokine release in order to corroborate the changes in the levels of surface molecules. We initially optimized the assay protocol in order to achieve two results: (i) a high percentage of CD11c⁺ DCs showing an immature phenotype on day 9 of BMDC culture; and (ii) significant upregulation of surface markers after LPS treatment. We then evaluated the predictive performance of the BMDC assay by using

20 chemicals. Our results showed good sensitivity (69%) and accuracy (75%). The BMDC assay showed excellent specificity; all non-chemical allergens analysed had a SI of <1.5. Moreover, 12 of 16 allergens had a SI of \geq 1.5: DNFB (8.3), DNCB (8.5), BB (4.4), PPD (2.6), Cinn (2.3), NiSO₄ (2.9), Eug (2.9), Bzc (2), AHCP (11.2), PA (1.5), TMI (4.1), and BC (4.4) (Fig. 3). Analysis of the cytokines released in the culture supernatants confirmed the results obtained with the membrane markers, but did not lead to better discrimination of the contact or respiratory allergens or to an improvement in the performance of the BMDC assays. Finally, a significant correlation was found between the *in vivo* LLNA EC₃ values and the EC₃ values obtained for allergens with the BMDC (Pearson correlation: $r = 0.952$, $p = 0.003$, $n = 8$; Fig. 5). It is therefore possible to categorize chemicals according to their allergenic potential by using the BMDC model proposed here. According to LLNA guidelines (OECD-TG429), chemicals are considered to be sensitizers when the SI is >3 (9). Moreover, *in vivo* LLNA EC₃ values, derived from the calculated SI, allow chemicals to be categorized according to their sensitizing potential. To categorize chemicals in this study, we selected the analysis of the phenotypic response of the BMDC model based on the percentage of highly positive cells that give a SI of 3. To compare the BMDC assay proposed in this study with the LLNA, an EC₃ was extrapolated from the concentration–response experiments (Fig. 3). The EC₃ values obtained for each chemical with the *in vitro* BMDC assay are compared with

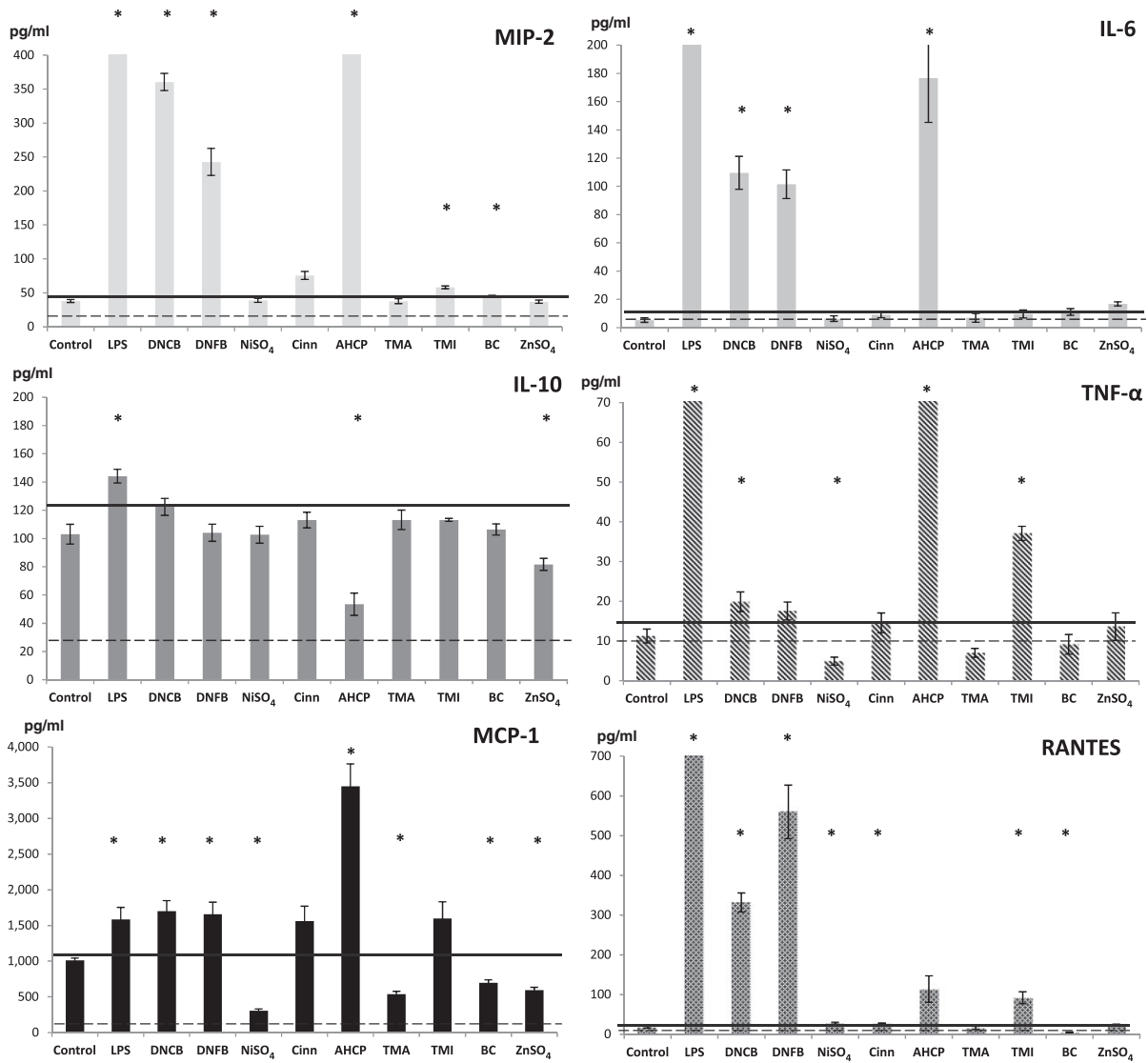


Fig. 4. Effects of selected chemicals on cytokine release by bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) after treatment for 48 h. BMDCs were incubated with the highest CV₈₀ concentrations of 10 reagents. Lipopolysaccharide (LPS) was used as the positive control. For each cytokine, the positive threshold was calculated from the means of untreated cells + 3 × standard error of the mean (SEM) (black horizontal line). The limit of detection is represented by the dashed horizontal line. Results are expressed in pg/mL and as mean ± SEM calculated from at least three independent experiments. Asterisks indicate significant differences between treated and control cells (*p* < 0.05).

the published *in vivo* LLNA EC₃ values shown in Table 2. With the exception of Oxa (which could not be classified in our model) and Cinn (categorized as a strong allergen here, but as only a moderate allergen in the LLNA), all of the contact allergens could be categorized in the same way as in the LLNA (Table 2).

Nine of the chemical allergens tested were well-characterized contact allergens (Oxa, DNCB, DNFB, BB, PPD, Cinn, NiSO₄, Eug, and Bzc). All except one of the chemicals were classified correctly, including

pre-/pro-haptens and weak sensitizers, giving a high level of accuracy for contact allergens (92%). Only Oxa was misclassified. Oxa is recognized as a contact allergen, and is frequently used as an extreme contact sensitizer for reference (EC₃_{LLNA} = 0.003) (37, 38). In this study, Oxa did not cause any activation of BMDCs. The result remained negative despite the large range of concentrations tested (data not shown). In previous *in vivo* tests such as the LLNA, Oxa was used with a mixture of acetone and olive oil as the vehicle; however, this vehicle is not compatible

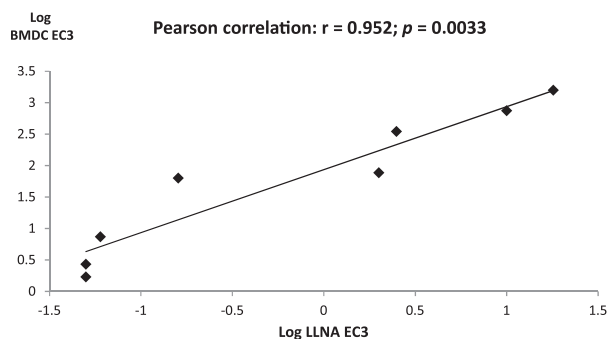


Fig. 5. Correlation between the *in vivo* local lymph node assay (LLNA) effective concentration (EC) 3 values and the EC3 values obtained for allergens with bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs). The concentration of chemical that provides the EC for a stimulation index of 3 (EC3) was calculated by linear extrapolation, as described in Materials and Methods, and was compared with the LLNA EC3 value. Pearson correlation: $r = 0.952$, $p = 0.003$.

with *in vitro* models that use submerged cell cultures. Other studies based on the use of cell models have also found an underestimation of the allergenic potential of Oxa (38, 39, 41), so this discrepancy is apparently not limited to the BMDC assay. Moreover, a recent *in vivo* model of inhalation in rats showed that the Oxa could be considered to be a respiratory allergen in the same way as TMA (42). Given these observations, Oxa might not be a good reference chemical for the development of future *in vitro* models for assessments of allergenic potential.

In many countries, nickel is the most common cause of ACD, and it is considered to be a skin sensitization positive control by the ECETOC (43). Some studies have shown that the non-conserved histidines 456 and 458 of human toll-like receptor (TLR) 4 are required for DC activation by nickel, and these two residues are different in murine TLR4 (44). However, nickel has been shown to activate murine DCs in previous studies (27, 45, 46). In our murine cellular model, NiSO_4 was able to activate BMDCs, confirming the previous findings. The mechanism involved in the activation was not investigated in our study.

Some chemicals yielded discordant results in the BMDC assay and the LLNA (Table 2). In particular, four respiratory allergens (PA, TMA, TDI, and MDI) gave FN results in the BMDC assay, highlighting the limitations of this assay. According to our results (Table 1), these chemicals were the least cytotoxic, however, they are also highly unstable in water. For example, anhydrides (TMA and PA) are readily hydrolysed in water, and diisocyanates produce inert, solid, insoluble polyurea compounds. The hydrolysis of diisocyanates in aqueous solution is rapid, with a half-life of <20 seconds. Factors such

as chemical solubility, reactivity and metabolic activation, which may mask the potential allergenicity of some chemicals, must therefore be considered when *in vitro* assays are developed. This is mainly because of solubility and stability issues in cell-based assays, in which the chemical must be added to the submerged cell culture medium. To overcome this problem, reconstituted human epidermis, which would allow chemicals to be solubilized in organic solvents such as acetone/olive oil, is under development (47, 48). The issue of chemical instability could be solved by developing the nanoprecipitation process for encapsulation of chemical allergens, which would improve the bioavailability of chemicals in conventional cell culture media (49).

