



**HAL**  
open science

# L'apport de l'étude des mécanismes intracellulaires pour l'évaluation du pouvoir sensibilisant de substances industrielles

Adrien Audry

## ► To cite this version:

Adrien Audry. L'apport de l'étude des mécanismes intracellulaires pour l'évaluation du pouvoir sensibilisant de substances industrielles. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2022. Français. NNT : 2022LORR0082 . tel-03800852

**HAL Id: tel-03800852**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03800852>**

Submitted on 6 Oct 2022

**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.



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES  
UNIVERSITAIRES**

## 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 bibliothèque : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)  
*(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)*

## 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.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 **Adrien AUDRY**

**L'apport de l'étude des mécanismes intracellulaires pour l'évaluation du pouvoir sensibilisant de substances industrielles.**

Date de soutenance : 09/06/2022

#### Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme Caroline GILBERT	Professeure, Centre de recherche du CHU de Québec – Université Laval, Ville de Québec
	M Laurent VERNHET	Professeur, Institut de Recherche en Santé Environnement, et Travail (IRSET), Rennes
Examineurs :	M Athanase VISVIKIS (Président du jury)	Professeur, laboratoire IMOPA, Vandœuvre-lès-Nancy
	Mme Isabelle SPONNE	Docteure, Institut National de Recherche et Sécurité (INRS), Vandœuvre-lès-Nancy, co-directrice de thèse
Membres invitées :	Mme Brigitte LEININGER	Professeure, UMR_S Inserm-UL 1256 NGERE, Vandœuvre-lès- Nancy, directrice de thèse
	Mme Danièle LEJZEROWICZ	Professeure, CHRU de Nancy, Nancy

---

Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS)  
Département Toxicologie et Biométrie  
Rue du Morvan, CS 60027, 54519 Vandœuvre-lès-Nancy

Laboratoire NGERE INSERM U1256  
Université de Lorraine  
9 Av. de la Forêt de Haye, 54500 Vandœuvre-lès-  
Nancy





# Remerciements

La thèse fut un long travail qui ne serait pas rendu possible sans toutes les personnes qui y ont participé de près ou de loin et je tiens à la remercier sincèrement.

Tout d'abord, je remercie l'Institut National de Recherche et Sécurité qui m'a donné l'opportunité de réaliser ces travaux, plus particulièrement le Pr Pierre Campo et le Pr Louis Laurent.

Je tiens à remercier mes directrices de thèse Isabelle Sponne et Brigitte Leininger de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Encore merci pour vos conseils, votre aide, votre bienveillance tout au long de cette thèse. Malgré les obstacles et la période sanitaire difficile, vous m'avez toujours encouragé.

Je remercie la Professeure Caroline Gilbert et le Professeur Laurent Vernhet d'avoir accepté d'évaluer les travaux de ma thèse en qualité de rapporteurs. Je remercie également le Pr Athanase Visvikis d'avoir accepté de faire partie de mon jury en qualité d'examineur.

Je remercie Danièle Lejzerowicz d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi et de m'avoir conseillé tout au long de la thèse.

Je remercie le responsable du laboratoire IMSA Fabrice Battais pour ses conseils, sa confiance en mes travaux et son aide pour la rédaction du manuscrit.

Je remercie Lisa Chedik pour ses encouragements, son aide dans la rédaction du manuscrit et pour m'avoir fait découvrir le monde merveilleux de la vulgarisation scientifique.

Je remercie Aurélie Remy pour son aide dans les analyses statistiques.

Que serait un doctorant sans son équipe de laboratoire ! Je tiens à remercier Julianne Mathiot, Amélie Coiscaud, Samuel Muller et Isabelle Langonné pour leur bonne humeur, leurs encouragements et leur aide pour les expérimentations. Vous m'avez accompagné tout au long de cette aventure, j'espère vous recroiser autour d'un bon repas !

Je remercie également mes différents colocataires de bureau : merci à Anais Kirsch de m'avoir fait rire tout au long de cette thèse (et comme tu le dis si bien, il y'a pire dans la vie !) ; merci Hélène Barthel pour ton soutien inconditionnel et pour avoir aussi bien contribué à faire du mur des « *memes* » un monument. Merci Maurane pour ton soutien dans cette période difficile.

Je tiens à remercier les membres du laboratoire CMR / ASBA pour l'accueil / l'intégration et leur soutien au quotidien.

Un grand merci à mes amis pour leur soutien. Merci à vous Fyoh, PJ, Doud, Kevin et Tofuw d'avoir cru en moi.

Je remercie également Agathe et Mona de m'avoir soutenu et encouragé tout au long de cette thèse.

Merci à ma famille, parents, frères et sœurs d'avoir toujours été présent. J'espère que vous lirez mes travaux avec fierté.

Je termine en remerciant toutes les personnes que je n'ai pas pu citer. Vous avez tous contribué à rendre ma thèse unique.



# Table des matières

Liste des abréviations.....	10
Liste des figures .....	14
Liste des tableaux .....	18
Avant-propos .....	21
Introduction.....	23
1. Les allergies professionnelles .....	23
1.1. Exemples de maladies professionnelles allergiques : aspects cliniques et traitement.....	23
1.2. Données épidémiologiques sur les allergies professionnelles .....	26
2. L'hypersensibilité .....	27
2.1. L'étiquetage des sensibilisants chimiques et aspects réglementaires .....	29
2.2. Caractéristiques des sensibilisants chimiques : les différents types d'haptène ...	33
2.3. Les différentes étapes de la sensibilisation cutanée et de la sensibilisation respiratoire.....	37
3. Les cellules dendritiques : un rôle majeur dans la réponse à un sensibilisant .....	41
3.1. Les différentes populations de cellules dendritiques .....	41
3.2. Les signaux de danger .....	43
3.3. Comment sont recrutées les cellules dendritiques au niveau du site de l'inflammation ?.....	47
3.4. La maturation des cellules dendritiques .....	50

3.5. Présentation de l'antigène par les cellules dendritiques matures aux lymphocytes T	50
4. Principales voies de signalisation impliquées dans la sensibilisation.....	54
4.1. Les principales voies MAPK.....	54
4.2. Les voies de signalisation JAK/STAT.....	58
4.3. La signalisation Nrf2/Keap1 .....	60
5. L'évaluation du potentiel sensibilisant .....	68
5.1. L' <i>Adverse Outcome Pathway</i> (AOP).....	68
5.2. Exemples de modèles alternatifs validés ou en cours de développement.....	73
5.3. L'approche définie pour l'évaluation de la sensibilisation cutanée.....	82
Objectifs .....	87
Matériels et méthodes .....	90
1. Modèle de cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (BMDC).....	91
1.1. Expérimentation animale.....	92
1.2. Isolement des cellules de moelle osseuse de souris .....	92
1.3. Mise en culture .....	92
1.4. Produits utilisés et exposition .....	94
2. Criblage par <i>proteome profiler array</i> (R&D Systems).....	97
2.1. Extraction des protéines totales et dosage .....	97
2.2. Utilisation des membranes .....	98
3. Expériences de cytométrie en flux.....	101
3.1. Caractérisation des cellules dendritiques.....	101
3.2. Étude de l'expression des marqueurs phénotypiques des DC matures.....	102

3.3.	Étude de l'activation des MAPK et STAT par <i>Phosphoflow</i> .....	104
3.4.	Étude de l'accumulation de la protéine Nrf2 par marquage cytométrie et influence de la voie p38 .....	107
3.5.	Analyses statistiques des données de cytométrie.....	107
4.	Expériences de RT-qPCR .....	108
4.1.	Étude de l'expression de gènes régulés par Nrf2 et étude de l'expression du gène <i>IL12p40</i> .....	108
4.2.	Analyses statistiques .....	110
5.	Mesure d'activité de la protéine Nrf2 .....	111
5.1.	Extraction des protéines et dosage (DC BioRad).....	111
5.2.	Utilisation du kit TransAM pour mesurer l'activité de la protéine Nrf2.....	111
	Résultats .....	113
1.	Caractérisation des cellules dendritiques du modèle BMDC.....	113
2.	Criblage par <i>proteome array</i> des voies de signalisation activées dans des DC exposées à deux sensibilisants de référence : le DNFB et l'HCP .....	114
3.	Étude de l'activation des MAPK et des STAT par la méthode de <i>Phosphoflow</i> .....	119
3.1.	Test de sensibilisants cutanés .....	119
3.2.	Test de sensibilisants respiratoires .....	126
3.3.	Test de non-sensibilisants irritants .....	129
4.	Étude de l'activation des MAPK et des STAT : cinétique d'activation dans les DC exposées au DNFB et à l'HCP .....	131
5.	Expression du gène <i>IL12p40</i> en réponse à des sensibilisants.....	133
6.	Étude de la voie Nrf2/Keap1.....	135

6.1. Mise au point d'une méthode pour étudier l'accumulation de la protéine Nrf2 et application à divers sensibilisants et non-sensibilisants (Résumé publication <i>Toxicology Research</i> 2021).....	135
6.2. Autres sensibilisants testés .....	136
6.3. Expression des gènes régulés par Nrf2 en fonction de la durée d'exposition....	138
6.4. Mesure d'activité de la protéine Nrf2.....	140
7. Impact de la voie MAPK p38 sur les différentes réponses des DC aux sensibilisants	141
7.1. Impact de la voie MAPK p38 sur la maturation des DC .....	141
7.2. Impact de la voie p38 sur l'activation des autres voies MAPK et STAT .....	144
7.3. Impact de la voie MAPK p38 sur l'expression du gène <i>IL12p40</i> .....	147
7.4. Relation entre les voies MAPK p38 et Nrf2/Keap1.....	148
7.5. Impact de la voie MAPK p38 sur l'activité de la protéine Nrf2.....	155
Discussion.....	157
Conclusions et perspectives.....	176
Références bibliographiques.....	179
Annexe 1 : Publication scientifique.....	189
Annexe 2 : Puissance des différents sensibilisants testés .....	195

# Liste des abréviations

## A

AD : Approche Définie

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADRA : *Amino acid Derivative Reactivity Assay*

Ag : Antigène

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

AO : *Adverse Outcome*

AOP : *Adverse Outcome Pathway*

ARE : *Antioxidant Response Element*

ARN : Acide RiboNucléique

ATCP : Tétrachloroplatinate d'ammonium

## B

BALB : *Bagg ALBino*

BCA : *Bicinchoninic Acid Assay*

BD : Beckton Dickinson

BMDC : *Bone Marrow-derived Dendritic Cell*

BV : Brilliant Violet

## C

CAS : *Chemical Abstracts Service*

CBP : *CREB Binding Protein*

CCL : Chimiochine Ligand

CCR : *C-C chemokine receptor type*

CXCR : *C-X-C chemokine receptor type*

CD : Cluster de Différenciation

cDC : Cellule Dendritique conventionnelle

Cinn : Cinnamaldéhyde

CLP : *Classification, Labelling, Packaging*

CLR : *C-type Lectin Receptor*

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CNC : *Cap 'n' Collar*

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CREB : *C-AMP Response Element-binding protein*

Cy : Cyanine

## D

Da : Dalton

DAMP : *Damage-Associated Molecular Pattern*

DC : Cellule Dendritique

DCP : *common-Dendritic Cell Progenitor*

DC-SIGN : *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DNCB : Dinitrochlorobenzène

DNFB : Dinitrofluorobenzène

DO : Densité Optique

DPRA : *Direct Peptide Reactive Assay*

## **E**

EC : Cellule Épithéliale

ECHA : *European CHemicals Agency*

ECVAM : *European Centre for the Validation of Alternative Methods*

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

EGF : *Epidermal Growth Factor*

EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*

ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinases*

## **F**

FGF : *Fibroblast Growth Factor*

FOR : Formaldéhyde

## **G**

GARD : *Genomic Allergen Rapid Detection*

Gclc : Glutamate cystéine ligase catalytic

GDP : Guanosine DiPhosphate

GM-CSF : *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*

GTP : Guanosine TriPhosphate

## **H**

h : heure

HBSS : *Hanks' Balanced Salt Solution*

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

HCP : Hexachloroplatinate d'ammonium

HHP : Hydrogen hexahydroxyplatinate IV

Hmox1 : Hemoxygenase-1

HPLC : Chromatographie en phase liquide à

haute performance

HQ : HydroQuinone

HSC : Cellule Souche Hématopoïétique

## **I**

iDC : cellule dendritique immature

IFN : interféron

IgE : immunoglobuline de type E

IκB : *inhibitor of nuclear factor kappa B*

IKK : IκB Kinase

IL : Interleukine

IMDM: *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

IRAK : *Interleukin-1 Receptor Associated Kinase*

IsoE : Isoeugénol

ITS : *Integrated Test Strategy*

## **J**

JAK : Janus Kinase

JNK : *C-jun N terminal Kinases*

## **K**

KC : kératinocyte

KE : *Key Event*

Keap1 : *Kelch-like ECH Associated Protein 1*

## **L**

LC : cellule de Langerhans

LLNA : *Local Lymph Node Assay*

LN : ganglion lymphatique

LPS : LipoPolySaccharide

LT : Lymphocyte T

## **M**

MAPK : *Mitogen-Associated Protein Kinases*

MAPKK : MAPK Kinase

MAPKKK : MAPK kinase kinase

MBP : *Mannose-Binding Protein*

MCP : *Monocyte Chemotactic Protein-3*

MDP : Progéniteur de macrophage

mDC : cellule dendritique dérivée de monocyte

MFI : Moyenne d'Intensité de Fluorescence

MIE : évènement moléculaire initiateur

Min : Minute

MIP : *Macrophage Inflammatory Protein-1*

MMP : MétalloProtéinase Matricielle

MMR : *Macrophage Mannose Receptor*

MSA : Méthyl Salicylate

## **N**

Nap : Naphtol

NF-AT : *Nuclear Factor of Activated T cell*

NF- $\kappa$ B : *Nuclear Factor-kappa B*

NLR : *NOD-Like Receptor*

NLRP : *NOD-Like Receptor Proteins*

NOD : *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein*

nqo1 : NAD(P)H déshydrogénase quinone 1

Nrf2 : *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*

## **O**

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONAP : Observatoire Nationale des Allergies Professionnelles

ONU : Organisation des Nations Unies

## **P**

PAMP : *Pathogen Associated Molecular Pattern*

PBS : *Phosphate-Buffered Saline*

pDC : cellule dendritique plasmacytoïde

PDGF : *Platelet-Derived Growth Factor*

PKC : Protéine Kinase C

PPRA : *Peroxydase Peptide Reactivity Assay*

PRR : *Pattern Recognition Receptor*

## **R**

REACH : *Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of CHemicals*

RFI : Intensité relative de fluorescence

ROS : *Reactive Oxygen Species*

## **S**

SAPK : *Stress-Activated Protein Kinase*

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SGH : Système Général Harmonisé

SI : *Stimulation Index*

SP : *Surfactant Protein*

SP-D : Protéine Tensioactive D

srxn1 : sulforedoxine-1

STAT : *Signal Transducers and Activator of Transcription*

SVF : Sérum de Veau Foetal

## **T**

TAB : *TAK1-binding protein*

TAK : *Transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase*

tBHQ : *tert*-Butylhydroquinone

TBS : Tris-Buffered Saline

TCR : *T Cell Receptor*

T<sub>Fh</sub> : *T Follicular Helper*

Th : *T helper*

Tir : Tiram

TLR : *Toll-Like Receptor*

TMI : p-Tolyl isocyanate

TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

TPCH : TetraamminePlatinum(II) Chloride Hydrate

TRAF : *TNF Receptor-Associated Factor*

TSLP : *Thymic Stromal Lymphopoietin*

## **V**

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

# Liste des figures

Figure 1 : Symptôme clinique de la dermatite de contact allergique : éruptions cutanées ....	24
Figure 2 : Classification des hypersensibilités.....	27
Figure 3 : Les différents types d'haptènes.....	33
Figure 4 : Les 10 groupes fonctionnels des haptènes électrophiles. ....	34
Figure 5 : Oxydation du limonène : différents produits de réaction allergisants.....	35
Figure 6 : Formation de la vanilline à partir de l'isoeugénol, un pro-haptène.....	36
Figure 7 : Schéma de la phase de sensibilisation d'une hypersensibilité de type IV. ....	38
Figure 8 : Mécanisme de la phase de sensibilisation d'une hypersensibilité de type I. ....	40
Figure 9 : Ensemble des sous-populations de DC . ....	42
Figure 10 : Signalisation des récepteurs TLR .....	45
Figure 11 : Synapse immunologique entre une cellule dendritique et un lymphocyte T naïf .	51
Figure 12 : Les différentes populations de lymphocytes <i>Helper</i> .....	53
Figure 13 : Schéma des différentes voies MAPK.....	55
Figure 14 : Exemple d'une signalisation JAK/STAT.....	58
Figure 15 : Mécanisme d'activation de la voie Nrf2/Keap1. ....	60
Figure 16 : Structure de la protéine Nrf2.....	61
Figure 17 : Structure de Keap1, le répresseur de la protéine Nrf2.....	62
Figure 18 : Modèle de dissociation de Keap et Cul3, entraînant le détachement de Nrf2. ....	64
Figure 19 : Modèle <i>Hinge and latch</i> .....	65
Figure 20 : Communication entre Nrf2 et NF- $\kappa$ B.....	67
Figure 21 : AOP de la sensibilisation cutanée.....	70
Figure 22 : AOP proposé pour la sensibilisation respiratoire. ....	71
Figure 23 : AOP hybride entre la sensibilisation cutanée et la sensibilisation respiratoire ....	72
Figure 24 : Corrélation entre le modèle BMDC et le modèle LLNA.....	81

Figure 25 : Arbre décisionnel lié à l'approche définie "2o3", permettant l'évaluation du potentiel sensibilisant cutané et la comparaison des performances avec les données du LLNA ou les données humaines .....	84
Figure 26 : Arbre décisionnel lié à l'approche définie ITS, permettant l'évaluation du potentiel sensibilisant cutané et comparaison des performances avec celles du LLNA. ....	86
Figure 27 : Voies de signalisation étudiées dans le cadre de la thèse.....	89
Figure 28 : Résumé des principales expériences réalisées. ....	91
Figure 29 : Principe du <i>proteome array</i> .....	97
Figure 30 : Principe du Phosphoflow.....	104
Figure 31 : Stratégie d'analyse de la phosphorylation des MAPK et STAT dans des DC par cytométrie en flux avec FlowJo®.....	106
Figure 32 : Principe du kit TransAM pour analyser l'activité de la protéine Nrf2 .....	112
Figure 33 : Caractérisation des DC aux jours 7 et 9 de culture.....	114
Figure 34 : Les DC exposées au sensibilisant cutané DNFB expriment des protéines actives de la signalisation cellulaire.....	116
Figure 35 : Les DC exposées au sensibilisant respiratoire HCP expriment des protéines actives de la signalisation cellulaire.....	117
Figure 36 : Les DC exposées au non-sensibilisant SDS expriment des protéines actives de la signalisation cellulaire. ....	118
Figure 37 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées au DNFB pendant 30 min ou 2 h. ....	121
Figure 38 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées au FOR pendant 30 min ou 2 h.....	122
Figure 39 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées à l'Iso E pendant 30 min ou 2 h.....	123
Figure 40 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées au Nap pendant 30 min ou 2 h.....	124

Figure 41 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées à l'HQ pendant 30 min ou 2 h. ....	125
Figure 42 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées à l'HCP pendant 30 min ou 2 h. ....	127
Figure 43 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées au TMI pendant 30 min ou 2 h. ....	128
Figure 44 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées au SDS pendant 30 min ou 2 h. ....	129
Figure 45 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées au MSA pendant 30 min ou 2 h. ....	130
Figure 46 : Cinétique d'activation des MAPK et STAT dans les DC en réponse à l'HCP, un sensibilisant respiratoire. ....	132
Figure 47 : Cinétique d'activation des MAPK et STAT dans les DC en réponse au DNFB, un sensibilisant cutané. ....	132
Figure 48 : Expression du gène codant la cytokine IL12p40 en réponse aux sensibilisants. ....	134
Figure 49 : Accumulation de la protéine Nrf2 pour des DC exposées au DNFB et à l'HCP pendant 3 h. ....	136
Figure 50 : Expression de <i>hmox1</i> , <i>srxn1</i> , <i>nqo1</i> et <i>gclc</i> dans des DC en réponse à deux sensibilisants. ....	139
Figure 51 : Mesure d'activité de la protéine Nrf2. Les DC sont exposées pendant 3 h au DNFB et 6 h à l'HCP. ....	140
Figure 52 : Expression des marqueurs Iad, CD86, CD80, CD54, CD40 et CMH-I pour des cellules exposées 24 h à l'HCP ou au DNFB, avec ou sans ajout de SB203580. ....	143
Figure 53 : Indice d'activation des protéines p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des BMDC exposées à l'HCP ou au DNFB, respectivement un sensibilisant respiratoire et un sensibilisant cutané pendant 15 min. ....	145

Figure 54 : Indice d'activation des protéines p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées à l'HCP ou au DNFB, respectivement un sensibilisant respiratoire et un sensibilisant cutané pendant 3 h. ....	146
Figure 55 : Expression du gène <i>IL12p40</i> dans des DC exposées pendant 3 h ou 6 h au DNFB, à l'HCP et au SDS avec une inhibition ou non de la voie p38.....	147
Figure 56 : Effet de l'inhibition de p38 sur l'accumulation de Nrf2. Les DC ont été exposées au DNFB, à l'HCP et au tBHQ pendant 15 min ou 3 h.....	149
Figure 57 : Expression des gènes <i>hmx1</i> et <i>nqo1</i> après exposition pendant 3 h ou 6 h au DNFB, à l'HCP ou au SDS avec ou sans ajout de SB203580. ....	150
Figure 58 : Expression des gènes <i>srxn1</i> et <i>gclc</i> après exposition pendant 3 h ou 6 h au DNFB, à l'HCP ou au SDS avec ou sans ajout de SB203580. ....	151
Figure 59 : Influence de p38 sur l'activité de la protéine Nrf2. ....	155
Figure 60 : Schéma récapitulatif du rôle central de p38 dans la réponse des DC aux sensibilisants cutanés et aux sensibilisants respiratoires. ....	173

# Liste des tableaux

Tableau I : Classification des sensibilisants .....	30
Tableau II : Familles de produits chimiques connues pour induire une sensibilisation cutanée .....	31
Tableau III : Familles de produits chimiques connues pour induire une sensibilisation respiratoire .....	32
Tableau IV : Exemples de DAMP extracellulaires.....	43
Tableau V : Différentes familles de NLR .....	46
Tableau VI : Récepteurs de chimiokines et leur rôle dans la migration des DC murines.....	48
Tableau VII : Récepteurs de chimiokines et leur rôle dans la migration des DC humaines ...	49
Tableau VIII : Facteurs de transcription STAT activés par des cytokines impliquées dans la sensibilisation .....	59
Tableau IX : Aperçu des gènes régulés par le facteur de transcription Nrf2 .....	63
Tableau X : Composition du milieu de culture .....	93
Tableau XI : Conditions de culture en fonction des expérimentations réalisées .....	94
Tableau XII : Liste des produits utilisés pour l'exposition des DC. ....	95
Tableau XIII : Liste des protéines phosphorylées étudiées dans le <i>proteome array</i> (Kit ARY003B). ....	99
Tableau XIV : Liste des protéines phosphorylées étudiées dans le <i>proteome array</i> (Kit ARY003C). ....	100
Tableau XV : Liste des anticorps utilisés pour caractériser les DC présentes dans la culture cellulaire. ....	102
Tableau XVI : Liste des anticorps utilisés pour l'étude des marqueurs phénotypiques (BD Biosciences). ....	103
Tableau XVII : Liste des anticorps utilisés pour le Phosphoflow (BD Biosciences).....	105
Tableau XVIII : Liste des gènes étudiés avec les amorces utilisées pour les RT-qPCR.....	110

Tableau XIX : Etude de l'accumulation de la protéine Nrf2 dans des DC exposés à différents produits chimiques testés.....	137
Tableau XX : Effet de l'inhibiteur de la voie MAPK p38 sur l'expression des gènes <i>hmox1</i> et <i>srxn1</i> dans des DC exposées à des sensibilisants cutanés, respiratoires et à des non-sensibilisants.....	153



# Avant-propos

Les allergies relèvent de maladies professionnelles fréquentes dont les manifestations les plus courantes sont d'ordre respiratoire (rhinite, asthme, pneumopathie d'hypersensibilité) ou cutané dont la plus fréquente est la dermatite de contact allergique. L'allergie est définie comme une réaction d'hypersensibilité se déroulant en 2 phases : une phase de sensibilisation, asymptomatique et une phase de réponse ou de déclenchement symptomatique. Cette pathologie est liée à l'exposition à des substances dites « sensibilisantes » qui peuvent être de nature protéique ou chimique.

Afin de minimiser le risque de développer une allergie, il est important pour la santé des travailleurs, de connaître le caractère sensibilisant des produits utilisés dans le cadre de leur activité professionnelle. La réglementation REACH encadrant l'utilisation des produits chimiques exige de caractériser les propriétés toxiques de ces substances et de les ranger dans l'une et / ou l'autre des classes de danger « sensibilisant cutané » et « sensibilisant respiratoire ».

Alors qu'il n'existe aucun test reconnu par les instances réglementaires permettant de caractériser les sensibilisants respiratoires, des sensibilisants cutanés peuvent être identifiés à l'aide de différents essais. Parmi eux, le *Local Lymph Node Assay* (LLNA) réalisé chez la souris, a longtemps été le plus utilisé [1].

Les évolutions réglementaires répondant aux exigences sanitaires, économiques et sociétales incitent au développement de méthodes alternatives à l'expérimentation animale pour les études toxicologiques, comme les approches *in vitro* par exemple.

Le développement de telles méthodes ne peut se faire que si l'on comprend les mécanismes sous-jacents de la physiopathologie conduisant aux allergies. Les connaissances de ces mécanismes chimiques et biologiques peuvent permettre leur modélisation de manière simple dans un diagramme toxicologique appelé *Adverse Outcome Pathway* (AOP). Cette représentation schématique débute par l'évènement moléculaire initiateur (MIE), correspondant au premier évènement clé (KE), et il conduit à l'effet adverse (AO) en passant par plusieurs étapes intermédiaires. Il existe un AOP approuvé par l'organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) conduisant à la sensibilisation cutanée [2]. Celui correspondant à la sensibilisation respiratoire est toujours en cours d'élaboration [3].

Parmi les évènements clés, l'activation des cellules dendritiques (DC) joue un rôle essentiel dans l'apparition de l'hypersensibilité, qu'elle soit cutanée ou respiratoire. Cette réponse des DC aux sensibilisants, conduisant à leur maturation, est associée à l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaire. Elle correspond à un évènement commun aux deux AOP conduisant aux deux sensibilisations cutanée et respiratoire.

L'Institut National de Recherche et Sécurité (INRS) étudie la sensibilisation et l'allergie dans le cadre des expositions aux substances industrielles utilisées en milieu professionnel.

Un modèle *in vitro* basé sur la maturation de DC dérivées de moelle osseuse de souris (BMDC) a été développé à l'INRS pour évaluer le pouvoir sensibilisant des produits chimiques [4]. Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans la continuité des précédents pour améliorer les performances du test BMDC actuel. Ils s'attacheront en particulier à rechercher des voies de signalisation et / ou des marqueurs permettant de discriminer les sensibilisants cutanés des sensibilisants respiratoires.

# Introduction

## 1. Les allergies professionnelles

L'allergie est une pathologie très répandue dans la population mondiale ; elle est classée au 4<sup>ème</sup> rang des affections chroniques les plus fréquentes par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui définit l'allergie comme « une réaction d'hypersensibilité, c'est-à-dire une réaction inadaptée et excessive du système immunitaire face à une substance ou un agent appelé allergène » [5]. Les travailleurs manipulant de tels composés sont directement confrontés au risque d'allergie [6] dont les signes cliniques varient en fonction du type d'allergène et des mécanismes physiopathologiques impliqués. Les allergies professionnelles les plus répandues affectent la peau (dermatite de contact allergique, urticaire), les voies respiratoires (asthme professionnel allergique, rhinite), voire les deux.

### 1.1. Exemples de maladies professionnelles allergiques : aspects cliniques et traitement

#### 1.1.1. Dermatite de contact allergique

La dermatite de contact allergique est une réaction du système immunitaire à la substance au contact de la peau. Elle est caractérisée par une éruption cutanée qui génère des démangeaisons (**Figure 1**) [7]. Les démangeaisons sont traitées par des antihistaminiques ou encore des corticoïdes mais ce traitement est inefficace si l'exposition à la substance sensibilisante se poursuit.



**Figure 1 : Symptôme clinique de la dermatite de contact allergique : éruptions cutanées**

### **1.1.2. Urticaire de contact**

L'urticaire de contact est une pathologie caractérisée par une apparition, peu de temps après l'exposition à la substance impliquée, de lésions érythémato-oedémateuses prurigineuses. L'urticaire allergique est dû à la libération massive d'histamine qui va agir sur les vaisseaux, induisant une vasodilatation responsable de l'érythème. Cette libération entraîne également une perméabilité vasculaire qui peut se manifester par un œdème dermique.

### **1.1.3. La rhinite**

La rhinite se manifeste cliniquement par des éternuements, une rhinorrhée et une obstruction nasale, parfois accompagnée d'une conjonctivite. Touchant directement les fosses nasales, la rhinite peut s'avérer être la première manifestation clinique avant l'apparition d'un asthme.

#### 1.1.4. L'asthme allergique

L'asthme est caractérisé par une obstruction réversible des voies respiratoires. Il se développe généralement après des mois, voire des années de sensibilisation à une substance présente sur le lieu de travail. Les symptômes sont la toux, la dyspnée ou encore une oppression thoracique [8].

Le diagnostic de l'asthme professionnel est difficile car il demande de faire appel au *curriculum laboris* du patient, rendant parfois difficile l'identification de la substance sensibilisante. Lorsqu'elle est identifiée, la meilleure prévention est l'éviction de la substance, soit par mesure de protection du travailleur, soit par substitution de la substance par une autre ne présentant pas de danger pour la santé du travailleur [9].

De manière générale, les manifestations cliniques sont la résultante d'hypersensibilités induites par l'exposition au produit sensibilisant. En fonction de la nature du produit, le type d'hypersensibilité allergique ne sera pas forcément le même. Si certains traitements peuvent atténuer les symptômes, seul l'arrêt de toute exposition au sensibilisant permet d'éviter la survenue d'allergie et ce quels que soient les mécanismes impliqués. Chaque hypersensibilité possède des mécanismes qui lui sont propres. Ces mécanismes seront développés dans un paragraphe ultérieur.

## **1.2. Données épidémiologiques sur les allergies professionnelles**

### **1.2.1. Les allergies cutanées**

Le coût des dermatites professionnelles, qui entraînent environ 3 millions de journées de travail perdues, est estimé à 600 millions d'euros chaque année à l'échelle de l'Union Européenne (UE) [10].

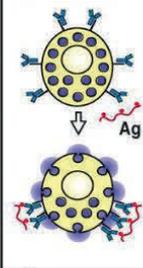
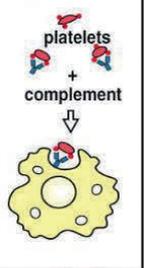
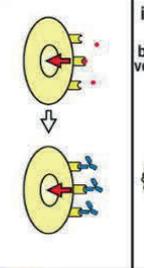
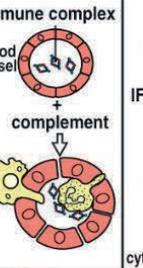
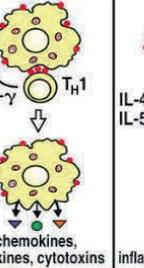
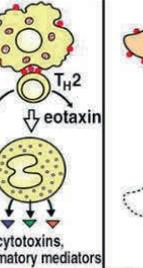
La dermatite de contact représente à elle seule entre 70 et 90 % des dermatoses professionnelles [11]. En 2013, son incidence annuelle était estimée entre 11 et 86 cas pour 100 000 personnes en France. Les secteurs d'activités qui sont les plus concernés sont la coiffure, le nettoyage, la métallurgie, l'industrie chimique et l'agroalimentaire.

### **1.2.2. Les allergies respiratoires**

L'observatoire national des asthmes professionnels (ONAP) estime qu'en France, l'incidence annuelle moyenne de l'asthme professionnel est de 24 cas par million de travailleurs et que 9 % des asthmes ont une cause d'origine professionnelle. Les données recueillies par l'ONAP montrent une augmentation progressive du nombre de cas signalés [12]. En effet, ils ont pu observer 487 cas en 1996, 540 en 1998, 673 en 2000 et 588 en 2002. En 2003, les principales substances allergisantes en cause étaient la farine (19 %), les isocyanates (11,9 %), les persulfates alcalins (8 %), les aldéhydes (5,3 %), le latex (5,1 %) et les acariens (3,6 %). Parmi les professionnels les plus atteints, on retrouve les boulangers et les pâtisseries (19,6 %), les coiffeurs (10,2 %), les employés de nettoyage (8 %), les professionnels des secteurs médicaux et paramédicaux (7,7 %), les peintres (7,3 %), les travailleurs du bois (4,1 %). Le nombre de produits ou de secteurs d'activités touchés ne cesse d'augmenter. Plus récemment, la littérature indique que 15 % des asthmes de l'adulte sont causés par des expositions professionnelles [13]. Egalement, en France le nombre de cas déclaré d'asthme a augmenté entre 2017 et 2020 [14].

## 2. L'hypersensibilité

L'hypersensibilité comprend l'hypersensibilité allergique qui dépend de l'activation du système immunitaire (**Figure 2**), et l'hypersensibilité non allergique, indépendante de cette activation. Parmi les hypersensibilités allergiques, on distingue celles médiées par les Immunoglobuline de type E (IgE) (type I) et celles non médiées par les IgE (type II à IV). Chaque type est caractérisé par un effecteur différent et une durée de réponse différente [15].

Classification des hypersensibilités Maladies autoimmunes et allergiques						
Type I	Type II		Type III	Type IV		
IgE	IgG		IgG	CD4 Th1	CD4 Th2	CD8 cytotox.
Antigènes solubles	Ag cellulaires ou matriciels	Récepteur cellulaire	Ag solubles	Ag soluble	Ag soluble	Ag cellulaire
Mastocyte	Complément, Phagocytes, NK	Ac altère la signalisation	Complément, Phagocytes	Macrophage	Eosinophiles	Cytotoxicité
						
Rhinite all. Asthme all. Choc anaph. Anaphylaxie	Cytopénies médic. Réaction transfus. Anémie hémolytique	Thyroïdite Myasthénie	Maladie sérique Lupus érythémateux	(IDR tuberculine) Rejet de greffes Arthrite Diabète	Asthme all. chr. Rhinite all. chr.	*Rejet de greffes *Diabète type I
Urticaire de contact	Pemphigus Pemphigoïde	Urticaire chronique Pemphigus	Vascularites immunoall.	Psoriasis	Dermatite atopique	Eczéma all.de contact Vitiligo Pelade

**Figure 2 : Classification des hypersensibilités (d'après Gell et Coombs, 1963).**

L'hypersensibilité de type I est liée à la production d'IgE. L'hypersensibilité de type II fait intervenir les IgG et le système du complément. L'hypersensibilité de type III dépend des complexes immuns et de l'activation du système du complément. L'hypersensibilité de type IV, elle-même divisée en plusieurs sous-types, est liée à l'action des lymphocytes T face à l'antigène. (Ag : antigène)

L'hypersensibilité de type I est liée à la production d'IgE spécifiques d'un allergène. Cette production entraîne une libération de facteurs pro-inflammatoires. C'est une réaction immédiate qui peut toucher aussi bien la peau (urticaire) que les voies respiratoires (asthme allergique).

L'hypersensibilité de type II est une hypersensibilité non médiée par les IgE, caractérisée par une activation du système du complément. Lorsque le complément reconnaît une cellule portant l'antigène, cette cellule est lysée. Parmi les signes cliniques, il y a la cytopénie allergique.

L'hypersensibilité de type III dépend des complexes immuns. Ces complexes, en grand nombre, ne sont pas éliminés par les macrophages. Le dépôt de ces complexes initie une réaction conduisant au recrutement des éléments du complément et des neutrophiles sur le site, ce qui aboutit à des réactions inflammatoires et des destructions tissulaires. Ce mécanisme est impliqué dans le lupus érythémateux ou la maladie sérique.

L'hypersensibilité de type IV est également appelée hypersensibilité retardée. L'effecteur est le lymphocyte T, qui va reconnaître l'antigène. Il existe plusieurs sous types qui correspondent à l'activation de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et de lymphocytes T auxiliaires (*helper*) CD4+ de nature différente. Parmi les lymphocytes T *helper*, on trouve les lymphocytes Th1 qui activent les macrophages, responsables de réponses inflammatoires à l'origine de pathologies comme la dermatite de contact allergique. Les lymphocytes Th2 activent les éosinophiles, qui vont produire des cytokines pro-inflammatoires et induire de l'asthme.

Les allergènes peuvent entraîner des hypersensibilités différentes en fonction de leur nature et de la voie d'exposition. Nous nous intéresserons ici aux hypersensibilités de type I et IV qui sont celles le plus fréquemment rencontrées en milieu professionnel. Les substances

chimiques induisant ces hypersensibilités sont dites sensibilisantes et sont également appelées haptènes.

### **2.1. L'étiquetage des sensibilisants chimiques et aspects réglementaires**

L'étiquetage *Classification Labelling Packaging* (CLP) distingue deux classes de sensibilisants : les sensibilisants respiratoires et les sensibilisants cutanés. Les premiers sont des substances qui entraînent une hypersensibilité des voies respiratoires tandis que les seconds entraînent une réaction d'hypersensibilité de la peau par contact cutané (**Tableau I**). Les critères de classification sont décrits dans l'annexe I du règlement CLP. Le Système Général Harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (SGH de l'ONU) décrit un sensibilisant cutané comme étant une substance qui provoque une réponse allergique suite à un contact répété avec la peau [5]. En complément de la classification, l'étiquetage indique la catégorie des niveaux de danger différents.

Les substances sont classées comme sensibilisants respiratoires de catégorie 1 s'il existe des données montrant que la substance peut induire une hypersensibilité respiratoire spécifique chez l'être humain ou si des essais sur les animaux donnent des résultats positifs.

Le sensibilisant respiratoire est sous-catégorisé 1A si la fréquence d'occurrence de la substance est élevée chez l'humain ou si la probabilité d'apparition de la sensibilisation est élevée chez l'humain par extrapolation d'essais sur des animaux ou autres.

Le sensibilisant appartient à la sous-catégorie 1B si cette même fréquence d'occurrence est faible.

Les substances sont classées comme sensibilisants cutanés s'il existe des données montrant des sensibilisations par contact cutané chez l'Homme ou si des résultats positifs ont été obtenus sur des essais réalisés avec des tests *in chemico*, *in vitro* et *in vivo*.

Un sensibilisant cutané appartient à la sous-catégorie 1A si la substance présente une fréquence d'occurrence élevée chez l'Homme ou une puissance élevée chez l'animal qui peut suggérer un fort potentiel sensibilisant chez l'Homme.

Un sensibilisant cutané est sous-catégorisé 1B si la fréquence d'occurrence est faible chez l'Homme ou si la puissance du sensibilisant est faible chez l'animal, suggérant un faible pouvoir sensibilisant chez l'Homme.

**Tableau I : Classification des sensibilisants**

Éléments d'étiquetage pour les sensibilisants respiratoires ou cutanés		
Classification	Sensibilisation respiratoire	Sensibilisation cutanée
	Catégorie 1 et sous- catégories 1A et 1B	Catégorie 1 et sous- catégories 1A et 1B
Pictogramme		
Mention d'avertissement	Danger	Attention
Mention de danger	H334 Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation	H317 Peut provoquer une allergie cutanée

L'ensemble des sensibilisants, qu'ils soient cutanés ou respiratoires, va induire une réponse au niveau des tissus et donc des cellules qui constituent la voie d'exposition. Il existe deux types de sensibilisants : les produits chimiques à faible poids moléculaire et les protéines à haut poids moléculaire que l'on retrouve dans les matériaux naturels. L'allergie cutanée aux produits chimiques se développe au cours du temps, tandis que l'allergie aux protéines peut apparaître très rapidement. Les produits chimiques sensibilisants sont utilisés dans diverses industries telles que l'électronique, le textile, la coiffure ou encore l'utilisation et la fabrication des produits d'entretien (**Tableau II** et **Tableau III**).

Tableau II : Familles de produits chimiques connues pour induire une sensibilisation cutanée

<b><u>Composés</u></b>	<b><u>Milieus professionnels concernés</u></b>
<b>Sel de métaux : Cobalt, Nickel, Chrome</b>	Plaqueurs, industrie électronique, coiffure, caissiers, métallurgistes
<b>Résines/plastiques : isocyanates, formaldéhyde, acrylates</b>	Construction, peinture, coiffure, industrie électronique, manufacture
<b>Colorant/teintures : Paraphénylènediamine</b>	Coiffure, industrie du textile
<b>Désinfectants : glutaraldéhyde</b>	Professions médicales, agents d'entretien
<b>Fragrances</b>	Coiffure, agents d'entretien
<b>Produits pharmaceutiques : antibiotiques, thimerosal, polyéthylène glycol</b>	Personnel de santé
<b>Solvants : éthylènediamine</b>	Métallurgistes, peintures, mécaniciens
<b>Caoutchouc synthétique : dérivés de phénylènediamine</b>	Personnel de santé, coiffure, travailleurs du bois
<b>Traitements protecteurs : parabènes, isothiazolinones</b>	Métallurgistes, coiffure, travailleurs du bois

Tableau III : Familles de produits chimiques connues pour induire une sensibilisation respiratoire

<b><u>Composés</u></b>	<b><u>Milieus professionnels concernés</u></b>
<b>Isocyanates</b>	Peinture, fabrication des isolants et plastiques
<b>Anhydrides</b>	Industrie plastique
<b>Poussière de bois</b>	Menuiserie, ébénisterie
<b>Métaux : sels de platine</b>	Soudure, raffinage, joaillier
<b>Biocides</b>	Désinfection
<b>Formaldéhyde</b>	Industrie du textile, colorant et caoutchouc
<b>Persulfates</b>	Coiffure
<b>Médicaments</b>	Industrie pharmaceutique
<b>Amines aliphatiques</b>	Peinture, cosmétique, plastique, pharmaceutique

## 2.2. Caractéristiques des sensibilisants chimiques : les différents types d'haptène

Les substances allergènes induisant des hypersensibilités de type I ou IV sont généralement des molécules de faible poids moléculaire (<1000 Da) appelées haptènes. Contrairement aux allergènes protéiques, les haptènes sont d'un poids moléculaire trop faible pour être reconnus directement par le système immunitaire. Ils doivent former un complexe haptène-protéine pour devenir immunogènes [16].

Les haptènes se divisent en 3 types : les haptènes « vrais », les pré-haptènes et les pro-haptènes (**Figure 3**).

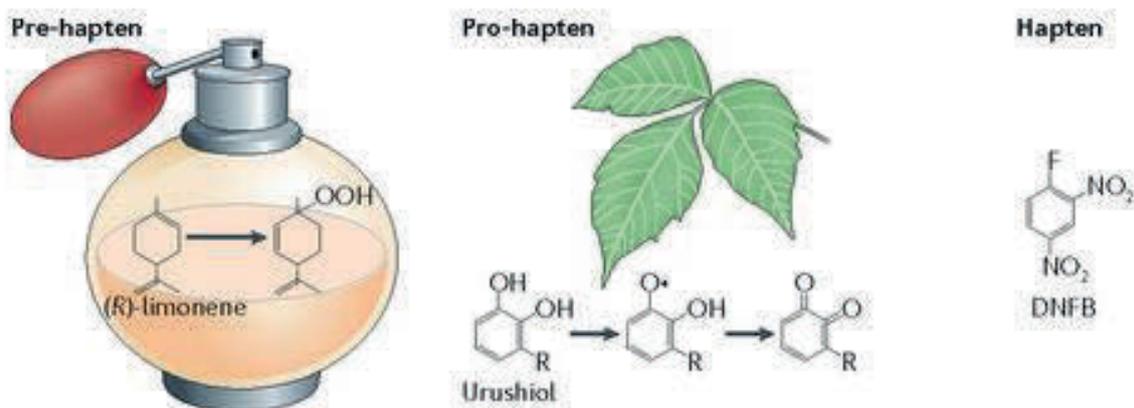
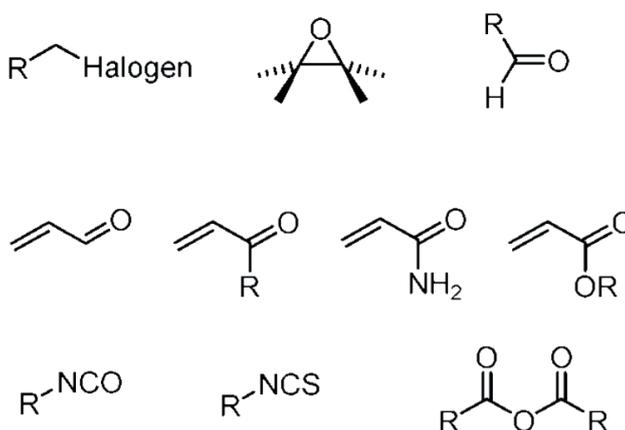


Figure 3 : Les différents types d'haptènes

### 2.2.1. Les haptènes vrais

**Les haptènes vrais** présentent une réactivité liée à leurs propriétés électrophiles intrinsèques. Ils peuvent pénétrer l'épithélium et se lier aux protéines résidentes pour former un complexe haptène – protéine immunogène. Parmi eux, on peut trouver le dinitrofluorobenzène (DNFB) qui a la particularité de se lier de façon covalente avec les protéines épithéliales. Il existe une dizaine de groupes électrophiles connus pour réagir avec les groupements nucléophiles (**Figure 4**).



**Figure 4 : Les 10 groupes fonctionnels des haptènes électrophiles (Karlberg *et al*, 2008) [17].**

#### a. Formation de liaisons covalentes

Les liaisons covalentes sont des liaisons qui confèrent aux haptènes une grande stabilité qui favorisera une sensibilisation. Ces liaisons se forment entre les fonctions chimiques électrophiles de l'haptène et les résidus nucléophiles des protéines de l'épithélium cutané ou respiratoire [18]. Parmi les acides aminés les plus fréquemment impliqués dans la formation de complexes antigéniques, la cystéine et la lysine sont les plus représentées comme cibles des électrophiles. Néanmoins, d'autres acides aminés contenant des groupements nucléophiles sont susceptibles de réagir avec les haptènes [19].

## b. Formation de liaisons de coordination

Des liaisons non-covalentes telles que les liaisons de coordination se forment généralement avec les métaux [20]. Parmi eux, il peut y avoir le nickel, le platine, le chrome ou encore le cobalt. Ils réagissent avec les protéines par des liaisons de faible affinité. Les complexes de coordination formés entre ces métaux et les protéines sont assez stables pour être reconnus par le système immunitaire.

## 2.2.2. Les pré-haptènes

**Les pré-haptènes** sont des molécules initialement inertes. Pour être réactives, elles nécessitent une transformation non enzymatique comme l'oxydation. Après cette transformation abiotique, elles sont capables de se lier aux protéines de l'épithélium pour former un complexe immunogène [16, 21]. On trouve parmi elles des fragrances comme le limonène, une substance présente dans les agrumes. Par oxydation avec l'air, il va générer des hydroperoxydes allyliques sensibilisants (**Figure 5**).

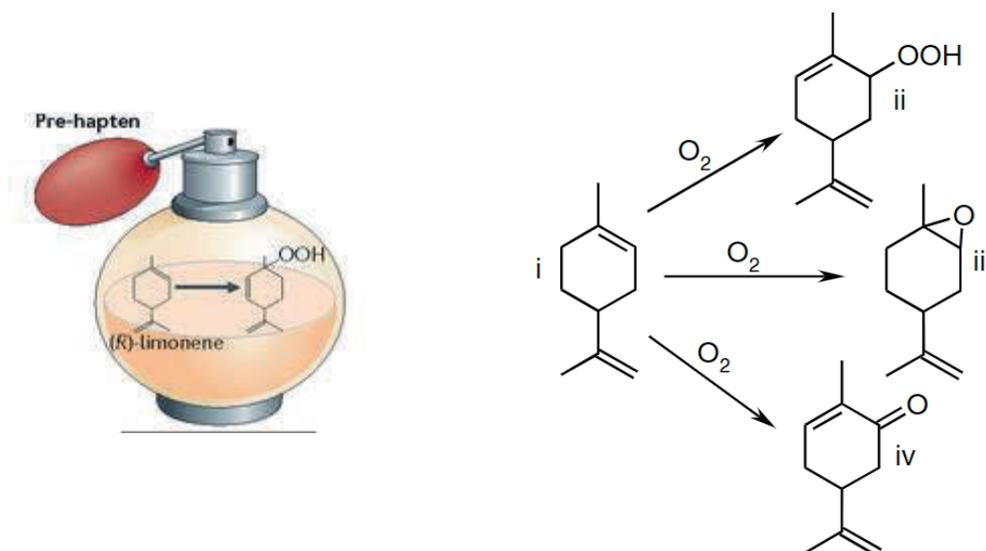


Figure 5 : Oxydation du limonène : différents produits de réaction allergisants (Matura *et al*, 2002) [22].

*i* : *d*-limonène ; *ii* : limonène-2-hydroperoxyde ; *iii* : limonène époxyde ; *iv* : carvone

### 2.2.3. Les pro-haptènes

**Les pro-haptènes** sont des molécules qui nécessitent la métabolisation par l'hôte pour devenir des haptènes vrais. L'épithélium cutané ou respiratoire possède des systèmes enzymatiques qui vont modifier la structure chimique de l'haptène pour favoriser son élimination. Les réactions d'oxydation catalysées par les cytochromes P450 figurent parmi les systèmes enzymatiques les plus fréquemment impliqués [16, 21]. L'isoeugénol est un exemple de produit qui, grâce à la peroxydase d'hydrogène, va s'oxyder et former un composé chimique sensibilisant, la vanilline (**Figure 6**).

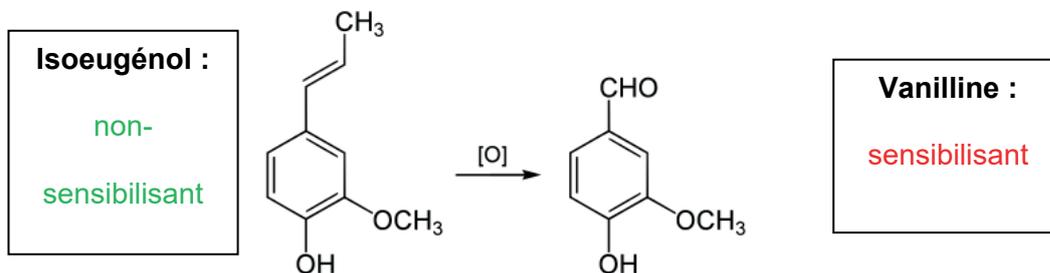


Figure 6 : Formation de la vanilline à partir de l'isoeugénol, un pro-haptène

### **2.3. Les différentes étapes de la sensibilisation cutanée et de la sensibilisation respiratoire**

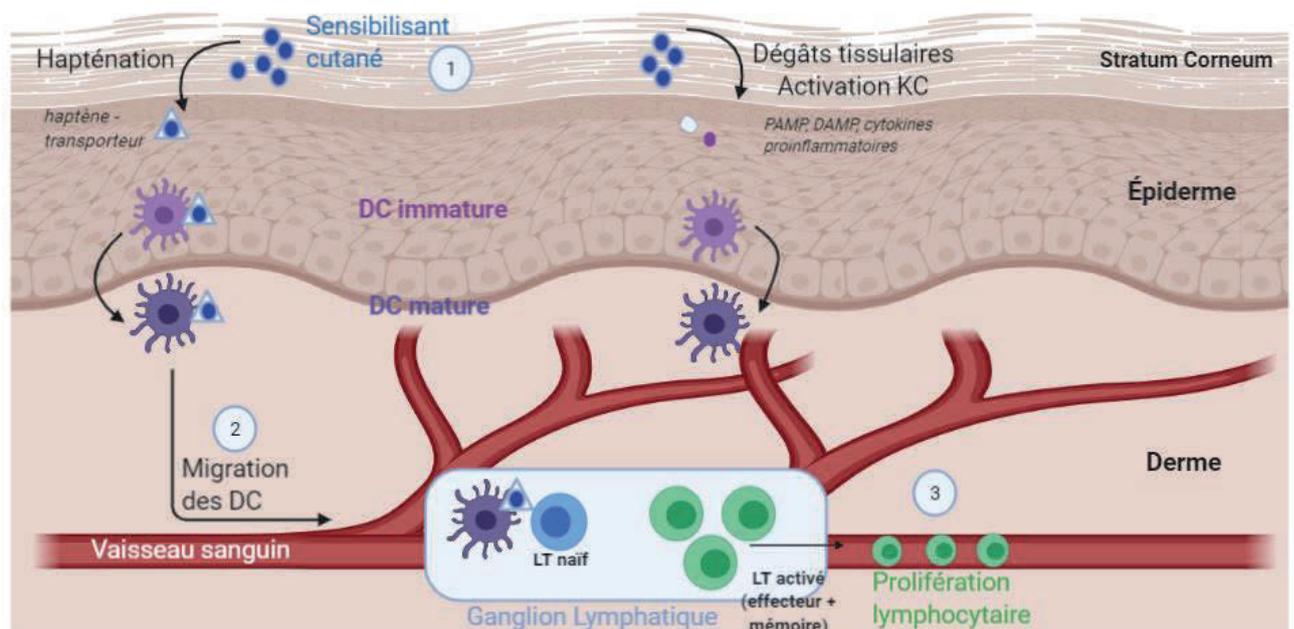
Les haptènes sont des molécules immunoréactives qui vont initier la réponse immunitaire et par conséquent l'hypersensibilité. Celle-ci se déroule en deux étapes : une phase asymptomatique dite phase de sensibilisation et une phase symptomatique appelée phase de réaction allergique ou effectrice.

La première est caractérisée par une activation inappropriée du système immunitaire inné. Plusieurs acteurs et mécanismes sont mis en jeu ; ils sont différents selon la voie d'exposition [23].

#### **2.3.1. La sensibilisation cutanée**

La phase de sensibilisation commence par le passage de l'haptène à travers la barrière épithéliale cutanée. Au niveau de l'épithélium cutané, les kératinocytes représentent la première ligne de défense face aux pathogènes, aux agressions chimiques et aux modifications mécaniques de l'environnement. Pour éliminer les éléments étrangers, ils mettent en œuvre des systèmes enzymatiques comme les cytochromes P450 ou des enzymes antioxydantes. Ce type cellulaire joue un rôle important dans la métabolisation de l'haptène [16]. L'haptène est ensuite pris en charge de manière endogène ou exogène. La première correspond à l'internalisation de l'haptène seul par les DC tandis que la seconde passe par la liaison de l'haptène avec une protéine de l'épithélium pour former un complexe haptène – transporteur. La DC, lors de la prise en charge de l'haptène va subir une maturation puis migrer vers le ganglion lymphatique. Par l'intermédiaire de molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), la DC va présenter l'antigène aux lymphocytes T (LT) naïfs, des lymphocytes T qui n'ont pas encore été activés par des antigènes. Cette présentation induit leur prolifération et activation en LT effecteurs et en LT « mémoires » circulants (**Figure 7**).

Les lymphocytes T cytotoxiques, caractérisés par la présence du marqueur CD8+, sont des LT effecteurs qui ont une activité cytotoxique. Les lymphocytes T CD4+ auxiliaires ou "helper" (Th) sont caractérisés par un profil de sécrétion cytokinique particulier. Dans le cas de la sensibilisation cutanée, il s'agit d'un profil dit Th1, avec la sécrétion des cytokines IL-2 et l'IFN $\gamma$  qui interviennent dans l'activation des lymphocytes cytotoxiques et dans la mise en place de l'hypersensibilité retardée (Type IV). Les LT mémoires vont se comporter comme des sentinelles capables d'induire une nouvelle réponse immune spécifique de la substance mais dans un délai plus court. Ces lymphocytes T mémoires ont une durée de vie très allongée et se distinguent par l'expression de la molécule CD45RO [24].



**Figure 7 : Schéma de la phase de sensibilisation d'une hypersensibilité de type IV.**

La phase asymptomatique commence par le passage de l'haptène à travers la barrière épithéliale. Puis les DC prennent en charge l'haptène avant de migrer vers le ganglion lymphatique. Enfin, la présentation de l'haptène par les DC aux LT permettront à ces derniers de se différencier puis de proliférer [23]. KC : keratinocyte ; DC : cellule dendritique ; LT : Lymphocyte T ; PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Pattern* ; DAMP : *Damage-Associated Molecular Pattern*.

### 2.3.2. La sensibilisation respiratoire

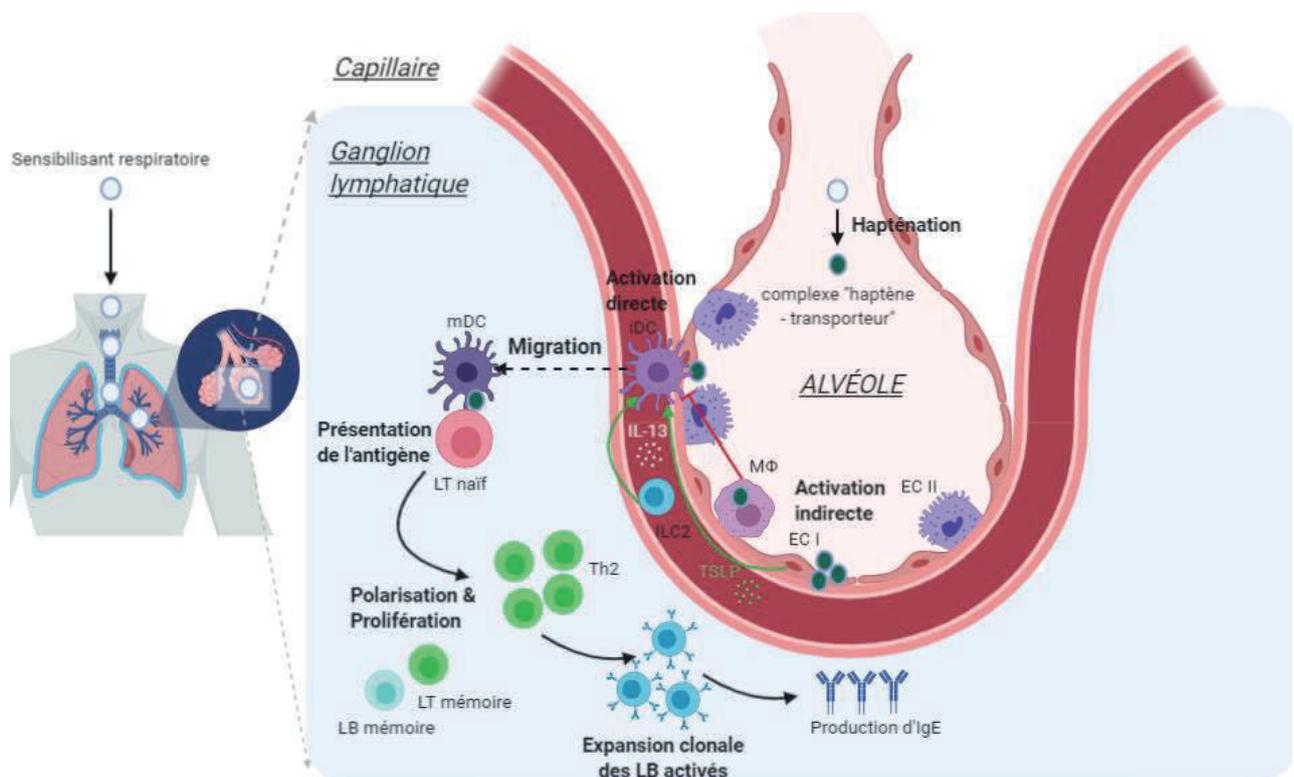
Les tissus des voies respiratoires peuvent être affectés par les molécules inhalées, notamment par les sensibilisants chimiques. Parmi les tissus respiratoires, la région alvéolaire est celle qui suscite un fort intérêt dans les études toxicologiques. En effet, sa grande surface d'échange et la présence de cellules immunitaires font de ce tissu un foyer pour l'apparition d'hypersensibilités respiratoires. Les différentes étapes de la sensibilisation respiratoire sont représentées dans la **Figure 8** [25, 26].

L'épithélium alvéolaire représente la première barrière de défense et contribue à rendre les substances chimiques immunoréactives. Les cellules épithéliales de type I et II (EC I et EC II) expriment de nombreuses enzymes de métabolisme de phase I et II qui peuvent activer la substance chimique [27, 28]. Lorsque le sensibilisant forme avec une protéine un complexe immunoréactif dit « haptène – transporteur », deux cas de figures sont possibles :

- l'élimination de la substance par les macrophages résidents par phagocytose (voie indirecte),
- l'activation des cellules épithéliales qui vont produire 2 protéines, la *monocyte chemoattractant protein-3* (MCP-3) et la *macrophage inflammatory protein-1* (MIP-1). Celles-ci vont permettre le recrutement de DC immatures qui vont s'activer sous l'effet du *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) et de l'interleukine-33 produites également par les cellules épithéliales [29-31].

Les DC vont maturer et migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques et vont présenter leurs antigènes aux LT naïfs, ce qui va induire l'activation et la prolifération en LT effecteurs *Helper* de type 2 (Th2), et, tout comme pour la sensibilisation cutanée, il y aura une production de LT mémoires. Les cytokines IL-13 et IL-4 produites par les Th2 vont induire une activation et expansion clonale des lymphocytes B. Ces derniers vont produire des Immunoglobulines de

type E (IgE) spécifiques du sensibilisant. Lors d'une nouvelle exposition au même allergène, la liaison de ces IgE sur leur récepteur spécifique (FcεR1), présents à la surface des mastocytes et des basophiles, va déclencher leur dégranulation et la libération subséquente d'histamines et de facteurs pro-inflammatoires conduisant par la suite à une hyperréactivité du système respiratoire [32]. Ainsi, un dérèglement de la balance Th1/Th2 en faveur de Th2 peut entraîner de l'asthme ou des urticaires [33].



**Figure 8 : Mécanisme de la phase de sensibilisation d'une hypersensibilité de type I.**

La première étape est l'hapténation qui va permettre d'obtenir un complexe haptène-transporteur immunogène. Ce complexe est pris en charge par les DC résidant dans l'alvéole. Ces DC vont mûrir et migrer vers le ganglion lymphatique, où elles présenteront le complexe aux lymphocytes T. Ces derniers vont ensuite proliférer et permettre l'expansion clonale de lymphocytes B, qui seront responsables de la production d'IgE spécifiques du sensibilisant. LT : Lymphocyte T ; LB : Lymphocyte B ; Th : T *helper* ; IgE : Immunoglobuline E ; EC : Cellule épithéliale ; MΦ : macrophage ; ILC1 : cellules lymphoïdes innées de type 1 ; ILC2 : cellules lymphoïdes innées de type 2 ; iDC : cellule dendritique immature ; mDC : cellule dendritique mature

### 3. Les cellules dendritiques : un rôle majeur dans la réponse à un sensibilisant

Les cellules dendritiques jouent un rôle important dans la mise en place de la sensibilisation cutanée ou respiratoire. Nous allons nous intéresser tout particulièrement à cet acteur de la sensibilisation.

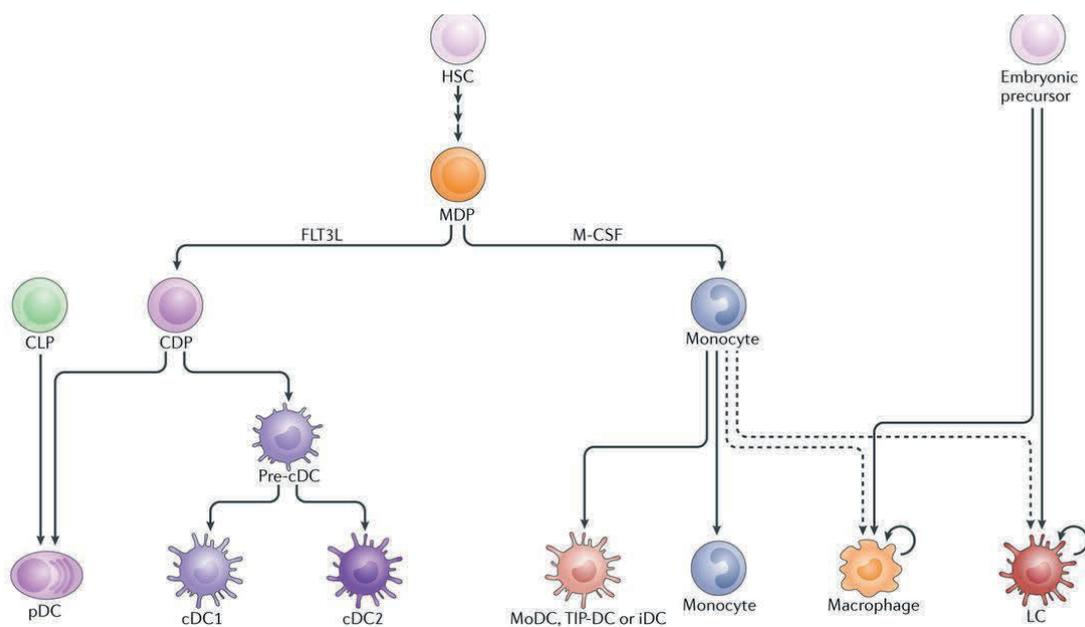
#### 3.1. Les différentes populations de cellules dendritiques

Les DC, au même titre que les macrophages et les lymphocytes B, constituent les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Ces CPA sont spécialisées dans la capture, le transport et la présentation de l'antigène aux lymphocytes T. Elles sont issues d'un même progéniteur hématopoïétique appelé *common-Dendritic Cell Progenitor* (DCP) [34].

Ce progéniteur est capable de générer différentes sous-populations de DC, définies en fonction de leur phénotype et de leur localisation [35, 36]. On distingue les DC conventionnelles (cDC), les DC plasmacytoïdes (pDC), les DC de Langerhans (LC) et les DC dérivées de monocytes (mDC) (**Figure 9**).

Les cDC sont caractérisées par une expression de l'intégrine- $\alpha$  X, également appelée CD11c, et par celle du CMH-II. Ces cellules possèdent toutes les caractéristiques nécessaires pour activer les lymphocytes T. Elles expriment les *Toll-Like Receptor* (TLR) TLR2, 3, 4 et 9 chez la souris. Leur phénotype peut varier en fonction de leur localisation (circulantes ou résidentes) [37]. Les pDC sont impliquées dans la réponse à une infection virale. Leur activation permet la production de grandes quantités d'IFN- $\alpha$ . Elles n'expriment pas toutes les mêmes TLR que les cDC (TLR7, 9 et 12) [34]. Les mDC sont des DC dérivées de monocytes. Ces derniers peuvent, en présence de certaines cytokines comme le GM-CSF ou l'IL-4, se différencier en DC. Ces mDC n'apparaissent qu'au cours d'un syndrome inflammatoire et sont fonctionnelles pour présenter l'antigène aux LT.

Les DC de Langerhans (LC) résident dans l'épiderme. Contrairement aux autres populations de DC, elles sont issues d'un précurseur embryonnaire [38]. Chez l'Homme ou chez la souris, ces cellules ont la particularité d'exprimer à leur surface la langérine, appelée également CD207, qui est un récepteur de lectine C de type II impliqué notamment dans la reconnaissance et l'induction de l'immunité adaptative aux pathogènes.



**Figure 9 : Ensemble des sous-populations de DC (d'après Eisenbarth *et al*, 2019).**

Les DC conventionnelles (cDC) et plasmacytoïdes (pDC) sont issues d'un progéniteur commun (CDP), lui-même issu d'un progéniteur de macrophage (MDP) qui provient de cellules souches hématopoïétiques (HSC). Seules les DC de Langerhans (LC) proviennent d'un précurseur embryonnaire [34].

### 3.2. Les signaux de danger

Les DC s'activent en présence de molécules appelées « signaux de danger » : les *Damage-Associated Molecular Pattern* (DAMP) et les *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMP).

S'il s'agit d'une agression microbienne, les corps étrangers (virus ou bactéries) libèrent des PAMP déclenchant une réponse inflammatoire. Les PAMP comprennent les acides nucléiques de virus ou bactéries, des composants de la paroi fongique, la protéine bactérienne flagelline, des peptidoglycanes de la paroi bactérienne et des lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram négatif [39].

Les DAMP sont des molécules endogènes généralement libérées après un stress, une blessure ou une mort cellulaire. Elles peuvent être d'origine intracellulaire ou extracellulaire [40].

Les DAMP d'origine extracellulaire sont des constituants de la matrice extracellulaire comme les protéoglycanes ou des glycoprotéines, qui sont libérés par divers mécanismes : sécrétion, synthèse *de novo*, clivage par les métalloprotéinases matricielles (MMP) (**Tableau IV**).

**Tableau IV : Exemples de DAMP extracellulaires.**

DAMP	Mécanisme de relargage	Nature chimique	Récepteur(s)
Biglycane	Clivage MMP, synthèse <i>de novo</i>	Protéoglycane	<b>TLR2, TLR4, NLRP3</b>
Fibronectine-EDA+	Clivage MMP	Glycoprotéine	<b>TLR4</b>
Tenascine C	Synthèse <i>de novo</i>	Glycoprotéine	<b>TLR4</b>

MMP : Métalloprotéinases matricielles

Les DAMP d'origine intracellulaire peuvent provenir des différents compartiments de la cellule : le cytosol, la membrane plasmique, la mitochondrie, le noyau, l'autophagosome ou encore le réticulum endoplasmique.

### 3.2.1. La reconnaissance des signaux de danger : les différents types de récepteurs présents sur les cellules dendritiques

Les différents signaux de danger peuvent être reconnus par les récepteurs *Pattern Recognition Receptor* (PRR) situés au niveau de la DC et regroupés en cinq classes : les *Toll Like Receptor* (TLR), les *Nod-Like Receptor* (NLR), les *RIG-I-like receptors*, les *AIM2-like receptors* et les *transmembrane C-type lectin receptors* (CLR). Nous nous intéresserons notamment aux TLR, aux NLR et aux CLR qui sont les récepteurs les plus couramment impliqués dans l'allergie et plus précisément l'inflammation.

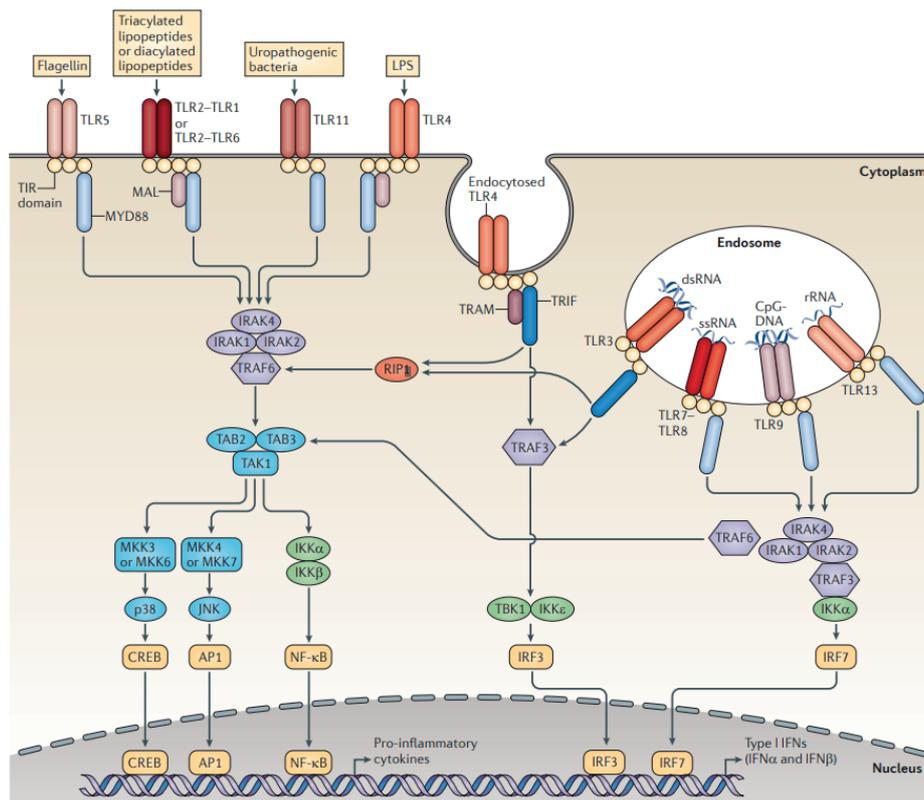
#### a. Les Toll-Like Receptors (TLR)

Les récepteurs TLR sont des glycoprotéines transmembranaires constituées d'un domaine extracellulaire, d'un domaine *N-terminal ectodomain* responsable de la reconnaissance du ligand et d'un domaine intracellulaire ou *Toll-IL-1-Receptor* (TIR) qui induit une signalisation conduisant à l'activation de la cellule dendritique. À ce jour, 10 TLR différents ont été décrits chez l'Homme (TLR 1 à 10) et 12 chez la souris (TLR1 à TLR9 et TLR11 à 13) [41].

Certains TLR sont localisés dans la membrane plasmique et d'autres au niveau de la membrane de l'endosome situé dans la cellule (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 et TLR13). En fonction du ligand, ces TLR vont s'hétéro/homodimériser et parfois utiliser des molécules adaptatrices.

Il existe une voie de signalisation commune à tous les TLR impliquant la protéine *interleukin-1 receptor associated kinase 1* (IRAK1) [42]. Après liaison du ligand au TLR, celui-ci va se combiner à la protéine adaptatrice MyD88. Le complexe TLR/MyD88 va permettre le recrutement de la protéine IRAK1. En parallèle, MyD88 formera également un complexe avec IRAK4 qui sera responsable de l'activation par phosphorylation de IRAK1. Après activation de cette dernière, IRAK1 se liera à la protéine TRAF6. Ce complexe va ensuite se détacher de MyD88 pour interagir avec un autre complexe au niveau de la membrane. Ce complexe est

constitué d'une kinase appelée *Transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1* (TAK1) et de deux protéines de liaison *TAK1-binding protein* (TAB), TAB1 et TAB2. TRAF1 permettra la translocation de ce complexe vers le cytosol et la kinase TAK1 va s'activer puis phosphoryler  $\text{IKK}\alpha$  et  $\text{IKK}\beta$  qui vont phosphoryler à leur tour la protéine  $\text{I}\kappa\text{B}$ . Cette dernière phosphorylation va induire la dégradation d' $\text{I}\kappa\text{B}$  avant la libération de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . La voie de signalisation aboutit à l'activation et la translocation de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  dans le noyau cellulaire (**Figure 10**).



**Figure 10 : Signalisation des récepteurs TLR (D'après O'Neill *et al*, 2013) [43].**

TLR : *Toll-Like Receptor* ; LPS : Lipopolysaccharide ; IFN : Interféron ; IRAK : *interleukin-1 receptor associated kinase* ; TAB : *TAK1-binding protein* ; TAK1 : *Transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1*.

b. Les *Nod-Like Receptors* (NLR)

Les NLR comprennent les *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein* (NOD) et les *NOD-Like Receptor Proteins* (NLRP) [44]. Ces récepteurs sont impliqués dans la réponse à divers PAMP et DAMP. La structure d'un NLR comprend une région C-terminale riche en motifs répétés de résidus *Leucine*. Cette région est celle qui permet la reconnaissance des signaux de danger PAMP ou DAMP. La structure comprend également une région centrale NOD, responsable de l'activation du récepteur. Enfin, ces récepteurs possèdent un domaine N-terminal constitué de plusieurs domaines qui interagissent avec des protéines impliquées dans des voies de signalisation, dont certaines sont reliées à l'inflammation. Ce domaine N-terminal est de composition variable qui va déterminer le type de NLR (**Tableau V**).

Tableau V : Différentes familles de NLR

Type de NLR	Particularité du domaine N-terminal	Fonction
NLRA	Domaine transactivation acide	Transcription du CMH-II / Régulation de son expression
NLRB	Domaine <i>baculovirus inhibitor repeat</i>	Inhibition de l'apoptose
NLRC	Domaine <i>caspase recruitment domain</i>	Reconnaissance des molécules bactériennes Régulation du CMH-I
NLRP	Domaine pyridine	NLRP3 : inflammasome

Les NLR partagent certaines propriétés des TLR. Certains NLR comme NOD1 et NOD2 sont connus pour activer la voie *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) ainsi que la voie NF- $\kappa$ B : deux voies d'intérêt dans la sensibilisation.

### c. Les récepteurs lectiniques de type C (CLR)

Les récepteurs lectiniques de type C (*C-type lectin receptors*, CLR) sont des récepteurs spécialisés dans la détection de saccharides exprimés par les champignons, mais aussi les bactéries et les virus. Ces récepteurs peuvent être exprimés au niveau transmembranaire (dectin-1, dectin-2, DC-SIGN, MMR (*macrophage mannose receptor*)) ou sous forme soluble (SP (*surfactant protein*)-A, SP-D et MBP (*mannose-binding protein*)) [45]. Ces derniers ont principalement une fonction d'opsonisation [46]. La reconnaissance de motifs osidiques par des CLR membranaires participe au processus de phagocytose et entraîne l'activation des facteurs de transcriptions *Nuclear Factor of Activated T Cell* (NF-AT), NF- $\kappa$ B et des MAPK, aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. En particulier, l'activation CLR dans les DC stimule la production d'IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-23 [45]. Ces cytokines sont impliquées dans la différenciation des lymphocytes Th17.

### 3.3. Comment sont recrutées les cellules dendritiques au niveau du site de l'inflammation ?

La plupart des précurseurs des DC quittent la moelle osseuse et entrent dans la circulation pour se localiser dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes. Le recrutement des DC est assuré par chimiotactisme grâce à une famille de cytokines appelée les chimiokines. Les DC immatures expriment à leur surface des récepteurs spécifiques de ces chimiokines, les *C-C chemokine receptor type* (CCR) et les *C-X-C chemokine receptor type* (CXCR) : CCR4, CCR6, CXCR1, CXCR2 et CXCR4 [47]. Dans des conditions inflammatoires, les DC résidentes des tissus périphériques se déplacent *via* le système lymphatique jusqu'aux ganglions lymphatiques de drainage, où elles interagissent avec les lymphocytes T. Les pDC humaines sont généralement présentes uniquement dans la circulation et dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires, où elles sont susceptibles de s'y localiser en fonction de la présence

de la chimiokine CXCR4. Dans des conditions pathologiques, les pDC se localisent dans les tissus périphériques, y compris la peau, par des mécanismes qui dépendent de l'expression de CXCR4 et CXCR3. Chez la souris, dans des conditions homéostatiques ou inflammatoires, les récepteurs de chimiokines tels que CCR2, CCR5 et CCR9 régulent la migration des DC vers des organes non lymphoïdes, tels que la peau [48]. Pour emprunter des voies migratoires aussi différentes, les DC modifient rapidement l'expression des récepteurs de chimiokines afin de répondre au gradient chimiotactique qui les guide. Un aperçu des récepteurs des chimiokines et de leur rôle dans la migration des DC est présenté dans le **Tableau VI** et le **Tableau VII** pour la souris et pour l'Homme.

**Tableau VI : Récepteurs de chimiokines et leur rôle dans la migration des DC murines [47].**

Type de DC	Récepteur de chimiokines	Fonction
cDC	CCR1	Recrutement dans les poumons lors d'une réaction allergique
	CCR2	Tolérance centrale
	CCR2, CCR6	Migration vers le tissu où se déroule l'inflammation
	CCR4	Sortie des DC cutanées vers le nœud lymphatique
	CCR7	Migration vers les nœuds lymphatiques
	CX3CR1	Migration vers les vaisseaux lymphatiques
	CXCR4	Rétention des précurseurs de DC dans la moelle osseuse
	CXCR5	Induction de la réponse Th2
	XCR1	Activation des lymphocytes CD8+
pDC	CCR2	Trafic homéostatique
	CCR2, CCR5	Sortie de la moelle osseuse
	CCR6, CCR10	Recrutement vers l'épithélium inflammatoire

Tableau VII : Récepteurs de chimiokines et leur rôle dans la migration des DC humaines [47].

Type de DC	Récepteur de chimiokines	Fonction
cDC	CCR2, CCR6	Recrutement vers le tissu inflammé
	CCR5	Recrutement vers le tissu inflammé
	CXCR4, CCR7	Recrutement vers le nœud lymphatique
	XCR1	Présentation de l'antigène aux lymphocytes T
pDC	CCR6, CCR10	Recrutement vers l'épithélium inflammé
	CXCR3	Recrutement vers le tissu malade
	CXCR4, CCR7	Recrutement vers le nœud lymphatique
	CXCR4	Recrutement homéostatique vers le nœud lymphatique
mDC	CCR1, CCR3	Recrutement vers les tissus inflammés
	CCR1, CCR5	Recrutement vers les tissus inflammés

En condition pro-inflammatoire, les cellules résidentes de l'épithélium cutané ou respiratoire produisent diverses chimiokines ligands (CCL) telles que CCL2, CCL5, CCL7, CCL20, CCL22. Parmi ces différentes chimiokines, le CCL20, également appelé *Macrophage Inflammatory Protein-3 $\alpha$*  (MIP-3 $\alpha$ ), est crucial pour le chimiotactisme des DC [49]. Il va se lier au récepteur CCR6 présent au niveau de ces DC.