Although Bzc is classified as a non-sensitizer by the LLNA, in our model it is a weak allergen (Table 2), consistent with other *in vitro* studies (13, 50). Bzc is a well-known contact allergen, and is involved in cases of ACD. A further discordance between the BMDC and the LLNA classifications was found for SDS, which is a non-allergen according to the BMDC assay but is a positive sensitizer in the LLNA. SDS is a surfactant known to be an irritant in humans. It is classified as a non-allergen in humans and is a FP in the LLNA (51). Irritation may thus be a confounding factor in the LLNA (52), and the published EC3 values alone cannot provide any information on the irritant potential of a chemical. Although it has proven to be a difficult chemical when tested with various *in vitro* approaches (53, 54), our BMDC assay can correctly classify this substance.

Of the other allergens tested in this study, three (BC, AHCP, and TMI) induced strong activation of BMDCs, and were classified as extreme, strong and moderate allergens, respectively (Fig. 3 and Table 2). AHCP and TMI are known respiratory allergens, and have been used as reference sensitizers in several studies (13, 40, 50, 55, 56). Our results agree with previous findings, and the BMDC assay allowed us to classify these chemicals as allergens. The first studies describing BC as a contact allergen were based on positive patch test results for reported cases of ACD, presumably owing to BC exposure. This conclusion has since been challenged, on the basis of misinterpretation of these clinical tests owing to the strong irritant potential of this substance (57). BC is therefore commonly used in studies as an irritant non-sensitizer (38, 50, 58). However, recent studies have shown that the BC could, in fact, be a contact sensitizer (59–64). Furthermore, BC belongs to the quaternary family of ammonium compounds, whose use as biocides is steadily increasing. Many cases of occupational asthma have been attributed to these agents, including BC (65–67).

Table 2. Comparison of the bone marrow-derived dendritic cell (BMDC) assay performance with the local lymph node assay (LLNA) performance, according to the effective concentration (EC) 3 values

| Chemical | Clinical class | LLNA EC3 (%) ^a | LLNA classification | BMDC EC3 calculated (μ M) | BMDC classification |
|------------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|
| Oxazolone | Contact | 0.003 | Extreme | – | NC |
| Dinitrofluorobenzene | Contact | 0.03 | Extreme | 2 | Extreme |
| Dinitrochlorobenzene | Contact | 0.05 | Extreme | 3 | Extreme |
| Brandrowski's base | Contact | 0.06 | Extreme | 7 | Extreme |
| <i>p</i> -Phenylenediamine | Contact | 0.16 | Strong | 63 | Strong |
| Cinnamal | Contact | 2.00 | Moderate | 77 | Strong |
| NiSO ₄ | Contact | 2.50 | Moderate | 350 | Moderate |
| Eugenol | Contact | 10.00 | Weak | 740 | Weak |
| Benzocaine | Contact | – | NS | 1590 | Weak |
| Ammonium hexachloroplatinate | Respiratory | 1.15 ^b | – | 38 | Strong |
| Phthalic anhydride | Respiratory | 0.16 | Strong | – | NC |
| Trimellitic anhydride | Respiratory | 0.22 | Strong | – | NC |
| Toluene diisocyanate | Respiratory | 0.11 | Strong | >2000 | NS |
| Diphenylmethane diisocyanate | Respiratory | 0.30 | Strong | – | NC |
| <i>p</i> -Tolyl isocyanate | Respiratory | – | – | 125 | Moderate |
| Benzalkonium chloride | Respiratory/contact | – | NS | 3 | Extreme |
| Sodium dodecyl sulfate | Irritant | 14 ^c | NS ^c | >2000 | NS |
| <i>p</i> -Aminobenzoic acid | Irritant | – | NS | >2000 | NS |
| ZnSO ₄ | Negative control | – | NS | – | NC |
| Isopropanol | Negative control | – | NS | – | NC |

NC, not calculated; NS, non-sensitizing according to the LLNA or BMDC assay classification.

The LLNA classification is based on the available EC3 values (%) according to the following categorization (29, 37): extreme, <0.1; strong, ≥ 0.1 to <1; moderate, ≥ 1 to <10; weak, ≥ 10 to <100.

The extrapolated EC3 (μ M) values obtained in this study allow the following classification to be proposed: extreme, <10; strong, ≥ 10 to <100; moderate, ≥ 100 to <500; weak, ≥ 500 to <2000.

^aLLNA EC3 values were taken from the literature (13, 38–40).

^bA nonstandard LLNA in which BALB/c strain mice were used with a single topical application of chemical, and lymph nodes were harvested on day 3.

^cSodium dodecyl sulfate is ranked as a weak to moderate sensitizer by the LLNA. However, as this is a false positive, we have recorded it here as a non-sensitizer.

The discrepancies between the *in vivo* LLNA and human clinical data for Bzc, SDS and also BC indicate that any *in vitro* assay developed to replace animal models should correlate with the 'gold standard' LLNA and that, when possible, results should also be compared with human clinical data. Alternative tests (3R concept) addressing single key events [protein reactivity (KE1), keratinocyte response (KE2), and DC activation (KE3)] of the AOP for skin sensitization have been validated for hazard identification (14). However, the prediction of skin sensitization potency is also crucial for adequate risk assessment. The three non-animal test methods (DPRA, KeratinosensTM, and h-CLAT) for skin sensitization accepted as test guidelines by the OECD cannot be used as stand-alone methods for predicting sensitization potency (e.g. as strong, moderate, or weak) (18). Data generated with these *in vitro* test methods should be considered in the context of integrated approaches, such as

an integrated approach to testing and assessment (IATA) or an integrated testing strategy (ITS), and combined with other complementary information. Other similar test methods, such as our BMDC assay, that address the KEs are currently under development to complete the test guidelines work plan.

In conclusion, the BMDC assay is an original and promising tool for rapid screening of the allergenic potential of chemicals *in vitro*. By analysing the expression of phenotypic markers, we have shown that BMDCs can reproducibly discriminate allergens from non-allergens. Moreover, our BMDC model classified chemicals according to their allergenic potency. The next step should include the testing of additional reference chemicals (contact allergens, respiratory allergens, and non-allergens) in order to establish a robust predictive model that could possibly discriminate between contact and respiratory chemical allergens.

References

- Wong C L, Ghassabian S, Smith M T, Lam A L. In vitro methods for hazard assessment of industrial chemicals – opportunities and challenges. *Front Pharmacol* 2015; **6**: 94.
- Fernandez-Nieto M, Quirce S, Carnes J, Sastre J. Occupational asthma due to chromium and nickel salts. *Int Arch Occup Environ Health* 2006; **79**: 483–486.
- Spoerri I, Scherer K, Michel S et al. Detection of nickel and palladium contact hypersensitivity by a flow cytometric lymphocyte proliferation test. *Allergy* 2015; **70**: 323–327.
- Basketter D A, Lemoine S, McFadden J P. Skin sensitisation to fragrance ingredients: is there a role for household cleaning/maintenance products? *Eur J Dermatol* 2015; **25**: 7–13.
- Yamamoto O, Tokura Y. Photocontact dermatitis and chloracne: two major occupational and environmental skin diseases induced by different actions of halogenated chemicals. *J Dermatol Sci* 2003; **32**: 85–94.
- Cahill J, Williams J D L, Matheson M C et al. Occupational contact dermatitis: a review of 18 years of data from an occupational dermatology clinic in Australia. Research Reports. Canberra, Safe Work Australia, 2012.
- Cochrane S A, Arts J H, Ehnes C et al. Thresholds in chemical respiratory sensitisation. *Toxicology* 2015; **333**: 179–194.
- Kimber I, Dearman R J, Basketter D A, Boverhof D R. Chemical respiratory allergy: reverse engineering an adverse outcome pathway. *Toxicology* 2014; **318**: 32–39.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Guidelines for testing of chemicals. Draft Guideline No. 429. Skin sensitisation: the local lymph node assay, 2001.
- (ONU) NU. *Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH)* 5th revised edition: New York and Geneva, United Nations, 2013.
- European Commission. Regulation (EC) No. 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. 1907/2006. *Off J Eur Union* 2008; **L353**.
- European Commission. 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 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No. 793/93 and Commission Regulation (EC) No. 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. *Off J Eur Union* 2006; **L:136/133**.
- dos Santos G G, Reinders J, Ouwehand K et al. Progress on the development of human in vitro dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; **236**: 372–382.
- Ezendam J, Braakhuis H M, Vandebriel R J. State of the art in non-animal approaches for skin sensitization testing: from individual test methods towards testing strategies. *Arch Toxicol* 2016; **90**: 2861–2883.
- MacKay C, Davies M, Summerfield V, Maxwell G. From pathways to people: applying the adverse outcome pathway (AOP) for skin sensitization to risk assessment. *ALTEX* 2013; **30**: 473–486.
- Hennen J, Blömeke B. Keratinocytes improve prediction of sensitization potential and potency of chemicals with THP-1 cells. *ALTEX* 2017; **34**: 279–288.
- Mehling A, Eriksson T, Eltze T et al. Non-animal test methods for predicting skin sensitization potentials. *Arch Toxicol* 2012; **86**: 1273–1295.
- Delrue N, Sachana M, Sakuratani Y et al. The adverse outcome pathway concept: a basis for developing regulatory decision-making tools. *Altern Lab Anim* 2016; **44**: 417–429.
- OECD. *The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins*: Paris, OECD Publishing, 2014.
- Kimber I, Basketter D A, Gerberick G F et al. Chemical allergy: translating biology into hazard characterization. *Toxicol Sci* 2011; **120**(Suppl. 1): S238–S268.
- Toebak M J, Gibbs S, Bruynzeel D P et al. Dendritic cells: biology of the skin. *Contact Dermatitis* 2009; **60**: 2–20.
- Casati S, Worth A, Amcoff Sven P et al. EURL ECVAM Strategy for Replacement of Animal Testing for Skin Sensitisation Hazard Identification and Classification. Publications Office of the European Union 2013.
- OECD. *Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)*: Paris, OECD Publishing, 2015.
- OECD. *Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT)*: Paris, OECD Publishing, 2016.
- OECD. *Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method*: Paris, OECD Publishing, 2015.
- EURL ECVAM. Status report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods and approaches, 2016.
- Pepin E, Goutet M, Ban M. Murine bone marrow-derived dendritic cells as a potential in vitro model for predictive identification of chemical sensitizers. *Toxicol Lett* 2007; **175**: 89–101.
- Casati S, Aeby P, Kimber I et al. Selection of chemicals for the development and evaluation of in vitro methods for skin sensitisation testing. *Altern Lab Anim* 2009; **37**: 305–312.
- ECETOC. *Contact Sensitisation: Classification According to Potency*. Technical Report No 87: Brussels, European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, 2003.
- Rovida C, Basketter D, Casati S et al. Management of an integrated project (Sens-it-iv) to develop in vitro tests to assess sensitisation. *Altern Lab Anim* 2007; **35**: 317–322.
- Inaba K, Swiggard W J, Steinman R M et al. Isolation of dendritic cells. *Curr Protoc Immunol* 2009; Chapter 3: Unit 3 7.
- Azam P, Peiffer J L, Chamousset D et al. The cytokine-dependent MUTZ-3 cell line as an in vitro model for the screening of contact sensitizers. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; **212**: 14–23.
- Basketter D A, White I R, McFadden J P, Kimber I. Skin sensitization: implications for integration of clinical data into hazard identification and risk assessment. *Hum Exp Toxicol* 2015; **34**: 1222–1230.
- Basketter D A, Andersen K E, Lidén C et al. Evaluation of the skin sensitizing potency of chemicals by using the existing methods and considerations of relevance for elicitation. *Contact Dermatitis* 2005; **52**: 39–43.
- Griem P, Goebel C, Scheffler H. Proposal for a risk assessment methodology for skin sensitization based on sensitization potency data. *Regul Toxicol Pharmacol* 2003; **38**: 269–290.
- Schneider K, Akkan Z. Quantitative relationship between the local lymph node assay and human skin sensitization