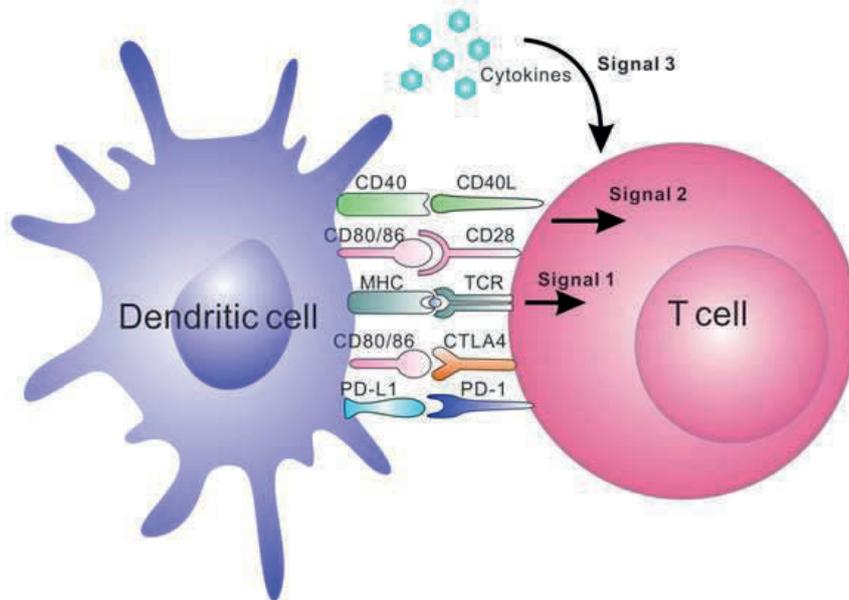
### 3.4. La maturation des cellules dendritiques

Lorsque la DC prend en charge l'haptène, elle mature, ce qui se traduit par un changement de morphologie et une réorganisation du cytosquelette [50]. Cette réorganisation permet à la cellule d'acquérir une motilité. La DC va présenter l'antigène en augmentant l'expression du CMH-I, du CMH-II et celle de marqueurs de co-stimulation et d'adhésion CD80, CD54, CD40 et CD86 [51, 52]. En plus de perdre ses fonctions de phagocytose [53], elle va acquérir des capacités de migration par l'augmentation de l'expression de récepteurs aux chimiokines comme le CCR7 [37]. Toutes ces nouvelles fonctions vont permettre à la DC d'activer les lymphocytes T.

### 3.5. Présentation de l'antigène par les cellules dendritiques matures aux lymphocytes T

Les DC engagent les LT naïfs dans une différenciation résultant de la combinaison de trois signaux (**Figure 11**) [54]. Le premier signal résulte de l'interaction du CMH de la DC avec le récepteur des cellules T (TCR) du lymphocyte T. Le deuxième signal découle de molécules de co-stimulation comme le CD86 et le CD80 avec leur récepteur CD28 ou le CD40 avec son récepteur CD40L. Le dernier signal est lié à la production par les DC et les LT eux-mêmes de cytokines comme les interleukines 2 et 12 (IL-2, IL-12). Ces interleukines jouent un rôle essentiel dans la polarisation de la réponse immune. Un déséquilibre de cette réponse peut conduire à l'allergie et à certaines maladies auto-immunes [55].

La présentation de l'antigène est différente selon la nature endogène ou exogène de ce dernier. Les antigènes endogènes sont présentés via les protéines de surface CMH-I, tandis que les antigènes exogènes sont présentés par celle du CMH-II [56].

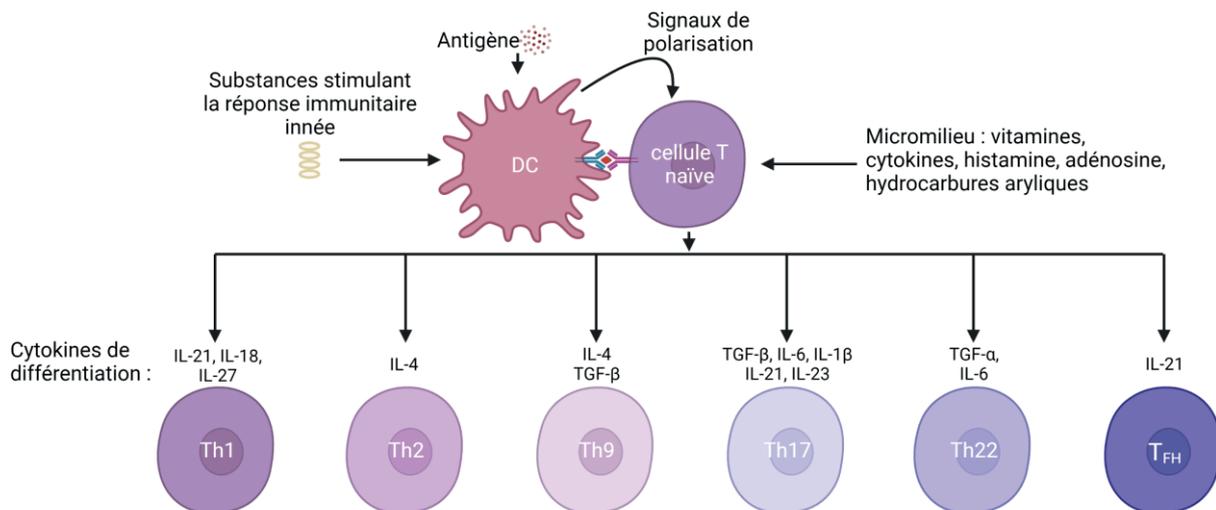


**Figure 11 : Synapse immunologique entre une cellule dendritique et un lymphocyte T naïf (D'après Wang et al, 2017).**

Le premier signal correspond à l'interaction entre le CMH et le TCR. Le deuxième signal est produit par l'interaction entre les molécules de co-stimulation (CD80, CD86, CD40) des DC et le CD28 / CD40L des lymphocytes T. Le troisième signal correspond à la production de cytokines polarisantes [54].

Les lymphocytes T sont responsables de la réponse immunitaire cellulaire spécifique. La structure globale des lymphocytes T est identique mais ils se distinguent par le récepteur membranaire ou TCR qui leur est propre. Tous les lymphocytes T possèdent au niveau du TCR le *cluster* de différenciation CD3 mais ils ne possèdent pas tous CD4 ou CD8. Les lymphocytes T possédant le CD8 correspondent aux lymphocytes T cytotoxiques, tandis que les lymphocytes T possédant le CD4 correspondent aux lymphocytes auxiliaires *Helper* (Th) [57]. Les lymphocytes Th agissent sur la réponse immunitaire adaptative en activant d'autres cellules immunitaires [58].

Les différentes populations de lymphocytes Th se distinguent par la nature des cytokines produites (**Figure 12**). Un lymphocyte T peut se différencier en lymphocyte T *helper* Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 et T<sub>FH</sub> [59]. Dans les conditions physiologiques, il y a un équilibre entre ces différents partenaires de la réponse immunologique. Un dérèglement de cet équilibre peut conduire à certaines pathologies. La réponse de type Th1 est déterminante pour le développement d'affections comme la dermatite de contact allergique (hypersensibilité de type IV). La polarisation Th1 des lymphocytes T est fortement induite par l'expression du gène *T-bet* et par l'inhibition du gène *GATA3* exprimé lors d'une polarisation Th2 [60]. En présence d'un antigène, la cellule dendritique peut produire à la fois de l'IL-27 et de l'IL-12 [61]. L'IL-27 va se fixer à son récepteur sur les lymphocytes T naïfs pour activer des facteurs de transcription STAT et induire une inhibition de *GATA3*, conduisant ainsi à augmenter l'expression de *T-bet* [55]. L'IL-12 va également se fixer sur des récepteurs de LT naïfs pour activer STAT-4 et induire une augmentation d'expression de *T-bet*. Cette activation conduira à une polarisation vers Th1 [60]. Cette dernière étape de polarisation des lymphocytes T est importante car elle va conditionner la nature des symptômes cliniques. On distingue 3 grands types de réponses reliées au type lymphocyte T *helper* impliqué : les réponses Th1, Th2 et Th17. Sur le plan clinique, une réponse Th1 est généralement associée à une dermatite de contact allergique [62] alors que la réponse Th17 induit des réactions inflammatoires localisées. Ces dernières sont responsables de pathologies comme le psoriasis [63]. La réponse de type Th2, quant à elle, est généralement associée à la défense de l'organisme contre des parasites helminthes. Un déséquilibre de cette réponse peut entraîner l'apparition de maladies comme l'asthme allergique ou l'urticaire (hypersensibilité de type I).



**Figure 12 : Les différentes populations de lymphocytes *Helper* (Adapté de Akdis et al, 2012)**

La polarisation des lymphocytes T est contrôlée par les DC. On distingue les lymphocytes Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 et T<sub>FH</sub>. Ces lymphocytes Th ont différentes fonctions qui dépendent des cytokines effectrices sécrétées [59]. Th : *Helper* ; DC : cellule dendritique ; IL : Interleukine.

#### 4. Principales voies de signalisation impliquées dans la sensibilisation

*Les DC sont majoritairement responsables de la polarisation des lymphocytes T qui dépend de signaux dont la nature est régulée par l'activation de voies de signalisation intracellulaires. Parmi les voies les plus connues, on retrouve celle des MAPK, la voie Signal Transducers and Activator of Transcription (STAT) ou encore la voie Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) / Kelch-like ECH Associated Protein 1 (Keap1).*

##### 4.1. Les principales voies MAPK

L'activation d'une voie MAPK est caractérisée par une cascade de réactions de phosphorylation impliquant une MAPK Kinase Kinase (MAPKKK) qui phosphoryle une MAPKK qui, elle-même, phosphoryle une MAPK. Ces MAPK sont capables de phosphoryler une large gamme de substrats qui comprend des facteurs cytoplasmiques ou nucléaires [64]. Ces voies de signalisation initient la réponse cellulaire face à un environnement ou un stimulus donné.

Parmi les voies MAPK, on retrouve notamment la voie *C-jun N terminal kinases* (JNK), la voie p38 ou encore la voie ERK1/2 (**Figure 13**) [65]. Ces différentes voies sont impliquées dans diverses réponses cellulaires. La voie ERK1/2 est habituellement impliquée dans la prolifération cellulaire [66] tandis que les voies p38 et JNK sont plutôt impliquées dans la réponse inflammatoire ou encore dans la mort cellulaire.

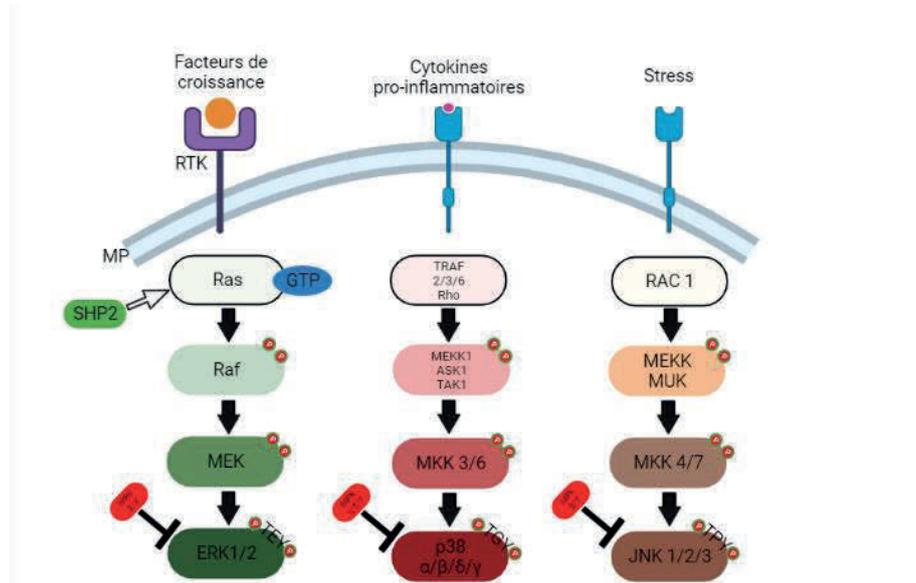


Figure 13 : Schéma des différentes voies MAPK (Adapté de Soares-Silva *et al*, 2016)[67]

#### 4.1.1. La voie p38 MAPK

Il existe quatre isoformes de p38, appelés p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  et p38 $\delta$ . Les isoformes p38 $\alpha$  et p38 $\beta$  sont exprimés de manière ubiquitaire [68], alors que les expressions de p38 $\gamma$  et p38 $\delta$  varient en fonction des tissus : p38 $\gamma$  est exprimée de manière prédominante dans le muscle squelettique [69] tandis que p38 $\delta$  est enrichie dans les poumons, les reins, les testicules, le pancréas et l'intestin grêle [70].

La voie p38 MAPK peut être activée de plusieurs manières comme l'exposition aux UV, l'augmentation de la température, les cytokines inflammatoires (IL-1 et *Tumor Necrosis Factor* appelé TNF- $\alpha$ ) ainsi que les facteurs de croissance comme FGF (*fibroblast growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth actor*) et PDGF (*platelet-derived growth factor*).

Les p38 sont activées dans leur boucle d'activation *Thréonine-Glycine-Tyrosine*, plus spécifiquement au niveau des résidus *Thréonine* et *Tyrosine*. Plusieurs MAPKKK ont été décrites comme étant impliquées dans l'activation de la voie p38 par phosphorylation : MAP3K11, MAP3K5 et MAP3K7. Ces MAPKKK vont phosphoryler les MAP kinase kinases

(MKK) MKK6, MKK3, MKK4 et MKK7. Ces kinases sont aussi connues pour activer la voie JNK appartenant à la même famille des SAPK (*Stress-Activated Protein Kinase*).

Lors de la maturation des DC, les expressions des marqueurs phénotypiques de surface tels que CD40, CD80, CD83, CD86 et les molécules du CMH de classe II sont augmentées. L'augmentation de l'expression de ces marqueurs est nécessaire pour que les DC stimulent les cellules T naïves dans la réponse immunitaire primaire. Par exemple, l'augmentation d'expression de CD40, CD80, CD86, CMH-II et CD83 induite par le TNF- $\alpha$ , une protéine impliquée dans l'inflammation, est fortement réduite par la préincubation des DC avec un inhibiteur sélectif de la voie p38 MAPK, le SB203580 [71]. Il réduit l'expression de nombreux antigènes de surface sur les DC pendant leur maturation, montrant que la voie p38 MAPK stimule l'expression des marqueurs phénotypiques de la maturation des DC.

#### **4.1.2. La voie ERK1/2 MAPK**

La voie ERK1/2 est impliquée dans la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire [72]. Elle peut être activée par différents stimuli comme le stress, des cytokines ou des facteurs de croissance. Les ligands activant la voie ERK1/2 MAPK se lient à un récepteur tyrosine kinase. Les principaux récepteurs impliqués dans l'activation de la voie ERK sont le récepteur de EGF : EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), les récepteurs de FGF : FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*) et les récepteurs de PDGF : PDGFR (*Platelet Derived Growth Factor Receptor*). La liaison du ligand à son récepteur entraîne l'activation de ce dernier. À l'état activé, le récepteur se dimérise, permettant son activation par autophosphorylation. Une fois activé, le récepteur recrute la protéine à domaine SH2 (*Src homology domain 2*), GRB2 (*Growth factor Receptor-Bound protein 2*) et permet l'interaction avec SOS-1 (*Son Of Sevenless homolog 1*) un facteur d'échange guanosine diphosphate / guanosine triphosphate (GDP/GTP) de la petite protéine G Ras. SOS-1 permet le recrutement d'une protéine Ras

activée en induisant l'échange du GDP par le GTP, convertissant ainsi Ras dans sa forme active. La protéine Ras activée est alors capable d'activer plusieurs voies de signalisation dont ERK1/2.

Contrairement à l'inhibiteur de p38 MAPK, l'inhibiteur de la MAPKK de ERK1/2, MEK1, n'inhibe pas l'augmentation d'expression de marqueurs CD80, CD86, CD83, CMH-II ou CD40 pendant la maturation des DC induite par le TNF- $\alpha$ . Au contraire, l'inhibiteur de MEK1 augmente parfois légèrement la régulation positive de CD80, CD86, CD83, CMH-II ou CD40 dans des DC exposées au sensibilisant cutané dinitrochlorobenzène (DNCB) [73]. La voie de signalisation ERK semble réguler négativement la maturation phénotypique des DC avec un impact plus faible que la MAPK p38.

#### **4.1.3. La voie JNK MAPK**

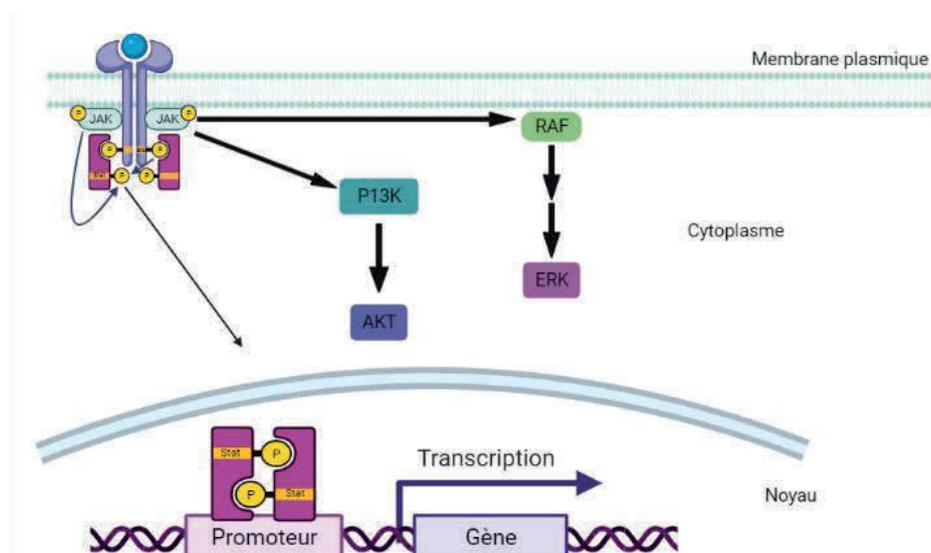
La voie JNK est activée principalement par des cytokines et par l'exposition à un stress environnemental [74]. Il existe 14 MAPKKK qui peuvent activer la voie JNK [75]. Selon les stimuli, une ou plusieurs des MAPKKK phosphorylent et activent les MAPKK MKK4 et MKK7 [76]. Les protéines kinases MKK4 et MKK7 phosphorylent et activent JNK sur sa boucle d'activation Thréonine Proline Tyrosine.

L'augmentation d'expression de CD83, CD86, CD80 et CD54 dans les DC exposées au LPS est légèrement inhibée par l'inhibiteur de la voie JNK (SP600125), tandis que l'expression de CMH-II et CD40 induite par le LPS n'est pas affectée par cet inhibiteur [77]. Néanmoins, le degré d'inhibition est bien inférieur à celui induit par l'inhibiteur de la voie p38 MAPK. Cela montre que les MAPK p38 et JNK régulent positivement la maturation des DC.

#### 4.2. Les voies de signalisation JAK/STAT

La voie Januse Kinase/STAT (JAK/STAT) est une voie de signalisation intracellulaire qui joue un rôle important dans la transmission d'un signal provenant de la membrane cellulaire vers le noyau. Cette voie de signalisation est cruciale pour la production de certaines cytokines et facteurs de croissance impliqués dans des événements cellulaires comme l'hématopoïèse ou encore le développement du système immunitaire [78].

Les JAK, qui se lient au récepteur via leurs domaines SH2, subissent une autophosphorylation avant de phosphoryler à leur tour des STAT. Les STAT activés se dimérisent. Les JAK subissent ensuite une translocation vers le noyau où elles se fixent sur les promoteurs de gènes cibles, provoquant soit une activation, soit une inhibition. Il existe plusieurs modèles d'activation de la voie JAK/STAT. Ici, les JAK phosphorylent le récepteur et créent des sites de liaison pour les STAT (**Figure 14**). En parallèle, les récepteurs des cytokines activent également des voies de signalisation impliquant des protéines telles que l'AKT et la MAPK ERK1/2 [78].



**Figure 14 : Exemple d'une signalisation JAK/STAT.**

Après fixation du ligand sur le récepteur, les JAK subissent une autophosphorylation. Ces JAK phosphorylent ensuite des STAT qui, après translocation dans le noyau, régulent leurs gènes cibles. En parallèle, d'autres voies de signalisation peuvent s'activer comme la voie PI3K/AKT ou encore la voie ERK1/2.

La voie JAK/STAT est une voie qui a la particularité d'induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [78], notamment l'interleukine 12 (IL-12). L'IL-12 est une cytokine hétérodimérique constituée de deux sous-unités : p35 et p40 qui, sous sa forme activée, stimule la production d'IFN- $\gamma$  ayant un rôle important dans la mise en place d'une réponse de type Th1 [79]. La production de ces cytokines peut dépendre de l'activation de facteurs de transcription STAT. Ainsi, l'activation des facteurs STAT3 et STAT5 dans la cellule dendritique favorise la mise en place d'une réponse de type Th2 [80, 81]. De même, la production d'IL-12 dans les DC est régulée par l'activation de STAT1 [82]. Inversement, les cytokines peuvent également activer les STAT par leur récepteur. Dans le cadre de la réponse immunitaire, la liste des STAT activées par les cytokines est indiquée dans le **Tableau VIII** [83].

**Tableau VIII : Facteurs de transcription STAT activés par des cytokines impliquées dans la sensibilisation**

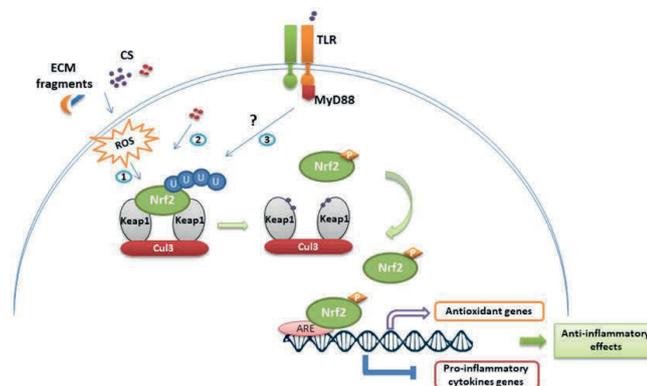
Cytokine	Jak	STAT
IL-3	Jak2	STAT3, STAT5
IL-4	Jak1, Jak2	STAT6
IL-5	Jak2	STAT1, STAT3, STAT5
IL-12	Jak2, Tyk2	STAT4
IL-13	Jak1, Jak2, Tyk2	STAT6

### 4.3. La signalisation Nrf2/Keap1

Certains sensibilisants électrophiles réagissent avec les groupements nucléophiles des protéines de l'épithélium, générant des signaux de danger dont certains peuvent provoquer un stress oxydant [84]. La voie Nrf2/Keap1 fait partie d'une des nombreuses voies de signalisation dont l'activation a été démontrée après exposition des cellules à des sensibilisants cutanés comme le DNCB ou le sulfate de nickel ( $\text{NiSO}_4$ ) [85].

La voie Nrf2/Keap1 est une voie de régulation majeure pour l'activation de gènes cytoprotecteurs. Elle est activée au cours des stress oxydant ou électrophile [86]. Les principaux acteurs sont (**Figure 15**) :

- Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), un facteur de transcription qui, associé aux protéines maf, se fixe sur les motifs ARE (*antioxidant response element*), situés dans les régions régulatrices des gènes cytoprotecteurs [87] ;
- Keap1 (*Kelch ECH associating protein 1*), un répresseur cytosolique dont sa liaison à Nrf2 favorise la poly-ubiquitination et la dégradation de ce dernier par le protéasome : c'est une protéine riche en cystéines [88].

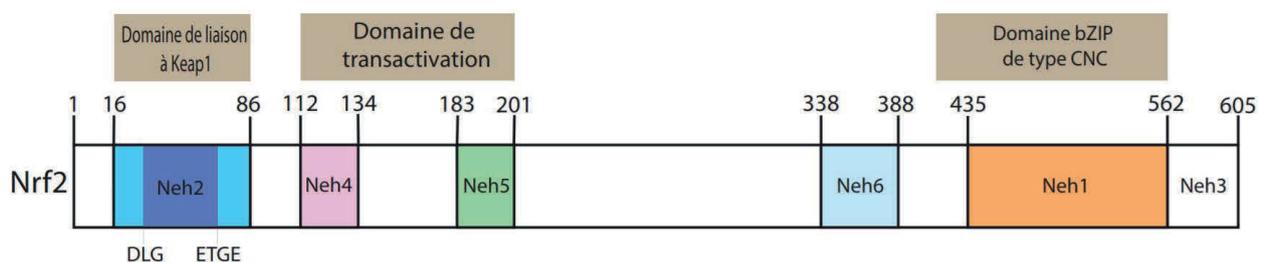


**Figure 15 : Mécanisme d'activation de la voie Nrf2/Keap1 (d'après Helou et al, 2019).**

L'activation d'un TLR ou la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) conduit à la phosphorylation de Nrf2 et à son détachement de Keap1 lui permettant ainsi d'échapper à sa dégradation. Nrf2 migre dans le noyau pour se fixer sur les motifs ARE de gènes cytoprotecteurs dont il régule l'expression [89].

#### 4.3.1. Le facteur de transcription Nrf2

Le facteur de transcription Nrf2 appartient à la famille des Cap 'n' Collar (CNC), une protéine exprimée de manière ubiquitaire dans les organes détoxifiants comme le foie, le rein, la peau et les poumons. Chez l'Homme, la protéine est constituée de 605 acides aminés au lieu de 597 chez la souris. Son domaine C-terminal présente une région appelée *basique leucine ZIPper* (bZIP). La protéine Nrf2 possède six domaines fonctionnels *Nrf2 ECH homology* numérotés de 1 à 6 (**Figure 16**). Le premier domaine Neh1 permet la fixation de l'ADN au niveau des motifs ARE. Le deuxième domaine Neh2 est impliqué dans la dégradation de Nrf2. Il possède en effet des motifs permettant le recrutement de l'ubiquitine ligase. Ce domaine est divisé en 2 motifs, le motif DLG et le motif ETGE. Ces deux motifs sont responsables de la liaison de la protéine Nrf2 à son répresseur Keap1. Les régions Neh3 à 5 sont impliquées dans l'activation transcriptionnelle de la protéine Nrf2. La dernière région Neh6 possède des motifs qui gèrent la dégradation de la protéine Nrf2.



**Figure 16 : Structure de la protéine Nrf2**

### 4.3.2. Keap1, le répresseur de Nrf2

La protéine Keap1 possède un poids moléculaire de 69kDa avec 624 acides aminés possédant des groupements thiols. Il y a 25 cystéines chez la souris et 27 chez l'Homme. La présence de ces résidus cystéine est ce qui confère le rôle de capteur à cette protéine. Les molécules électrophiles peuvent oxyder ces cystéines, induisant une modification de la conformation de Keap1 qui affecte la stabilité du complexe Nrf2/Keap1. Cela entraîne la dissociation du complexe Nrf2/Keap1. Keap1 possède 5 domaines fonctionnels (**Figure 17**) :

- la région N-terminale (*N-Terminal Region* ou NTR) ;
- le domaine de dimérisation *Broad complex Tramtrack and Bric-a-Brac* (BTB), responsable de la dimérisation et de l'interaction avec le complexe *Cul3/Rbx1 E3 ubiquitine ligase* qui permet l'adressage de Nrf2 au protéasome 26S pour sa dégradation ;
- la région *InterVening Region* (IVR) qui possède un grand nombre de cystéines interagissant avec les substances électrophiles pour une oxydation (Cys273 et Cys288, connus pour la stabilité du complexe Nrf2/Keap1) ;
- le domaine *Double Glycine Repeat/Kelch* (DGR) : Le domaine DGR et la région terminale forment une région permettant l'interaction avec le domaine Neh2 de la protéine Nrf2 ;
- la région C-terminale (*C-Terminal Region* ou CTR).

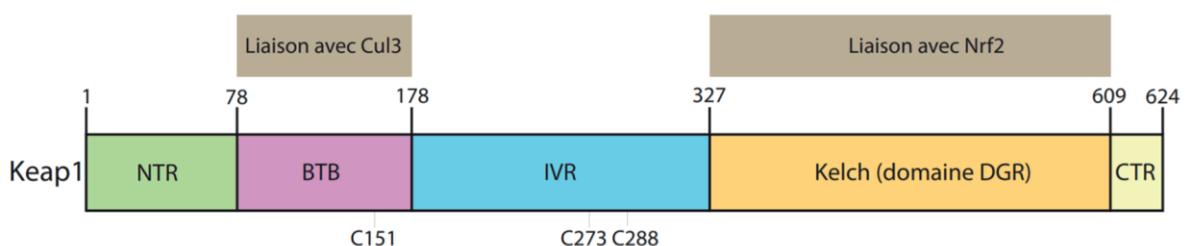


Figure 17 : Structure de Keap1, le répresseur de la protéine Nrf2

#### 4.3.3. Les gènes cibles de Nrf2, importance de la séquence « *Antioxidant Response Element (ARE)* »

Les motifs ARE sont des séquences qui se retrouvent au niveau du promoteur du gène cible de la protéine Nrf2. Ils sont situés dans la région régulatrice en amont de la séquence codante de ces gènes. La séquence du motif est la suivante : 5'-gagTcACaGTgAGtCggCAaaatt-3'. Les motifs ARE peuvent partager des séquences spécifiques de Nrf2 avec d'autres facteurs de transcription. Ainsi il peut y avoir différentes combinaisons d'hétérodimères possibles. Parmi les combinaisons possibles, on sait que Nrf2 peut s'hétérodimériser avec Jun et avec les Maf, la plus fréquente étant avec ces dernières.

Il existe différents gènes régulés par la protéine Nrf2. Parmi ces gènes on peut trouver des gènes codant des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (**Tableau IX**).

Tableau IX : Aperçu des gènes régulés par le facteur de transcription Nrf2

<u>Gène régulé par Nrf2</u>	<u>Fonction</u>
<i>hmox1 (heme oxygenase 1)</i>	Réponse au stress protéique
<i>gclc (Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit)</i>	Synthèse facteur réducteur
<i>srxn1 (Sulfiredoxine 1)</i>	Régénération des facteurs oxydants
<i>Trx (Thioredoxine)</i>	
<i>SOD (Superoxide dismutase 3)</i>	Catabolisme des ROS
<i>nqo1 (NAD(P)Hydroquinone oxidoreductase)</i>	Réduction
<i>CYP2A5 (Cytochrome P450)</i>	Oxydation
<i>GSTA2 (Glutathion S-transferase)</i>	Piégeage nucléophile

#### 4.3.4. Les différents modèles d'activation de la voie Nrf2/Keap1

##### 1. Le modèle de dissociation de Keap1 et Cul3

L'une des premières expériences visant à identifier le rôle de Cul3 dans la voie Keap1-Nrf2 a révélé que Keap1 et Cul3 étaient dissociés par les inducteurs tert-Butylhydroquinone (tBHQ) et sulforaphane [90]. Ces données suggèrent que les inducteurs ont pour fonction de stabiliser Nrf2 en dissociant le complexe Keap1-Cul3, ce qui entraîne l'inhibition de l'ubiquitination de Nrf2 et sa stabilisation (**Figure 18**). Ainsi, il semble qu'en fonction de certains inducteurs, la stabilisation de Nrf2 puisse être provoquée par un changement d'interaction entre Keap1 et Cul3.

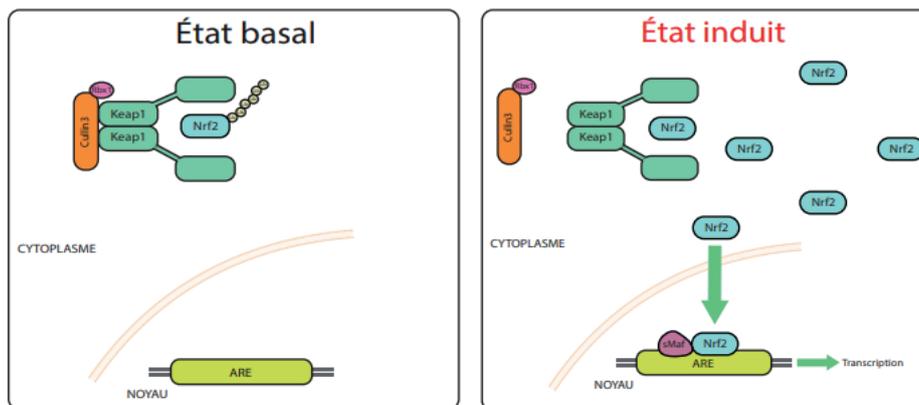
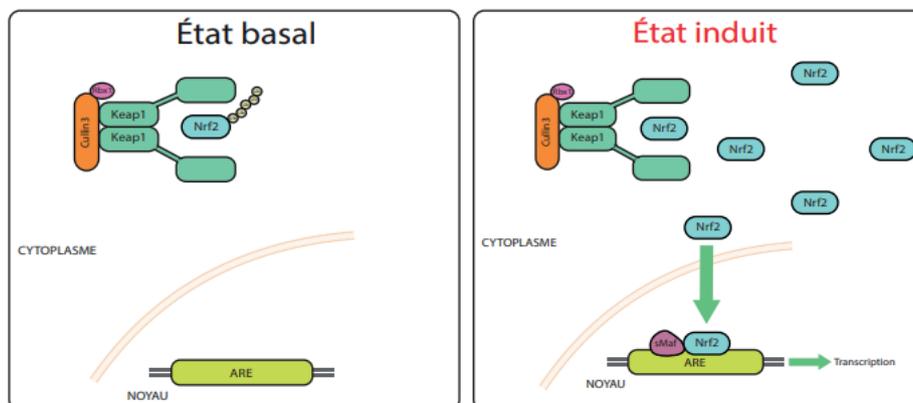


Figure 18 : Modèle de dissociation de Keap et Cul3, entraînant le détachement de Nrf2.

## 2. Le modèle *Hinge and latch*

Dans des conditions basales, Nrf2 monomère se lie à un dimère de Keap1. L'un des monomères de Keap1 se lie à Nrf2 par le motif ETGE, tandis que l'autre monomère se lie à la DLG. Cette double liaison de Nrf2 stabilise son orientation, permettant une ubiquitination efficace des résidus lysine dans l'hélice du domaine Neh2. Lorsque les inducteurs entrent dans la cellule, ils se lient aux résidus cystéine réactifs de Keap1, ce qui entraîne un changement de conformation de Keap1 et la libération de l'interaction avec le motif DLG qui est plus faible. Dans ces conditions, l'orientation de Nrf2 n'est pas fixe, et il n'est plus efficacement ciblé pour l'ubiquitination par Keap1. Le taux réduit d'ubiquitination de Nrf2 conduit à un taux réduit de dégradation de Nrf2. Comme Nrf2 est toujours lié à Keap1, tout Nrf2 nouvellement traduit ne sera pas capable de se lier à Keap1 et peut donc contourner la "porte Keap1", ce qui lui permet de s'accumuler dans la cellule, de transloquer vers le noyau, de se dimériser avec de petits Mafs et d'activer la transcription de gènes ARE-dépendants. Le mode spécifique de liaison de Nrf2 à Keap1 donne son nom au modèle, le motif ETGE formant la charnière, et le DLG le verrou. Lorsque des inducteurs se lient à Keap1, la charnière est maintenue mais le verrou est libéré, ce qui entraîne l'accumulation de Nrf2 (**Figure 19**).



**Figure 19 : Modèle *Hinge and latch***

#### 4.3.5. Autres régulations de la voie Nrf2/Keap1

##### 1. Régulation par phosphorylation

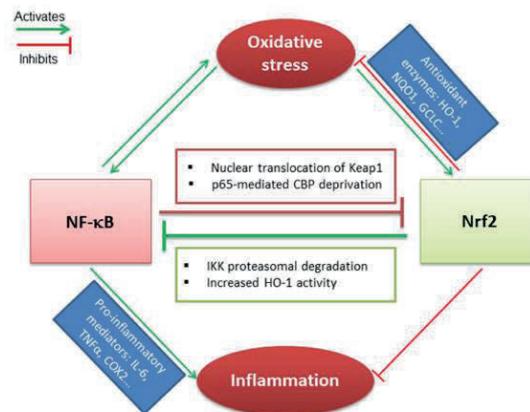
Keap1 est le principal régulateur de la protéine Nrf2 mais il existe d'autres mécanismes pouvant jouer un rôle dans son activation. En effet, la voie Nrf2 est activée par des produits chimiques qui ont des effets différents dans la cellule, en plus de modifier Keap1. Les composés peuvent affecter le phénotype cellulaire de bien d'autres façons, et certains de ces effets peuvent moduler l'activité de la protéine Nrf2 d'une manière indépendante de Keap1 [87]. De nombreuses voies de signalisation sont contrôlées de manière post-traductionnelle par l'activité des protéines kinases. Plusieurs d'entre elles jouent un rôle dans la régulation de l'activité de Nrf2. C'est le cas de la protéine kinase C (PKC). L'activation de la PKC augmente l'expression de gènes ARE-dépendants. Il a été observé que l'inhibition de la PKC réduit l'accumulation de la protéine Nrf2 médiée par le tBHQ [91]. Par la suite, il a été montré que la cible de la phosphorylation de PKC était la Sérine40 (S40) de Nrf2. Bien que la mutation de ce résidu ait réduit l'expression des gènes ARE-dépendants, cet effet n'était que partiel, ce qui suggère que la PKC agit de concert avec Keap1 [92]. D'un point de vue mécanistique, il a été suggéré que la phosphorylation de S40 par la PKC favorise la libération de Nrf2 du complexe formé avec Keap1, entraînant une augmentation de l'expression des gènes ARE-dépendants [92]. Il a été montré que l'activité de PKC est augmentée par le stress oxydatif et que cette augmentation est médiée par les kinases de la famille Src [93].

Une autre cascade de signalisation, activée par le stress oxydatif et impliquée dans le contrôle de Nrf2 est la voie des MAPK. Les inducteurs de Nrf2 tels que le tBHQ et le sulforaphane modulent l'activité MAPK [94]. L'inhibition de p38 ou ERK diminue de l'expression des gènes ARE-dépendants, suggérant que ces kinases jouent un rôle positif dans l'activation de Nrf2 [95]. En revanche, il a également été démontré que p38 régule négativement Nrf2 [94]. Cela suggère que l'impact des MAPK sur l'activation de la voie Nrf2/Keap1 peut être complexe et dépendre probablement de l'inducteur et du type de cellule. L'effet de l'activité MAPK sur

l'expression génique ARE-dépendante pourrait être dû soit à la phosphorylation directe de Keap1 ou Nrf2, soit à un mécanisme indirect et moins spécifique.

## 2. Régulation par la voie NF- $\kappa$ B

Les voies de signalisation intracellulaires communiquent entre elles pour contribuer à l'homéostasie cellulaire. L'action de Nrf2 dépend à la fois de son échappement à la dégradation et de sa phosphorylation. Plusieurs protéines vont agir sur ces deux mécanismes. L'une d'entre elles, NF- $\kappa$ B, est aussi sensible au stress oxydant. Cette protéine régule négativement Nrf2 par la translocation nucléaire de Keap1 et une privation de la *CREB binding protein* ou CBP (**Figure 20**) [96]. Nrf2 inhibe également NF- $\kappa$ B en augmentant l'expression de *hmox1* et en favorisant la dégradation de IKK, une kinase qui phosphoryle I $\kappa$ B, un régulateur négatif de NF- $\kappa$ B [97].



**Figure 20 : Communication entre Nrf2 et NF- $\kappa$ B (d'après Helou *et al*, 2019)**

Les deux facteurs de transcription ont des effets antagonistes. Nrf2 inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B en favorisant sa dégradation.

NF- $\kappa$ B inhibe Nrf2 en le privant de la "*CREB binding protein*"[89].

Les différents mécanismes décrits jusqu'ici apportent des connaissances intéressantes permettant de mieux comprendre les réponses cellulaires à différents stress qui peuvent être générés par certains produits chimiques. Ils peuvent servir de base dans l'élaboration de tests *in vitro* visant à déterminer le caractère sensibilisant de ces composés.

## 5. L'évaluation du potentiel sensibilisant

Longtemps, le modèle de référence pour étudier la sensibilisation était le *Local Lymph Node Assay* (LLNA), un test réalisé sur l'animal qui étudie la prolifération lymphocytaire. Néanmoins, la dernière directive sur l'expérimentation animale ou de la réglementation REACH imposent de réduire fortement l'utilisation d'animaux dans la recherche scientifique et, par conséquent, dans l'élaboration de tests pour l'évaluation du risque chimique. C'est pourquoi aujourd'hui, de nombreux laboratoires tentent de développer des tests reposant sur des méthodes alternatives afin de réduire, voire de remplacer, l'utilisation d'animaux.

De nombreux modèles alternatifs sont en cours de développement afin d'évaluer le potentiel sensibilisant des substances chimiques. Pour qu'un modèle soit validé en Europe, un dossier doit être soumis à l'*European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM).

Il n'existe pas encore de modèle validé pour évaluer le potentiel sensibilisant respiratoire. Dans le manuscrit de thèse sera présentée une liste non exhaustive de modèles évaluant le potentiel sensibilisant cutané des produits chimiques. Certains d'entre eux sont présentés par leurs promoteurs comme propres à évaluer le potentiel sensibilisant respiratoire.

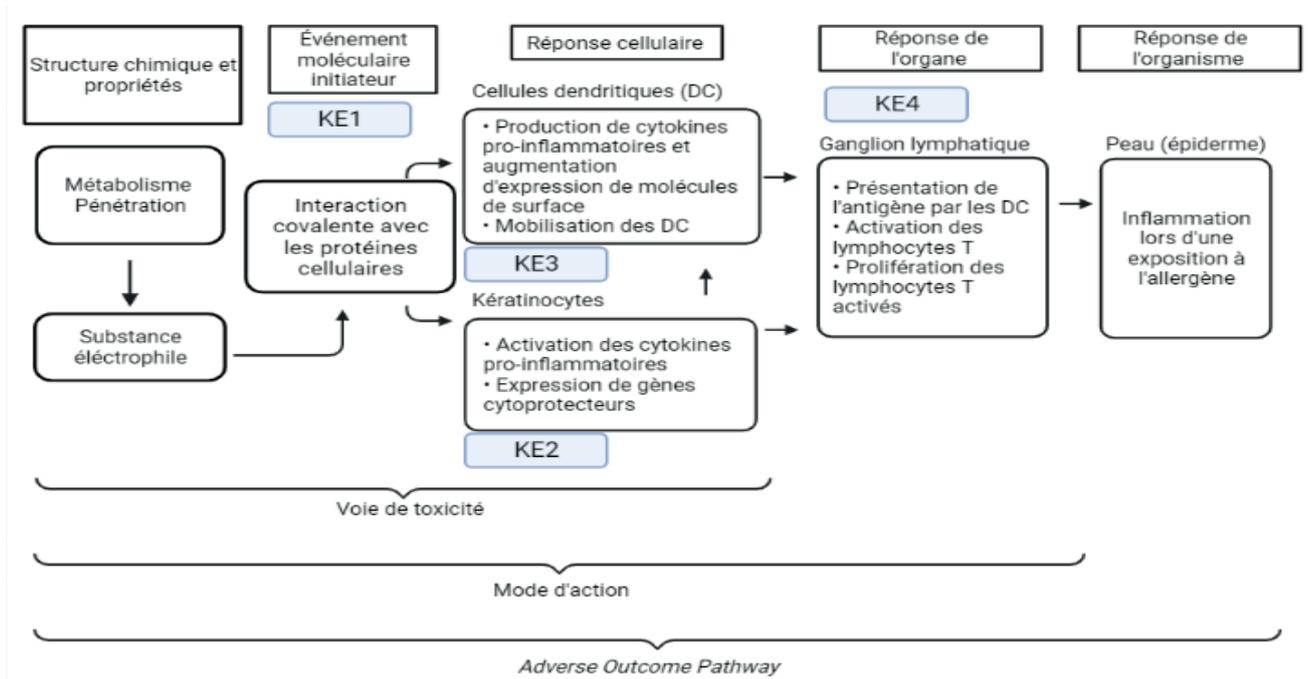
### 5.1. L'*Adverse Outcome Pathway* (AOP)

Les règlements européens comme REACH (*Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals*) ou encore CLP (*Classification, Labelling, Packaging*) imposent de déterminer les propriétés toxicologiques des substances chimiques, fabriquées ou importées avant leur mise sur le marché. Jusqu'à récemment, ces propriétés étaient évaluées par des tests réalisés sur l'animal entier, comme le test LLNA réalisé sur la souris pour évaluer la sensibilisation cutanée. La réglementation actuelle incite à limiter l'expérimentation animale et à développer des tests de substitution *in silico*, *in chemico* ou *in vitro* (directive 2010/63/UE).

Le développement de ces tests de substitution repose sur la connaissance des mécanismes d'action conduisant à la sensibilisation et à l'allergie. L'état des connaissances actuelles sur ces mécanismes a permis de modéliser les relations entre les différents événements clefs et le cheminement qui conduit de l'exposition au produit chimique à l'effet néfaste final (*Adverse Outcome*). Cette modélisation est représentée par l'AOP (*Adverse Outcome Pathway*) [98]. L'étape initiale d'une AOP est l'évènement moléculaire initiateur (MIE), suivie de plusieurs événements clés (*key event*, KE) correspondant à des niveaux de réponses différents (réponse cellulaire, réponse de l'organe). Enfin, l'AOP se termine par l'effet adverse (AO) qui correspond aux effets néfastes qu'induit le produit sur un organisme ou une population.

#### 5.1.1. L'AOP de la sensibilisation cutanée (AOP 40)

Le premier AOP publié par l'OCDE concerne la sensibilisation cutanée [99] (**Figure 21**). Dans cet AOP, l'évènement moléculaire initiateur (le premier événement clé KE1) est l'établissement d'une liaison covalente entre des substances chimiques électrophiles et les centres nucléophiles des résidus cystéine et lysine des protéines de la peau. Le deuxième événement clé se déroule dans les kératinocytes et comprend des réponses inflammatoires et des changements d'expression génique, liés à des voies de signalisation cellulaire spécifiques telles que les voies dépendant de l'élément de réponse antioxydant/électrophile (ARE). Le troisième événement clé est l'activation des cellules dendritiques, habituellement évaluée d'après l'expression de marqueurs de surface et la sécrétion de cytokines ; il peut intervenir directement après la KE1. Le quatrième événement clé est la prolifération et l'activation des lymphocytes T. Enfin l'effet indésirable (AO) est une dermatite de contact allergique.



**Figure 21 : AOP de la sensibilisation cutanée**

L'évènement moléculaire initiateur est l'interaction covalente avec les protéines de l'épithélium. Plusieurs *key events* s'en suivent avec notamment une activation des DC et des kératinocytes (au niveau cellulaire). L'effet adverse correspond à l'inflammation au niveau de la peau suite au contact avec l'allergène [99].

### 5.1.2. L'AOP de la sensibilisation respiratoire (AOP 39)

Un AOP schématisant la sensibilisation respiratoire est en cours de développement [100]. Celui-ci peut être résumé comme commençant par la liaison covalente des protéines, préférentiellement aux groupements nucléophiles de la lysine dans les poumons ou la peau, après une exposition respiratoire ou cutanée à un produit chimique de faible poids moléculaire. Cette liaison aux protéines provoque l'activation des voies de réponse au stress et des signaux de danger cellulaires, notamment le stress oxydatif. Les cytokines et les chimiokines libérées par les cellules épithéliales, entraînent la maturation et la migration des cellules dendritiques. Les haptènes peuvent également contribuer directement à l'activation des DC. Les DC entraînent au niveau des LT une polarisation de type Th2, qui caractérisent la phase de sensibilisation correspondant à l'effet indésirable (AO).

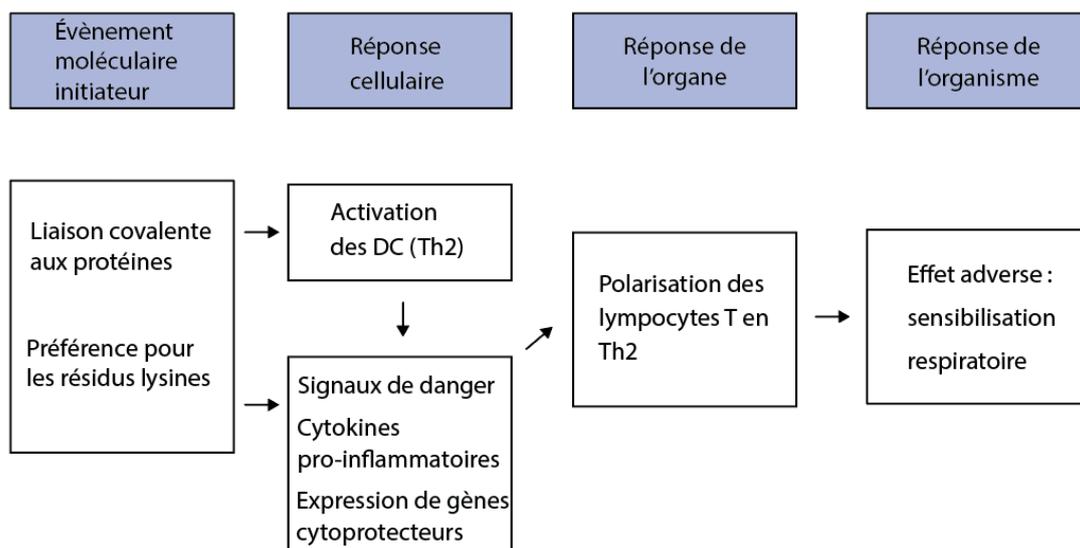
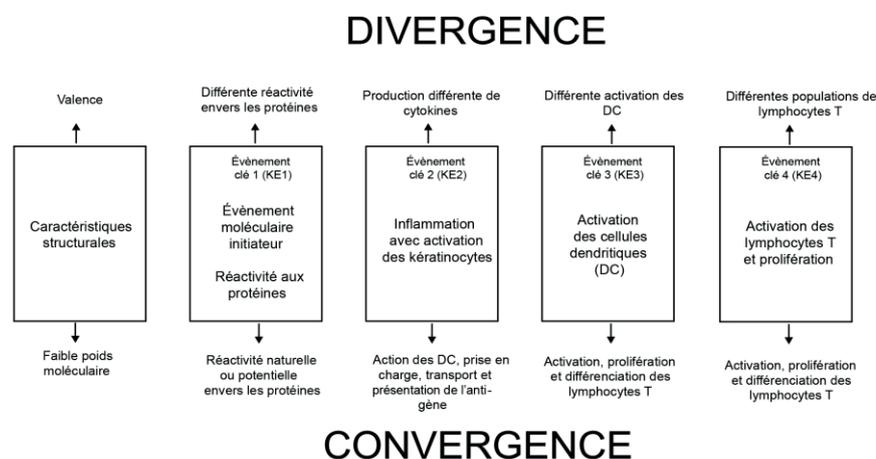


Figure 22 : AOP proposé pour la sensibilisation respiratoire (adapté de Sullivan *et al*, 2017).

### 5.1.3. Confluence entre l'AOP de la sensibilisation cutanée et l'AOP de la sensibilisation respiratoire

Une tentative d'AOP hybride a été réalisée afin de déterminer les points de convergence et de divergence entre la sensibilisation cutanée et la sensibilisation respiratoire [101]. Les événements clés pour le développement de la sensibilisation cutanée et respiratoire restent les mêmes. Comme indiqué ci-dessous (**Figure 23**), les différences semblent minimales, mais sont d'une importance considérable pour déterminer la forme que prendront les réponses immunitaires. Il existe des zones de convergence où les principaux événements sur la voie de sensibilisation sont globalement les mêmes pour les allergènes chimiques de contact et respiratoires comme par exemple la formation de signaux de danger par les cellules épithéliales ou encore l'activation des DC et la présentation de l'antigène aux lymphocytes T. Cet AOP hybride identifie également les zones de divergence potentielle où il existe des nœuds d'activité où de petites variations peuvent, individuellement ou collectivement, conduire la réponse immunitaire en aval dans différentes directions. Certains des facteurs possibles qui pourraient être responsables de l'induction de réponses divergentes comprennent : les propriétés structurales, la sélectivité des acides aminés, l'induction différentielle des DAMP, d'autres cofacteurs et cytokines, et l'engagement des DC avec des différences dans leurs propriétés fonctionnelles.



**Figure 23 : AOP hybride entre la sensibilisation cutanée et la sensibilisation respiratoire (adapté de Kimber *et al*, 2018)**

## 5.2. Exemples de modèles alternatifs validés ou en cours de développement

Les différents tests disponibles modélisent un ou plusieurs évènements clés de l'AOP. La combinaison de plusieurs tests semble supérieure à l'utilisation de tests séparés pour prédire avec exactitude le pouvoir sensibilisant des produits chimiques [102].

### 5.2.1. Le *Direct Peptide Reactive Assay* : DPRA (OCDE, ligne directrice TG 442C)

L'essai de liaison directe sur la réactivité peptidique (*Direct Peptide Reactivity Assay*) ou DPRA est un test *in chemico* qui évalue le pouvoir sensibilisant des substances chimiques en mesurant leur réactivité avec des peptides de synthèse renfermant des acides aminés lysine ou cystéine [103]. Il adresse l'évènement moléculaire initiateur correspondant au premier évènement clé (KE1) de l'AOP de la sensibilisation cutanée, à savoir l'établissement d'une liaison covalente entre les substances chimiques électrophiles et les centres nucléophiles des protéines de la peau [104]. Les produits à tester sont dissous et incubés avec des peptides dans des rapports de 1/10 pour le peptide à cystéine ou 1/50 pour le peptide à lysine. Après 24 h d'incubation, la concentration en peptide non déplété est déterminée par méthode HPLC et détection UV à une longueur d'onde de 220 nm. La déplétion peptidique des échantillons incubés dans la substance d'essai est comparée à celle des échantillons témoins (solvant) et exprimée en « déplétion peptidique relative ». Le taux ainsi calculé représente la diminution du nombre de peptides intacts en fonction du nombre total de peptides présents dans l'échantillon. Ensuite, une déplétion en peptide cystéine et lysine est rapportée pour chaque substance d'essai. Ces pourcentages de déplétion sont utilisés dans un modèle prédictif qui permet d'assigner le produit chimique testé à l'une des 4 classes de réactivité utilisées pour distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants : une classe « négative » (taux de déplétion < 6,38 %) et 3 classes « positives » (faible ; modéré ou fort). Malgré ces gradations, la prédictivité du DPRA reste limitée à une classification négative (non sensibilisant) ou positive

(sensibilisant). Le DPRA montre une reproductibilité inter-laboratoire de 80 %, une exactitude de 80 %, une sensibilité de 80 % et une spécificité de 77 % en comparaison avec des données obtenues par le LLNA.

Du fait de certaines limitations de la méthode originelle, des méthodes dérivées du DPRA ont été développées. En effet, ce test ne peut pas évaluer le potentiel sensibilisant des pré et pro-haptènes. C'est pourquoi une étape d'oxydation a été ajoutée dans le *Peroxydase Peptide Reactivity Assay* (PPRA) [105]. Par ailleurs, les produits co-éluant avec les peptides ou peu solubles peuvent être mal classés (faux négatifs). La déclinaison ADRA pour *Amino acid Derivative Reactivity Assay* (essai de réactivité à des dérivés d'acides aminés), qui s'appuie sur l'utilisation d'acides aminés de synthèse contenant soit de la lysine, soit de la cystéine permet d'améliorer la sensibilité de la méthode. Dans tous les cas, cet essai ou ses déclinaisons ne sont pas applicables à certains sensibilisants tels que les composés métalliques. Les produits chimiques qui nécessitent une bioactivation enzymatique autre que l'oxydation, pour exercer leur potentiel de sensibilisation sur la peau ne peuvent pas non plus être détectés. Cette méthode dérivée montre une reproductibilité inter-laboratoire de 91,9 %, une exactitude de 86,9 %, une sensibilité de 81,5 % et une spécificité de 98,1 % en comparaison avec des données obtenues par le LLNA.

Il est important de remarquer que le DPRA est à l'heure actuelle le seul test alternatif qui, dans sa déclinaison d'essai cinétique ou kDPRA (*kinetic DPRA*), a été validé pour catégoriser les sensibilisants (en 1A ou 1B). Dans cette variante, la réactivité des produits chimiques d'essai vis-à-vis d'un peptide de synthèse contenant de la cystéine, est établie en fonction du temps et de la concentration [106]. Les constantes de vitesse de la réaction sont calculées et le logarithme de la constante de vitesse maximale ( $\log$  valeur  $k_{max}$  en  $s^{-1}M^{-1}$ ) obtenu pour chaque produit chimique est utilisé pour aider à distinguer les sensibilisants de la sous-catégorie 1A ( $\log k_{max} \geq -2.0$ ) du SGH de l'ONU des autres (1B ou non sensibilisant-  $\log k_{max} < -2.0$ ). Concernant les performances pour la catégorisation des sensibilisants, le kDPRA montre une reproductibilité inter-laboratoire moyenne de 88 %. Cet essai permet de distinguer les sensibilisants cutanés appartenant à la sous-catégorie 1A de ceux qui ne sont pas sous-

catégorisés 1A (non-sous-catégorie 1A) avec une exactitude de 85 %, une sensibilité de 84 % et une spécificité de 86 %, par comparaison avec les résultats obtenus par le LLNA.

### **5.2.2. Le Keratinosens™ (OCDE, ligne directrice TG 442D)**

Certains sensibilisants cutanés, en induisant un stress oxydant ou électrophile, activent la voie Nrf2/Keap1. Le test *in vitro* du KeratinoSens™ utilise une lignée cellulaire HaCaT humaine de kératinocytes. Dans cette lignée, la luciférase, un gène rapporteur, est utilisé pour quantifier l'expression induite par le motif ARE situé dans le promoteur de l'aldoreductase [107]. Ce test a été validé par l'OCDE. Le test consiste à tester douze concentrations de la substance allant de 0,98 à 2000 µM. Les cellules sont ensuite exposées 48 h au produit. Après lyse cellulaire, le substrat de la luciférase est ajouté puis la luminescence est mesurée. Pour que le résultat du test soit valide, la viabilité cellulaire doit être supérieure à 70 %. La mesure de la luminescence est corrélée à l'activation de la voie Nrf2/Keap1 et, dans le cas de ce test, au pouvoir sensibilisant. L'induction de la luciférase, est mesurée pour établir une courbe dose-réponse entière, l'*I*<sub>max</sub> (le taux d'induction maximal utilisant le solvant comme témoin) et l'*EC*<sub>1,5</sub> (la concentration nécessaire pour induire un taux d'induction de 1,5) sont alors déterminés. Un taux d'induction supérieur au seuil de 1,5 de l'activité de la luciférase signifie que la substance testée est sensibilisante. Sur la base de l'ensemble de données de l'étude de validation et des tests internes utilisés pour l'examen indépendant par les pairs du test, le KeratinoSens™ s'est avéré transférable aux laboratoires expérimentés en culture cellulaire avec une reproductibilité inter-laboratoire de 85 %. Il possède une exactitude de 77 %, une sensibilité de 78 % et une spécificité de 76 % en comparaison avec les données obtenues avec le LLNA. Toutefois, la mise en évidence de l'activation de la voie Nrf2/Keap1 n'est pas suffisante pour caractériser tous les sensibilisants [108].

### 5.2.3. LuSENS (OCDE, ligne directrice TG 442D)

Le test LuSENS est un test *in vitro* qui utilise une lignée cellulaire dérivée de kératinocytes humains dans laquelle a été inséré le gène de la luciférase sous le contrôle de l'élément ARE, de la même manière que le Keratinosens™. A la différence de ce dernier le promoteur utilisé est celui du gène codant la NADPH quinone oxydoréductase (nqo1) et 6 concentrations de produits sont testées [109]. Dans cet essai l'activité de la luciférase est également directement liée à l'activation de la voie Nrf2/Keap1. Ce test est proposé comme étant une alternative au Keratinosens™. Il a montré une excellente reproductibilité inter-laboratoire (100 %) ainsi qu'une bonne exactitude (82 %) [110].

### 5.2.4. SENS-IS

Le test Sens-Is *in vitro* permet d'évaluer la capacité des substances chimiques testées à induire spécifiquement l'expression génique de biomarqueurs de l'irritation et de la sensibilisation en utilisant un épiderme 3D reconstruit appelé *Episkin*™[111]. Le protocole consiste à l'analyse de trois groupes de gènes par RT-qPCR, un groupe spécifique au potentiel irritant et deux groupes spécifiques au potentiel sensibilisant. En mesurant le nombre de gènes induits dans ces trois catégories à un temps donné (6 h) après l'application et en le comparant aux témoins, le test du SENS-IS permet de déterminer le danger et d'avoir une information sur la puissance. Ils sont mis en culture pendant deux semaines avant que la substance d'essai soit dissoute dans un solvant approprié et appliquée au niveau du *stratum corneum* pendant 15 minutes. Les concentrations d'essai pour chaque substance testée sont de 0,1 %, 1 %, 10 %, 50 % et 100 % v / v. Le premier groupe de gènes pour l'irritation est utilisé pour valider le test. En effet, le test est rejeté si la substance testée à la concentration minimale induit la surexpression de plus de 20 gènes d'irritation pour un seuil de 1,25 fois la valeur du véhicule. En parallèle au caractère sensibilisant de la substance, une puissance est également attribuée

(faible à extrême). Plus la substance est sensibilisante à une concentration faible, plus la puissance sensibilisante est importante. Pour être considérée comme sensibilisante, une substance d'essai doit induire une augmentation d'au moins 1,25 fois l'expression d'au moins 6 gènes dans le groupe des gènes spécifiques de la sensibilisation. Si aucune des concentrations d'essai ne dépasse ce seuil, la substance est évaluée comme étant non-sensibilisante. Les performances de ce test indiquent une reproductibilité inter-laboratoire excellente (>90 %) ainsi qu'une excellente sensibilité (91 %), spécificité (83 %) et exactitude (87 %) en comparaison avec les données humaines ou celles obtenues par LLNA [112]. Ce test est en cours de validation auprès de l'ECVAM.

#### **5.2.5. Myeloid U937 Skin Sensitisation Test : U-SENS**

Ce test *in vitro* permet d'évaluer la capacité d'une substance à activer des DC. La viabilité cellulaire ainsi que l'expression de la molécule de co-stimulation CD86 sont analysées en cytométrie en flux [113, 114]. Afin d'éviter d'analyser des données comprenant un effet cytotoxique significatif, la détermination préalable de la CV70 (concentration maximale de produit d'essai pour laquelle la viabilité est au moins égale à 70 %) est réalisée. Les cellules de lymphome histiocytaire humaines U937 sont exposées pendant 48h au produit testé avec une gamme de six concentrations. Les cellules sont ensuite lavées et incubées avec des anticorps anti-CD86 couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine et sont analysées par cytométrie en flux. La viabilité cellulaire est mesurée par exclusion à l'iodure de propidium (IP). Pour les concentrations d'essai ayant une viabilité d'au moins 70 %, la mesure de l'expression du CD86 sert à déterminer l'indice de stimulation (SI). La concentration induisant un SI de 1,5 est calculée par interpolation linéaire. Une molécule est prédite sensibilisante si elle induit une augmentation du CD86 supérieure à 150 % des cellules non traitées et si cette induction est dose-dépendante par rapport aux doses non toxiques. Les performances de test comprennent

une reproductibilité inter-laboratoire de 84 %, une exactitude de 86 %, une sensibilité de 91 % et une spécificité de 65 % en comparaison avec des données obtenues avec le LLNA.

#### **5.2.6. Le modèle *human-Cell Line Activation* : test h-CLAT (OCDE, 2016a).**

Le modèle h-CLAT utilise des cellules de la lignée THP-1, connues pour avoir des compétences similaires à celles des DC (capacité de maturation et de présentation de l'antigène) [115]. Ce test *in vitro* repose sur l'analyse des marqueurs phénotypiques de maturation CD86 et CD54 [116]. Le test h-CLAT est divisé en deux parties. La première partie vise à déterminer la concentration de la substance qui induit une viabilité cellulaire de 75 %, la CV75. Cette étape est réalisée par cytométrie en flux à l'aide de l'iodure de propidium (IP). La deuxième partie étudie l'expression des marqueurs CD86 et CD54, analysée par cytométrie en flux après traitement des cellules pendant 24h par 8 concentrations différentes se situant autour de la CV75. L'intensité de fluorescence relative appelée RFI est déterminée pour interpréter les résultats. La RFI du CD86 et du CD54 pour les cellules témoins positifs et les cellules traitées par la substance sont calculées. Si la RFI du CD86 est supérieure ou égale à 150 % ou/et si la RFI du CD54 est supérieure ou égale à 200 % pour n'importe quelle dose testée avec au moins deux essais indépendants, la substance testée sera considérée comme étant sensibilisante. Le cas contraire, elle sera classée comme étant un non-sensibilisant. Ce test montre une reproductibilité inter-laboratoire de 80 %, une exactitude de 85 % avec une spécificité et sensibilité respectivement de 66 % et 93 % en comparaison avec des données obtenues avec le LLNA.

### 5.2.7. Le *Genomic Allergen Rapid Detection test (GARD)*

Le GARD est un test *in vitro* utilisant une lignée de cellules humaines myéloïdes (MUTZ-3) pour évaluer le potentiel sensibilisant cutané. Ce test a été développé par la société SenzaGen en partenariat avec l'université de Lund (Suède). Ce test repose sur une analyse transcriptomique de 200 gènes « signatures » activés lors d'une exposition cellulaire aux sensibilisants cutanés [117]. Récemment, ce modèle a proposé une première signature génique pour la sensibilisation respiratoire [118]. Les cellules sont stimulées avec le produit à tester à une concentration n'induisant pas une mortalité supérieure à 10 %. Au bout de 24h, une analyse phénotypique est réalisée. L'ARN est ensuite collecté et hybridé à des puces. Le profil d'expression est analysé puis comparé à une base de données prédictive qui permet de conclure si la substance testée est sensibilisante ou non sensibilisante. Le GARD est décliné en plusieurs tests, le GARDSkin, le GARDAir et le GARDPotency. Ils analysent respectivement le potentiel sensibilisant cutané, le potentiel sensibilisant respiratoire et la puissance des sensibilisants. Les performances du GARDSkin comprennent une reproductivité inter-laboratoire de 92 %, avec une exactitude de 93,8 %, une sensibilité de 92,7 % et une spécificité de 96 % ; un avant-projet pour ce test a été édité par l'ECVAM fin 2021. Le GARDPotency possède une reproductibilité inter-laboratoire de 61,1 %, une sensibilité de 90,3 % pour la catégorie 1A, une sensibilité de 84,2 % pour la catégorie 1B avec une exactitude globale de 88 %. Néanmoins l'ECVAM *Scientific Advisory Committee* (ESAC) considère la reproductibilité inter-laboratoire de ce test comme étant insuffisante pour envisager sa validation. Le GARDair montre une exactitude de 84 %, une sensibilité de 67 % et une spécificité de 89 %. Bien qu'il soit l'un des premiers tests développés pour évaluer les sensibilisants respiratoires, celui-ci n'a pas encore été à notre connaissance proposé pour validation auprès des instances réglementaires (ECVAM/OCDE). Ainsi, il n'existe pas encore à ce stade de modèle validé pour évaluer potentiel sensibilisant respiratoire.

### 5.2.8. Le modèle de cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris (BMDC) développé au laboratoire

Le test BMDC a été développé à l'INRS à partir de 2007 [4]. Comme le h-CLAT il modélise l'étape 3 de l'AOP à savoir la réponse des cellules dendritiques au sensibilisant. Il repose sur l'utilisation de DC dérivées de cellules de moelle osseuse de souris. Après exposition pendant 48 h à des concentrations croissantes du produit à tester, jusqu'à une limite de viabilité de 80 %, l'expression des marqueurs de surface CD86, CD80, CD54, CD40 et CMH-II est analysée par cytométrie en flux. Un index de stimulation (SI) est calculé selon la formule décrite ci-dessous. Si le SI est supérieur à 1.5, le produit est classé comme sensibilisant, sinon il est considéré comme non-sensibilisant.

**Formule de calcul du Stimulation Index (SI) avec T (traité) et c (contrôle positif) :**

$$SI = \text{mean} \left( \left( \frac{\% \text{ cells} + T \text{ MHCII}}{\% \text{ cells} + c \text{ MHCII}} \right); \left( \frac{\% \text{ cells} + T \text{ CD40}}{\% \text{ cells} + c \text{ CD40}} \right); \right. \\ \left. \left( \frac{\% \text{ cells} + T \text{ CD54}}{\% \text{ cells} + c \text{ CD54}} \right); \left( \frac{\% \text{ cells} + T \text{ CD86}}{\% \text{ cells} + c \text{ CD86}} \right) \right)$$

Cet essai BMDC éprouvé sur 20 produits chimiques, permet de classer les sensibilisants qu'ils soient cutanés ou respiratoires avec une sensibilité de 69 % et une exactitude de 75 % [119]. Les SI obtenus ont par ailleurs montré une belle corrélation avec la concentration effective (EC3) issue du test LLNA, permettant une catégorisation des sensibilisants en termes de puissance (**Figure 24**). Toutefois, les données obtenues avec le test BMDC ainsi publiées, ne permettent pas de distinguer les sensibilisants cutanés des sensibilisants respiratoires. Récemment, les performances du modèle ont été calculées après avoir testé plus de 100 produits chimiques ; des sensibilisants, essentiellement cutanés et des non-sensibilisants. Avec une sensibilité de 94 % et une spécificité de 78 %, les performances sont égales voire

supérieures aux modèles alternatifs déjà validés. Cependant il n'est pas en mesure de discriminer les sensibilisants cutanés des sensibilisants respiratoires.

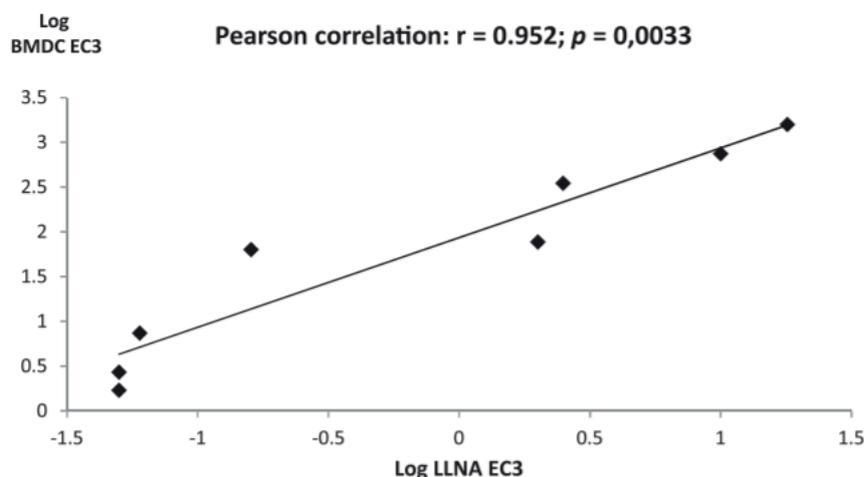


Figure 24 : Corrélation entre le modèle BMDC et le modèle LLNA (de Battais *et al*, 2017) [119].

Par ailleurs, les cellules du modèle BMDC exposées à un sensibilisant respiratoire ou cutané puis co-cultivées avec des lymphocytes T, induisent l'activation de ces derniers [120]. En effet, ces DC pré-incubées avec différents sensibilisants cutanés ou respiratoires, notamment le DNFB et l'HCP, entraînent une réponse lymphocytaire telle que la prolifération (CD4 et/ou CD8), l'expression de certains marqueurs de surface (CD25, CD44, CD69 et CD124) et la sécrétion de cytokines (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 et IL-17) ; ces événements correspondent à la KE 4 de l'AOP. En d'autres termes, les cellules BMDC sont fonctionnelles pour induire une activation lymphocytaire. Les BMDC, en réponse aux sensibilisants, modélisent donc non seulement la KE3 mais permettent de déclencher, au moins en partie, les étapes ultérieures conduisant à la sensibilisation.

Le modèle développé à l'INRS, présente ainsi plusieurs intérêts. En comparaison avec les autres tests d'évaluation des sensibilisants cutanés décrits précédemment, ses performances sont plus élevées. De plus, il permet de renseigner sur la puissance de ces sensibilisants,

enfin il permet d'identifier les sensibilisants respiratoires sans pour autant les distinguer des sensibilisants cutanés.

### **5.3. L'approche définie pour l'évaluation de la sensibilisation cutanée**

Une approche définie « AD » est selon l'OCDE « un ensemble défini de sources d'information (prédiction *in silico*, données *in chemico* ou *in vitro*) utilisées en une combinaison spécifique, dont les résultats sont interprétés selon une procédure établie d'interprétation des données (modèle mathématique ou approche fondée sur des règles, par exemple) ». Les AD utilisent des combinaisons de méthodes dans le but de compenser certaines des limites de chacune de ces méthodes lorsqu'elles sont appliquées seules.

La ligne directrice OCDE n°497 définit 2 approches définies qui sont [121]:

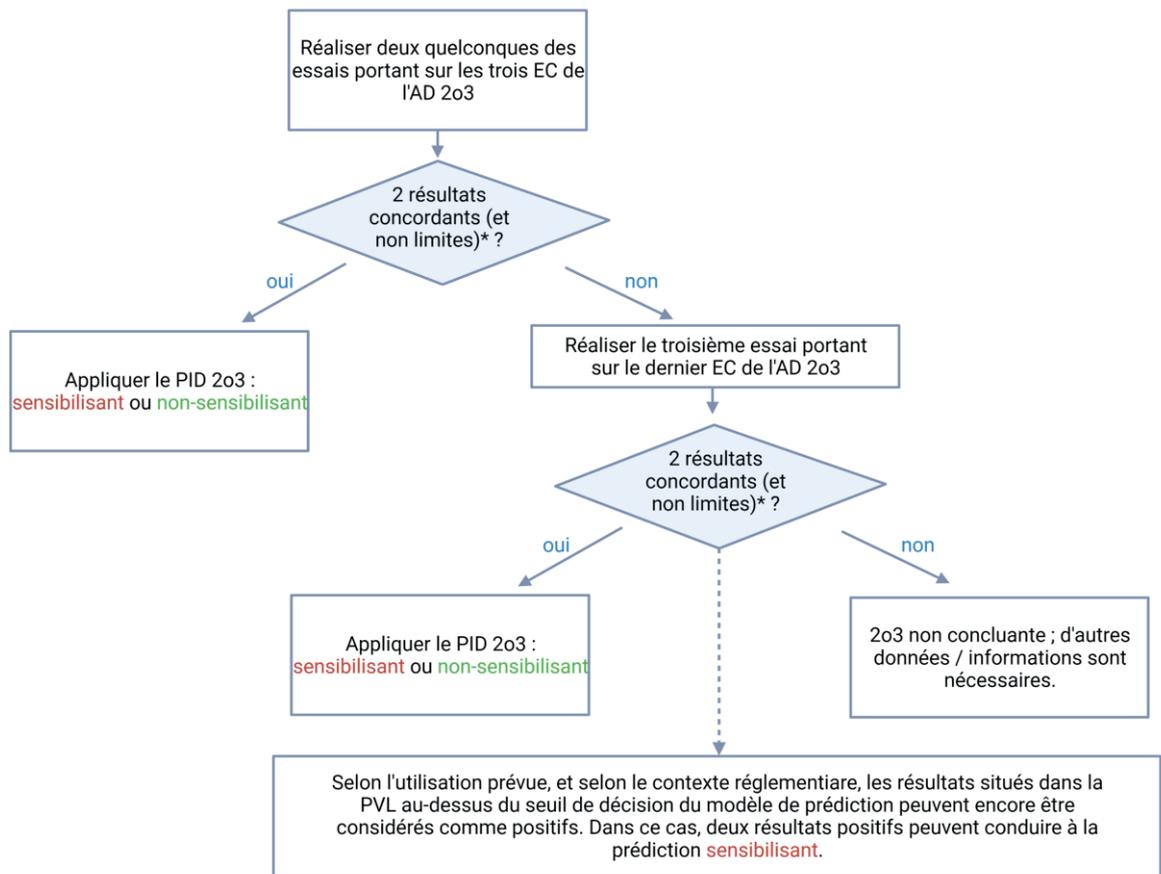
- l'approche définie « 2o3 » pour évaluer le potentiel sensibilisant cutané
- la stratégie d'essai intégrée (ITS) version 1 ITSv1 ou version ITSv2 pour évaluer le potentiel sensibilisant cutané et la puissance.

#### **5.3.1. L'approche définie 2o3**

L'approche définie « 2o3 » a été conçue pour identifier le danger de la sensibilisation cutanée sans recourir à l'expérimentation animale. Elle n'est cependant pas conçue pour évaluer la puissance du sensibilisant. Les différents tests inclus dans cette approche définie couvrent au moins deux des trois premiers événements clés de l'AOP de la sensibilisation cutanée. La liaison du produit aux protéines est couverte par le test DPRA. L'activation des kératinocytes est couverte par le Keratinosens™ et l'activation des DC est couverte par le test h-CLAT. Au terme de l'interprétation des données, deux résultats concordants obtenus par des

méthodes portant sur au moins deux des trois premiers évènements clés de l'AOP déterminent la classification finale. La comparaison des résultats de l'AD 2o3 effectuée pour 168 produits chimiques avec les données de référence obtenues via LLNA a donné lieu à une exactitude de 83 % et une exactitude équilibrée de 84 %. Une comparaison a également été effectuée pour 65 produits chimiques avec les données de référence humaines. Elle a montré que l'exactitude de l'AD 2o3 dépasse celle du LLNA pour l'identification du danger. L'acquisition et l'interprétation des données sont une démarche transparente qui ne nécessite pas un avis d'expert. Elle prédit le danger de sensibilisation cutanée sur la base d'essais successifs, réalisés dans un ordre non déterminé, conformément à un maximum de trois méthodes substitutives à l'expérimentation animale qui sont reconnues à l'échelle internationale.

Le principe de cette approche est de tester deux évènements clés et, si les résultats concordent, le produit chimique est en conséquence prédit sensibilisant ou non sensibilisant. Si les deux premiers essais donnent des résultats discordants, l'essai portant sur le troisième évènement clé est réalisé et permet de confirmer l'évaluation du potentiel sensibilisant. Le résultat final est basé sur les deux résultats concordants, compte tenu du degré de confiance des prédictions obtenues. Ainsi, deux résultats positifs signifient que le produit testé est sensibilisant (**Figure 25**).



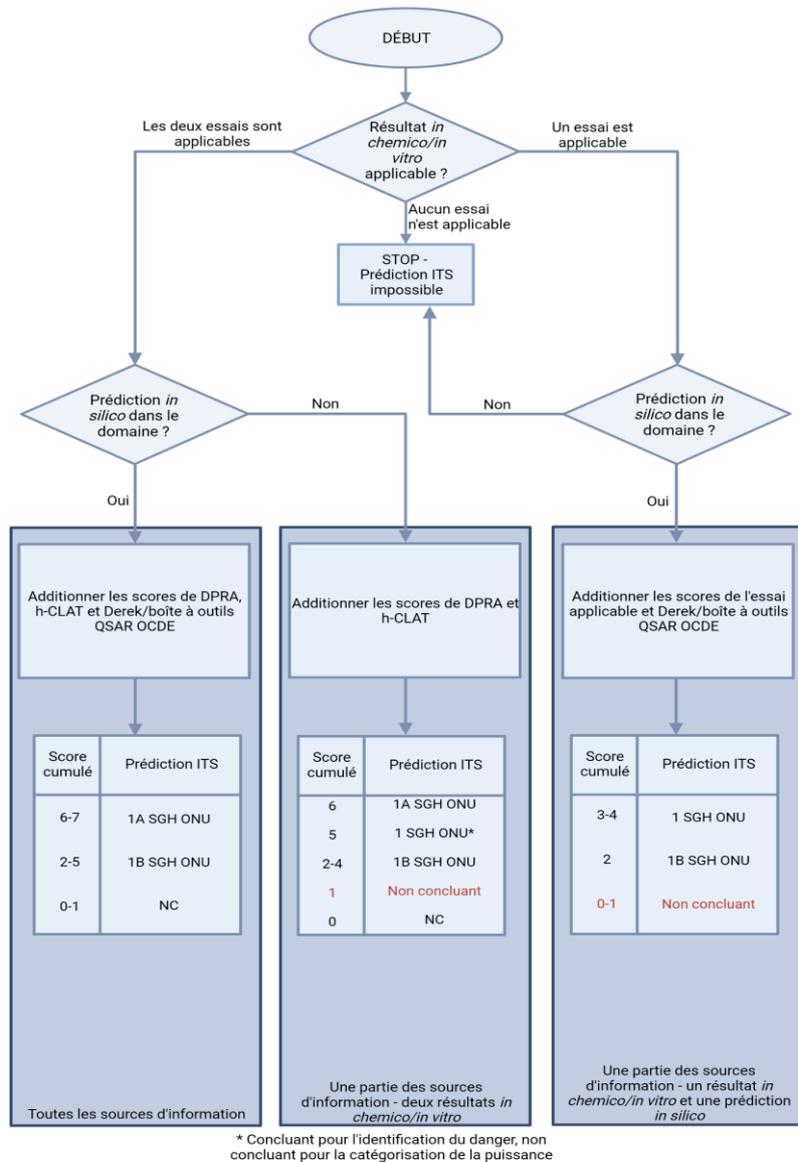
Performances 2o3 vs LLNA	« 2o3 »
<b>Exactitude</b>	83 %
<b>Sensibilité</b>	82 %
<b>Spécificité</b>	85 %
Performances 2o3 vs données humaine	« 2o3 »
<b>Exactitude</b>	89 %
<b>Sensibilité</b>	89 %
<b>Spécificité</b>	88 %

Figure 25 : Arbre décisionnel lié à l'approche définie "2o3", permettant l'évaluation du potentiel sensibilisant cutané et la comparaison des performances avec les données du LLNA ou les données humaines

### 5.3.2. L'approche définie ITS

L'approche ITS a été réalisée pour déterminer à la fois le potentiel sensibilisant cutané et la catégorisation (1A / 1B) de la puissance du sensibilisant. Elle utilise des méthodes d'essai portant sur les événements clés 1 et 3 de l'AOP et inclut une prédiction *in silico* de la sensibilisation cutanée (**Figure 26**). La liaison avec les protéines est évaluée quantitativement par le DPRA. L'activation des DC est évaluée quantitativement par le test h-CLAT. La prédiction *in silico* de la sensibilisation cutanée est fournie soit par Derek Nexus (ITSv1) soit par la boîte à outils QSAR de l'OCDE (ITSv2).