- assays. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004; **39**: 245–255.
- 37 Loveless S E, Api A M, Crevel R W et al. Potency values from the local lymph node assay: application to classification, labelling and risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 2010; **56**: 54–66.
- 38 Saito K, Miyazawa M, Nukada Y et al. Development of an in vitro skin sensitization test based on ROS production in THP-1 cells. *Toxicol In Vitro* 2013; **27**: 857–863.
- 39 Lambrechts N, Vanheel H, Nelissen I et al. Assessment of chemical skin-sensitizing potency by an in vitro assay based on human dendritic cells. *Toxicol Sci* 2010; **116**: 122–129.
- 40 Gerberick G F, Ryan C A, Kern P S et al. Compilation of historical local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods. *Dermatitis* 2005; **16**: 157–202.
- 41 Emter R, Ellis G, Natsch A. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; **245**: 281–290.
- 42 Kuper C F, Radonjic M, van Triel J et al. Oxazolone (OXA) is a respiratory allergen in Brown Norway rats. *Toxicology* 2011; **290**: 59–68.
- 43 Thyssen J P, Uter W, McFadden J et al. The EU Nickel Directive revisited – future steps towards better protection against nickel allergy. *Contact Dermatitis* 2011; **64**: 121–125.
- 44 Schmidt M, Raghavan B, Müller V et al. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol* 2010; **11**: 814–819.
- 45 Cruz M T, Gonçalves M, Paiva A et al. Contact sensitizers downregulate the expression of the chemokine receptors CCR6 and CXCR4 in a skin dendritic cell line. *Arch Dermatol Res* 2005; **297**: 43–47.
- 46 Watanabe M, Ishimaru N, Ashrin M N et al. A novel DC therapy with manipulation of MKK6 gene on nickel allergy in mice. *PLoS ONE* 2011; **6**: e19017.
- 47 Corsini E, Galbiati V, Mitjans M et al. NCTC 2544 and IL-18 production: a tool for the identification of contact allergens. *Toxicol In Vitro* 2013; **27**: 1127–1134.
- 48 Saito K, Nukada Y, Takenouchi O et al. Development of a new in vitro skin sensitization assay (Epidermal Sensitization Assay; EpiSensA) using reconstructed human epidermis. *Toxicol In Vitro* 2013; **27**: 2213–2224.
- 49 Cortial A, Nosbaum A, Rozieres A et al. Encapsulation of hydrophobic allergens into nanoparticles improves the in vitro immunological diagnosis of allergic contact dermatitis. *Nanomedicine* 2015; **11**: 1029–1033.
- 50 Natsch A, Ryan C A, Foertsch L et al. A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *J Appl Toxicol* 2013; **33**: 1337–1352.
- 51 Basketter D A, Kimber I. Skin irritation, false positives and the local lymph node assay: a guideline issue? *Regul Toxicol Pharmacol* 2011; **61**: 137–140.
- 52 Ball N, Cagen S, Carrillo J C et al. 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* 2011; **60**: 389–400.
- 53 Python F, Goebel C, Aeby P. Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; **220**: 113–124.
- 54 Reuter H, Gerlach S, Spieker J et al. Evaluation of an optimized protocol using human peripheral blood monocyte derived dendritic cells for the in vitro detection of sensitizers: results of a ring study in five laboratories. *Toxicol In Vitro* 2015; **29**: 976–986.
- 55 Dearman R J, Basketter D A, Kimber I. Inter-relationships between different classes of chemical allergens. *J Appl Toxicol* 2013; **33**: 558–565.
- 56 Plitnick L M, Loveless S E, Ladics G S et al. Cytokine mRNA profiles for isocyanates with known and unknown potential to induce respiratory sensitization. *Toxicology* 2005; **207**: 487–499.
- 57 Basketter D A, Marriott M, Gilmour N J, White I R. Strong irritants masquerading as skin allergens: the case of benzalkonium chloride. *Contact Dermatitis* 2004; **50**: 213–217.
- 58 Cao Y-P, Ma P-C, Liu W-D et al. Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals in THP-1/keratinocyte co-cultures. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2012; **34**: 196–204.
- 59 Basketter D A, Kimber I. Skin sensitization, false positives and false negatives: experience with guinea pig assays. *J Appl Toxicol* 2010; **30**: 381–386.
- 60 Dao H Jr, Fricker C, Nedorost S T. Sensitization prevalence for benzalkonium chloride and benzethonium chloride. *Dermatitis* 2012; **23**: 162–166.
- 61 Suneja T, Belsito D V. Occupational dermatoses in health care workers evaluated for suspected allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 2008; **58**: 285–290.
- 62 Uter W, Lessmann H, Geier J, Schnuch A. Is the irritant benzalkonium chloride a contact allergen? A contribution to the ongoing debate from a clinical perspective. *Contact Dermatitis* 2008; **58**: 359–363.
- 63 Uter W, Räämsch C, Aberer W et al. The European baseline series in 10 European Countries, 2005/2006 – results of the European Surveillance System on Contact Allergies (ESSCA). *Contact Dermatitis* 2009; **61**: 31–38.
- 64 Wentworth A B, Yiannias J A, Davis M D, Killian J M. Benzalkonium chloride: a known irritant and novel allergen. *Dermatitis* 2016; **27**: 14–20.
- 65 Bellier M, Barnig C, Renaudin J M et al. Importance of specific inhalation challenge in the diagnosis of occupational asthma induced by quaternary ammonium compounds. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2015; **3**: 819–820.
- 66 Marple B, Roland P, Benninger M. Safety review of benzalkonium chloride used as a preservative in intranasal solutions: an overview of conflicting data and opinions. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; **130**: 131–141.
- 67 Purohit A, Kopferschmitt-Kubler M C, Moreau C et al. Quaternary ammonium compounds and occupational asthma. *Int Arch Occup Environ Health* 2000; **73**: 423–427.

**Annexe 2 : Article "Activation
of T cells by dendritic cells
exposed to a reference
sensitizer: Towards a promising
model to assess the allergenic
potential of chemicals"**

ORIGINAL ARTICLE

Activation of T cells by dendritic cells exposed to a reference sensitizer: Towards a promising model to assess the allergenic potential of chemicals

Cécile Huppert^{1,2} | Christophe Paris^{2,3} | Isabelle Langonné¹ | Samuel Muller¹ |
Julianne Mathiot¹ | Hakima Abdessadeq¹ | François Gagnaire¹ | Fabrice Battais^{1†} |
Isabelle Sponne^{1†}

¹Department of Toxicology and Biometry, National Institute for Research and Safety (INRS), Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France

²Faculté de Médecine, INGRES, EA 7298, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

³INSERM, Unité U1085-IRSET, Rennes, France

Correspondence

Dr Isabelle Sponne, National Institute for Research and Safety (INRS), Department of Toxicology and Biometry, Rue du Morvan, CS 60027, 54019 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

Email: isabelle.sponne@inrs.fr

Background: Low molecular weight chemicals constitute one of the major causes of occupational allergies. European legislation on chemicals recommends limiting the use of *in vivo* models for assessing the sensitizing potential of chemicals, and encourages the development of integrated alternative methods. An *in vitro* mouse model of bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) that showed good accuracy (75%) and sensitivity (69%) has previously been developed to assess the sensitizing potential of chemicals.

Objective: To assess the ability of BMDCs to activate T cells (TCs) *in vitro*.

Methods: BMDCs pre-exposed to the reference sensitizer ammonium hexachloroplatinate (AHCP) were co-cultured with different subpopulations of TCs. TC activation was assessed by surface marker expression, proliferation, and cytokine release.

Results: The results showed significant activation of TCs co-cultured with dendritic cells pre-exposed to AHCP as evaluated by CD124 expression, proliferation, and cytokine secretion. Moreover, the response of TCs appeared to be Th2-oriented. Naive TCs were shown to be involved in this response, and the removal of regulatory TCs did not improve the cell response.