Les résultats obtenus avec le test DPRA et le test h-CLAT sont convertis en scores allant de 0 à 3. Pour le DPRA, c'est le pourcentage moyen de déplétion des peptides à résidus cystéine et à résidus lysine qui est converti en un score de 0 à 3, sur la base des valeurs de seuil associées aux classes de réactivité. En cas de co-élution touchant uniquement les peptides à lysine, seule la déplétion des peptides à cystéine est convertie en un score de 0 à 3. Pour les résultats obtenus du h-CLAT, le seuil minimum d'induction (MIT) est converti en un score de 0 à 3 sur la base des limites de 10 et 150 µg / mL. Pour les prédictions *in silico* Derek ou OCDE *toolbox*, une prédiction positive est associée à un score de 1 et une prédiction négative à un score de 0. Lorsque tous les scores sont attribués, ils sont additionnés et le total appelé « score cumulé » est utilisé pour prédire le potentiel sensibilisant cutané et la puissance du sensibilisant. Le critère de positivité pour un sensibilisant cutané correspond à un score total égal supérieur ou égal à 2. Si le score total est égal à 1 ou 0, alors le produit est considéré comme étant non sensibilisant. Pour déterminer la puissance du sensibilisant, il y a 2 niveaux de score total : un score de 6-7 correspond à un sensibilisant fort alors qu'un score compris entre 2 et 5 correspond à un sensibilisant modéré/faible.



Approche ITS vs LLNA	ITSv2
Exactitude	88 %
Sensibilité	93 %
Spécificité	67 %

Approche ITS vs LLNA	ITSv1
Exactitude	87 %
Sensibilité	92 %
Spécificité	70 %

Figure 26 : Arbre décisionnel lié à l'approche définie ITS, permettant l'évaluation du potentiel sensibilisant cutané et comparaison des performances avec celles du LLNA.

# Objectifs

Les modifications cellulaires observées dans les DC, qu'elles soient génomiques ou protéomiques, représentent une adaptation cellulaire à différents stimuli : PAMP, stress oxydant, stress électrophile [122].

Aujourd'hui, il est avéré que les changements phénotypiques induits dans les DC par les sensibilisants peuvent être différenciés de ceux induits par les irritants. Ces observations ont ainsi conduit au développement de tests *in vitro* prédictifs du pouvoir sensibilisant des produits chimiques. Trois d'entre eux ont été adoptés par l'OCDE et font l'objet de la ligne directrice 442E : le Test d'activation de la lignée cellulaire humaine THP-1 (h-CLAT), le test d'activation de la lignée cellulaire U937 (U-SENS) et l'essai IL-8 Luc [OCDE, 2018]. Cependant, ces tests *in vitro* ne permettent pas de distinguer les sensibilisants respiratoires des sensibilisants cutanés. Une meilleure compréhension des voies de signalisation impliquées lors de l'activation des DC par les sensibilisants pourrait contribuer au développement de biomarqueurs plus sensibles que les marqueurs phénotypiques et permettre ainsi de discriminer le pouvoir sensibilisant des produits chimiques.

Pour ces raisons, l'objectif principal de cette thèse sera d'étudier l'activation des voies de signalisation de façon à mettre en évidence des marqueurs discriminant les sensibilisants cutanés des sensibilisants respiratoires. En effet, les DC ont la capacité unique de convertir des signaux environnementaux reçus au niveau de la peau ou de la muqueuse respiratoire d'une part, en un mode d'expression caractéristique de protéines membranaires (protéines du CMH de classe II, protéines de co-stimulation, protéines d'adhésion cellulaires, récepteurs de chimiokines), et d'autre part, en un profil spécifique de cytokines sécrétées stimulant les lymphocytes T. Ces modifications phénotypiques spécifiques provoquées par les sensibilisants sont la résultante de l'activation de voies de signalisation qui précèdent ces changements phénotypiques. Ainsi, l'activation de plusieurs voies de signalisation comme

Nrf2/Keap1 [107], p38 [73, 123-125], NF- $\kappa$ B [85, 126, 127], ERK1/2 [128, 129] a été étudiée lors de l'exposition de DC à des sensibilisants dans l'espoir d'en identifier la nature.

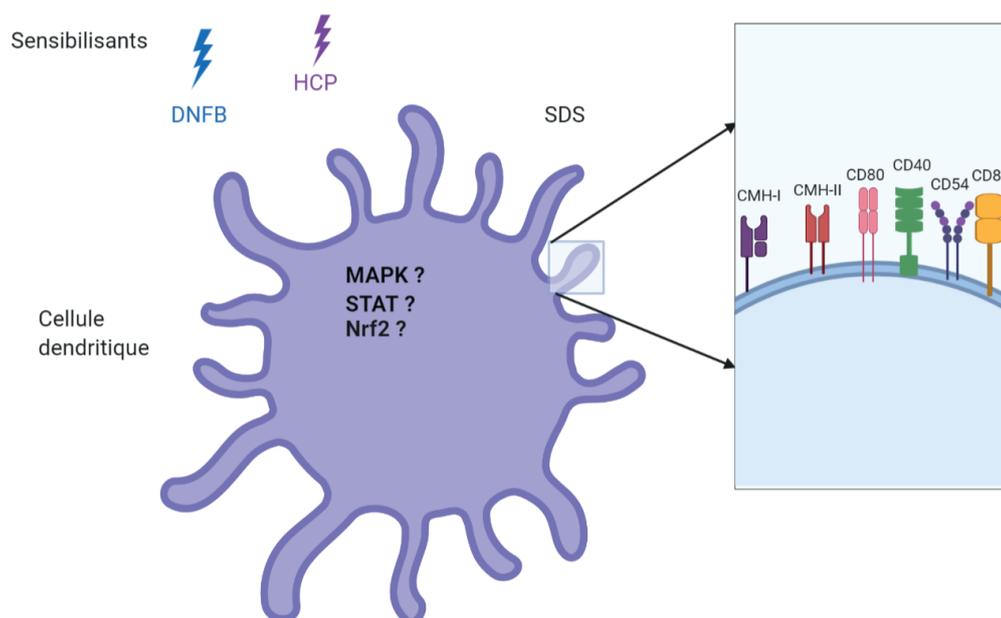
Les travaux entrepris au cours de cette thèse reposent sur **l'hypothèse suivante** : les sensibilisants peuvent activer des voies de signalisation différentes dans la cellule dendritique en fonction de leur nature cutanée ou respiratoire. Ces différences pourraient permettre de discriminer la nature de ces sensibilisants et de prévenir les effets néfastes encourus par les salariés exposés.

En résumé, **l'objectif principal** de ce travail de thèse a été de définir des profils d'activation et/ou des marqueurs de voies de signalisation identifiés dans le modèle BMDC, pour tenter de discriminer un sensibilisant cutané d'un sensibilisant respiratoire. L'étude de l'activation de ces voies de signalisation a porté, entre autres, sur l'identification des protéines phosphorylées (activées) et sur l'amplitude et les cinétiques des réponses observées (**Figure 27**).

Dans un premier temps, les études réalisées dans le cadre de cette thèse se sont focalisées sur les voies de signalisation MAPK et STAT dans des DC exposées à des sensibilisants cutanés et respiratoires ainsi que des non-sensibilisants. Le niveau de phosphorylation de ces protéines a été étudié tout d'abord sur des DC exposées aux deux sensibilisants de référence cutané et respiratoire, respectivement le DNFB et l'hexachloroplatinate d'ammonium (HCP). Pour ce faire, il a fallu déterminer les conditions pour obtenir la plus grande amplitude de réponse à ces produits avant de les appliquer à un grand nombre de produits : sensibilisants et non-sensibilisants. Le but était de déterminer le profil d'activation spécifique des sensibilisants et, de manière plus précise, un profil spécifique aux sensibilisants cutanés et aux sensibilisants respiratoires.

Ensuite, l'activation de la voie Nrf2/Keap1 dans des DC exposées à des sensibilisants a été étudiée à travers la quantification de la protéine Nrf2 et l'expression des gènes *hmox1*, *nqo1*, *srxn1* en réponse aux sensibilisants et non-sensibilisants.

Pour finir, le lien entre l'activation de la voie p38 MAPK et la voie Nrf2/Keap1 a été étudié par le biais de la mesure de l'impact de l'inhibition de la voie p38 MAPK sur l'accumulation de la protéine Nrf2, sur l'expression des gènes cités ci-dessus et sur l'activité Nrf2.



**Figure 27 : Voies de signalisation étudiées dans le cadre de la thèse.**

DNFB : dinitrofluorobenzène ; HCP : hexachloroplatinate d'ammonium ; SDS : Sodium dodécyl sulfate.



# Matériels et méthodes

Les différentes expériences ont été réalisées sur un modèle de DC dérivées de moelle osseuse de souris (BMDC), un modèle développé au laboratoire [4, 119]. Après avoir caractérisé ces DC, nous nous sommes intéressés après criblage par *proteome array* à l'activation des MAPK p38, ERK1/2, JNK et à celle de STAT1, STAT3 STAT5 après exposition à des sensibilisants de nature différente. L'expression de marqueurs de surface CD86, CD80, CD54, CD40, CMH-I et lad est également étudiée. En parallèle, nous nous sommes intéressés à l'étude de la voie Nrf2/Keap1 par l'analyse de l'accumulation de Nrf2, de son activité et de l'expression de gènes qu'elle régule. D'autres marqueurs ont également été étudiés, comme l'IL12p40. La majorité des expériences réalisées est résumée dans la **Figure 28**.

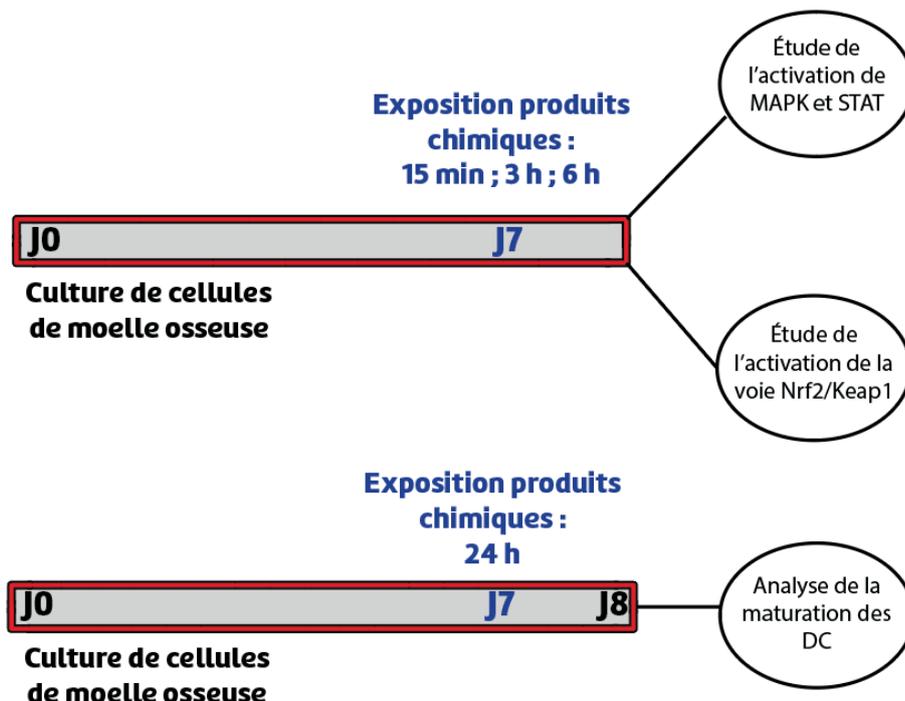


Figure 28 : Résumé des principales expériences réalisées.

## 1. Modèle de cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (BMDC)

### 1.1. Expérimentation animale

Les expérimentations animales ont été réalisées dans les conditions définies par la réglementation européenne (directive 2010/63/EU) dans un établissement accrédité par le ministère de l'agriculture (accréditation D54-547-10). Les travaux de la thèse s'inscrivent dans le cadre d'une étude dont les procédures des expérimentations animales ont été approuvées par le comité local d'éthique. Cette étude a été enregistrée sous le numéro AE-2015-002.

### 1.2. Isolement des cellules de moelle osseuse de souris

Les cellules de moelle osseuse proviennent de tibias et de fémurs de souris BALB/c femelles âgées de 8 à 10 semaines (Charles River). Après prélèvement de la moelle osseuse, la viabilité et la concentration cellulaire ont été analysées à l'aide d'un Vicell (Beckman Coulter) par coloration au bleu trypan. Après centrifugation à 370 g, la densité cellulaire fut ajustée à  $15 \cdot 10^5$  cellules / mL dans du milieu de conservation constitué de 90 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) et de 10 % (v/v) de diméthylsulfoxyde (DMSO) et les cellules ont été transférées dans des cryotubes. Les cellules étaient incubées à  $-70^{\circ}\text{C}$  pendant 1 nuit dans des boîtes remplies d'isopropanol puis elles étaient ensuite déplacées dans des cuves à azote liquide.

### 1.3. Mise en culture

Après décongélation par immersion dans un bain-marie à  $37^{\circ}\text{C}$  et lavage dans du PBS, les cellules étaient comptées et la viabilité était évaluée à l'aide du Vi-Cell. Elles étaient ensuite cultivées en boîte de Pétri 150 mm non traitées dans de l'IMDM complété avec un cocktail pénicilline / streptomycine, du 2-mercaptoéthanol, du SVF préalablement décomplémenté et du *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF). Les différentes informations concernant le milieu de culture sont précisées dans le **Tableau X**. Le GM-CSF et les facteurs

de croissance présents dans le SVF ont permis d'induire une différenciation progressive des cellules de moelle osseuse en DC immatures (iDC). Les boîtes de Pétri étaient placées dans un incubateur à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>.

Après 7 jours de culture, les cellules étaient décollées à l'aide de 4 mL d'une solution de trypsine (0,05 % v/v) -éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) pendant 2 minutes à température ambiante. La réaction était arrêtée avec du milieu de culture puis avec quelques allers-retours à la pipette les cellules étaient décollées. Après centrifugation à 370 g pendant 6 minutes, le surnageant était retiré puis les cellules remises en suspension dans 10 mL de milieu de culture. Un comptage au Vicell était réalisé et la concentration était ajustée pour une densité cellulaire finale de 2.10<sup>6</sup> cellules / mL. Les cellules étaientensemencées en plaques 6 puits ou en tubes de cytométrie selon les expérimentations réalisées (**Tableau XI**).

**Tableau X : Composition du milieu de culture**

	Fournisseur	Volume	Concentration finale
<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)</i>	Gibco	89 mL	
Sérum de Veau fœtal (SVF)	Bio West	10 mL	10 % (v / v)
Pénicilline / Streptomycine	Gibco	1 mL	100 µg / mL
2-mercaptoéthanol	Gibco	100 µL	0,1 % (v / v)
<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)</i>	Peptotech	25 µL	50 ng / mL

Tableau XI : Conditions de culture en fonction des expérimentations réalisées

Expérimentation	Support de culture	Concentration cellulaire	Volume final
Phénotypage	Plaque 6 puits	2.10 <sup>6</sup> cellules / mL	2 mL
Phosphoflow / Marquage intracellulaire	Tubes de cytométrie	2.10 <sup>6</sup> cellules / mL	1 mL
RT-qPCR	Tubes de cytométrie	2.10 <sup>6</sup> cellules / mL	1 mL
Protéome Array / Mesure d'activité	Tubes de cytométrie	2.10 <sup>6</sup> cellules / mL	3 mL

#### 1.4. Produits utilisés et exposition

Les produits à étudier ont été mis en solution soit dans du *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS), soit dans du DMSO en fonction de leur solubilité aux véhicules. Les informations sur les produits utilisés ainsi que les concentrations choisies pour l'exposition sont indiquées dans le **Tableau XII**. Les informations sur la puissance des sensibilisants sont indiquées dans l'**Annexe 2**. Les conditions d'exposition optimales (concentrations sub-toxiques et durées d'exposition) permettant d'obtenir une activation maximale ont été déterminées au cours d'expériences antérieures réalisées au laboratoire.

**Tableau XII : Liste des produits utilisés pour l'exposition des DC.**

Les propriétés sensibilisantes sont indiquées à partir de données cliniques ou de données *in vivo* par le test LLNA [130, 131]. L'inhibiteur de la voie p38 MAPK utilisé est également ajouté dans ce tableau. La catégorisation (puissance) des sensibilisants testés est indiquée dans l'Annexe 2.

Nom du produit	Fournisseur	N°CAS	Véhicule	Propriétés	Concentrations
<b>Diméthylsulfoxyde (DMSO)</b>	<b>Gibco</b>	67-68-5		Contrôle véhicule	0,125 % DMSO (v / v)
<b>Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)</b>	<b>Gibco</b>			Contrôle véhicule	100% (v / v)
<b>Dinitrofluorobenzène (DNFB)</b>	<b>Sigma</b>	70-34-8	DMSO (0,125 % v / v)	<b>Sensibilisant cutané de référence</b>	5 µM 10 µM 15 µM 30 µM 60 µM
<b>Hexachloroplatinate d'ammonium (HCP)</b>	<b>Sigma</b>	16919-58-7	HBSS	<b>Sensibilisant respiratoire de référence</b>	25 µM 50 µM 100 µM 150 µM 200 µM 400 µM
<b>Tétrachloroplatinate d'ammonium (ATCP)</b>	<b>Sigma</b>	13820-41-2	HBSS	Sensibilisant respiratoire	50 µM 100 µM 150 µM 200 µM
<b>Tetraammineplatinum(II) chloride hydrate (TPCH)</b>	<b>Sigma</b>	108374-32-9	HBSS	Non sensibilisant	400 µM
<b>Hydrogen hexahydroxyplatinate IV (HHP)</b>	<b>Sigma</b>	51850-20-5	DMSO (0,125 % v / v)	Non sensibilisant	200 µM
<b>Chloramine T (ChT)</b>	<b>Sigma</b>	149358-73-6	HBSS	Sensibilisant respiratoire	500 µM 750 µM 1000 µM 1200 µM

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

<b>Naphtol (Nap)</b>	<b>Sigma</b>	90-15-3	DMSO (0,125 % v / v)	Sensibilisant cutané	300 µM 600 µM 900 µM
<b>IsoeugénoI (IsoE)</b>	<b>Sigma</b>	97-54-1	DMSO (0,125 % v / v)	Sensibilisant cutané	500 µM 1000 µM 2000 µM
<b>Cinnamaldéhyde (Cinn)</b>	<b>Sigma</b>	104-55-2	DMSO (0,125 % v / v)	Sensibilisant cutané	100 µM 200 µM 400 µM
<b>p-Tolyl isocyanate (TMI)</b>	<b>Sigma</b>	622-58-2	DMSO (0,125 % v / v)	Sensibilisant respiratoire	300 µM 400 µM 500 µM 600 µM
<b>Hydroquinone (HQ)</b>	<b>Sigma</b>	123-31-9	HBSS	Sensibilisant cutané	120 µM 240 µM 480 µM
<b>Formaldéhyde (FOR)</b>	<b>Sigma</b>	50-00-0	HBSS	Sensibilisant respiratoire et cutané	175 µM 350 µM 500 µM
<b>Sodium Dodécyl Sulfate (SDS)</b>	<b>Sigma</b>	151-21-3	HBSS	Irritant cutané et respiratoire	175 µM 350 µM
<b>Méthyl Salicylate (MSA)</b>	<b>Sigma</b>	119-36-8	DMSO (0,125 % v / v)	Irritant cutané	800 µM 1000 µM 1200 µM
<b>tert-butylhydroquinone (tBHQ)</b>	<b>Sigma</b>	1948-33-0	DMSO (0,125 % v / v)	Activateur Nrf2	50 µM 100 µM
<b>SB203580</b>	<b>Sigma</b>	152121-47-6	DMSO (0,125 % v / v)	Inhibiteur sélectif de p38	25 µM

## 2. Criblage par *proteome profiler array* (R&D Systems)

Afin de déterminer des voies de signalisation intéressantes, une méthode permettant de cribler des dizaines de protéines au sein d'un même échantillon a été utilisée (**Figure 29**). Des anticorps de capture ont été déposés en double sur la membrane de nitrocellulose et permettaient de capturer les protéines cibles. Le lysat protéique était déposé sur la membrane et un anticorps de détection couplé à la streptavidine HRP était utilisé. Cet anticorps permettait de mesurer par bioluminescence la quantité d'anticorps de capture fixés à la protéine cible.

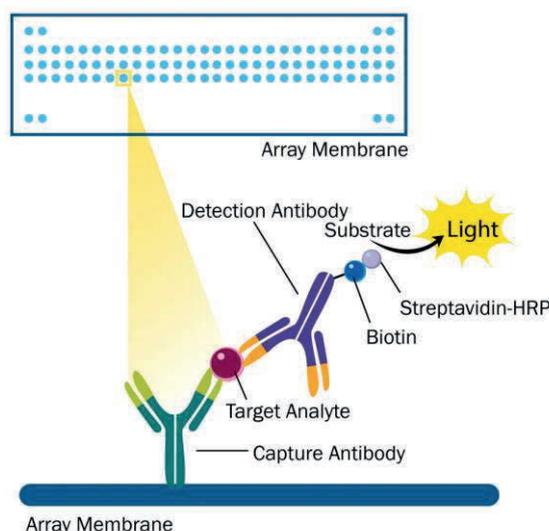


Figure 29 : Principe du *proteome array*

### 2.1. Extraction des protéines totales et dosage

Après exposition, les cellules étaient rincées avec 1 mL de PBS puis, après centrifugation, elles étaient resuspendues dans 200  $\mu$ L de solution de lyse fournie par le kit, appelé *Lysis Buffer 6*. Les échantillons étaient incubés à 4°C pendant 30 min. Après centrifugation à 14 000 *g* pendant 5 min, la concentration en protéines dans le surnageant était mesurée par la technique *BiCinchoninic acid Assay* (BCA), une technique de dosage colorimétrique. L'échantillon à doser était mis en présence d'une solution alcaline d'acide bicinchoninique et

de sulfate de cuivre de coloration verte. Les ions  $\text{Cu}^+$  formés créent avec le BCA un complexe coloré pourpre dont l'absorbance est mesurée à 562 nm. Celle-ci est proportionnelle à la concentration en protéines de l'échantillon. Une gamme étalon de protéines réalisée avec de l'albumine sérique bovine (BSA) permettait la quantification.

### **2.2. Utilisation des membranes**

Deux 2 kits différents ont été utilisés pour mesurer différentes protéines. Le premier kit, dit ARY003B mesure par le biais d'une membrane une variété de protéines phosphorylées. Le deuxième, dit ARY003C mesure également plusieurs protéines phosphorylées via deux membranes. Toutes les informations concernant ces protéines sont indiquées dans les **Tableaux XIII et XIV**.

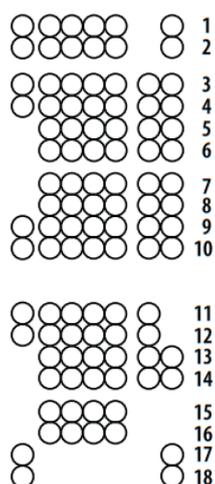
**Tableau XIII : Liste des protéines phosphorylées étudiées dans le *proteome array* (Kit ARY003B).**

Pour chaque protéine, les coordonnées sur la membrane et le site de phosphorylation détectée sont indiqués.

Membrane - Coordonnées	Cible / contrôle	Site(s) de phosphorylation
A-A1, A2	Reference Spot	
A-A3, A4	p38α	T180/Y182
A-A5, A6	ERK1/2	T202/Y204, T185/ Y187
A-A7, A8	JNK 1/2/3	T183/Y185, T221/ Y223
A-A9, A10	GSK-3α/β	S21/S9
B-A13, A14	p53	S392
B-A17, A18	Reference Spot	
A-B3, B4	EGF R	Y1086
A-B5, B6	MSK1/2	S376/S360
A-B7, B8	AMPKα1	T183
A-B9, B10	Akt 1/2/3	S473
B-B11, B12	Akt 1/2/3	T308
B-B13, B14	p53	S46
A-C1, C2	TOR	S2448
A-C3, C4	CREB	S133
A-C5, C6	HSP27	S78/S82
A-C7, C8	AMPKα2	T172
A-C9, C10	β-Catenin	
B-C11, C12	p70 S6 Kinase	T389
B-C13, C14	p53	S15
B-C15, C16	c-Jun	S63
A-D1, D2	Src	Y419
A-D3, D4	Lyn	Y397
A-D5, D6	Lck	Y394
A-D7, D8	STAT2	Y689
A-D9, D10	STAT5a	Y694

B-D11, D12	p70 S6 Kinase	T421/S424
B-D13, D14	RSK1/2/3	S380/S386/S377
A-E1, E2	Fyn	Y420
A-E3, E4	Yes	Y426
A-E5, E6	Fgr	Y412
A-E7, E8	STAT6	Y641
A-E9, E10	STAT5b	Y699
A-F9, F10	STAT5a/b	Y694/Y699
B-F11, F12	STAT3	S727
B-F13, F14	WNK1	T60
B-F15, F16	PYK2	Y402
A-G1, G2	Reference Spot	
A-G3, G4	PRAS40	T246
A-G9, G10	PBS (Negative Control)	
B-G11, G12	HSP60	
B-G17, G18	PBS (Negative Control)	

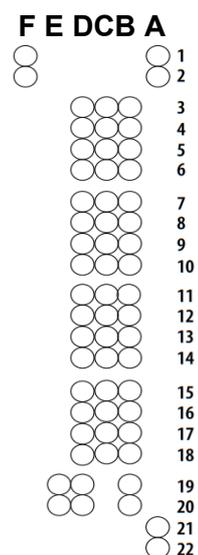
**GFEDCB A**



**Tableau XIV : Liste des protéines phosphorylées étudiées dans le *proteome array* (Kit ARY003C).**

Pour chaque protéine, les coordonnées sur la membrane et le site de phosphorylation détectée sont indiqués.

A1, A2	Reference Spots	
A21, A22	Reference Spots	
B3, B4	Akt1	S473
B5, B6	Akt2	S474
B7, B8	Akt3	S472
B9, B10	Akt pan	S473, S474, S472
B11, B12	CREB	S133
B13, B14	ERK1	T202/Y204
B15, B16	ERK2	T185/Y187
B17, B18	GSK-3 $\alpha/\beta$	S21/S9
B19, B20	GSK-3 $\beta$	S9
C3, C4	HSP27	S78/S82
C5, C6	JNK1	T183/Y185
C7, C8	JNK2	T183/Y185
C9, C10	JNK3	T221/Y223
C11, C12	JNK pan	T183/Y185, T221/Y223
C13, C14	MKK3	S218/T222
C15, C16	MKK6	S207/T211
C17, C18	MSK2	S360
D3, D4	p38 $\alpha$	T180/Y182
D5, D6	p38 $\beta$	T180/Y182
D7, D8	p38 $\delta$	T180/Y182
D9, D10	p38 $\gamma$	T183/Y185
D11, D12	p53	S46
D13, D14	p70 S6 Kinase	T421/S424
D15, D16	RSK1	S380
D17, D18	RSK2	S386
D19, D20	TOR	S2448
E19, E20	PBS	
F1, F2	Reference Spots	



### 3. Expériences de cytométrie en flux

#### 3.1. Caractérisation des cellules dendritiques

##### 3.1.1. Protocole expérimental

Les DC issues de la culture primaire de cellules de moelle osseuse ont été caractérisées à l'aide d'anticorps identifiant différentes populations de DC, qu'elles soient conventionnelles ou plasmacytoïdes (**Tableau XV**). Après 7 jours de culture, les cellules étaient rincées avec 4 mL de PBS puis décollées avec 4 mL de solution Trypsine-EDTA pendant 2 min. La réaction était ensuite arrêtée avec 4 mL d'IMDC complet. Après centrifugation à 370 g, le culot était resuspendu avec 10 mL d'IMDC complet. Un volume de 100 µL était prélevé et un comptage réalisé. À l'issue de ce comptage, la concentration cellulaire était ajustée à  $4 \cdot 10^6$  cellules / mL dans un tampon appelé « tampon de marquage » à base de PBS contenant 2 % de SVF. Un volume de 100 µL était déposé sur plusieurs puits d'une plaque 96 puits pour une densité de 400 000 cellules. Après 7 min de centrifugation à 1300 g à 4°C, le surnageant était retiré et les récepteurs Fc des cellules présentes dans le culot étaient bloqués avec 8 µL de solution dite *Fc Block* (Anti CD-16 / CD32 ; BD Biosciences) diluée au 1/50<sup>ème</sup> dans du tampon de marquage. Après 15 min de blocage à 4°C, un volume de 25 µL de mélange contenant tous les anticorps dilués au 1/100<sup>ème</sup> était ajouté dans chaque puit. Après 1 h d'incubation, 3 lavages à base de tampon de marquage étaient réalisés. Un volume de 5 µL de 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), un intercalant à l'ADN permettant d'évaluer la viabilité cellulaire, était ajouté 5 min avant l'analyse des échantillons en cytométrie en flux. Lorsque les cellules étaient mortes, l'intercalant se fixait sur l'ADN et émettait dans le canal PerCP-Cy5. Le signal émis par le 7-AAD permettait ainsi de différencier les cellules mortes des cellules vivantes.

**Tableau XV : Liste des anticorps utilisés pour caractériser les DC présentes dans la culture cellulaire.**

Pour chaque anticorps, la population cellulaire identifiée est indiquée.

<b><u>Anticorps utilisés :</u></b>	<b><u>Population identifiable (dans CD11c) :</u></b>
BlueViolet(BV)650 – <b>CD11c</b>	Toutes les <b>DC</b>
AlexaFluor(AF)647 – <b>CD207</b>	<b>DC de langerhans</b>
BV421 – <b>CD11b</b>	<b>DC conventionnelles de type CD11b<sup>+</sup></b>
BrilliantBlue(BB)515 – <b>CD8<math>\alpha</math></b>	<b>DC conventionnelles de type CD8<math>\alpha</math><sup>+</sup></b>
BB700 – <b>B220</b>	<b>DC plasmacytoïdes</b>

### 3.1.2. Analyse des données

Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un cytomètre BD LSRFORTESSA™ X-20. Les compensations ont été réalisées à l'aide de billes de compensation « CompBeads » (Invitrogen). L'acquisition des données se faisait sur 20 000 cellules. Les données collectées étaient analysées à l'aide du logiciel FlowJo®. Les résultats ont été exprimés en moyenne relative d'intensité de fluorescence (RFI). Elle correspondait à la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) des cellules marquées à l'anticorps se fixant à la protéine d'intérêt moins celle de la même condition expérimentale mais avec marquage isotypique.

## 3.2. Étude de l'expression des marqueurs phénotypiques des DC matures

### 3.2.1. Protocole expérimental

Après 7 jours de culture, les cellules ont été décollées puis remises en suspension à une densité de  $2 \times 10^6$  cellules / mL dans du milieu de culture, puis 2 mL de suspension cellulaire étaient ajoutés dans des puits de plaques de culture 6 puits non traitées. Les produits étaient ensuite ajoutés pour une durée d'exposition de 24 h.

Après exposition, les cellules étaient décollées et un comptage Vi-Cell™ réalisé. Les cellules étaient resuspendues dans du tampon de marquage SVF / PBS à 2 % (v / v) à raison de  $4 \cdot 10^6$  cellules / mL. Un volume de 400 000 cellules était ajouté dans un puits d'une plaque 96 puits non traitée. Avant le marquage des cellules, les récepteurs Fc étaient bloqués pendant 15 min à l'aide d'une solution de *Fc Block*™ (anti CD-16 / CD32 ; BD Biosciences) diluée au 50<sup>ème</sup> dans du tampon de marquage. Après blocage, une solution de marquage était réalisée avec les anticorps monoclonaux spécifiques de la souris indiqués dans le tableau V. Les cellules étaient ensuite incubées à 4°C pendant 20 min. Les puits étaient ensuite lavés avec 100 µL de tampon de marquage puis centrifugés à 370 g pendant 6 min à 4°C. Les culots étaient ensuite repris dans 200 µL de tampon de marquage. Pour évaluer la mortalité cellulaire, une solution contenant du 7-AAD était ajoutée 10 min avant le passage des échantillons en cytométrie en flux. Les données ont été analysées via le logiciel FlowJo. Dans la stratégie d'analyse, tout d'abord les doublets étaient exclus en fonction de la taille et de la granulométrie. Les cellules présentant une bonne taille et granulométrie étaient conservées dans l'analyse. Dans cette même population, les cellules marquées au 7-AAD étaient exclues puis la population CD11c positive était isolée. C'est sur celle-ci qu'étaient analysés les différents profils d'expression de chaque marqueur étudié.

**Tableau XVI : Liste des anticorps utilisés pour l'étude des marqueurs phénotypiques (BD Biosciences).**

Cible	Clone de l'anticorps	Fluorochrome
CD11c	HL3	BV786
lad	AMS-32.1	FITC
CD86	GL1	BV605
CD40	3/23	BV421
CD54	3E2	Allophycocyanin (APC)
CMH-I	SF1-1.1	PhycoErythrine (PE)
CD80	16-10A1	PE-CF594

### 3.3. Étude de l'activation des MAPK et STAT par *Phosphoflow*

#### 3.3.1. Protocole expérimental

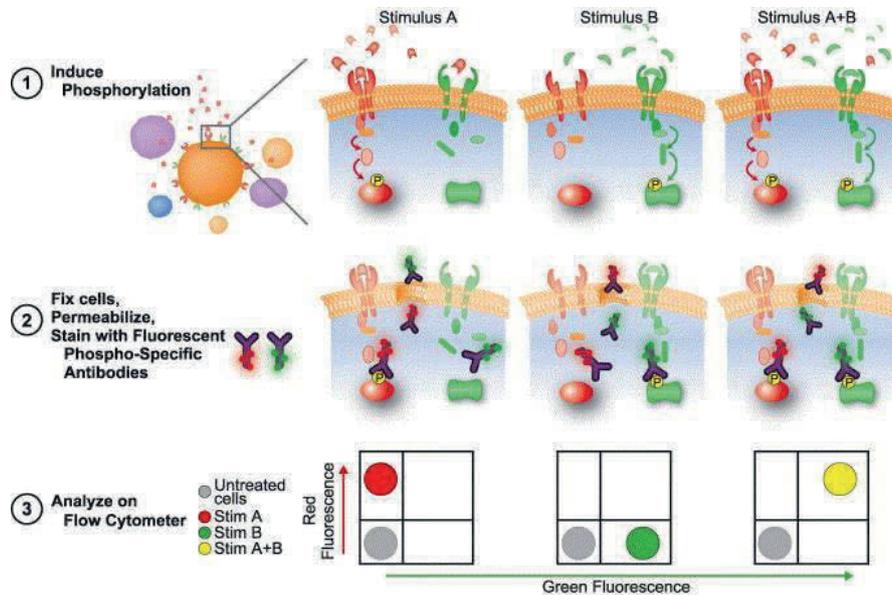


Figure 30 : Principe du Phosphoflow

Le principe général du Phosphoflow est indiqué dans la **Figure 30**. Après 7 jours de culture, les cellules étaient décollées puis remises en suspension à une densité de  $2 \times 10^6$  cellules / mL dans du milieu de culture puis 1 mL de suspension cellulaire était ajouté dans des tubes utilisés pour la cytométrie en flux. Le décollement par trypsinisation peut entraîner des phosphorylations non spécifiques. C'est pourquoi les suspensions cellulaires ont été laissées au repos à 37°C pendant 1 h. Les cellules étaient ensuite exposées aux produits à tester. Après l'exposition au produit testé, la viabilité cellulaire était évaluée par comptage au Vi-Cell. Les cellules étaient ensuite fixées par l'ajout de 1 mL de tampon de fixation (Cytifix – BD Biosciences) contenant du formaldéhyde à 4,21 % (v/v). Après la fixation, les cellules étaient perméabilisées dans 1 mL de tampon de perméabilisation contenant du méthanol à 87,68 % v/v (Perm III – BD Biosciences) puis lavées trois fois dans 3 mL d'une solution tampon appelée « tampon de marquage » (PBS contenant 2 % de SVF). Après blocage des récepteurs Fc (15 minutes à 4 °C) à l'aide de la solution de *Fc Block*<sup>TM</sup> (BD Biosciences) diluée au 50<sup>ème</sup> dans

du tampon de marquage, les cellules étaient marquées à l'aide d'anticorps monoclonaux, spécifiques des protéines de souris. À cette fin, un mélange était réalisé avec tous les anticorps de notre panel dilués au 1/50<sup>ème</sup> ou 1/100<sup>ème</sup> dans du tampon de marquage. Cette solution de marquage était ajoutée aux cellules ; l'ensemble incubait pendant 1 h à température ambiante. Après un dernier lavage, les cellules étaient prêtes à être analysées par cytométrie en flux. Les anticorps utilisés, leurs fluorochromes respectifs ainsi que les contrôles isotypiques associés étaient spécifiés dans le **Tableau XVII**.

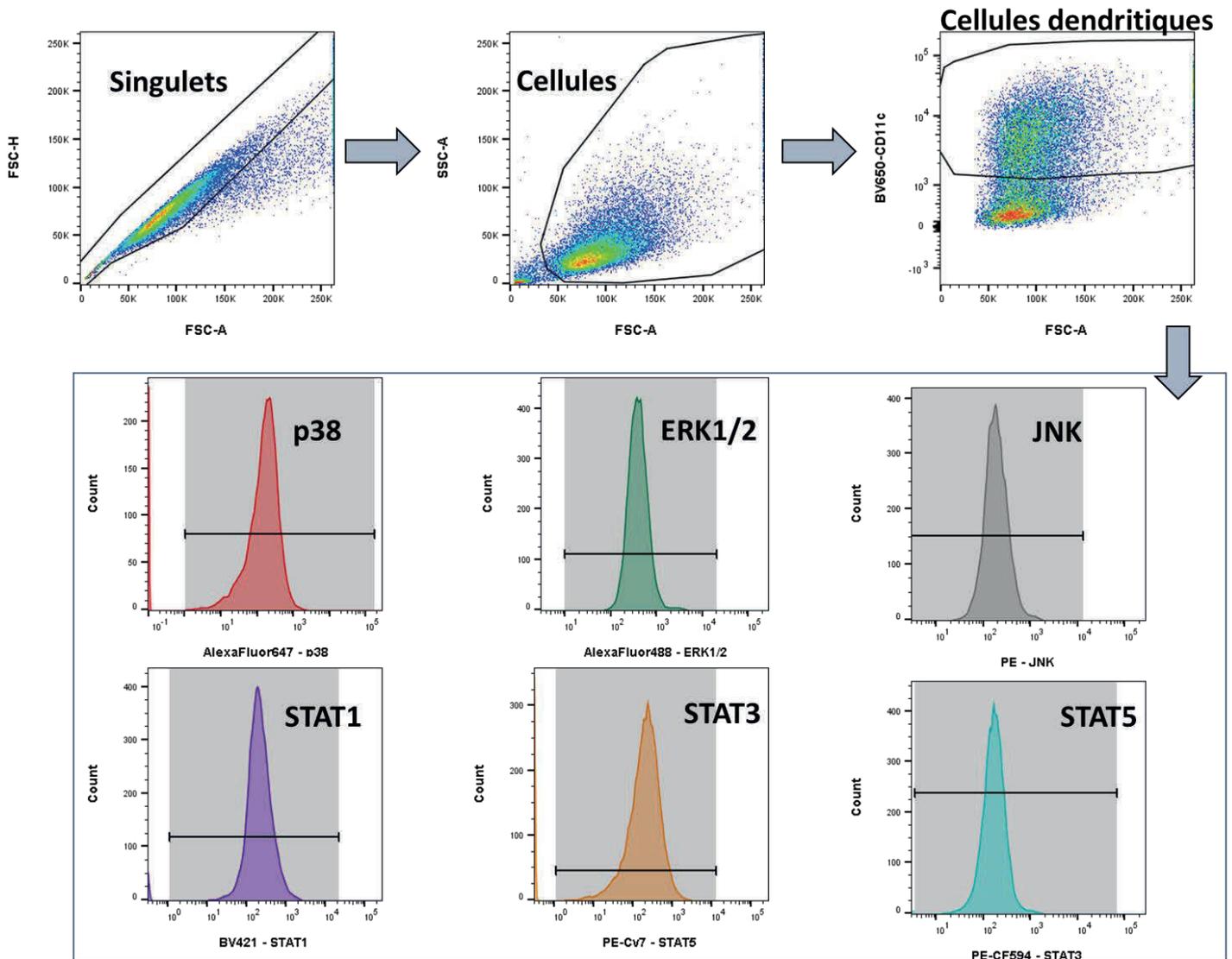
**Tableau XVII : Liste des anticorps utilisés pour le Phosphoflow (BD Biosciences).**

<b>Cible</b>	<b>Clone de l'anticorps</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Clone de l'isotype</b>
CD11c	<b>HL3</b>	BV650	G235-2356
p-p38 (pT180/pY182)	<b>36/p38</b>	AF647	MOPC-21
p-ERK1/2 (pT202/pY204)	<b>20a</b>	AF488	MOPC-21
p-STAT1 (pY701)	<b>4a</b>	BV421	MOPC-173
p-STAT3 (pY705)	<b>4/P-STAT3</b>	PE-CF594	MOPC-21
p-STAT5 (pY694)	<b>47/STAT5</b>	PE-Cyanine7	MOPC-21
p-JNK (pT183/pY185)	<b>N9-66</b>	PE	MOPC-173

### 3.3.2. Analyse des données

Les échantillons étaient analysés à l'aide d'un cytomètre BD LSRFORTESSA™ X-20. Les compensations étaient réalisées à l'aide de billes de compensation « CompBeads » (BD Biosciences). L'acquisition des données s'est faite sur 20 000 cellules. Les données collectées étaient analysées à l'aide du logiciel FlowJo®. Les résultats étaient exprimés en moyenne relative d'intensité de fluorescence (RFI). Ce RFI correspondant au MFI des cellules marquées

à l'anticorps se fixant à la protéine d'intérêt moins celle de la même condition mais avec marquage isotypique. Pour chaque résultat de cytométrie, les résultats sont représentés en *Stimulation Index* (SI) qui correspond au rapport du RFI Traité sur celui du véhicule. La stratégie d'analyse des données est indiquée dans la **Figure 31**.