Conclusions: The BMDCs used in this previously developed model appear to have the ability to activate TCs, confirming that the BMDC model represents a reliable assay for assessing the sensitizing potential of chemicals.

KEYWORDS

chemical allergens, dendritic cells, *in vitro* assay, T cells

1 | INTRODUCTION

Occupational allergies constitute an important health issue that may be caused, in particular, by low molecular weight chemicals.^{1,2}

[†]These senior authors contributed equally to this manuscript

Abbreviations: AHCP, ammonium hexachloroplatinate; BD, Becton Dickinson; BMDC, bone marrow-derived dendritic cell; CBA, cytometric bead array; CFSE, carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester; DC, dendritic cell; FBS, fetal bovine serum; HBSS, Hank's balanced salt solution; h-CLAT, human cell line activation test; IFN, interferon; IL, interleukin; IMDM, Iscove's modified Dulbecco's medium; LPS, lipopolysaccharide; RPMI, Roswell Park Memorial Institute; TC, T cell; Treg, regulatory T cell.

Exposure to these chemicals mainly induces contact hypersensitivity and respiratory sensitization, both of which can have important adverse health effects and can lead to detrimental socioeconomic consequences.^{3,4} Two pieces of legislation—(1) the 2008 amendment to the Regulation under the United Nations Globally Harmonized System for Classification, Labeling, and Packaging of substances and mixtures (Regulation [EC] No. 1272/2008)⁵ and (2) the European regulation of Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemical substances—recommend assessing the sensitizing potential of chemicals prior to their launch on the European market. In this context, *in chemico* and *in vitro* methods have been developed to

replace animal testing. Some of them have already been validated. These include the direct peptide reactivity assay (TG 442C⁶), an *in chemico* method; the KeratinoSens (TG 442D⁷), an *in vitro* method using a keratinocyte cell line; the human cell line activation test (h-CLAT; TG 442E⁸), which uses the human monocytic leukaemia cell line THP-1; the U-SENS (similar to the h-CLAT, but using the U937 cell line); and the interleukin (IL)-8 Luc assay, which uses the THP-1 cell line.⁸ Each of these tests deals with the first 3 of 4 key events in the sensitization process, namely, the covalent interaction with proteins, and keratinocyte and dendritic cell (DC) activation.⁹ Although some teams are currently working on *in vitro* T cell (TC) priming assays,⁹⁻¹¹ none of the methods that address the activation of TCs, which is the final and decisive step in the sensitization process, have been validated to date. In the TC priming process, DCs play a central role through their ability to uptake, process and present haptenated self-proteins to TCs.¹¹⁻¹³ Co-culture models involving different types of human DC and TC have already been described,¹⁴⁻¹⁷ however, they have a number of limitations, such as scarce supplies of fresh human cells, the handling of potentially infectious material, and wide interdonor variability. The use of mouse cells allows heterologous incompatibility to be avoided, and can lead to more homogeneous results.¹⁸

A DC activation model based on bone marrow-derived DCs (BMDCs) was previously developed in our laboratory, and showed encouraging results for a wide range of reference chemicals.^{19,20} In the present study, we aimed to assess the functionality of activated murine DCs by evaluating their ability to prime naive TCs and induce a proliferative response *in vitro*.

2 | METHODS

In order to evaluate the ability of DCs to prime TCs, the activated DCs were co-cultured with mouse splenic TCs. DC activation was carried out with lipopolysaccharide (LPS) and ammonium hexachloroplatinate (AHCP) (CAS no. 16919-58-7), a reference sensitizer.²¹⁻²³ TC activation was evaluated by measuring cell proliferation, the expression of membrane markers, and cytokine secretion.^{4,24} To develop this model, the optimal conditions for cell culture were first determined. The most relevant activation parameters were then selected, and the roles played by the different subpopulations of TCs in the observed response were evaluated.

2.1 | Preparation of chemicals

The 2 substances (AHCP and LPS) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (Saint Quentin Fallavier, France), and were of the highest purity available. Chemicals were prepared in Hank's balanced salt solution (HBSS) (Invitrogen, Carlsbad, California). Fresh solutions were prepared for each experiment.

2.2 | Generation and treatment of immature DCs

Animal experiments were performed in line with ethical regulations on animal experimentation (European Directive 2010/63/EU) in an

animal facility accredited by the French Ministry of Agriculture (Accreditation D54-547-10). The present study was approved by the local ethics committee, and was registered as AE-2015-002.

BALB/c mouse BMDCs were generated with a method described previously.^{20,25} Cells were cultured in 150-mm Petri dishes, in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 50 µM 2-mercaptoethanol (all from Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (BioWest, Nuaille, France), and 50 ng/mL recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Preprotech, Rocky Hill, New Jersey). BMDCs were briefly trypsinized (0.05% trypsin/0.02% EDTA; Sigma-Aldrich Chemical) on day 7, and washed, counted and plated in 6-well plates in complete medium. Chemicals dissolved in HBSS were added over a period 24 hours. On day 8, the cells were briefly trypsinized (0.05% trypsin/0.02% EDTA; Sigma-Aldrich Chemical), centrifuged (370 g, 6 min), resuspended in fresh medium, and distributed at 90 000 cells per well in 96-well plates for co-culture with TCs. Control samples were treated with the vehicle HBSS for 24 hours. LPS was used as a BMDC-activating positive control at 100 ng/mL.

2.3 | Isolation of murine TCs and BMDC-TC co-culture

The spleens of female naive BALB/c mice aged 6-8 weeks were removed, sliced and pushed into a 70 µm cell strainer with a syringe plunger in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 50 µM 2-mercaptoethanol, and 10% heat-inactivated FBS. TCs were enriched by selection with the mouse Pan T cell Isolation Kit II, the CD62L MicroBeads Kit, the CD25 MicroBead Kit, and the naive CD4⁺ and CD8a⁺ T Cell Isolation Kits (all from Miltenyi Biotec, Auburn, California), according to the manufacturer's instructions. Isolated TCs were added to the 96-well plates containing the pre-exposed DCs: 100 µL of the TC suspension in RPMI medium at 18×10^5 cells/mL was added to the wells containing 100 µL of the DC suspension in IMDM at 9×10^5 cells/mL (ratio: 1 DC/2 TCs). The plates were incubated at 37°C in 5% CO₂ for 12 to 72 hours.

Before the plating of TCs, carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) staining was performed in order to assess the proliferation of TCs.¹⁵ Fractionated TCs were labelled with CFSE for flow cytometric analysis of their proliferation. CFSE (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon) was added to cells to obtain a final concentration of 1.25 mM, and the cells were then incubated for 10 minutes at 37°C and washed twice in fresh medium before being distributed at 180 000 cells per well in the BMDCs containing 96-well plates for co-culture. Unlabelled cells were subjected to the same incubation and washing phases, but without the addition of CFSE. In order to avoid overlap between CFSE and monoclonal antibody fluorophores, some of the cells were left unstained for flow cytometric analysis of surface activation marker expression.

2.4 | Flow cytometry analysis and viability

CFSE-stained cells and non-CFSE-stained cells were analysed by flow cytometry. CFSE-stained cells were stained with PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD3 antibody (clone 145-2C11), BV786-conjugated anti-CD4 antibody (clone RM4-5), and PE-CF594-conjugated anti-CD8 antibody (clone 53-6.7). Non-CFSE-stained cells were stained with PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD3 antibody (clone 145-2C11), BV786-conjugated anti-CD4 antibody (clone RM4-5), PE-CF594-conjugated anti-CD8 antibody (clone 53-6.7), and PE-conjugated anti-CD11c antibody (clone HL3). To assess the activation of TCs, a number of different markers can be studied. Among these, we selected the hyaluronate receptor CD44, the very early activation antigen CD69, and the IL-4 receptor CD124.^{26–31} The antibodies used for the cytometry analysis included the following: BV605-conjugated anti-CD25 antibody (clone GL1), APC-Cy7-conjugated anti-CD44 antibody (clone IM7), APC-conjugated anti-CD69 antibody (clone H1.2F3) and BV421-conjugated anti-CD124 antibody (clone mL4R-M1) or isotype-matched control monoclonal antibodies. All antibodies were purchased from Pharmingen (BD Biosciences, le Pont de Claix, France). Surface staining was performed on fresh cells after co-culture, and the stained cells were analysed immediately on a Fortessa X20 flow cytometer with DIVA software (Becton Dickinson [BD], San Jose, California). BMDC population viability was assessed after 24 hours of exposure to chemicals by 7-aminoactinomycin D (7-AAD) staining (BD Biosciences, le Pont de Claix, France), and their activation was assessed with a PE-Cy7-conjugated anti-CD86 antibody (clone B7-2). The CD86 marker was analysed on the CD11c⁺ population (data not shown). After co-culture, debris and dead cells were eliminated from the analysis with a gate based on forward scatter and side scatter and by the use of LIVE/DEAD aqua fluorescent reactive dye (Life Technologies, Eugene, Oregon), respectively (Figure 1A). At least 20 000 cells were analysed for each sample.

FLOWJO v. 10.0.8 (FlowJo, Ashland, Oregon) was used for the analysis of FCS data files and the production of data illustrations. CD4⁺ and CD8⁺ gating was applied to the CD3⁺ population.

To evaluate TC activation, we used different membrane markers. CD44 is an adhesion molecule that is expressed at low levels on naive/resting TCs and upregulated on activated and memory TCs.²⁶ CD69 is a membrane-bound type II C-lectin receptor implicated in the homing and migration of activated lymphocytes.^{27,28} CD124 is the receptor of both IL-4 and IL-13 cytokines, whose (these?) are implicated in Th2 type differentiation, and its expression is upregulated on both CD4⁺ and CD8⁺ mature TCs.^{29,31} CD25, CD44, CD69 and CD124 markers were analysed on the CD3⁺, CD4⁺ or CD8⁺ populations, whereas the CD86 marker was analysed on the CD11c⁺ population. The percentage of positive cells was established by gating on the highly fluorescent cells (Figure 1A).

2.5 | Cytokine release

Interferon (IFN)- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13 production was used to explore activation of TCs.^{32–35} Supernatants were collected after 72 hours of co-culture, and stored at -80°C until analysis by cytometric bead array (CBA). BD CBA mouse IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-9

and IL-13 Flex Sets (BD Biosciences, San Jose, California) were used to quantify the amount of cytokine secreted in the supernatant, according to the manufacturer's instructions. The data were acquired with a BD FACSCanto II flow cytometry system (BD Biosciences), and the analyses were performed with BD F_{CAP} ARRAY v3.0 software (BD Biosciences).

2.6 | Statistical analysis

The results are presented as the mean of the percentage of positive cells \pm standard error of the mean (SEM). Student's *t*-test was applied for testing of differences between 2 groups. One-way ANOVA followed by a multiple-range test (with Bonferroni correction) was performed for comparison of the effects of various concentrations of AHCP on TC activation with those of the vehicles. Differences were considered statistically significant for *P* values of $\leq .05$.

3 | RESULTS

3.1 | Characterization of the activation of TCs after 72 hours of co-culture with BMDCs pre-exposed to a chemical

We first characterized the activation of TCs in order to select the most relevant markers to use in our model. Under our conditions of stimulation, CD44, CD69 and CD124 were significantly upregulated on CD3⁺ cells co-cultured for 72 hours with BMDCs pre-exposed to LPS and AHCP (Figure 1B). The percentages of positive cells in the CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ populations were higher with CD124 than with CD44 and CD69, so the CD124 surface marker was chosen to illustrate the following results.

The proliferation of TCs co-cultured for 72 hours with BMDCs pre-exposed to LPS and AHCP was significantly higher than that of TCs co-cultured with vehicle BMDCs. This increased proliferation was observed in the CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ populations (Figure 1C).

IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13 concentrations in supernatants collected from co-cultures conducted with BMDCs pre-exposed to AHCP and LPS were significantly higher than in those pre-exposed to HBSS. A significant increase in IL-2 secretion was found in the presence of BMDCs pre-exposed to LPS, but not in the presence of those pre-exposed to AHCP (Figure 1D). To determine the contributions of the CD4⁺ and CD8⁺ TCs, the different patterns of marker upregulation and proliferation in the CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations were examined. The results showed that the proportion of activated CD8⁺ TCs was higher than the proportion of activated CD4⁺ TCs (Figures 1B, 2, and 3).

3.2 | Influence of co-culture time on CD124 expression and proliferation of TCs

We investigated the influence of co-culture time on both the proliferation of TCs and their expression of CD124. The CD124 marker was strongly expressed on CD4⁺ and CD8⁺ TCs after 12, 36 and 72 hours of co-culture with BMDCs pre-exposed to LPS. CD124 showed significantly higher expression on both types of TC after 36 and

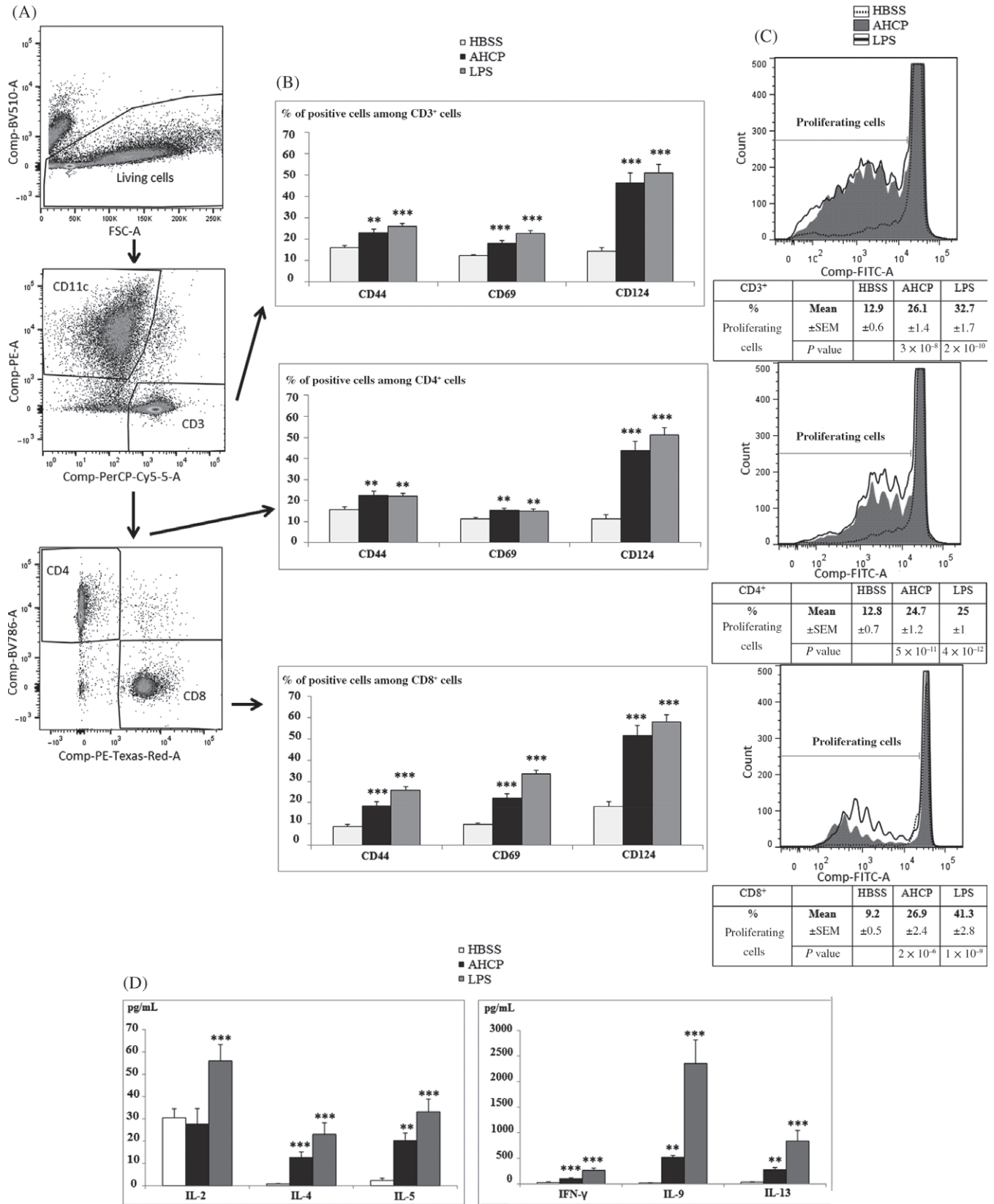


FIGURE 1 Phenotypic characterization of T cell (TC) activation after 72 hours of co-culture with bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) pre-exposed to chemicals. TCs were cultured for 72 hours with BMDCs pre-exposed to 100 μ M ammonium hexachloroplatinate (AHCP), 100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS), or the Hanks balanced salt solution (HBSS) vehicle control, and then stained with specific antibodies and analysed by flow cytometry. **A**, Data were processed with FLOWJO software with gating on live cells and CD3⁺ cells. Within the CD3⁺ population, the CD4⁺ and CD8⁺ populations were gated. **B**, CD44, CD69 and CD124 activation markers were studied in CD3⁺, CD4⁺ or CD8⁺ populations. **C**, After carboxyfluorescein diacetate succinidyl ester staining, proliferation was assessed in the CD3⁺ TC population and in its CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations. The histograms show an example of each proliferating cell population. The table under each figure shows the mean \pm SEM of the percentage of proliferating cells in each population, and the P values for each chemical. **D**, Cytokine secretion was measured in the supernatant after 72 hours of co-culture. Assays were performed 7 times with AHCP and 9 times with LPS. Data are mean \pm SEM. * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$. IFN, interferon; IL, interleukin

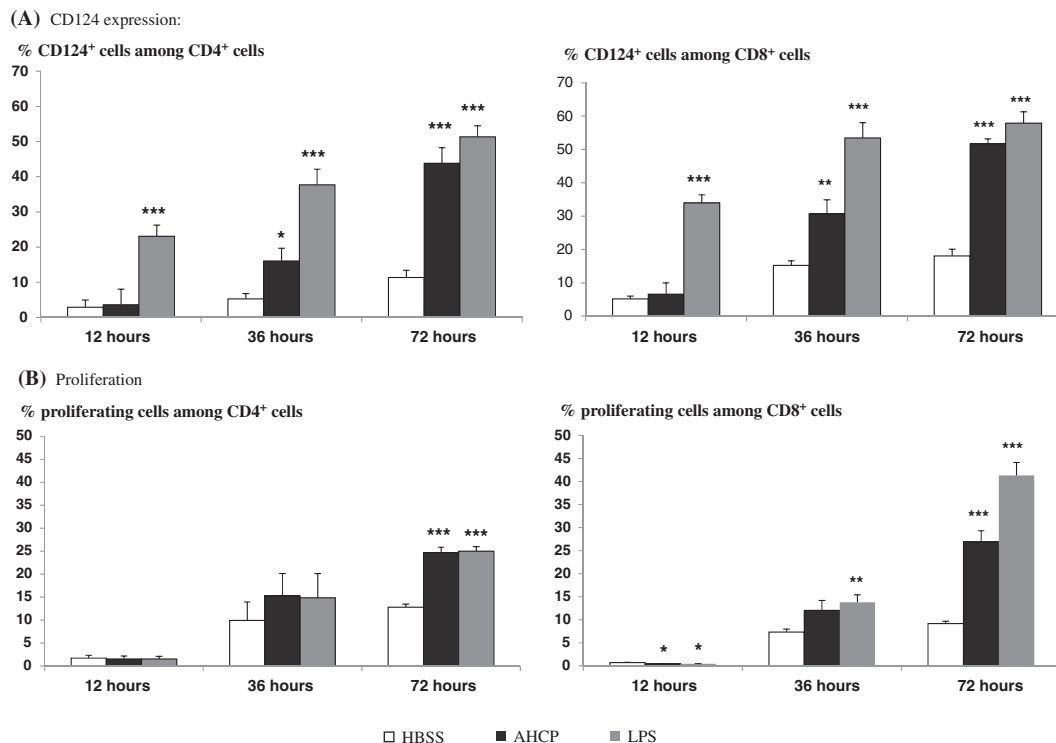


FIGURE 2 Phenotypic characterization of T cell (TC) activation after various durations of co-culture with bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) pre-exposed to chemicals: CD124 expression (A) and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester-stained proliferating TCs (B) were studied by flow cytometry after 12, 36 and 72 hours of culture with BMDCs pre-exposed to 100 μ M ammonium hexachloroplatinate (AHCP), 100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS), or the Hank's balanced salt solution (HBSS) vehicle control. Assays were performed 7 times with AHCP and 9 times with LPS at 72 hours, and twice with both AHCP and LPS at 12 and 36 hours. Data are mean \pm SEM. * P < .05; ** P < .01; *** P < .001

72 hours of co-culture with BMDCs pre-exposed to AHCP than after co-culture with BMDCs pre-exposed to HBSS. The maximum significance of CD124 expression, in both the CD4⁺ population and the CD8⁺ population, was observed after 72 hours of co-culture (Figure 2A).