**Figure 31 : Stratégie d'analyse de la phosphorylation des MAPK et STAT dans des DC par cytométrie en flux avec FlowJo®.**

En premier lieu, les doublets ont été éliminés puis les cellules étaient sélectionnées en fonction de leur taille (FSC) et de leur granulométrie (SSC). Les DC étaient sélectionnées par le marqueur d'expression CD11c. Enfin, les moyennes d'intensité de fluorescence étaient analysées pour les MAPK et STAT étudiées.

### **3.4. Étude de l'accumulation de la protéine Nrf2 par marquage cytométrie et influence de la voie p38**

L'accumulation de la protéine Nrf2 était analysée de la même manière que pour les MAPK et STAT. L'anticorps utilisé était un anticorps monoclonal anti-Nrf2 couplé avec du PE (clone D179C – *Cell Signaling Technology*). L'influence de p38 sur cette accumulation était étudiée par l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de cette MAPK, le SB203580 (Sigma), à une concentration de 25  $\mu$ M. Pour ce cas, l'inhibiteur était cette fois ajouté 1h avant l'ajout du produit.

### **3.5. Analyses statistiques des données de cytométrie**

Les données obtenues, lorsqu'elles contenaient au moins 3 expériences indépendantes (N=3), ont été analysées statistiquement à l'aide du logiciel STATA®. Un modèle de régression linéaire mixte a été appliqué aux RFI obtenues par Phosphoflow ou phénotypage après transformation logarithmique. Pour le Phosphoflow, les variables fixes comprenaient la concentration du produit, la durée du traitement, l'effet inhibiteur du SB203580 et l'interaction entre la durée et la concentration. Pour le phénotypage, les variables fixes comprenaient la concentration du produit et l'effet inhibiteur du SB203580. Une différence est significative lorsque la p-value est au moins inférieure à 0,05 (\*p<0,05).

#### 4. Expériences de RT-qPCR

En plus de l'accumulation de la protéine, la voie Nrf2/Keap1 était également étudiée à travers l'augmentation d'expression des gènes qu'elle régule. En parallèle, l'expression du gène *IL12p40*, une cytokine impliquée dans la sensibilisation cutanée, a été également étudiée.

##### 4.1. Étude de l'expression de gènes régulés par Nrf2 et étude de l'expression du gène *IL12p40*

Les Acides RiboNucléiques (ARN) de nos échantillons ont été extraits à l'aide d'un kit « RNeasy Plus Minit Kit » (Qiagen).

Les solutions d'ARN ont été quantifiées à l'aide d'un NanoDrop™ (Implen) piloté par le logiciel PVC. Les rapports des absorbances A280/A230 et A260/230 étaient également déterminés à l'aide de l'appareil afin de déterminer la pureté de nos ARN.

Afin de rétrotranscrire les ARN en ADN complémentaire (ADNc), le kit « iScript cDNA synthesis » (BioRad) comprenant le mix de réaction iScript 5X et la solution d'iScript Reverse transcriptase qui, elle, contient l'enzyme nécessaire à la réalisation de la rétro transcription, a été utilisé.

Les différentes amorces utilisées dans la RT-qPCR sont indiquées dans le Tableau VI.

La PCR a été réalisée dans des plaques 96 puits à l'aide d'un appareil CFX96 (Bio-Rad). Dans chaque puits étaient déposés l'ADNc, les amorces et du *SYBR™ Green supermix 2X* (Bio-Rad). Un contrôle négatif était réalisé par ajout d'eau stérile à la place de l'ADNc afin de vérifier l'absence de contamination dans le mélange.

Analyse des données :

Les résultats ont été exprimés en cycle seuil (Cq). À partir de ce cycle seuil, il est possible de comparer l'expression d'un gène par rapport à celle des gènes de ménage, dont l'expression ne varie pas, quel que soit le traitement.

La normalisation par rapport aux gènes de ménage se réalise à l'aide de la formule suivante :

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

Ensuite, ce résultat est normalisé par rapport au témoin :

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

où :

traité : DC exposées au produit

témoin : DC exposées au véhicule du produit

Enfin, la transformation exponentielle permet d'obtenir l'expression génétique relative du traité par rapport au témoin :

$$2^{-\Delta\Delta Cq} = \text{variation expression génétique}$$

De la même manière que pour l'étude de l'accumulation, l'influence de p38 sur l'expression des gènes régulés par Nrf2 a été étudiée par l'utilisation du SB203580.

L'expression du gène *IL12p40* a été étudiée de la même manière que les gènes régulés par Nrf2. La séquence des amorces est décrite dans le **Tableau XVIII**.

Tableau XVIII : Liste des gènes étudiés avec les amorces utilisées pour les RT-qPCR.

Amorces des gènes de ménage	
<i>actine</i>	Sens : GGCCAACCGTGAAAAGATGA Anti-sens : TACGACCAGAGGCATACAGG
<i>TATAbox binding protein (Tbp)</i>	Sens : ACGGACAACCTGCGTTGATTTT Anti-sens : ACTTAGCTGGGAAGCCCAAC
Amorces des gènes d'intérêt	
<i>NADPH quinone oxygénase 1 (nqo1)</i>	Sens : ACGGGGACATGAACGTCATTCT Anti-sens : AGTGTGGCCAATGCTGTAAACC
<i>hème oxygénase 1 (hmo1)</i>	Sens : AGGGTCAGGTGTCCAGAGAA Anti-sens : CTTCCAGGGCCGTGTAGATA
<i>sulforedoxine 1 (srxn1)</i>	Sens : GGACCCGGCCAAAGTGCAGA Anti-sens : CCACCCTGGGCCCTTTGAT
<i>glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (gclc)</i>	Sens : ATTCGTGGTACTGCTCACTAGGGT Anti-sens : TCTGGGCCACTTTTCATGTTCTCGT
<i>IL12p40</i>	Sens : CCTGAAGTGTGAAGCACCAA Anti sens : AGTCCCTTTGGTCCAGTGTG

#### 4.2. Analyses statistiques

Pour les résultats de RT-qPCR, un modèle de régression linéaire mixte a été appliqué sur les variables fixes étudiées à l'aide du logiciel STATA. Ces variables comprenaient la concentration du produit testé et l'effet inhibiteur du SB203580. Un effet aléatoire inter-expérience a été intégré au modèle afin de tenir compte de la variabilité inter-expérience.

## 5. Mesure d'activité de la protéine Nrf2

### 5.1. Extraction des protéines et dosage (DC BioRad)

Les cellules ont été exposées aux produits testés pendant 3 h ou 6 h. À l'issue de l'exposition, les protéines nucléaires étaient extraites à l'aide du kit d'extraction « *Nuclear Extract Kit* » (Active Motif). Ce kit a été choisi car il est vendu comme étant optimal pour la mesure d'activité avec une réduction du bruit de fond lié au tampon d'extraction. Pour la préparation d'extraits nucléaires, les cellules ont d'abord été collectées dans du PBS glacé en présence d'inhibiteurs de phosphatase pour limiter les modifications des protéines comme la phosphorylation ou déphosphorylation. Ensuite, les cellules ont été remises en suspension dans du tampon hypotonique pour gonfler la membrane et la fragiliser. L'ajout du détergent provoque une fuite des protéines cytoplasmiques dans le surnageant. Après prélèvement de la fraction cytoplasmique, les noyaux ont été lysés et les protéines nucléaires solubilisées dans du tampon de lyse sans détergent appelé « *Lysis Buffer AM1* » en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase. Les protéines nucléaires ont été séparées des débris par centrifugation à 14 000 g. Les extractions nucléaires ont été ensuite concentrées à l'aide de colonnes de concentration Amicon 30K (Merck) puis dosées à l'aide du kit « DC BioRad » (BioRad), reposant sur une méthode de dosage de type Lowry.

### 5.2. Utilisation du kit TransAM pour mesurer l'activité de la protéine Nrf2

Pour mesurer l'activité de la protéine Nrf2, un kit TransAM (Active Motif) a été utilisé. Ce kit repose sur une plaque contenant dans chaque puits des oligonucléotides portant le motif ARE. Si la protéine Nrf2 est active, celle-ci va se fixer sur le motif (**Figure 32**) et pourra être détectée par un cocktail d'anticorps spécifiques. Les protéines nucléaires étaient déposées sur la plaque puis un marquage primaire et secondaire était réalisé. La dernière étape consistait à

l'ajout de la solution de révélation. Lorsque la couleur est suffisamment forte, une solution stop était ajoutée et la plaque était lue dans un lecteur de microplaque Biotek Synergy H1 à une longueur d'onde de 450 nm. Pour chacune des conditions, l'absorbance du blanc était soustraite.

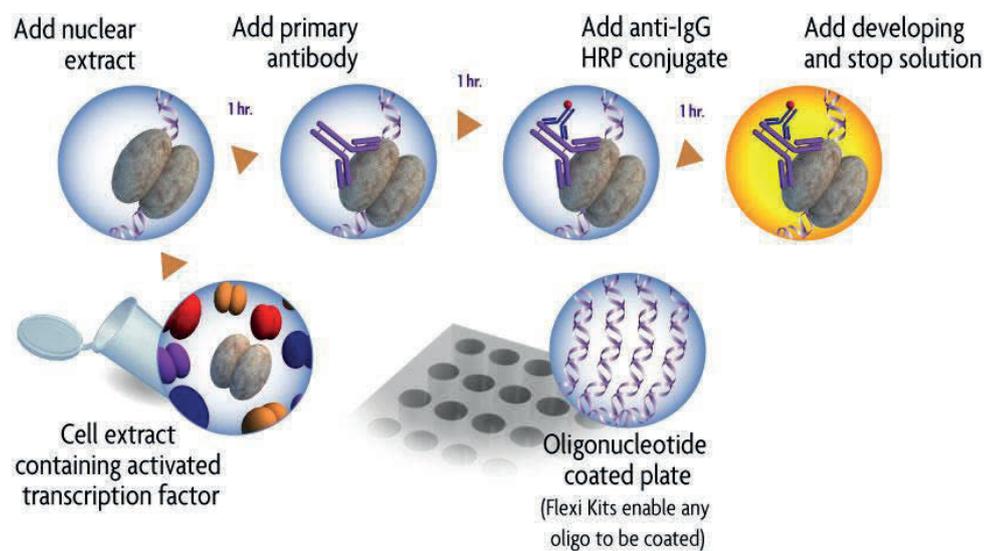


Figure 32 : Principe du kit TransAM pour analyser l'activité de la protéine Nrf2

# Résultats

## 1. Caractérisation des cellules dendritiques du modèle BMDC

Les DC ont été caractérisées à l'aide de plusieurs anticorps permettant d'identifier certains types de DC, conventionnelles ou plasmacytoïdes. Le phénotypage a été réalisé aux jours 7 et 9 de culture. Les résultats sont présentés dans la **Figure 33**. Parmi les anticorps utilisés, seuls les anti-CD11c et anti-CD11b donnaient un marquage positif. Par conséquent, les populations positives pour CD8 $\alpha$ , B220 CD127 ne sont pas visibles dans la figure 33 ce qui indique l'absence de DC plasmacytoïdes et de DC de Langerhans. Au jour 7 de culture, deux populations cellulaires étaient observables, la première minoritaire CD11b<sup>high</sup> / CD11c<sup>low</sup> à 29,6 % et une seconde CD11b<sup>high</sup> / CD11c<sup>high</sup> majoritaire à 69,4 %. Cette dernière correspondait à une population de DC. Les cellules uniquement positives au CD11b n'étaient pas totalement différenciées en DC. Au jour 9 de culture, cette population n'était quasiment plus présente (12,3 %) et une majorité des cellules possédait un phénotype CD11b<sup>high</sup> / CD11c<sup>high</sup> (86,9 %), caractéristique de DC conventionnelles de type CD11b.

Comme attendu, nos conditions de culture , notamment la présence de GM-CSF, sont propices au développement de DC de type conventionnel, ce qui a déjà été démontré dans d'autres travaux [132].

Après que les DC aient été caractérisées, nous avons voulu déterminer quelles voies de signalisation seraient intéressantes à étudier pour évaluer le potentiel sensibilisant.

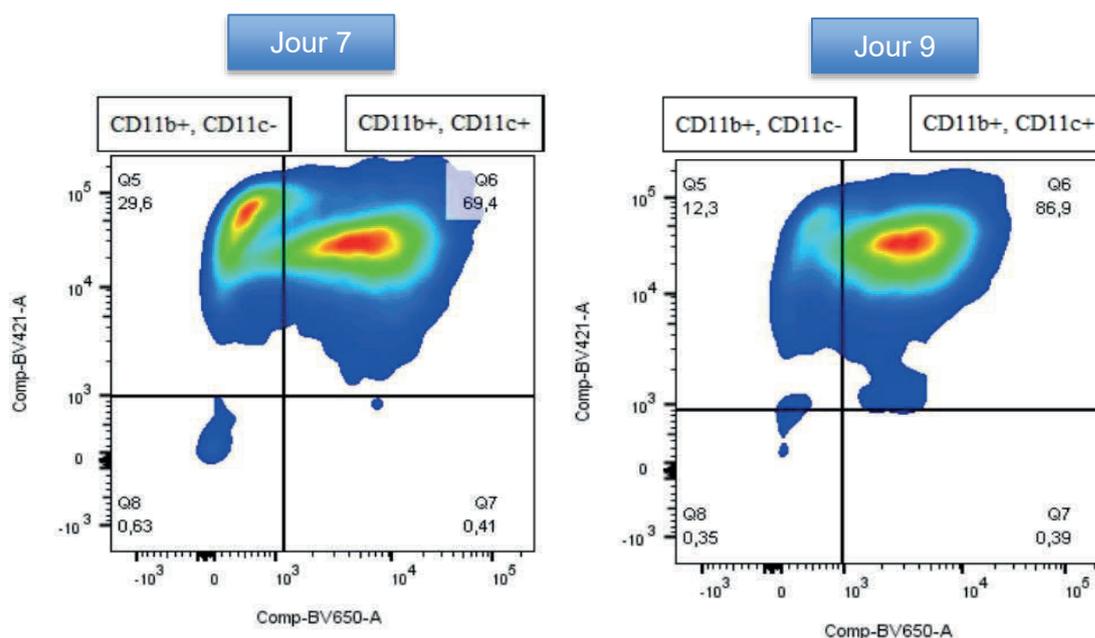


Figure 33 : Caractérisation des DC aux jours 7 et 9 de culture.

Pour chaque durée de culture cellulaire, les populations positives au CD11b ou au CD11c sont indiquées. La densité de la population est indiquée par sa couleur. Plus la couleur est chaude, plus la population est dense.

BV421-A correspond à l'intensité de fluorescence du marquage CD11b tandis que BV650-A correspond à l'intensité de fluorescence du marquage CD11c.

## 2. Criblage par *proteome array* des voies de signalisation activées dans des DC exposées à deux sensibilisants de référence : le DNFB et l'HCP

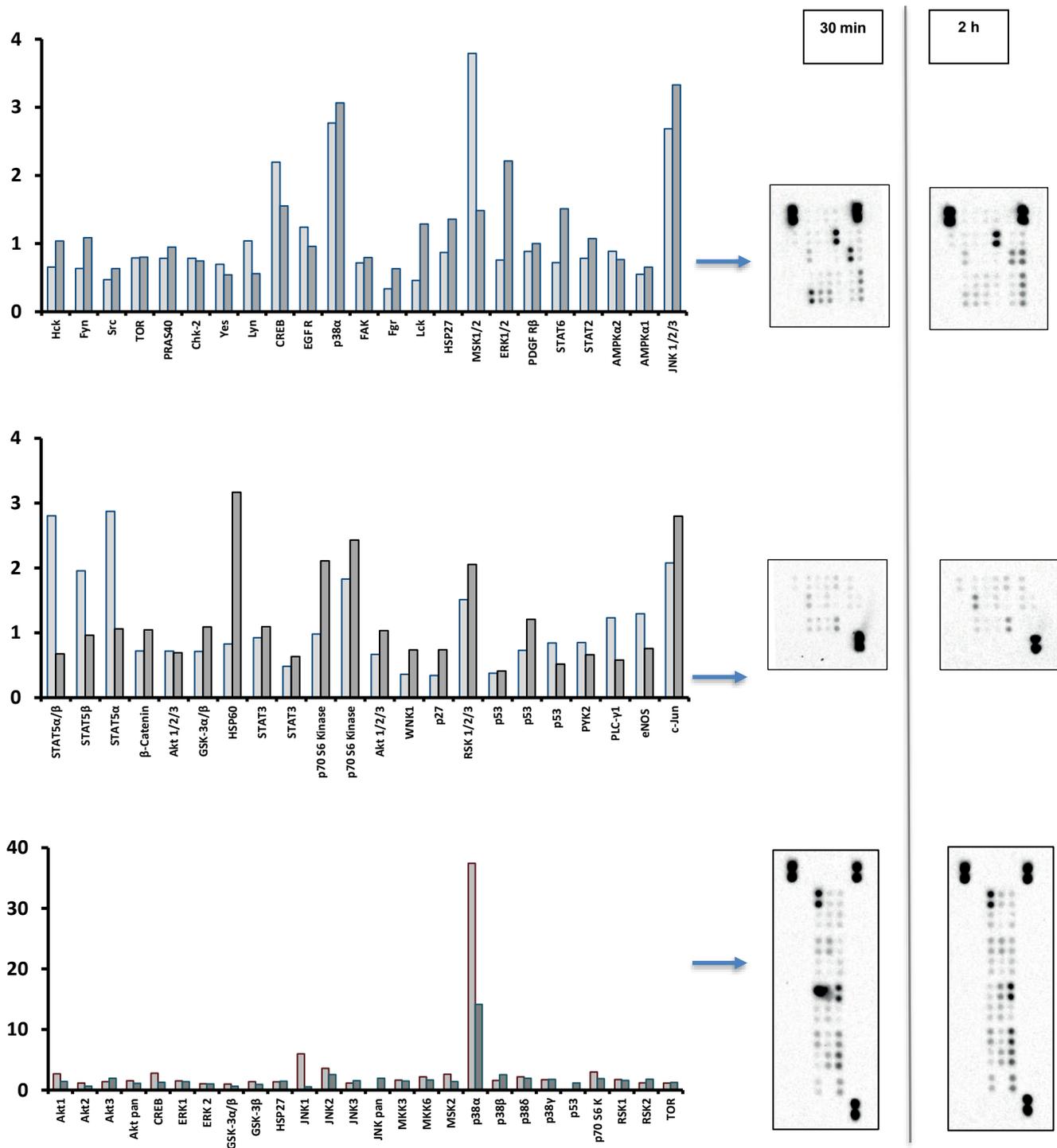
Il existe de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la sensibilisation, notamment celle impliquant les MAPK. Les kits de *proteome array* permettent de détecter la présence de plusieurs protéines phosphorylées dans un lysat. Dans un premier temps, les réponses obtenues avec un sensibilisant cutané et un sensibilisant respiratoire, respectivement le DNFB et l'HCP, ont été testées. Les DC ont tout d'abord été exposées à chaque sensibilisant pendant 30 min ou 2 h et les extractions de protéines ont été réalisées puis analysées via le kit. L'analyse de la moyenne de densité de pixels a été faite pour chacune des membranes. Pour chaque protéine, la moyenne obtenue à partir des DC exposées au sensibilisant était comparée à celle obtenue avec leur témoin véhicule respectif.

Les DC exposées au DNFB montraient une augmentation des formes phosphorylées de p38 $\alpha$ , MSK, HSP60, JNK, p70 kinase et CREB (**Figure 34**). La phosphorylation de la MAPK p38 était largement augmentée en réponse à ce sensibilisant, avec une densité de pixel 37 fois supérieure à celle correspondant au véhicule.

Les DC exposées à l'HCP montraient une augmentation des protéines phosphorylées p38 $\alpha$ , CREB, ERK1/2, JNK, STAT5a, HSP60, c-Jun et MSK1/2 (**Figure 35**). Cette augmentation était variable en fonction de la durée d'exposition. Après 2 h d'exposition, p38 $\alpha$  semblait plus active qu'à 30 min, cette observation était également valable pour JNK. Au contraire, à 30 min d'exposition, la moyenne de pixels est plus forte pour ERK2 et HSP60. Ces résultats indiquent que les voies impliquant des MAPK ou des STAT sont activées par le sensibilisant respiratoire. Les DC exposées au SDS ne montrent aucune augmentation particulière des protéines phosphorylées étudiées (**Figure 36**).

Contrairement à l'irritant (SDS), les sensibilisants induisaient rapidement différents mécanismes intracellulaires. Les voies de signalisation impliquées peuvent être communes ou différer en fonction de la nature du sensibilisant, cutané ou respiratoire. La cinétique d'activation était également variable en fonction du produit testé.

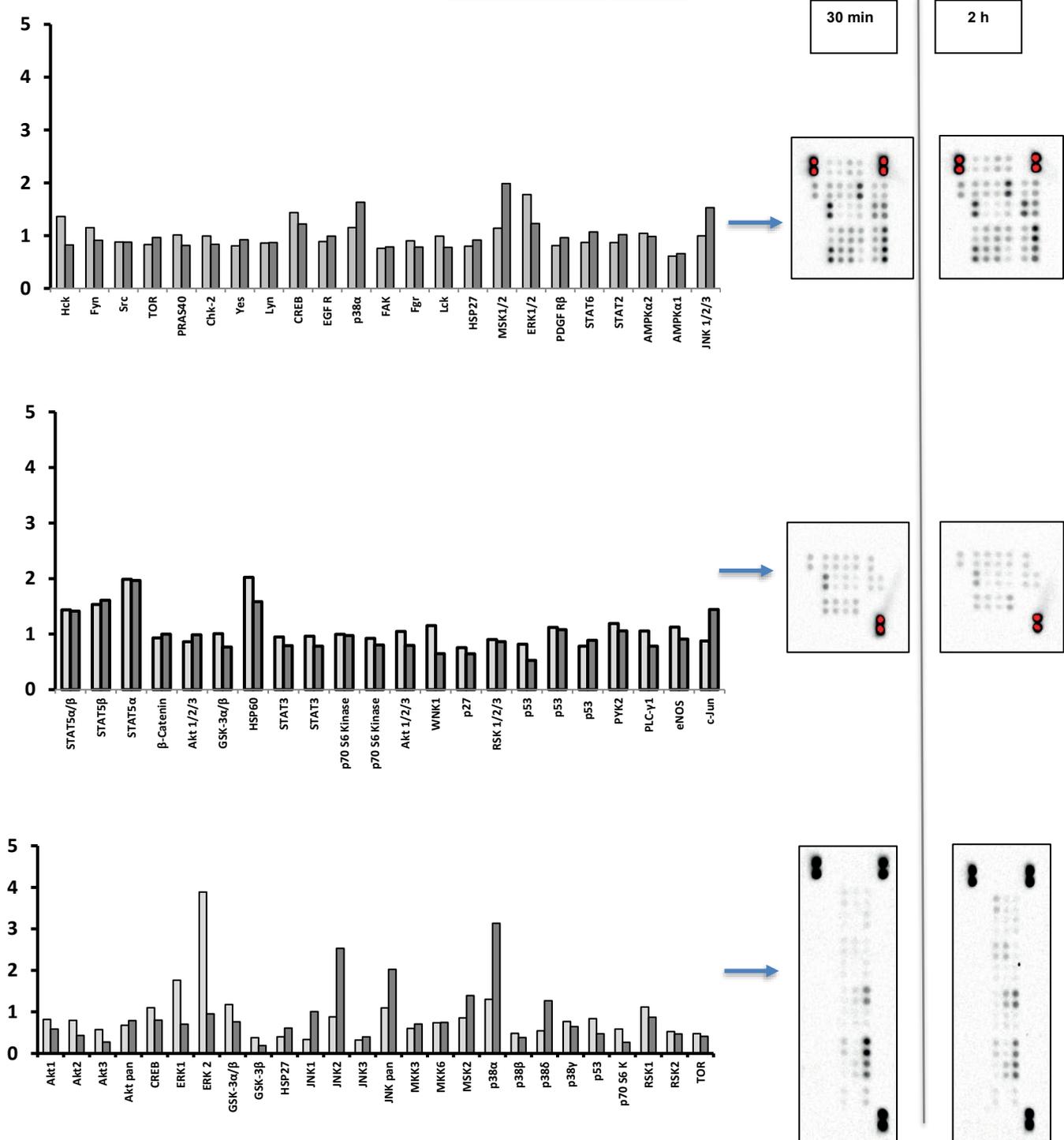
Cette étape de screening était une étape préliminaire afin de déterminer les voies intéressantes à étudier. Nous n'avons réalisé qu'une seule fois ces expérimentations car les effets obtenus, notamment sur p38 en réponse au DNFB, étaient suffisamment forts pour nous indiquer d'étudier les voies MAPK. Nous avons également préféré prendre du recul sur la variable « moyenne de pixel » qui n'était pas vraiment quantitative. Ainsi, notre priorité a été d'étudier plus particulièrement les voies signalisation MAPK et STAT dans les DC en réponse aux sensibilisants avec une méthode quantitative de cytométrie en flux.

**Proteome array : DNFB**

**Figure 34 : Les DC exposées au sensibilisant cutané DNFB expriment des protéines actives de la signalisation cellulaire.**

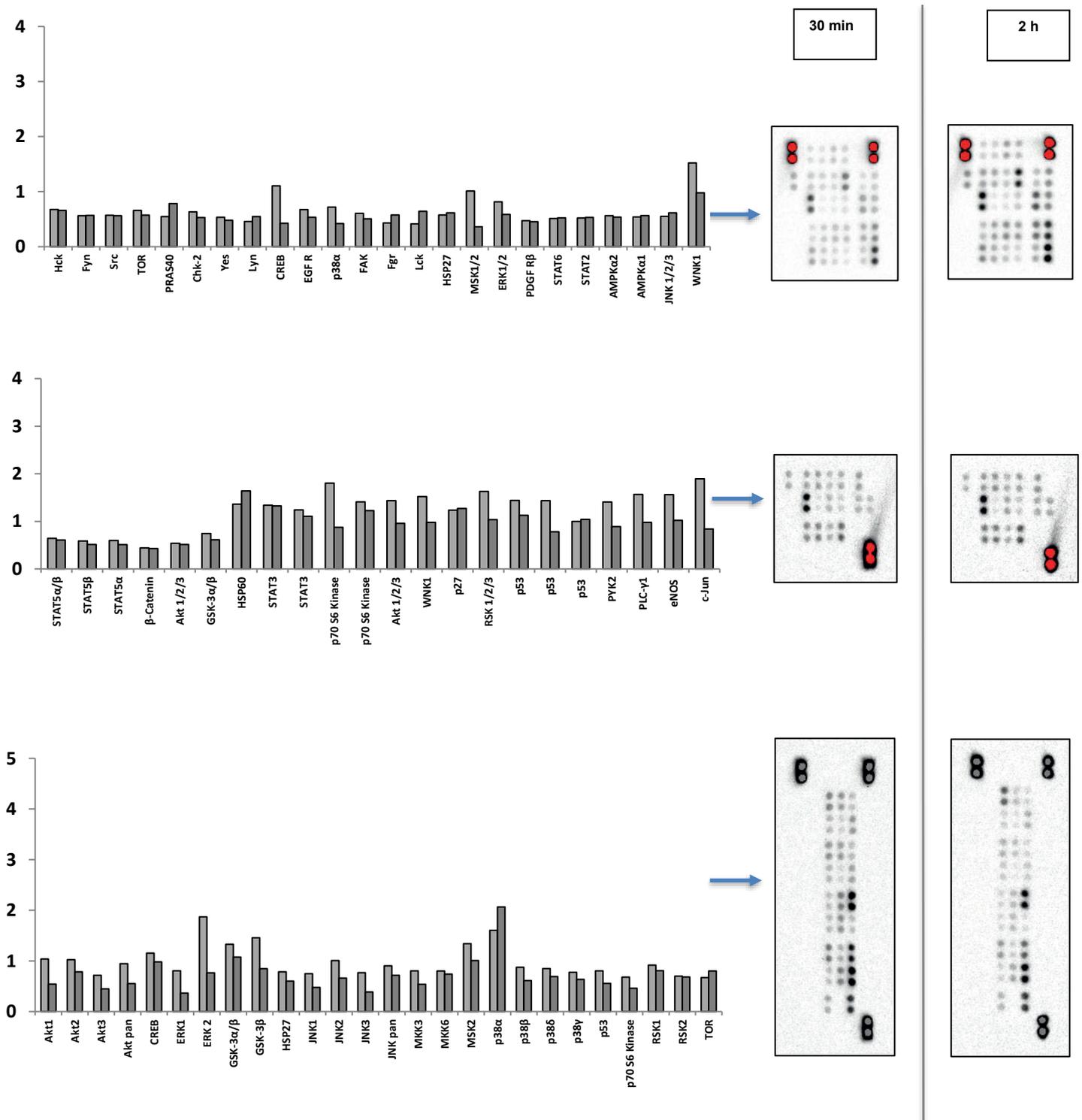
Chaque graphe correspond au résultat d'une membrane qui teste les formes phosphorylées des protéines indiquées. Pour chaque histogramme, la couleur gris clair indique le résultat pour une durée d'exposition de 30 min et la couleur gris foncé le résultat pour une durée d'exposition de 2 h. Les résultats sont exprimés en moyenne de pixels. N=1.

**Proteome array : HCP**



**Figure 35 : Les DC exposées au sensibilisant respiratoire HCP expriment des protéines actives de la signalisation cellulaire.**

Chaque graphe correspond au résultat d'une membrane, dont chacune teste les formes phosphorylées des protéines indiquées. Pour chaque histogramme, la couleur gris clair indique le résultat pour une durée d'exposition de 30 min et la couleur gris foncé le résultat pour une durée d'exposition de 2 h. Les résultats sont exprimés en moyenne de pixels. N=1.

**Proteome array : SDS**

**Figure 36 : Les DC exposées au non-sensibilisant SDS expriment des protéines actives de la signalisation cellulaire.**

Chaque graphe correspond au résultat d'une membrane, dont chacune teste les formes phosphorylées des protéines indiquées. Pour chaque histogramme, la couleur gris clair indique le résultat pour une durée d'exposition de 30 min et la couleur gris foncé le résultat pour une durée d'exposition de 2 h. Les résultats sont exprimés en moyenne de pixels. N=1.

### 3. Étude de l'activation des MAPK et des STAT par la méthode de Phosphoflow

Les voies MAPK et STAT sont des voies d'intérêt pour l'étude de la sensibilisation et les résultats obtenus en *proteome array* ont montré qu'elles pouvaient s'activer en réponse à des sensibilisants dans notre modèle cellulaire. Nous avons voulu déterminer si ces mécanismes intracellulaires étaient également déclenchés en réponse à d'autres sensibilisants cutanés ou respiratoires. Nous avons étudié la phosphorylation des protéines caractéristiques de l'activation de ces voies pour deux durées d'exposition, une dite précoce (30 min) et une plus tardive (2 h) avec un panel élargi de produits chimiques, sensibilisants cutanés ou respiratoires et quelques irritants non-sensibilisants.

#### 3.1. Test de sensibilisants cutanés

Cinq sensibilisants cutanés ont été étudiés :

- le dinitrofluorobenzène (DNFB),
- le formaldéhyde (FOR) (qui possède également un pouvoir sensibilisant respiratoire),
- le naphthol (Nap),
- l'isoeugénol (IsoE),
- l'hydroquinone (HQ).

Le DNFB (**Figure 37**) induisait une activation de la voie p38 après 30 min d'exposition (SI de 5,6 - DNFB 30  $\mu$ M) plus forte qu'après 2 h d'exposition (SI de 3,9 - DNFB 30  $\mu$ M).

Pour le formaldéhyde, une activation statistiquement significative de p38 (SI de 2,7 et 1,9 pour 30 min et 2 h – FOR 350  $\mu$ M) et une diminution de la phosphorylation d'ERK1/2, de JNK et de toutes les STAT ont été observées (**Figure 38**).

L'isoeugénol induisait une inhibition d'ERK1/2, STAT3 et STAT5 (**Figure 39**). De plus, on observait une activation de p38 dans les cellules exposées pendant 30 min (SI de 2,1 – IsoE 2000  $\mu$ M) et 2 h (SI de 1,6 – IsoE 2000  $\mu$ M).

Les expositions au naphthol induisaient une activation statistiquement significative de p38 (**Figure 40**) (SI de 2,4 – Nap 900  $\mu$ M, 30 min) et de STAT1 (SI de 3,10 – Nap 900  $\mu$ M, 30

min) ; l'activation de p38 était plus importante après 30 minutes qu'après 2 heures d'exposition (SI de 2,0 – Nap 900  $\mu\text{M}$ ).

Concernant l'hydroquinone (**Figure 41**), une augmentation de phospho-p38 a été observée uniquement après une exposition de 2 h (SI de 1,5 – HQ 480  $\mu\text{M}$ ).

Les résultats obtenus avec les sensibilisants cutanés montrent une activation de certaines voies intracellulaires, notamment p38 MAPK, dès les premières heures d'exposition. Pour la majorité des produits testés, la réponse de cette voie est plus importante après 30 min qu'après 2 h d'exposition.

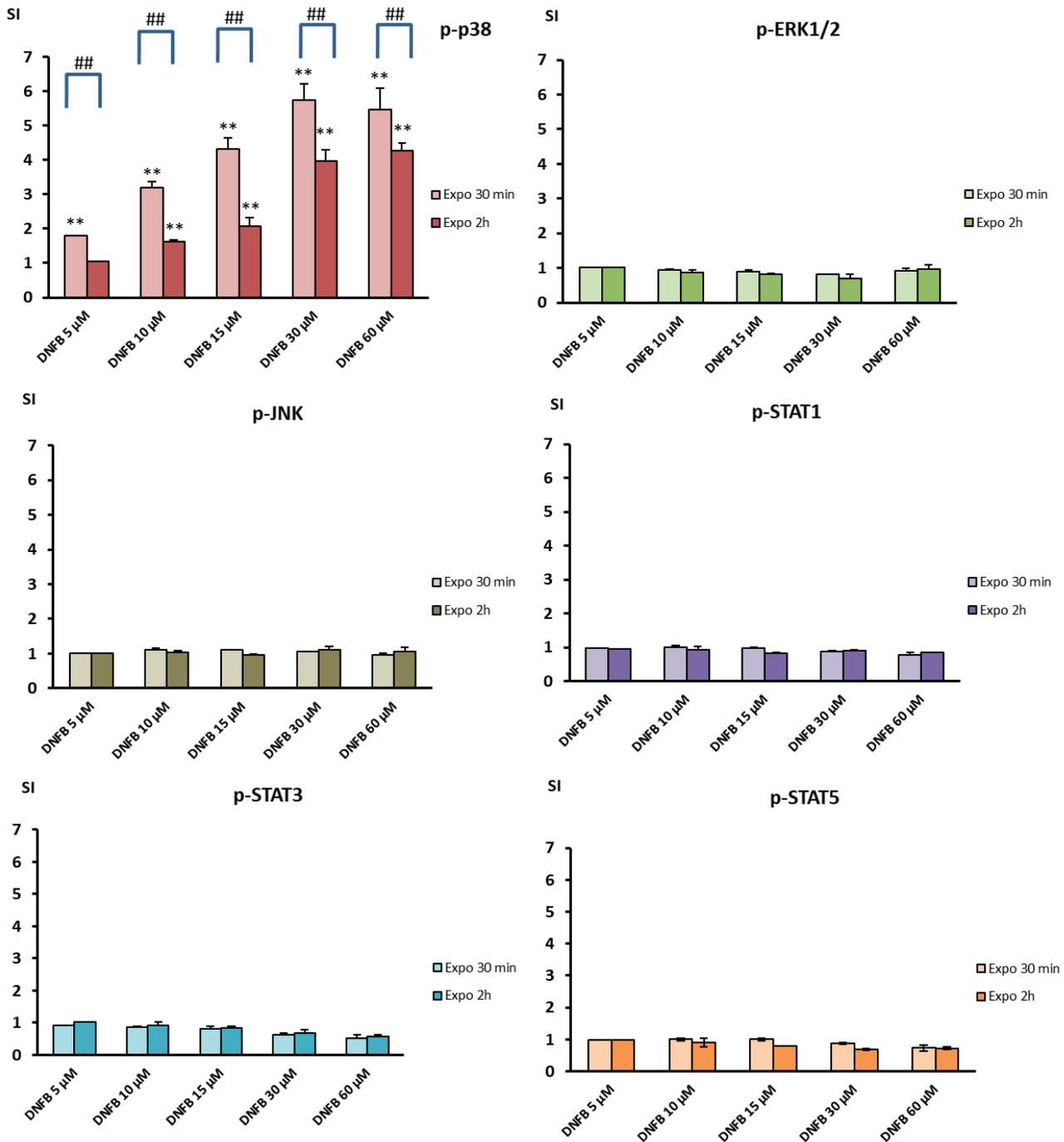
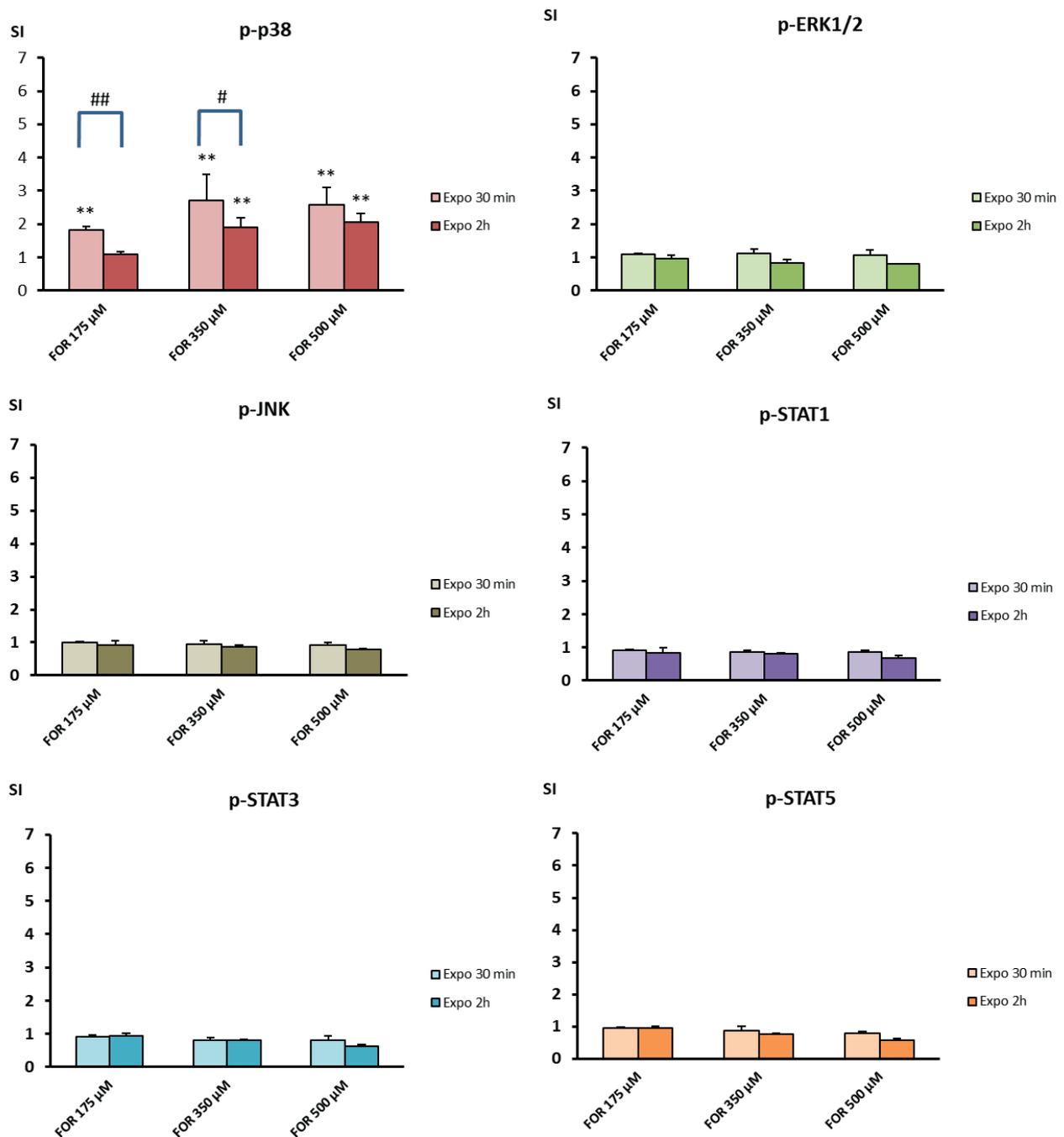


Figure 37 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées au DNFB pendant 30 min ou 2 h.