At 36 hours, significant proliferation could only be observed for CD8⁺ cells co-cultured with BMDCs pre-exposed to LPS. At 72 hours, significant proliferation was observed for both CD4⁺ and CD8⁺ cells co-cultured with DCs pre-exposed to LPS or AHCP (Figure 2).

Owing to high mortality rates at 96 and 120 hours of co-culture (from 35% to 50% mortality; data not shown), the results were not considered at these 2 time-points of co-culture.

3.3 | Effects on TC activation of exposure of BMDCs to various concentrations of AHCP

The effects of different concentrations of AHCP (0, 12.5, 50, 75, 100, 150 and 200 μ M) were studied. The results showed that TC proliferation increased significantly at concentrations of AHCP of 50 μ M and above, in both the CD4⁺ population and the CD8⁺ population. The maximum rates of cell proliferation were reached at 100 μ M for the CD4⁺ population and at 150 μ M for the CD8⁺ population. BMDC viability was below the threshold of 80% after 24 hours of exposure to 150 and 200 μ M AHCP (Figure 3).

3.4 | Responses of different TC populations after co-culture with BMDC pre-exposed to AHCP

We next investigated the contribution of naive and memory TCs to the observed response in this model. To select the different subpopulations of TCs, we used enrichment kits to select CD62L⁺ and CD44⁻ TCs. CD62L is a marker used to characterize naive TCs,³⁶ whereas CD44 is used to characterize memory TCs.³⁷ Whereas both CD62L⁻ and CD62L⁺ cells were activated after 72 hours of co-culture with BMDCs pre-exposed to LPS, AHCP stimulation of BMDCs led to a mainly CD62L⁺ TC response (Figure 4). Proliferation and CD124 expression were compared between pan-TCs and CD4⁺ CD44⁻ cells in co-culture with BMDCs pre-exposed to AHCP and LPS. The proliferation response and CD124 expression were higher with AHCP than with HBSS in both pan-TCs and CD4⁺ CD44⁻ cells. Both increases were similar between pan-TCs and CD4⁺ CD44⁻ cells (Table 1). The expression of CD124 on CD4⁺ CD44⁻ cells was not significantly higher with LPS than with HBSS, but CD124 expression was significantly higher on pan-TCs. When CD8⁺ CD44⁻ cells were cultured alone with BMDCs pre-exposed to AHCP or LPS, neither activation nor surface marker expression was observed (Table 1).

To assess the involvement of regulatory T cells (Tregs), we used a kit that selects CD25⁺ Tregs.¹⁶ After enrichment of the whole TC population in CD25⁻ cells, proliferation and CD124 marker expression were assessed. Table 1 shows that, with CD25⁻ enriched cells,

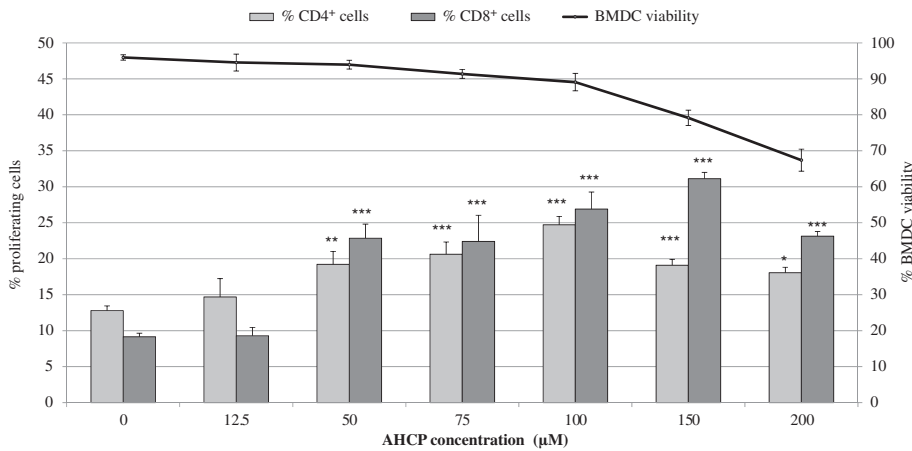


FIGURE 3 Effects of bone marrow-derived dendritic cell (BMDC) exposure to various concentrations of ammonium hexachloroplatinate (AHCP) on T cell activation. The percentages of live BMDCs after 24 hours of exposure to increasing concentrations of AHCP (0 [Hank's balanced salt solution], 12.5, 50, 75, 100, 150 and 200 μ M) are shown by the black line. Data are mean \pm SEM. * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$

there was a decrease in the significance level, both in the proliferating and in the CD124⁺ cells. The results were not significant for proliferation of CD25⁻ cells with either AHCP or LPS, or for CD124 expression with AHCP.

4 | DISCUSSION

In this study, we assessed the ability of DCs pre-exposed to a well-known reference sensitizer, AHCP,^{19,21,23} to activate TCs. For this purpose, DCs were co-cultured with TCs, and TC activation was evaluated through the expression of membrane markers on the TCs, cell proliferation, and cytokine secretion. First, we investigated the most relevant parameters for evaluating the activation of TCs co-cultured with DCs pre-exposed to LPS or AHCP. To evaluate the activation of TCs, 3 different membrane markers were used: CD44, CD69, and CD124. The results showed that all 3 activation markers were upregulated with both LPS and AHCP (Figure 1), showing that activated DCs were capable of inducing their expression and activating TCs. Lymphocyte proliferation was also used to characterize the response to allergens.⁴ Co-culture with DCs pre-exposed to AHCP led to

significant proliferation of TCs in our model, confirming the activation of TCs (Figure 1).

There is a significant difference in the proportions of CD4⁺ (70%) and CD8⁺ (25%) cells (data not shown) among the CD3⁺ TCs in mouse spleen. It is therefore important to discriminate between these 2 populations when analysing our results to ensure that the activation of CD8⁺ cells is not missed as a result of the higher proportion of CD4⁺ cells. Massive expansion of CD8⁺ TCs in response to antigens has already been described in another study.³⁸ In agreement with our results, the activation of the CD8⁺ TC population triggered by AHCP had previously been related to metal allergy and hapten-induced contact hypersensitivity.³⁹⁻⁴¹

The CD124 marker was selected as the most relevant for assessing TC activation in this model, as it showed the highest increases with AHCP and LPS as compared with HBSS. CD124 membrane marker expression has already been described in the Th2-type immune response,^{33,42,43} and AHCP has been reported to induce a Th2-type immune response after *in vivo* exposure.^{4,44-46} The following hypothesis can be suggested to explain the expression of CD124 induced by AHCP: DCs activated by their exposure to AHCP activate TCs, inducing IL-4 secretion, as shown in Figure 1D. The secreted IL-

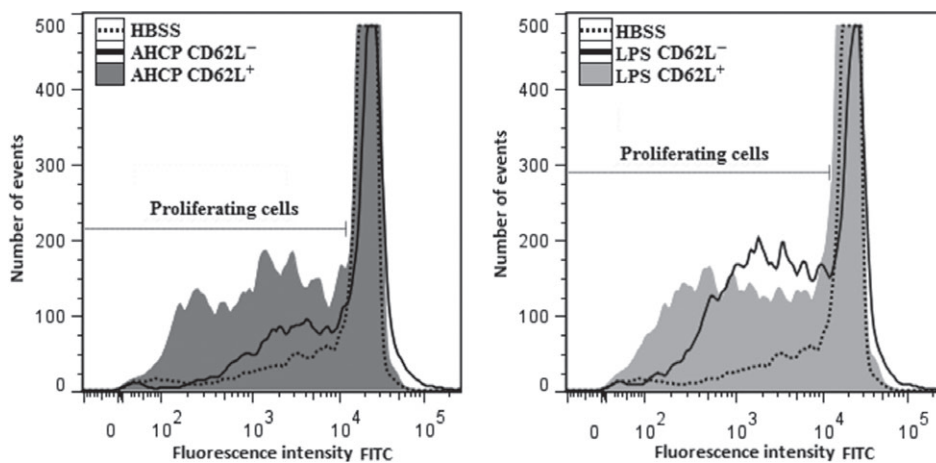


FIGURE 4 Activation of the CD62L⁺ and CD62L⁻ T cell populations by bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) pre-exposed to lipopolysaccharide (LPS) and ammonium hexachloroplatinate (AHCP): CD3⁺ CD62L⁺ or CD3⁺ CD62L⁻ enriched cell populations stained with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester were co-cultured for 72 hours with BMDCs pre-exposed to 100 μ M AHCP, 100 ng/mL LPS, or the Hank's balanced salt solution (HBSS) vehicle control. The histograms show an example of each proliferating population under the different exposure conditions. FITC, fluorescein isothiocyanate

TABLE 1 Activation of different T cell (TC) populations obtained by pan T cell selection, CD25 depletion and CD4⁺ CD44⁻ / CD8⁺ CD44⁻ selection: CD25⁻, CD4⁺ CD44⁻ or CD8⁺ CD44⁻ TCs were co-cultured for 72 hours with bone marrow-derived dendritic cells pre-exposed to 100 μM ammonium hexachloroplatinate (AHCP), 100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS), or the Hank's balanced salt solution (HBSS) vehicle control, and the results were then compared with those of assays performed on the pan-TC population

| | | Pan-TCs | | CD25 ⁻ | | CD4 ⁺ CD44 ⁻ | | CD8 ⁺ CD44 ⁻ | |
|------|------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| | | % proliferating cells | % CD124 ⁺ cells | % proliferating cells | % CD124 ⁺ cells | % proliferating cells | % CD124 ⁺ cells | % proliferating cells | % CD124 ⁺ cells |
| HBSS | Mean ± SEM | 12.9 ± 0.6 | 14.3 ± 1.8 | 20 ± 6.8 | 14.5 ± 4 | 7.4 ± 1.5 | 23.1 ± 7.2 | 8.3 ± 1.3 | 3.9 ± 0.8 |
| AHCP | Mean ± SEM | 26.1 ± 1.4 | 46.3 ± 4.5 | 28.2 ± 5.4 | 33.3 ± 7 | 21.5 ± 3 | 55.4 ± 5.1 | 6 ± 1 | 4.1 ± 0.5 |
| | P value | < .0001 | < .0001 | NS | NS | .0004 | .004 | NS | NS |
| LPS | Mean ± SEM | 32.7 ± 1.7 | 51 ± 3.8 | 35 ± 4.9 | 48.9 ± 7.3 | 15.8 ± 2.8 | 38.7 ± 5.8 | 9.5 ± 1.4 | 8.6 ± 3.1 |
| | P value | < .0001 | < .0001 | NS | .006 | .008 | NS | NS | NS |

NS, not significant; SEM, standard error of the mean.

The table shows the mean percentages of proliferating cells and of the CD124⁺ population ± SEM, and the P values for each culture condition. Assays were performed 7 times with AHCP and 9 times with LPS in pan-TCs, and 3 times in CD25⁻, CD4⁺ CD44⁻ and CD8⁺ CD44⁻ cells.

4 binds to the IL-4 receptor α chain (CD124),⁴⁷ and, through the JAK-STAT signalling pathway,⁴⁸ leads to transcription of the IL-4R gene and upregulation of CD124.⁴⁹ It is therefore possible that the expression of CD124 was linked to the Th2-type response, and that another sensitizer would not have induced this membrane marker expression. Even though the CD124 marker was efficient with AHCP (Figure 1B), it is possible that the upregulation of CD124 is less pronounced after exposure to a sensitizing agent known to induce a Th1 response, such as dinitrochlorobenzene. Thus, although we will test other reference chemical sensitizers with this model, we need to continue to analyse CD44, CD69 and CD124 markers when testing other known sensitizers with our model, especially known Th1-inducing chemicals. As far as cytokines were concerned, we observed increased secretion of Th2-type cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-13 in the supernatant of cells exposed to AHCP. In contrast, secretion of the Th1-type cytokine IL-2 was not modified by AHCP but was increased by LPS exposure. Together with the fact that the CD124 marker is also involved in Th2 differentiation, the data seem to be consistent with a Th2-oriented response. The Th2 orientation of the BALB/c strain could partly explain the Th2-oriented response observed. However, as shown by Nishino et al,⁵⁰ Th1-oriented strains such as C57/BL6N are susceptible to producing Th2-type cytokines in response to exposure to respiratory allergens. The specificity of the Th2-type response will be investigated in the future with assays on C57BL/6 mouse cells and other types of chemical allergen.

We then evaluated the concentration-dependent effect of AHCP on TC activation by examining increasing AHCP concentrations, ranging from 0 to 200 μM. These results showed a proportional effect of the concentration of AHCP on the activation of TCs by pre-exposed DCs. The maximum concentration-dependent effect depended on the subpopulation, that is, CD4⁺ or CD8⁺, which illustrates the discrepancy between the 2 subpopulations of TCs in terms of their response to pre-exposed DCs. After determining the most relevant activation markers for TCs, and ensuring that a concentration-related AHCP response had been observed, we determined the optimum co-culture time for detecting TC activation. As the highest expression of CD124 and proliferation of both CD4⁺ and CD8⁺ TCs were observed after 72 hours of co-culture, and as the mortality rate of TCs increases beyond this duration of co-culture, the 72-hour time-point

was selected. As compared with data obtained with other DC-LT co-culture models, 72 hours seems to be a relatively short time in which to observe a significant response.^{14,15,17}

TC populations are heterogeneous, and this could have an impact on the results. To assess the involvement of naive and memory TCs in the observed response, CD62L⁺ and CD62L⁻ TC populations were separated. It was shown that CD62L⁺ and CD62L⁻ TCs proliferated when DCs were exposed to LPS, whereas only CD62L⁺ naive TCs proliferated when DCs were exposed to AHCP. These data show that the response of TCs to AHCP is attributable to naive TCs, and not to memory TCs. To further explore the naive memory cell response, we assessed both CD4⁺ CD44⁻ and CD8⁺ CD44⁻ (CD44⁻ cells are the non-stimulated TCs²⁶) populations isolated by magnetic separation (Table 1). The results showed, that even in the absence of memory and CD8⁺ TCs, the proliferation of CD4⁺ cells increased significantly, as did CD124 expression, with AHCP as compared with the vehicle control. In contrast, with LPS, no significant increase in CD124 expression was observed, which supports the minor involvement of memory TCs in the AHCP response. These results are in agreement with other studies showing that DCs were unable to activate CD8⁺ CD44⁻ TCs in the absence of CD4⁺ TCs.^{51,52}

The presence of Tregs may reduce the cell response to stimulation, leading to false-negative results.¹⁶ It has been shown in previous studies that Tregs can prevent *in vitro* activation of TCs in response to moderate/weak allergens, and that the depletion of human CD25⁺ peripheral blood lymphocytes may be useful to significantly increase specific TC activation.¹⁶ We therefore depleted the CD25⁺ cells in the pan-TC population in order to verify whether this could increase the TC response to activated DCs. The results in Table 1 show that there was no increase in the proliferation or the percentage of CD124⁺ cells in the CD25⁻ population. In contrast, the higher background level in the proliferating cells and the higher variability in the response of TCs led to a decrease in the significance level when the CD25⁺ cells were removed from the TC population. We therefore assumed that, with this model, CD25⁺ cell depletion is not required to observe an appropriate response of TCs. Tregs have a tendency to lower the TC response.²⁴ Thus, the discrepancy between the literature data and the data provided by this model might be explained by

the use of murine cells instead of human cells, or by a shorter co-culture time than that used in other models.¹⁶

To conclude, we have developed a murine co-culture model that allows us to assess the ability of DCs exposed to AHCP—a reference sensitizer—to induce activation of TCs. These preliminary results are promising for the development of an easy-to-use in vitro model. This model has the advantage of not requiring the use of live animals, and, moreover, the BMDCs and TCs used in this model are both easy to obtain and homogeneous. Furthermore, the 72 hours of co-culture required to observe the TC response is shorter than in other models based on the same cell types.^{14,15,17} Our model, which explores the response of TCs, might also allow discrimination of Th1 and Th2 responses, which would be an interesting information in the development of alternatives to live animal experimentation. There is therefore a need to assess other reference chemical sensitizers, such as strong and weak sensitizers, especially those known to induce either Th1 or Th2 responses, as well as non-sensitizers, in order to use this co-culture model as a predictive test for assessing the allergenic potential of chemicals.

Conflict of interest

The authors declare no potential conflict of interests.