Les résultats sont exprimés en *stimulation index SI* (RFI Traité / RFI Véhicule). Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes (N=3). Différence significative entre le traité et le témoin : \* p-value<0,05 ; \*\* p-value<0,01. Différence statistiquement significative entre deux durées d'exposition pour une même concentration : # p-value<0,05 ; ## p-value<0,01. DNFB : Dinitrofluorobenzène.



**Figure 38 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées au FOR pendant 30 min ou 2 h.**

Les résultats sont exprimés en *stimulation index SI* (RFI Traité / RFI Véhicule). Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes (N=3). Différence significative entre le traité et le témoin : \* p-value<0,05 ; \*\* p-value<0,01. Différence significative entre deux durées d'exposition pour une même concentration : # p-value<0,05 ; ## p-value<0,01. FOR : Formaldéhyde.

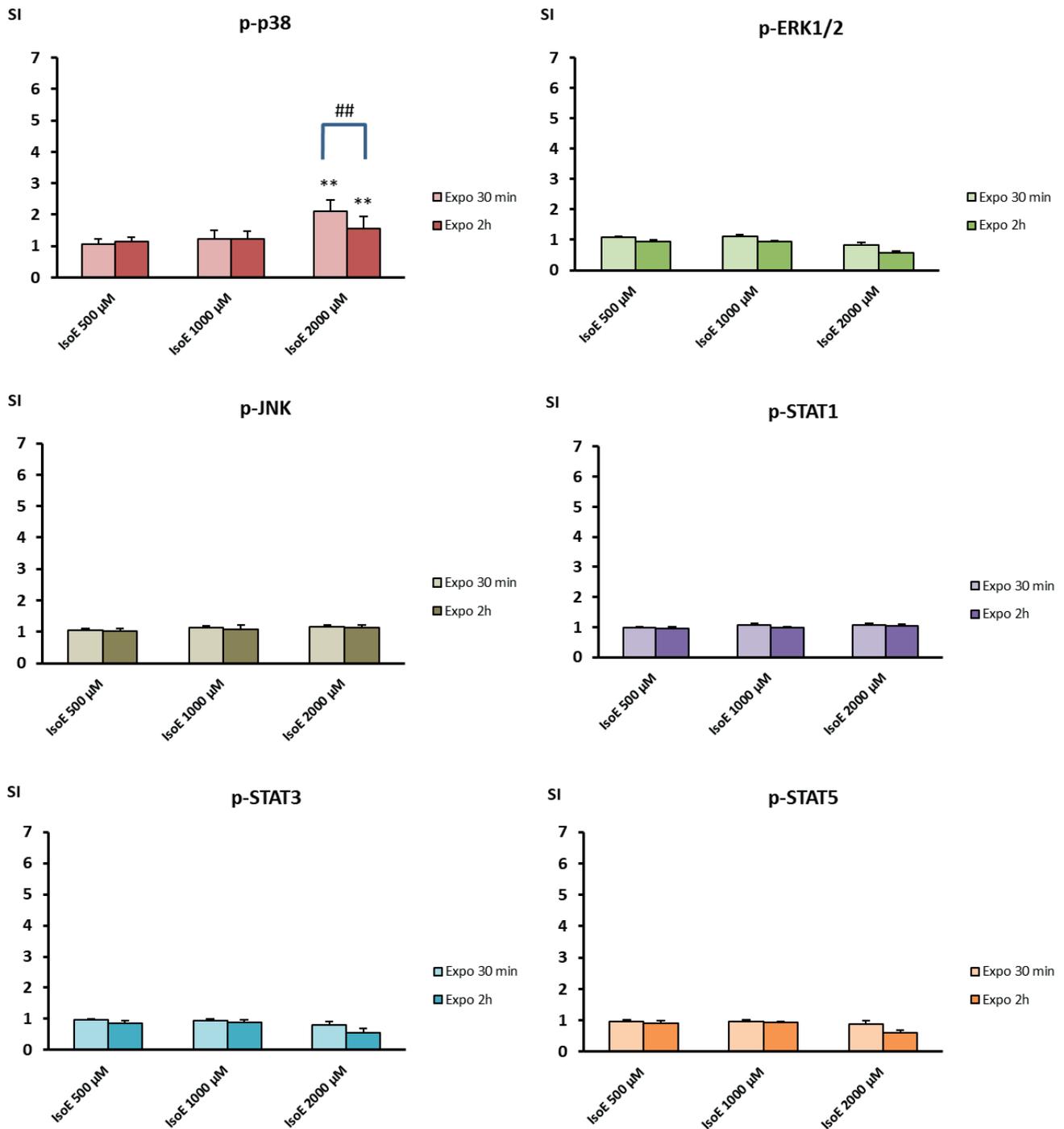


Figure 39 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées à l'Iso E pendant 30 min ou 2 h.

Les résultats sont exprimés en *stimulation index SI* (RFI Traité / RFI Véhicule). Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes (N=3). Différence significative entre le traité et le témoin : \* p-value<0,05 ; \*\* p-value<0,01. Différence significative entre deux durées d'exposition pour une même concentration : # p-value<0,05 ; ## p-value<0,01. Iso E : Isoeugénol.

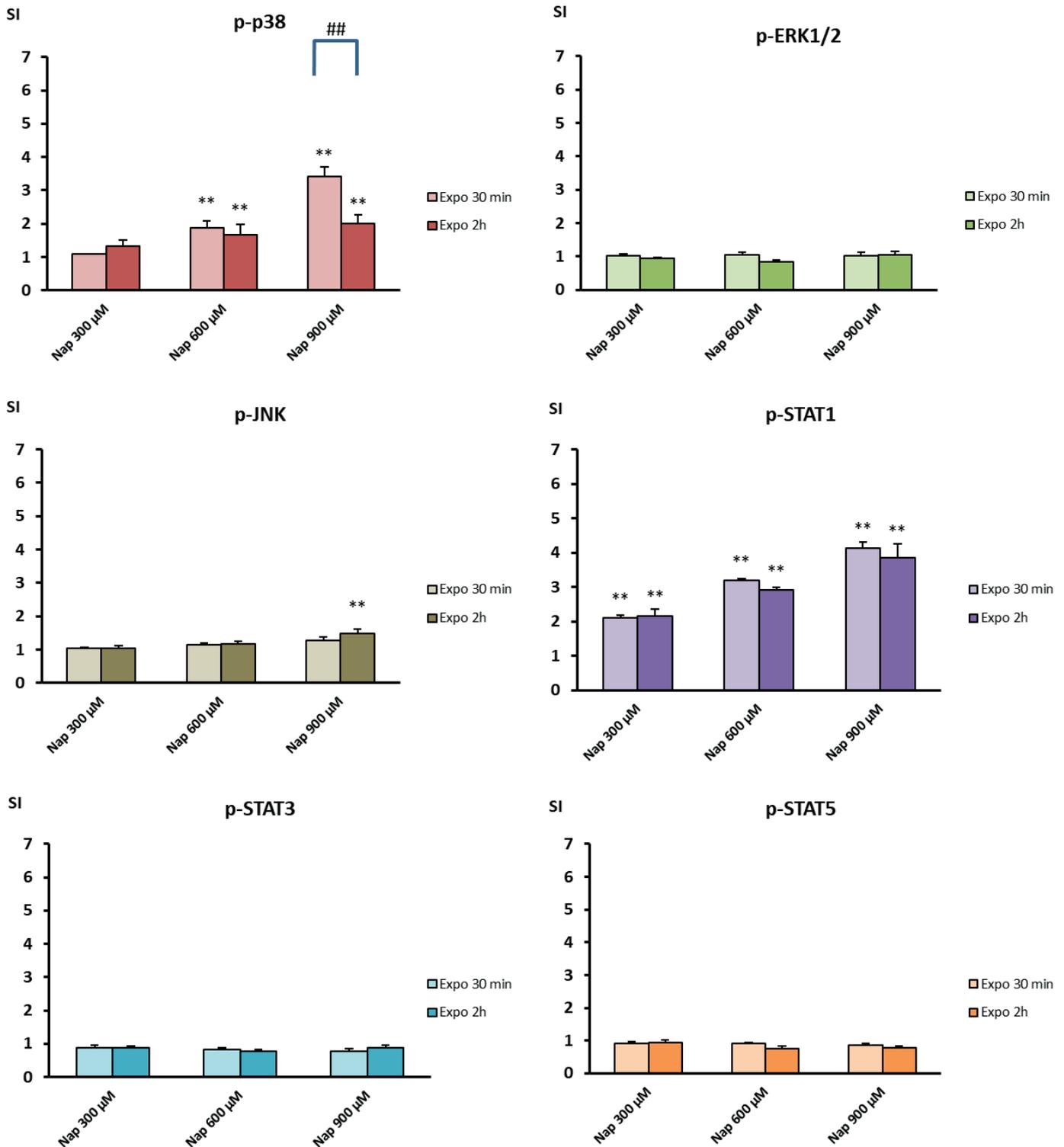


Figure 40 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées au Nap pendant 30 min ou 2 h.

Les résultats sont exprimés en *stimulation index SI* (RFI Traité / RFI Véhicule). Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes (N=3). Différence significative entre le traité et le témoin : \*\* p-value<0,01. Différence significative d'activation entre deux durées d'exposition pour une même concentration : ## p-value<0,01. Nap : Naphtol.

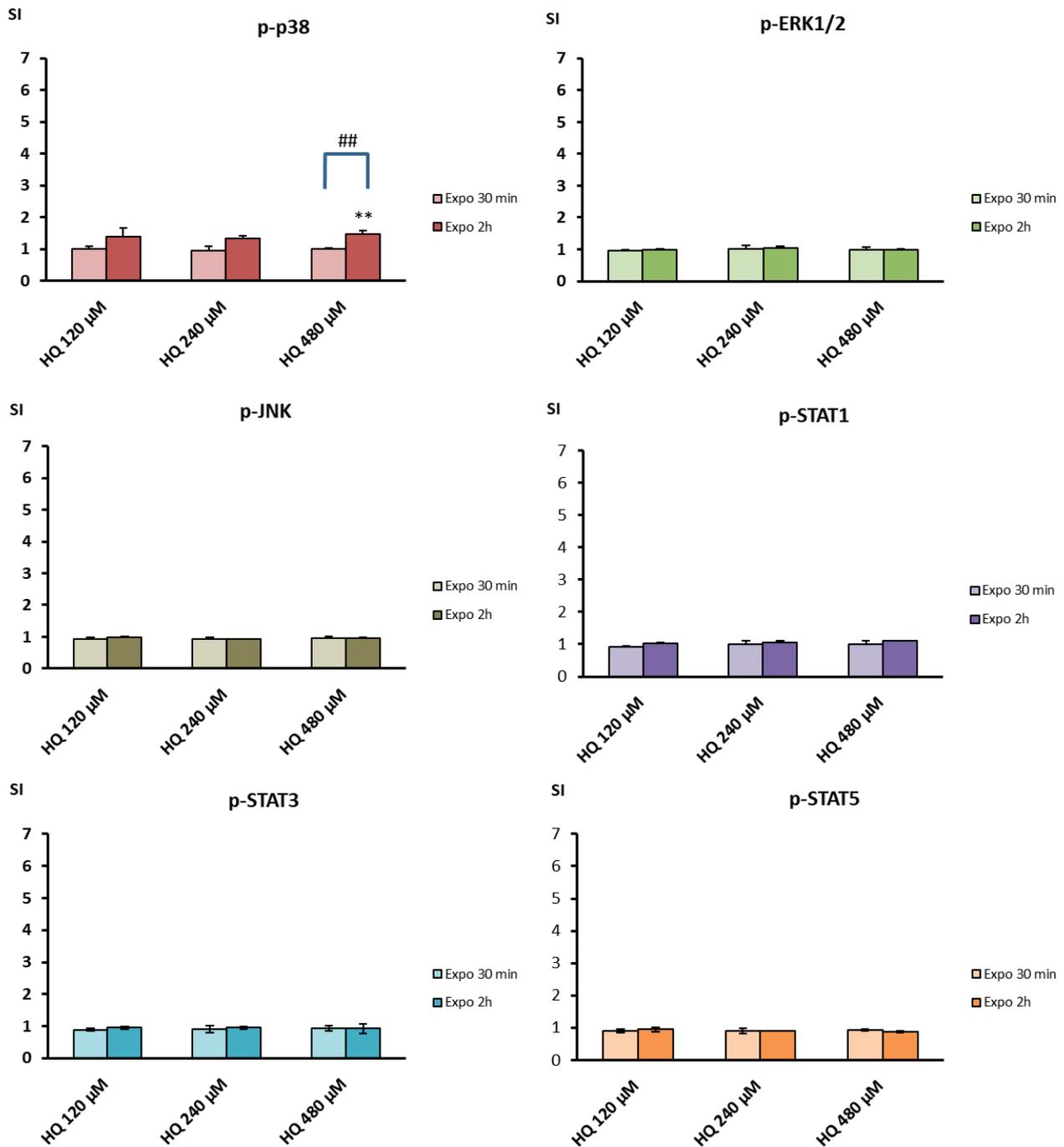


Figure 41 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées à l'HQ pendant 30 min ou 2 h.

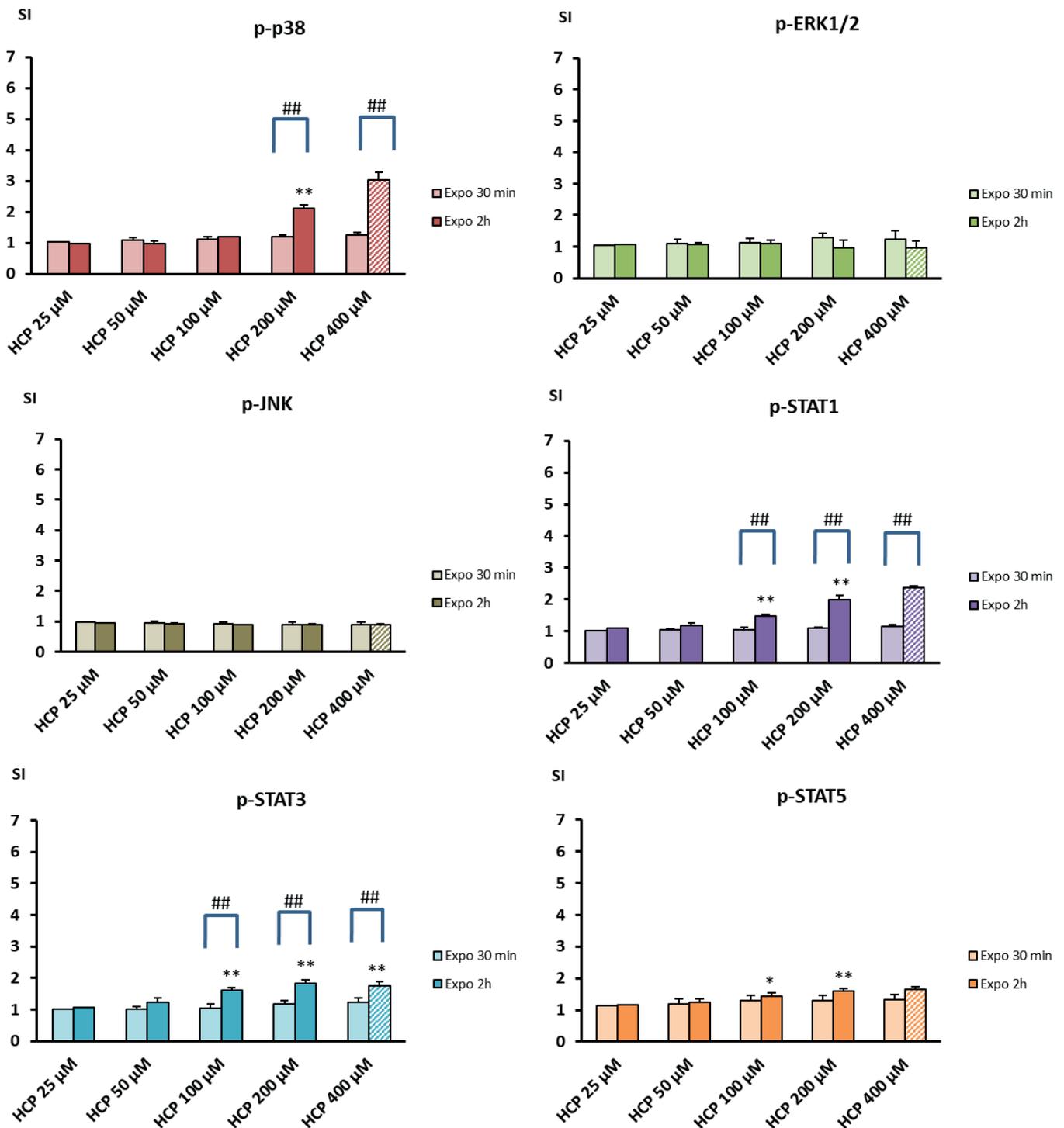
Les résultats sont exprimés en *stimulation index SI* (RFI Traité / RFI Véhicule). Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes (N=3). Différence significative entre le traité et le témoin : \*\* p-value<0,01. Différence significative entre deux durées d'exposition pour une même concentration : ## p-value<0,01. HQ : Hydroquinone.

### 3.2. Test de sensibilisants respiratoires

Deux sensibilisants respiratoires ont été testés, l'HCP et le TMI (**Figure 42 et 43**). Après exposition à ces deux composés, nous observons une activation statistiquement significative de p38 (SI de 2,12 et 1,2 pour HCP 200  $\mu$ M et TMI 500  $\mu$ M respectivement) ; l'activation après 2 h d'exposition était plus élevée que celle après 30 min d'exposition. Une diminution de phospho-ERK1/2, de phospho-JNK et de toutes les phospho-STAT était observée après exposition au TMI. En revanche, il y avait une forte augmentation de toutes les phospho-STAT après exposition à l'HCP (respectivement SI de 2,0, 1,8 et 1,6 pour STAT1, STAT3 et STAT5 – HCP 200  $\mu$ M). La concentration HCP 400  $\mu$ M entraînait une forte baisse de la viabilité et du pourcentage de cellules intactes. Cette concentration n'a pas été retenue dans l'analyse.

Un autre sensibilisant respiratoire, la chloramine T, a été testé mais les résultats ont montré une forte autofluorescence sur tous les canaux utilisés (données non montrées). Cette autofluorescence a également été observée lors du phénotypage. Ce produit n'a pas été étudié en cytométrie en flux.

L'ensemble de ces résultats indique que pour certains sensibilisants respiratoires, les voies STAT sont activées et que tous induisent une activation de la MAPK p38, plus importante à 2 h d'exposition.



**Figure 42 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées à l'HCP pendant 30 min ou 2 h.**

Les résultats sont exprimés en *stimulation index* SI (RFI Traité / RFI Véhicule). Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes (N=3). L'histogramme hachuré correspond à une concentration trop toxique non retenue dans l'analyse. Différence significative entre le traité et le témoin : \* p-value<0,05 ; \*\* p-value<0,01. Différence significative entre deux durées d'exposition pour une même concentration : # p-value<0,05 ; ## p-value<0,01. HCP : Hexachloroplatinate d'ammonium.

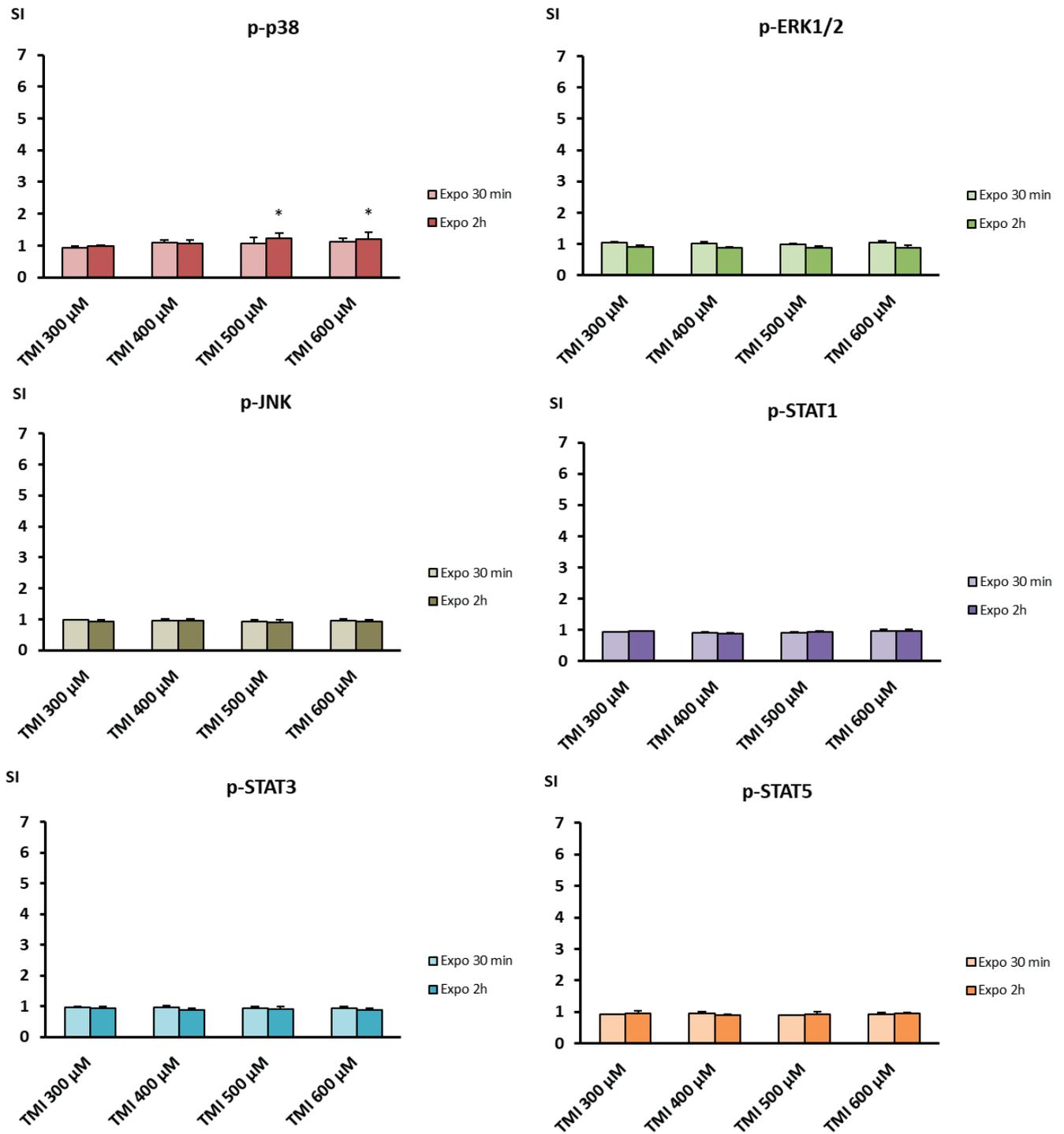
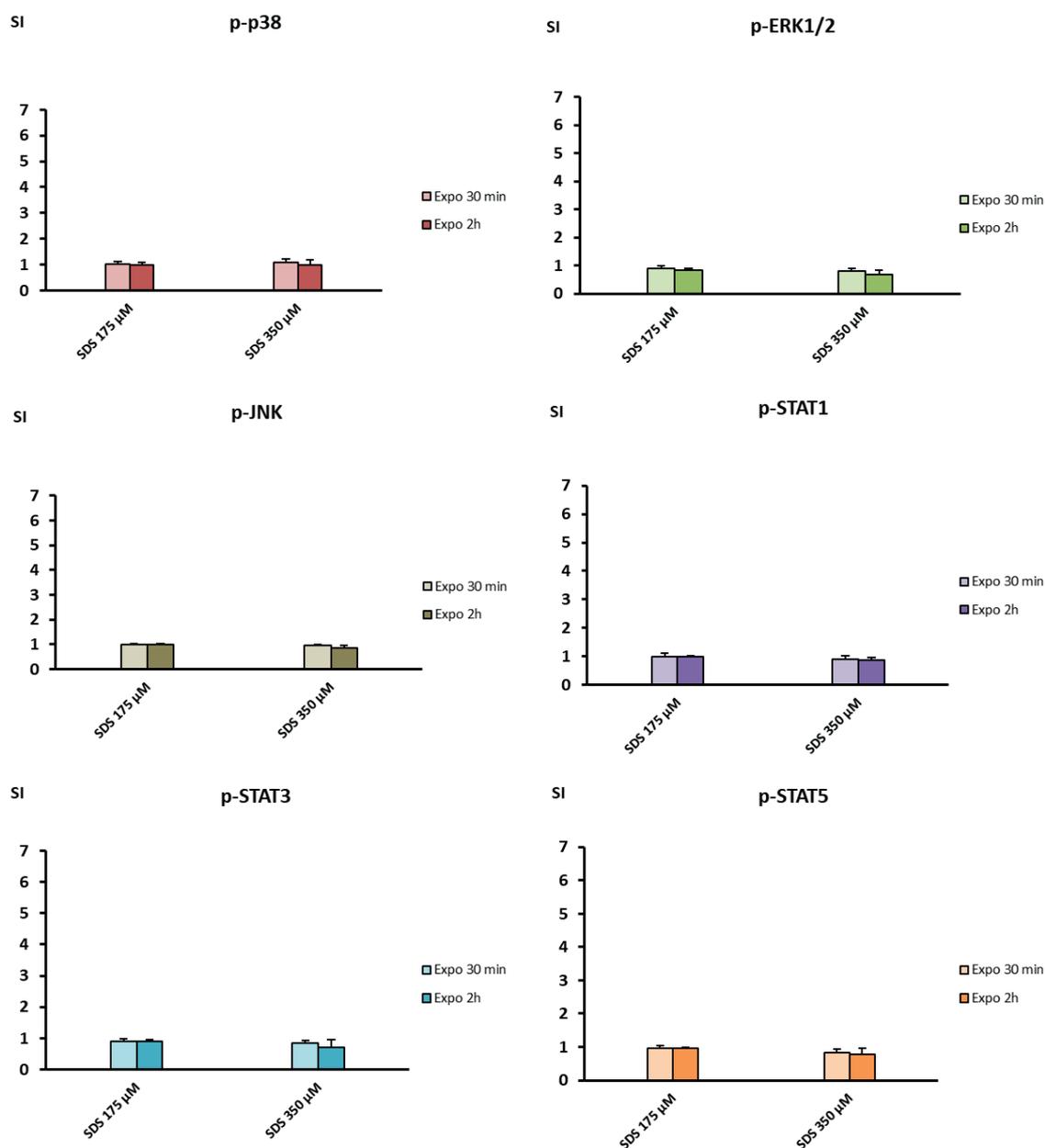


Figure 43 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées au TMI pendant 30 min ou 2 h.

Les résultats sont exprimés en *stimulation index SI* (RFI Traité / RFI Véhicule). Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes (N=3). Différence significative entre le traité et le témoin : \* p-value<0,05 ; \*\* p-value<0,01. Différence significative entre deux durées d'exposition pour une même concentration : # p-value<0,05 ; ## p-value<0,01. TMI : p-Tolyl isocyanate.

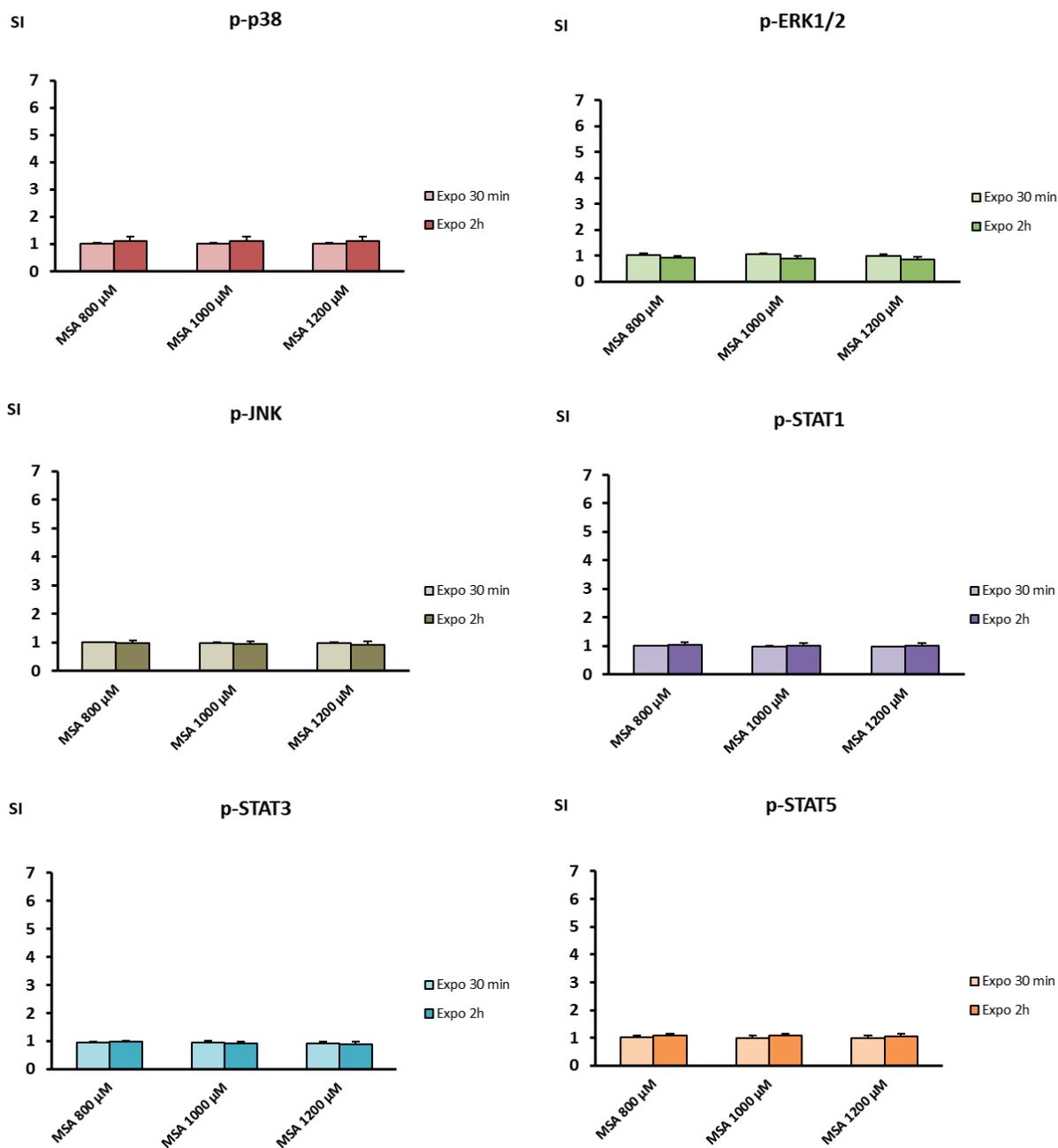
### 3.3. Test de non-sensibilisants irritants

Deux irritants non-sensibilisants ont été testés : le SDS et le MSA. Aucune activation n'a été observée dans les cellules exposées à ces deux produits et ce quelle que soit la concentration testée (**Figure 44**, **Figure 45**).



**Figure 44 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées au SDS pendant 30 min ou 2 h.**

Les résultats sont exprimés en *stimulation index SI* (RFI Traité / RFI Véhicule). Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes (N=3). SDS : Sodium dodécyl sulfate.



**Figure 45 : Indice d'activation de p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées au MSA pendant 30 min ou 2 h.**

Les résultats sont exprimés en *stimulation index SI* (RFI Traité / RFI Véhicule). Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes (N=3). MSA : Méthyl salicylate.

#### 4. Étude de l'activation des MAPK et des STAT : cinétique d'activation dans les DC exposées au DNFB et à l'HCP

Les précédents résultats ont montré que certaines voies intracellulaires étaient activées par les sensibilisants testés. Afin de déterminer les durées optimales d'analyse de la réponse au DNFB et à l'HCP, nous avons réalisé une expérience de cinétique d'activation après des expositions des DC comprises entre 15 min et 3 h.

Comme montré précédemment, le DNFB activait p38. Cette activation apparaissait de manière précoce et ce dès 15 min d'exposition (**Figure 46**). Parmi les durées d'exposition testées, l'activation de p38 était maximale entre 15 min et 30 min. Elle diminuait progressivement à partir de 30 min pour être quasi nulle au-delà de 2 h d'exposition. Aucune autre activation n'a été observée pour les autres protéines étudiées, MAPK ou STAT, et ce, quelle que soit la durée d'exposition.

Les DC exposées à l'HCP montraient un profil d'activation différent de celui du DNFB. Les marqueurs p-p38, p-STAT1, p-STAT3 et p-STAT5 s'activaient à partir d'1 h d'exposition et augmentaient jusqu'à 3 h (**Figure 47**). Il s'agissait ici d'une activation tardive en comparaison à celle induite par le DNFB. Concernant toutes les réponses cellulaires induites par l'HCP, la durée d'exposition 3 h était la plus optimale dans les conditions expérimentales testées.

Pour les expériences ultérieures de cytométrie après marquage intracellulaire, nous avons retenu les durées d'exposition de 15 min et de 3 h qui sont optimales à la fois en termes d'amplitude de réponse et de faisabilité.

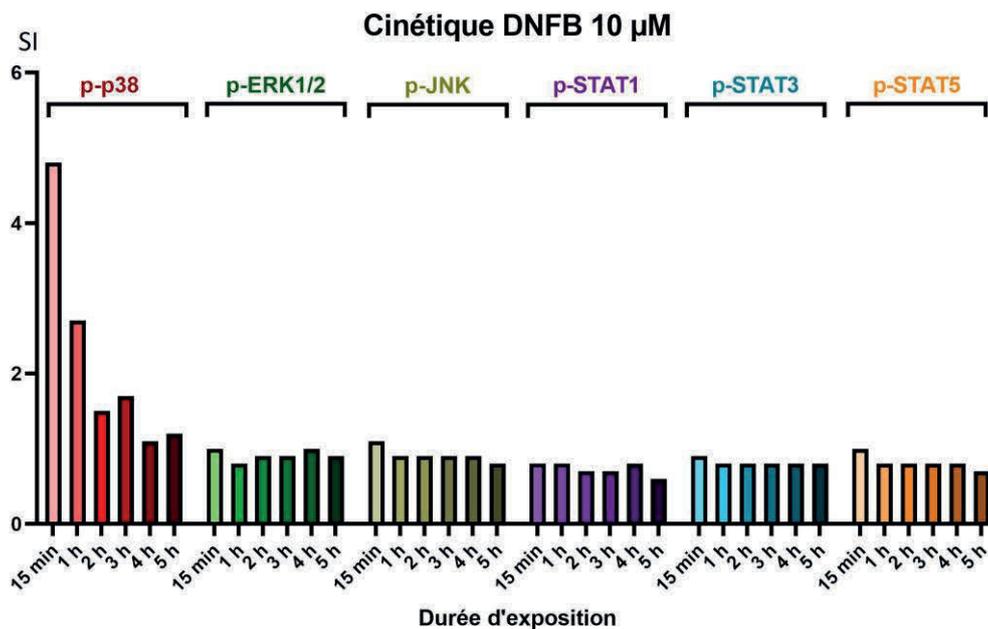


Figure 47 : Cinétique d'activation des MAPK et STAT dans les DC en réponse au DNFB, un sensibilisant cutané.

Les résultats sont exprimés en *stimulation index SI* (RFI Traité / RFI Véhicule). Les mesures de RFI ont été réalisées au cours d'une expérience (N=1). La cinétique d'exposition comprend les durées de 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h et 5 h.

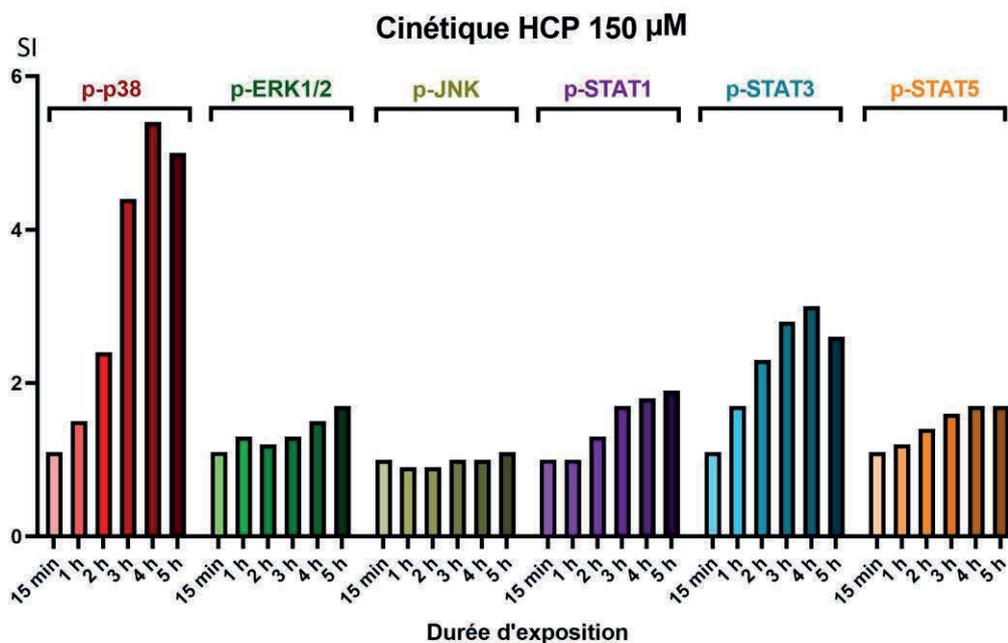


Figure 46 : Cinétique d'activation des MAPK et STAT dans les DC en réponse à l'HCP, un sensibilisant respiratoire.

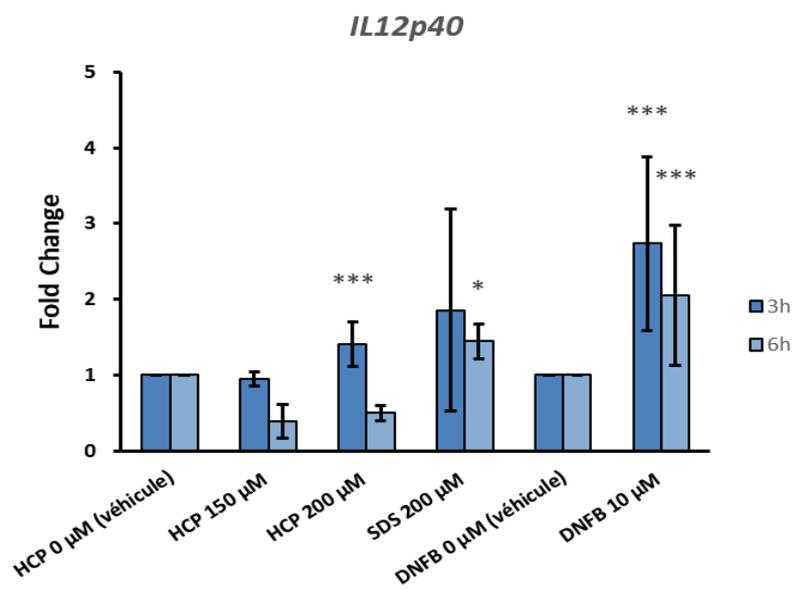
Les résultats sont exprimés en *stimulation index SI* (RFI traité / RFI Véhicule). Les mesures de RFI ont été réalisées sur une expérience (N=1). La cinétique d'exposition comprend les durées de 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h et 5 h.