REFERENCES

1. Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF, Ryan CA, Dearman RJ. Chemical allergy: translating biology into hazard characterization. *Toxicol Sci*. 2011;120(suppl 1):S238-S268.
2. Mamessier E, Milhe F, Guillot C, et al. T-cell activation in occupational asthma and rhinitis. *Allergy*. 2007;62:162-169.
3. Wong CL, Ghassabian S, Smith MT, Lam AL. In vitro methods for hazard assessment of industrial chemicals—opportunities and challenges. *Front Pharmacol*. 2015;6:94.
4. Cochrane SA, Arts JH, Ehnes C, et al. Thresholds in chemical respiratory sensitisation. *Toxicology*. 2015;333:179-194.
5. European Commission. Regulation (EC) No 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 1907/2006. *Official Journal of the European Union* 2008;L:353.
6. OECD. Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA): OECD Publishing, Paris; 2015.
7. OECD. Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase test method: OECD Publishing, Paris; 2015.
8. OECD. Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: OECD Publishing; 2017.
9. OECD. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins: OECD Publishing, Paris; 2014.
10. Martin SF, Esser PR, Schmucker S, et al. T-cell recognition of chemicals, protein allergens and drugs: towards the development of in vitro assays. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67:4171-4184.
11. Vocanson M, Hennino A, Rozieres A, Poyet G, Nicolas JF. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*. 2009;64:1699-1714.
12. Reuter H, Spieker J, Gerlach S, et al. In vitro detection of contact allergens: development of an optimized protocol using human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *Toxicol In Vitro*. 2011;25:315-323.
13. Toebak MJ, Gibbs S, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Rustemeyer T. Dendritic cells: biology of the skin. *Contact Dermatitis*. 2009;60:2-20.
14. Krasteva M, Peguet-Navarro J, Moulon C, Courtellemont P, Redziniak G, Schmitt D. In vitro primary sensitization of hapten-specific T cells by cultured human epidermal Langerhans cells—a screening predictive assay for contact sensitizers. *Clin Exp Allergy*. 1996;26:563-570.
15. Rougier N, Redziniak G, Mougou D, Schmitt D, Vincent C. In vitro evaluation of the sensitization potential of weak contact allergens using langerhans-like dendritic cells and autologous T cells. *Toxicology*. 2000;145:73-82.
16. Vocanson M, Achachi A, Mutez V, et al. Human T cell priming assay: depletion of peripheral blood lymphocytes in CD25(+) cells improves the in vitro detection of weak allergen-specific T cells. *EXS*. 2014;104:89-100.
17. Guironnet G, Dalbiez-Gauthier C, Rousset F, Schmitt D, Péguet-Navarro J. In vitro human T cell sensitization to haptens by monocyte-derived dendritic cells. *Toxicol In Vitro*. 2000;14:517-522.
18. Masopust D, Sivula CP, Jameson SC. Of mice, dirty mice, and men: using mice to understand human immunology. *J Immunol*. 2017;199:383-388.
19. Battais F, Huppert C, Langonne I, et al. In vitro detection of chemical allergens: an optimized assay using mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Contact Dermatitis*. 2017;77(5):311-322.
20. Pepin E, Goutet M, Ban M. Murine bone marrow-derived dendritic cells as a potential in vitro model for predictive identification of chemical sensitizers. *Toxicol Lett*. 2007;175:89-101.
21. dos Santos GG, Reinders J, Ouweland K, Rustemeyer T, Scheper RJ, Gibbs S. Progress on the development of human in vitro dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;236:372-382.
22. Dearman RJ, Basketter DA, Kimber I. Inter-relationships between different classes of chemical allergens. *J Appl Toxicol*. 2013;33:558-565.
23. ECETOC. *Skin and Respiratory Sensitisers: Reference Chemical Data Bank* [Technical report No. 77]. European Center of Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. 1999:92.
24. Kimber I, Travis MA, Martin SF, Dearman RJ. Immunoregulation of skin sensitization and regulatory T cells. *Contact Dermatitis*. 2012;67:179-183.
25. Inaba K, Swiggard WJ, Steinman RM, Romani N, Schuler G. Isolation of dendritic cells. *Curr Protoc Immunol*. 2009;Chapter 3:Unit 3.7.
26. Gerberick GF, Cruse LW, Miller CM, Sikorski EE, Ridder GM. Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells following allergen and irritant treatment. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997;146:1-10.
27. Cibrian D, Sanchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol*. 2017;47:946-953.
28. Gonzalez-Amaro R, Cortes JR, Sanchez-Madrid F, Martin P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med*. 2013;19:625-632.
29. Moniuszko M, Kowal K, Jeznach M, Rusak M, Dabrowska M, Bodzenta-Lukaszyk A. Phenotypic correlations between monocytes and CD4+ T cells in allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;161:131-141.
30. Ban M, Langonne I, Goutet M, Huguet N, Pépin E. Simultaneous analysis of the local and systemic immune responses in mice to study the occupational asthma mechanisms induced by chromium and platinum. *Toxicology*. 2010;277:29-37.
31. Tan C, Taylor AA, Coburn MZ, Marino JH, van de Wiele CJ, Teague TK. Ten-color flow cytometry reveals distinct patterns of expression of CD124 and CD126 by developing thymocytes. *BMC Immunol*. 2011;12:36.
32. Berker M, Frank LJ, Gessner AL, et al. Allergies—a T cells perspective in the era beyond the TH1/TH2 paradigm. *Clin Immunol*. 2017;174:73-83.
33. Goutet M, Pepin E, Langonne I, Huguet N, Ban M. Identification of contact and respiratory sensitizers according to IL-4 receptor alpha expression and IL-2 production. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;260:95-104.
34. Vocanson M, Nicolas J-F, Basketter D. In vitro approaches to the identification and characterization of skin sensitizers. *Expert Rev Dermatol*. 2013;8:395-405.
35. Rustemeyer T, de Ligter S, von Blomberg BM, Frosch PJ, Scheper RJ. Human T lymphocyte priming in vitro by haptenated autologous dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. 1999;117:209-216.

36. White JT, Cross EW, Kedl RM. Antigen-inexperienced memory CD8+ T cells: where they come from and why we need them. *Nat Rev Immunol.* 2017;17:391-400.
37. Curtsinger JM, Agarwal P, Lins DC, Mescher MF. Autocrine IFN-gamma promotes naive CD8 T cell differentiation and synergizes with IFN-alpha to stimulate strong function. *J Immunol.* 2012;189:659-668.
38. Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity.* 2011;35:161-168.
39. Takeda Y, Suto Y, Ito K, et al. TRAV7-2*02 Expressing CD8(+) T Cells Are Responsible for Palladium Allergy. *Int J Mol Sci.* 2017;18.
40. Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, et al. NKG2D(+) IFN-gamma(+) CD8(+) T cells are responsible for palladium allergy. *PLoS One.* 2014; 9:e86810.
41. Martin SF, Dudda JC, Delattre V, et al. Fas-mediated inhibition of CD4+ T cell priming results in dominance of type 1 CD8+ T cells in the immune response to the contact sensitizer trinitrophenyl. *J Immunol.* 2004;173:3178-3185.
42. Stone S, La Flamme AC. Type II activation of macrophages and microglia by immune complexes enhances Th17 biasing in an IL-6-independent manner. *PLoS ONE.* 2016;11:e0164454.
43. Garfias Y, Rojas-Ramos E, Jimenez Mdel C, et al. Comparative analysis of mononuclear cell surface markers in atopic processes—a preliminary study. *Immunol Invest.* 2003;32:95-104.
44. Di Gioacchino M, Di Giampaolo L, Verna N, et al. In vitro effects of platinum compounds on lymphocyte proliferation and cytokine release. *Ann Clin Lab Sci.* 2004;34:195-202.
45. Paolucci C, Ponti J, Fabbri MV, Breda D, Sabbioni E, Burastero SE. Platinum group elements enhance the allergic immune response by acting on dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;143:225-236.
46. SCOEL/SUM/150. Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for Platinum and Platinum compounds. September 2011. ec.europa.eu/social/BlobServlet?docId=7303&langId=en. Accessed June 30, 2017.
47. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:701-738.
48. Kotanides H, Reich NC. Interleukin-4-induced STAT6 recognizes and activates a target site in the promoter of the interleukin-4 receptor gene. *J Biol Chem.* 1996;271:25555-25561.
49. Ohara J, Paul WE. Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85: 8221-8225.
50. Nishino R, Fukuyama T, Watanabe Y, Kurosawa Y, Ueda H, Kosaka T. Effect of mouse strain in a model of chemical-induced respiratory allergy. *Exp Anim.* 2014;63:435-445.
51. Wang JC, Livingstone AM. Cutting edge: CD4+ T cell help can be essential for primary CD8+ T cell responses in vivo. *J Immunol.* 2003; 171:6339-6343.
52. Livingstone AM, Wilson EB, Ontiveros F, Wang JC. Unravelling the mechanisms of help for CD8+ T cell responses. *Immunol Res.* 2009; 45:209-217.

How to cite this article: Huppert C, Paris C, Langonné I, et al. Activation of T cells by dendritic cells exposed to a reference sensitizer: Towards a promising model to assess the allergenic potential of chemicals. *Contact Dermatitis.* 2018; 1-9. <https://doi.org/10.1111/cod.12991>

Résumé :

Les allergies représentent un problème majeur dans le domaine des maladies professionnelles et ont un impact sérieux sur la vie des travailleurs. Les allergies professionnelles sont principalement cutanées et respiratoires ; elles peuvent être causées par des produits chimiques de bas poids moléculaire. Dans le passé, les tests destinés à identifier les produits susceptibles d'entraîner des allergies étaient réalisés sur l'animal. Or, la législation européenne engage à limiter le recours à l'expérimentation animale pour évaluer le pouvoir sensibilisant des substances chimiques, incitant à développer des tests *in vitro* de substitution. C'est dans ce contexte que nous avons cherché à développer des modèles de cultures cellulaires destinés à identifier les substances sensibilisantes. Un premier modèle utilisant des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (BMDC) de souris BALB/c a été développé et a donné des résultats prometteurs pour l'identification des produits sensibilisants et leur catégorisation selon leur puissance sensibilisante. De plus, la voie de signalisation Nrf2/Keap1 semble être impliquée dans la réponse de ce modèle cellulaire aux sensibilisants. Dans le but de compléter ce modèle et d'évaluer la capacité des BMDC à activer les lymphocytes T (LT), un modèle de coculture de BMDC et LT a été mis au point avec un sensibilisant de référence avant d'être testé sur un ensemble de produits de référence (sensibilisants cutanés et respiratoires, irritants et non sensibilisants). Les BMDC de notre modèle, exposées à des sensibilisants, se sont révélées capables d'activer les LT en coculture. Enfin, des essais préliminaires utilisant des cellules de souris de souche C57BL6/J dans notre modèle de coculture ont donné des résultats comparables à ceux obtenus avec des cellules issues de la souche BALB/c. Les modèles de cultures cellulaires BMDC et de coculture BMDC-LT sont prometteurs dans le cadre du développement de méthodes de substitution à l'expérimentation animale pour l'évaluation du pouvoir sensibilisant de substances chimiques.

Mots-clefs : Cellules dendritiques, lymphocytes T, sensibilisation, produits chimiques, tests *in vitro*.

Abstract :

Allergies constitute an important issue in the field of occupational health and have a serious impact on the lives of workers. Occupational allergies are mainly contact and respiratory allergies and can be caused by low molecular weight chemicals. In the past, the tests that were used to identify the potential allergens were carried out on animals. However, European legislation has provided the impetus for reducing the use of animal testing to assess the sensitization potential of chemicals and promoted the development of alternative *in vitro* tests. In this context, we aimed to develop cell culture models to identify sensitizers. A first model using bone marrow derived dendritic cells (BMDC) from BALB/c mice was developed and showed promising results for identifying sensitizers and classify them according to their allergenic potency. Moreover, the Nrf2/Keap1 pathway seems to be involved in the response of this cell model to sensitizers. In order to supplement this model and to assess the functionality of BMDC, a BMDC-T cell (TC) coculture model was developed with a reference sensitizer before being tested on a range of reference sensitizers (cutaneous and respiratory sensitizers, irritants and non-sensitizers). The BMDC of our model, while exposed to sensitizers, were able to activate TC in coculture. Finally, preliminary tests using the cells of C57BL6/J mice in our coculture model showed that similar results to those obtained with cells from the BALB/c strain. The models of BMDC cultures and BMDC-TC coculture are promising for the development of alternative methods to animal experimentation assessing the sensitizing potential of chemicals.

Key words : Dendritic cells, T cells, sensitization, chemicals, *in vitro* tests.