## 5. Expression du gène *IL12p40* en réponse à des sensibilisants

L'IL-12 est une cytokine impliquée dans la polarisation Th1 conduisant à la sensibilisation cutanée. Parallèlement aux voies MAPK et STAT, nous avons ainsi étudié l'expression du gène codant la sous-unité IL12p40, afin de déterminer si celle-ci constituait un marqueur discriminant sensibilisant cutané de sensibilisant respiratoire.

L'expression d'*IL12p40* augmentait significativement après exposition au DNFB 10 µM à 3 h et à 6 h d'exposition (**Figure 48**). Cette augmentation semblait importante pour toutes les durées d'exposition. L'exposition à l'HCP entraînait également une augmentation de l'expression d'*IL12p40*, uniquement à 3 h d'exposition pour une concentration de 150 µM. Cette augmentation était néanmoins très légère en comparaison de celle obtenue avec le DNFB. L'exposition au SDS entraînait une légère augmentation d'expression pour une exposition de 6 h.

Les résultats indiquent que dans les conditions expérimentales testées, le sensibilisant cutané, le sensibilisant respiratoire ainsi que l'irritant augmentent l'expression d'*IL12p40*. De plus, selon les produits chimiques testés, la variabilité inter-expérience est importante. L'expression de l'*IL12p40* ne peut donc constituer à elle seule un marqueur discriminant.



**Figure 48 : Expression du gène codant la cytokine IL12p40 en réponse aux sensibilisants.**

Les résultats sont exprimés en *fold change* ( $2^{-\Delta\Delta C_q}$ ) et sont la moyenne de 3 expériences indépendantes (N=3).

HCP : Hexachloroplatinate d'ammonium ; SDS : Sodium dodécyl sulfate ; DNFB : Dinitrofluorobenzène.

## 6. Étude de la voie Nrf2/Keap1

En plus de l'implication des voies MAPK et STAT, celle de la voie Nrf2/Keap1 a été décrite dans la réponse cellulaire aux sensibilisants. Nous avons voulu analyser l'activation de cette voie dans le modèle BMDC.

### 6.1. Mise au point d'une méthode pour étudier l'accumulation de la protéine Nrf2 et application à divers sensibilisants et non-sensibilisants (Résumé publication *Toxicology Research* 2021)

L'accumulation de la protéine Nrf2 a été analysée par cytométrie dans les DC exposées à des activateurs de Nrf2 et à des sensibilisants. L'observation d'une augmentation du marquage de la protéine, dans les DC incubées avec les activateurs connus de Nrf2, le sulforaphane et le *tert*-butylhydroquinone nous a permis de valider la méthode (données non montrées). Les premiers résultats obtenus avec les sensibilisants de référence, l'HCP et le DNFB, révélaient une accumulation de la protéine Nrf2 lorsque les DC étaient exposées pendant 3 h aux deux produits. En effet, nous observions un SI de 5 pour les DC exposées au DNFB et pour celles exposées à l'HCP (**Figure 49**). Aucune accumulation de la protéine n'a pu être observée à 15 min d'exposition (données non présentées).

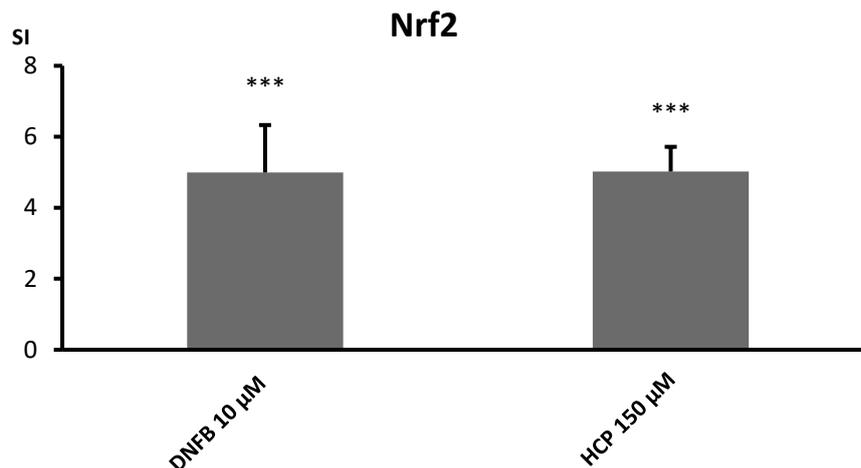


Figure 49 : Accumulation de la protéine Nrf2 pour des DC exposées au DNFB et à l'HCP pendant 3 h.

Les résultats sont exprimés en *stimulation index SI* (RFI traité / RFI véhicule) et correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes (N=3). Différence significative entre le traité et le véhicule : \*\*\* p-value<0,001. DNFB : Dinitrofluorobenzène ; HCP : Hexachloroplatinate d'ammonium.

## 6.2. Autres sensibilisants testés

Après avoir confirmé la méthodologie d'analyse de la protéine Nrf2, celle-ci a été appliquée sur un panel plus large de produits, sensibilisants et non sensibilisants. Les résultats sont résumés dans le **Tableau XIX**. Les résultats indiquaient qu'en plus du DNFB et de l'HCP, d'autres sensibilisants pouvaient également induire une accumulation cellulaire de la protéine Nrf2. Les augmentations du marquage Nrf2 les plus fortes étaient pour l'IsoE, le FOR et le Nap respectivement de 9,6, 3, et 7,9. En ce qui concerne le Cinn, nous observons une accumulation de la protéine Nrf2 décroissante avec l'augmentation de la concentration. Enfin, pour le sensibilisant respiratoire ATCP, les résultats montraient une accumulation de la protéine Nrf2 avec un RFI Traité / RFI Véhicule de 4,1 à une concentration de 150 µM.

Tableau XIX : Etude de l'accumulation de la protéine Nrf2 dans des DC exposés à différents produits chimiques testés.

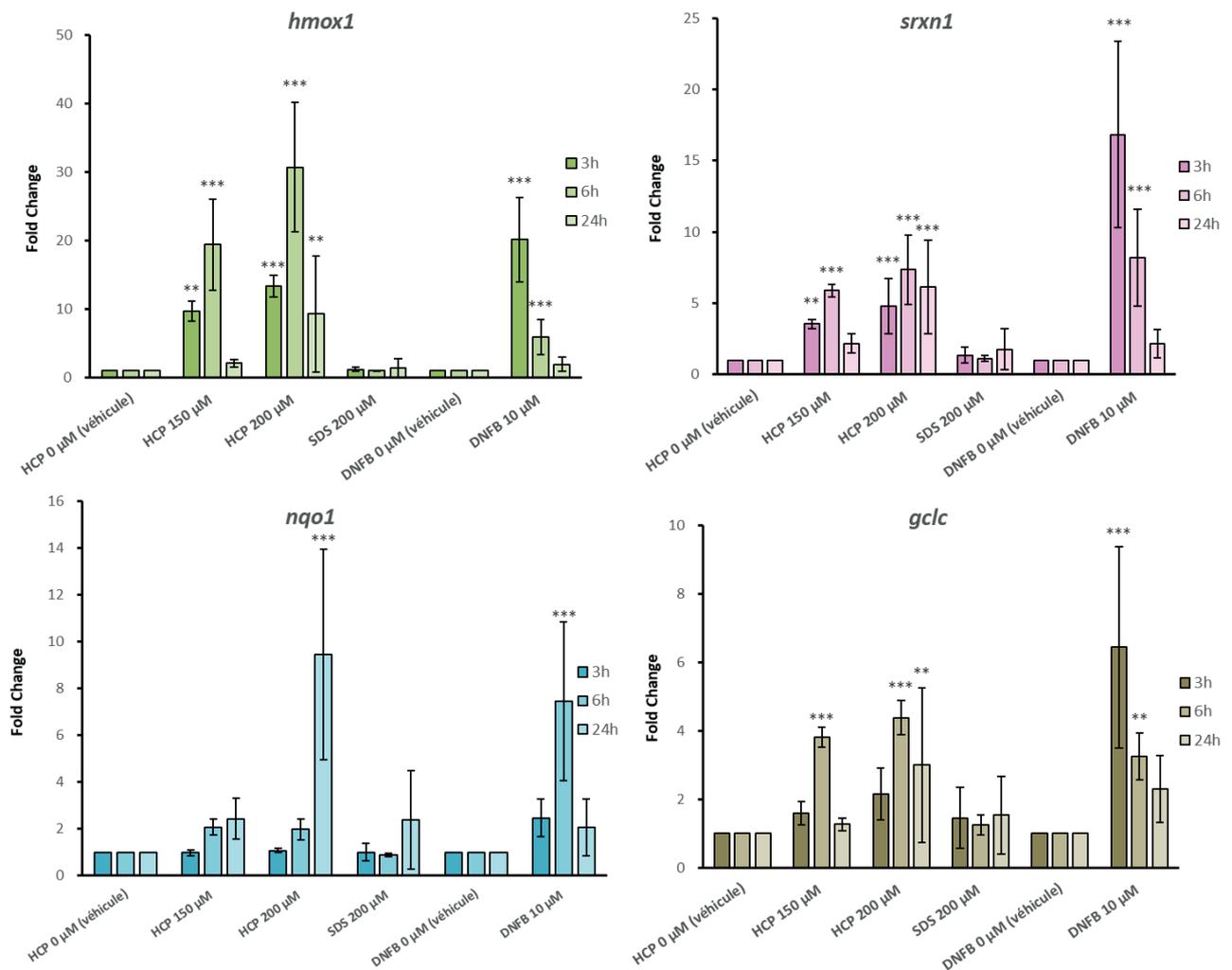
			Nrf2 (SI)	
			15 min	3 h
Sensibilisants cutanés	Cinn	100 $\mu$ M	2,0 $\pm$ 0,1	<b>7,9 <math>\pm</math> 0,1 ***</b>
		200 $\mu$ M	1,9 $\pm$ 0,2	<b>5,8 <math>\pm</math> 0,1***</b>
		400 $\mu$ M	1,9 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1
	Nap	300 $\mu$ M	1,1 $\pm$ 0,1	<b>3,0 <math>\pm</math> 0,2**</b>
		600 $\mu$ M	0,9 $\pm$ 0,1	<b>2,3 <math>\pm</math> 0,1*</b>
		750 $\mu$ M	0,8 $\pm$ 0,1	<b>2,2 <math>\pm</math> 0,1*</b>
	FOR	350 $\mu$ M	0,7 $\pm$ 0,1	<b>2,5 <math>\pm</math> 0,3*</b>
		500 $\mu$ M	0,6 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1
	IsoE	250 $\mu$ M	1,5 $\pm$ 0,3	<b>2,6 <math>\pm</math> 0,3*</b>
		500 $\mu$ M	1,5 $\pm$ 0,2	<b>9,3 <math>\pm</math> 0,5***</b>
		1000 $\mu$ M	1,7 $\pm$ 0,4	<b>7,6 <math>\pm</math> 0,4***</b>
	Sensibilisants respiratoires	ATCP	50 $\mu$ M	1,0 $\pm$ 0,1
100 $\mu$ M			1,1 $\pm$ 0,1	<b>3,5 <math>\pm</math> 0,5**</b>
150 $\mu$ M			1,0 $\pm$ 0,1	<b>4,1 <math>\pm</math> 0,2***</b>

Pour chaque produit est indiqué la moyenne des *stimulation index SI* (RFI traité / RFI véhicule) de 3 expériences indépendantes (N=3) pour les durées d'exposition 15 min ou 3 h. Différence significative entre le traité et le véhicule indiquée en gras : \*\*\* p-value<0,001 ; \*\*p-value<0,01 ; \*p-value<0,05. Cinn : Cinnamaldéhyde ; Nap : Naphtol ; FOR : Formaldéhyde ; IsoE : Isoeugénol ; ATCP : Tétrachloroplatinate d'ammonium.

### 6.3. Expression des gènes régulés par Nrf2 en fonction de la durée d'exposition

L'expression des gènes *hmox1*, *srxn1*, *nqo1* et *gclc* en réponse à l'HCP, au DNFB et au SDS a été étudiée aux durées d'exposition 3 h, 6 h et 24 h (**Figure 50**). Les premiers résultats obtenus montraient que contrairement au SDS, l'exposition à l'HCP ou au DNFB augmentait l'expression de tous les gènes étudiés. Cette surexpression variait en fonction de la durée d'exposition et cette cinétique était différente selon le sensibilisant. L'HCP augmentait l'expression de *hmox1*, *srxn1* et *gclc* à 6 h d'exposition (HCP 150 et 200  $\mu$ M) et *nqo1* à 24 h d'exposition (HCP 200  $\mu$ M). Quant au DNFB, l'exposition à ce sensibilisant cutané induisait une surexpression de *hmox1*, *srxn1* et *gclc* à 3 h d'exposition et à 6 h pour *nqo1*. Quel que soit le gène, le délai de réponse pour le sensibilisant respiratoire était donc plus long que celui correspondant au sensibilisant cutané.

L'exposition à l'irritant non sensibilisant, le SDS, n'entraînait aucune augmentation d'expression quel que soit le gène étudié.

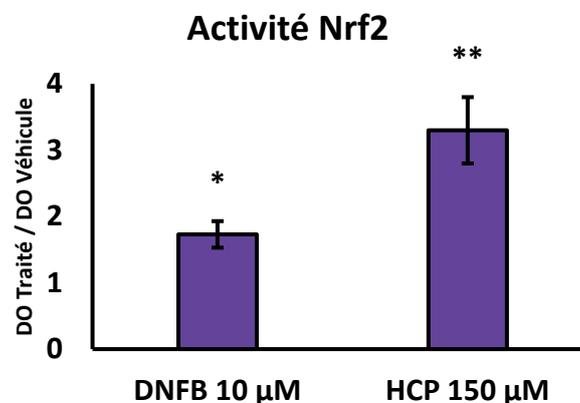


**Figure 50 : Expression de *hmx1*, *srxn1*, *nqo1* et *gclc* dans des DC en réponse à deux sensibilisants.**

Les DC ont été exposées pendant 3 h, 6 h ou 24 h à l'HCP, au DNFB et au SDS. Les résultats sont exprimés en *fold change* ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ) correspondant à la moyenne de 3 expériences indépendantes en triplicats (N=3 ; n=3) +/- l'écart-type par rapport à la moyenne. Différence significative d'expression entre le traité et le véhicule : \*\*\*p<0,001 ; \*\*p<0,01. HCP : Hexachloroplatinate d'ammonium ; SDS : Sodium dodécyl sulfate ; DNFB : Dinitrofluorobenzène.

#### 6.4. Mesure d'activité de la protéine Nrf2

L'activité de Nrf2 mesurée par le nombre de motifs ARE reconnus par la protéine est un autre niveau d'analyse permettant d'étudier l'implication de la voie Nrf2/Keap1. Ces expériences ont été réalisées à partir de DC exposées à 2 sensibilisants, le DNFB et l'HCP pendant 3 h ou 6 h. Nous observons une différence d'activité entre les cellules traitées avec les sensibilisants et celles avec le véhicule (**Figure 51**). En effet, nous observons une augmentation de DO pour les DC traitées au DNFB ou HCP en comparaison de celles traitées avec une solution véhicule contenant du DMSO 0,1 %. Cette augmentation d'activité témoignait de l'implication de la voie Nrf2/Keap1 dans les DC exposées aux deux types de sensibilisants que celui-ci soit cutané ou respiratoire.



**Figure 51 : Mesure d'activité de la protéine Nrf2. Les DC sont exposées pendant 3 h au DNFB et 6 h à l'HCP.**

Les résultats sont exprimés en variation de DO qui compare la DO du traité par rapport à celle du véhicule. Les résultats sont la moyenne de deux expériences indépendantes (N=2). Différence significative d'expression entre le traité et le véhicule : \*\*p<0,01 \*p<0,05. DNFB : Dinitrofluorobenzène ; HCP : Hexachloroplatinate d'ammonium.

L'analyse de l'accumulation de la protéine Nrf2 par cytométrie, de l'expression des gènes régulés par Nrf2 et de l'activité de Nrf2 montrent que les sensibilisants, qu'ils soient cutanés ou respiratoires, activent la voie Nrf2/Keap1.

## 7. Impact de la voie MAPK p38 sur les différentes réponses des DC aux sensibilisants

Les précédents résultats ont mis en évidence une activation de différentes voies de signalisation, notamment, p38 MAPK et Nrf2/Keap1, dans les DC en réponse aux sensibilisants. Nous avons également observé une augmentation d'expression de l'*IL12p40* après exposition au DNFB et à l'HCP. De précédents travaux ont montré que ces derniers entraînaient une maturation des DC mis en évidence par l'expression de marqueurs de surface [119]. Nous avons cherché à déterminer l'influence de la MAPK p38 sur toutes les réponses observées dans les DC : surexpression des marqueurs phénotypiques, activation des voies ERK, JNK, STAT, Nrf2/Keap1 et expression du gène *IL12p40*. Pour déterminer cette interdépendance, un inhibiteur spécifique de la voie p38 MAPK, le SB203580, a été utilisé.

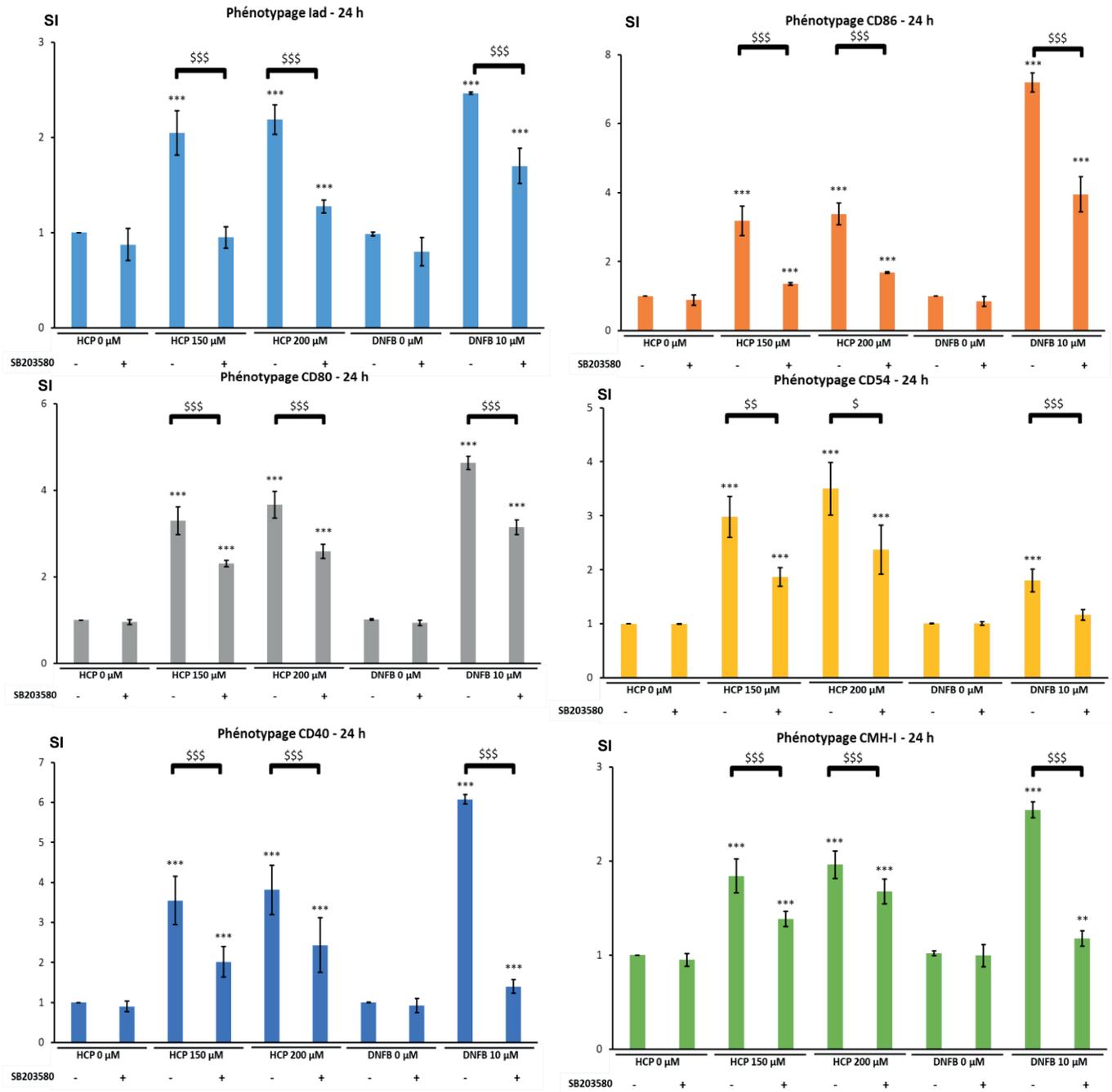
### 7.1. Impact de la voie MAPK p38 sur la maturation des DC

Pour évaluer la participation de la voie MAPK p38 sur la maturation des DC induite par les sensibilisants, nous avons mesuré l'expression des marqueurs phénotypiques qui y sont associés en présence ou en absence d'inhibiteur. Les cellules ont été exposées pendant 24 h aux deux sensibilisants de référence, le DNFB et l'HCP, avec ou sans ajout de SB203580. Un phénotypage était réalisé pour déterminer l'expression des marqueurs de surface suivants : CD80, CD86, CD40, CD54, CMH-1 et Iad (CMH-II). En parallèle la viabilité cellulaire était analysée par l'utilisation du 7-AAD et seules les expériences pour lesquelles la viabilité était supérieure à 75 % ont été analysées (données non présentées). L'exposition au DNFB ou à l'HCP entraînait une augmentation très significative de l'index de stimulation (SI correspondant au rapport RFI traité / RFI véhicule) pour tous les marqueurs étudiés (**Figure 52**). Quel que soit le marqueur, l'ajout d'inhibiteur de p38 entraînait une diminution de leur expression. Les amplitudes d'inhibition étaient différentes entre les deux produits et dépendaient du marqueur

considéré. Ainsi, pour les cellules exposées au DNFB, le SI diminuait de 71 % pour le CD86, 50 % pour le CD80 et 81 % pour le CD40.

Les cellules exposées à l'HCP voyaient l'expression du CD86 diminuer de 71 %. L'inhibition était totale pour l'Iad avec l'HCP et pour le CD54 avec le DNFB.

Une inhibition de la voie p38 MAPK entraîne une diminution de la surexpression de tous les marqueurs phénotypiques testés dans les DC exposées au DNFB et à l'HCP.



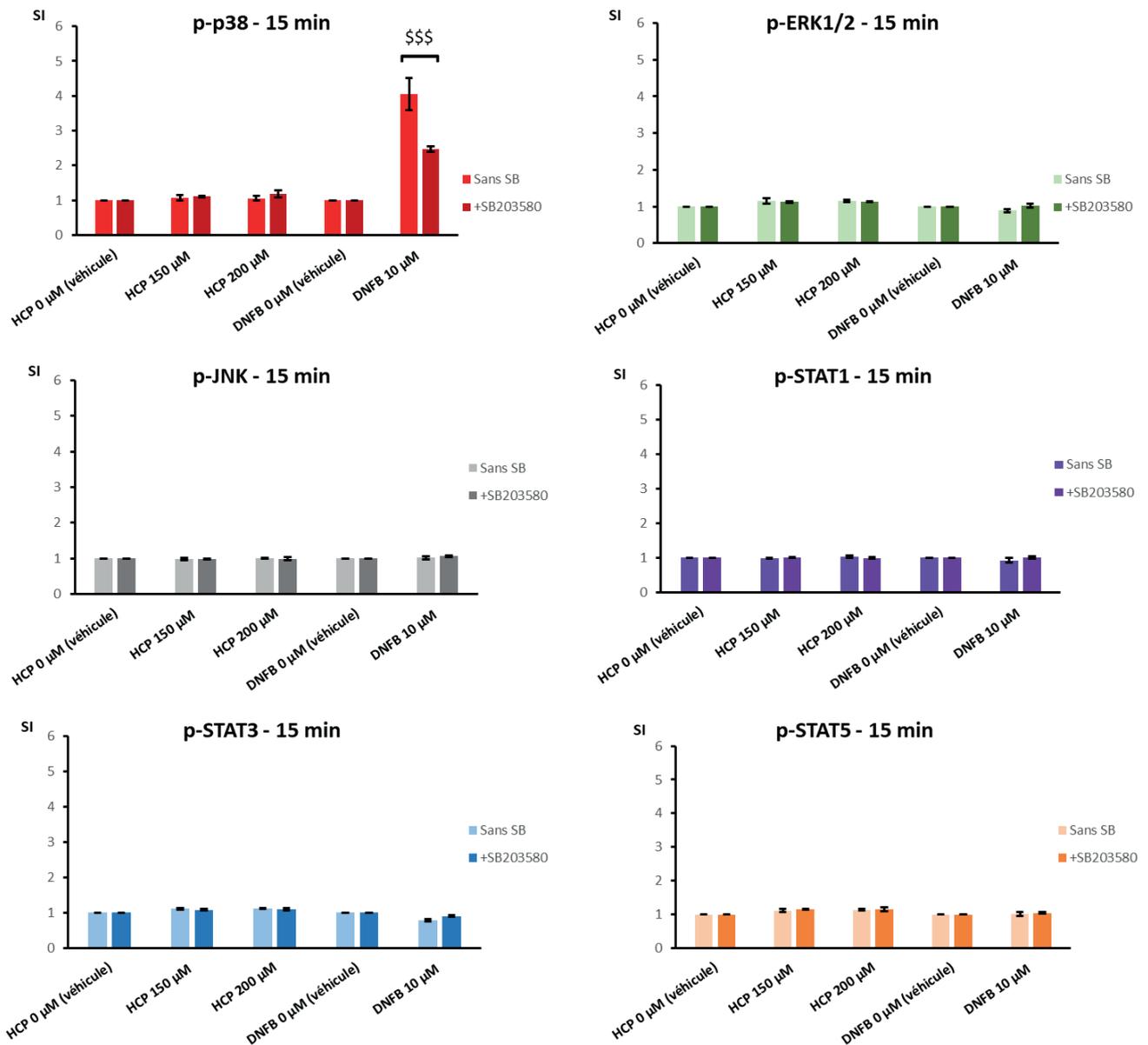
**Figure 52 : Expression des marqueurs Iad, CD86, CD80, CD54, CD40 et CMH-I pour des cellules exposées 24 h à l'HCP ou au DNFB, avec ou sans ajout de SB203580.**

Les résultats sont exprimés en *stimulation index SI* (RFI Traité / RFI Véhicule). Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes (N=3). Différence significative entre le traité et le témoin : \*\* p-value<0,01 ; \*\*\* p-value<0,001. Différence significative entre l'exposition avec inhibiteur et l'exposition sans inhibiteur pour une même concentration : \$ p-value<0,05 ; \$\$ p-value<0,01 ; \$\$\$ p-value <0,001. HCP : Hexachloroplatinate d'ammonium ; DNFB : Dinitrofluorobenzène.

## 7.2. Impact de la voie p38 sur l'activation des autres voies MAPK et STAT

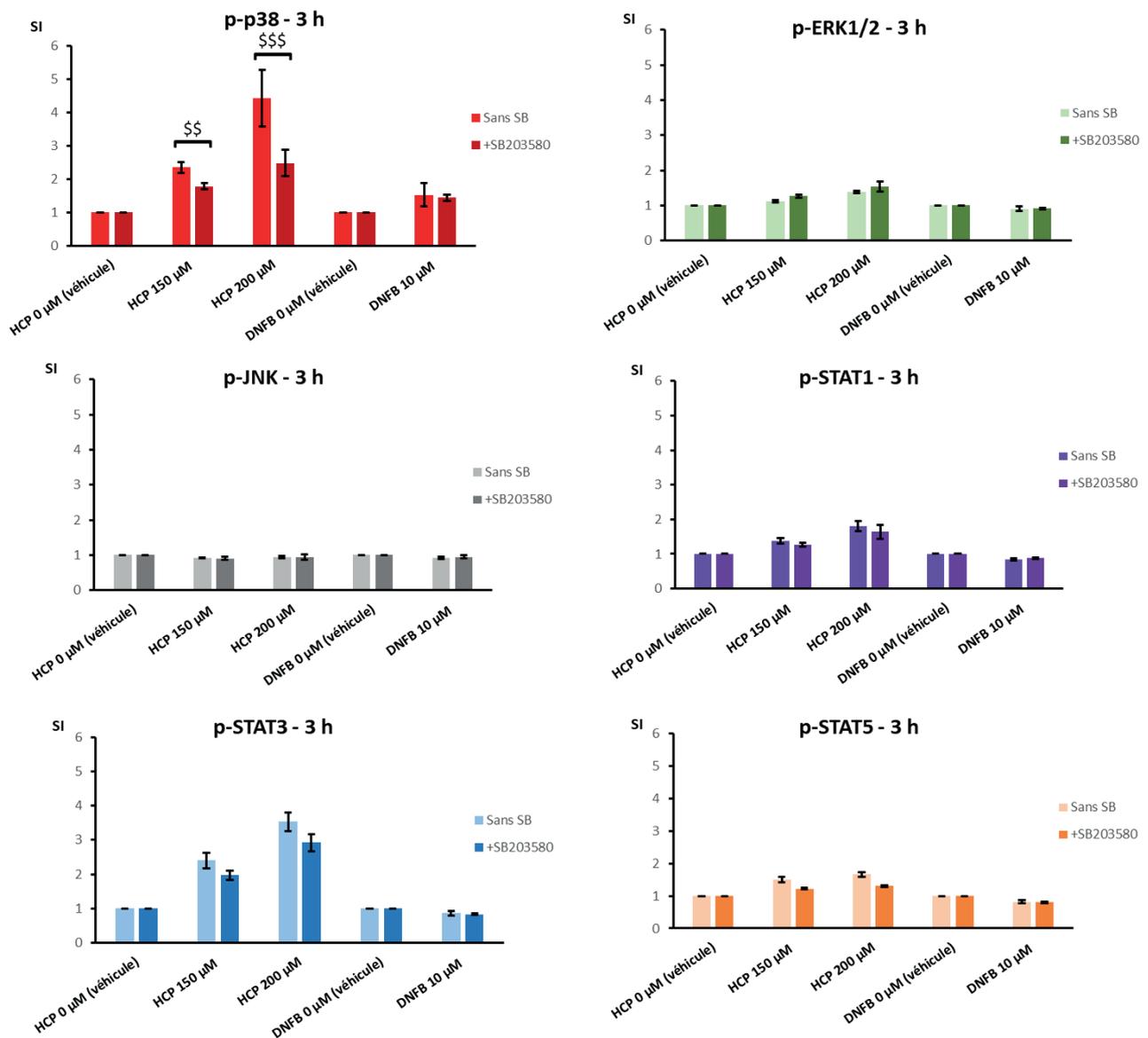
La MAPK p38 est un marqueur qui s'active pour tous les sensibilisants testés. Afin de comprendre les éventuelles interactions entre les différentes voies explorées, nous avons étudié les réponses des DC à la suite de leur exposition aux deux sensibilisants DNFB et HCP en présence d'inhibiteur SB203580. Les valeurs sont représentées en SI (**Figure 53** et **Figure 54**). L'ajout de SB203580 réduisait la phosphorylation de p38 pour les DC exposées au DNFB pendant 15 min, avec une diminution du SI (un SI de 2,5 avec l'ajout du SB203580). Une réduction de la phosphorylation de p38 était également observée pour les cellules exposées à l'HCP pendant 3 h, avec également une diminution du SI (un SI de 2,5 avec l'ajout du SB203580).

Ces résultats confirment l'action inhibitrice du SB203580 sur p38 ; dans les conditions expérimentales testées, cette inhibition n'est pas totale, puisqu'une activation de p38 reste visible. Par ailleurs, dans notre modèle, p38 n'influence aucune des autres voies testées, qu'il s'agisse des voies ERK1/2, JNK ou STAT.



**Figure 53 : Indice d'activation des protéines p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des BMDC exposées à l'HCP ou au DNFB, respectivement un sensibilisant respiratoire et un sensibilisant cutané pendant 15 min.**

Les résultats sont exprimés en *stimulation index SI* (RFI Traité / RFI Véhicule). L'indice d'activation pour chaque protéine correspond à la moyenne de 3 expériences indépendantes (N=3). Inhibition significative de l'activation de la protéine après ajout de l'inhibiteur de p38 : \$\$ p-value < 0,01 ; \$\$\$ p-value < 0,001. HCP : Hexachloroplatinate d'ammonium ; DNFB : Dinitrofluorobenzène.



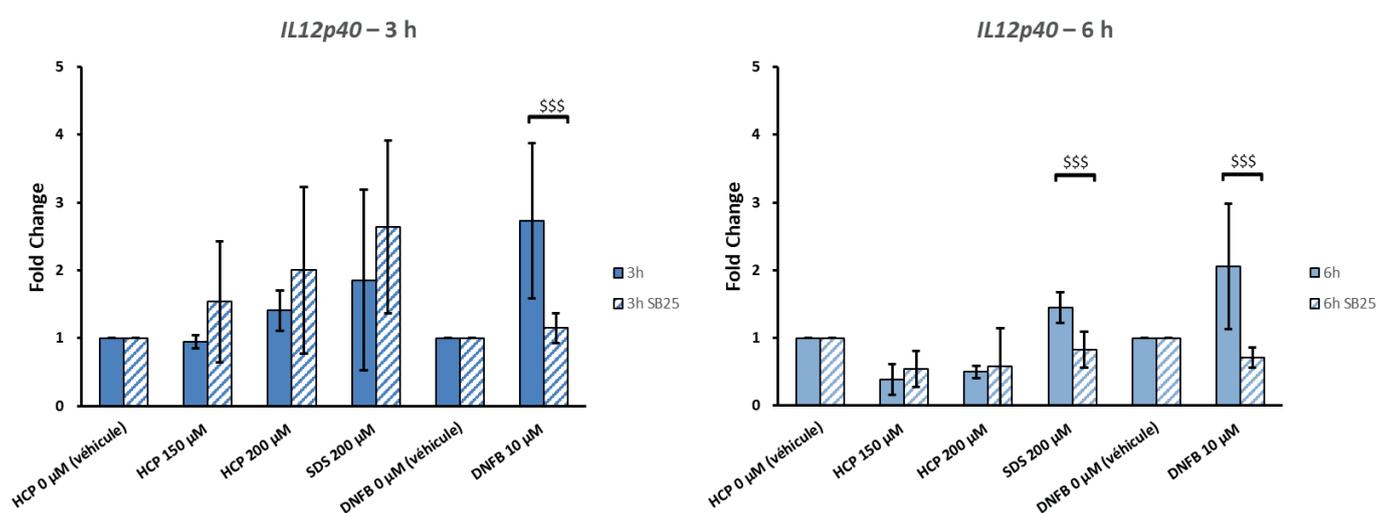
**Figure 54 : Indice d'activation des protéines p38, ERK1/2, JNK, STAT1, STAT3 et STAT5 pour des DC exposées à l'HCP ou au DNFB, respectivement un sensibilisant respiratoire et un sensibilisant cutané pendant 3 h.**

Les résultats sont exprimés en *stimulation index SI* (RFI Traité / RFI Véhicule). L'indice d'activation pour chaque protéine correspond à la moyenne de 3 expériences indépendantes (N=3). Inhibition significative de l'activation de la protéine après ajout de l'inhibiteur de p38 : \$\$ p-value < 0,01 ; \$\$\$ p-value < 0,001. HCP : Hexachloroplatinate d'ammonium ; DNFB : Dinitrofluorobenzène.

### 7.3. Impact de la voie MAPK p38 sur l'expression du gène *IL12p40*

Afin de déterminer l'influence de p38 dans la réponse cellulaire à un sensibilisant, nous avons étudié le possible lien entre l'activation de cette voie et l'augmentation d'expression de l'*IL12p40*. Pour ce faire, les expérimentations de RT-qPCR ont été réalisées après co-incubation des DC avec le sensibilisant et l'inhibiteur de p38. Les résultats obtenus avec le SB203580 montraient un effet sur la surexpression de l'*IL12p40* pour les cellules exposées au DNFB (**Figure 55**). Cette inhibition de surexpression était complète pour les deux durées d'exposition. Un effet inhibiteur pour les cellules exposées au SDS pendant 6 h a également été constaté.

L'inhibition de la voie p38 MAPK a un effet uniquement dans les DC exposées au sensibilisant cutané DNFB ou à l'irritant SDS.



**Figure 55 : Expression du gène *IL12p40* dans des DC exposées pendant 3 h ou 6 h au DNFB, à l'HCP et au SDS avec une inhibition ou non de la voie p38.**

Les résultats sont la moyenne de 3 expériences indépendantes en triplicats (N=3 ; n=3) avec l'écart-type de la moyenne. Les rectangles hachurés correspondent à une condition avec ajout du SB203580 à 25 µM (SB25). Inhibition significative de l'expression du gène après ajout de l'inhibiteur : \$\$ p-value<0,01 ; \$\$\$ p-value <0,001. HCP : Hexachloroplatinate d'ammonium ; DNFB : Dinitrofluorobenzène.

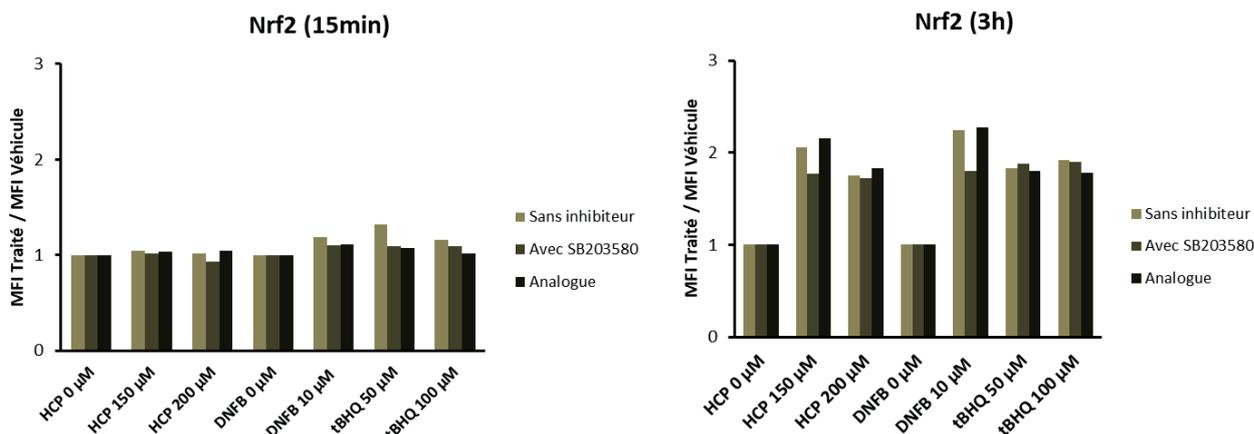
#### 7.4. Relation entre les voies MAPK p38 et Nrf2/Keap1

Afin de comprendre le rôle de p38 dans l'activation de la voie Nrf2/Keap1, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de p38 sur l'accumulation de la protéine Nrf2, sur l'expression des gènes régulés par celle-ci et sur l'activité de la protéine Nrf2.

##### 7.4.1. Influence de la MAPK p38 sur l'accumulation de la protéine Nrf2

L'accumulation de Nrf2 a été étudiée pour une exposition des DC de 15 min ou 3 h au sensibilisant respiratoire HCP, au sensibilisant cutané DNFB ou à un activateur de Nrf2, le tBHQ. Afin de confirmer l'effet inhibiteur du SB203580, un analogue structural inactif de cet inhibiteur a également été utilisé, le SB202474. L'ajout de SB203580 entraînait une diminution de l'accumulation de Nrf2 pour les DC exposées à l'HCP (150  $\mu$ M) et au DNFB pendant 3 h (**Figure 56**). L'inhibiteur n'avait cependant aucun effet pour les DC traitées au tBHQ.

Il semblerait que l'inhibition de la voie p38 limite l'accumulation de la protéine Nrf2 dans les DC exposées aux sensibilisants HCP ou DNFB. Néanmoins, l'absence d'analyse statistique ne nous permet pas de confirmer cet effet avec certitude.



**Figure 56 : Effet de l'inhibition de p38 sur l'accumulation de Nrf2. Les DC ont été exposées au DNFB, à l'HCP et au tBHQ pendant 15 min ou 3 h.**

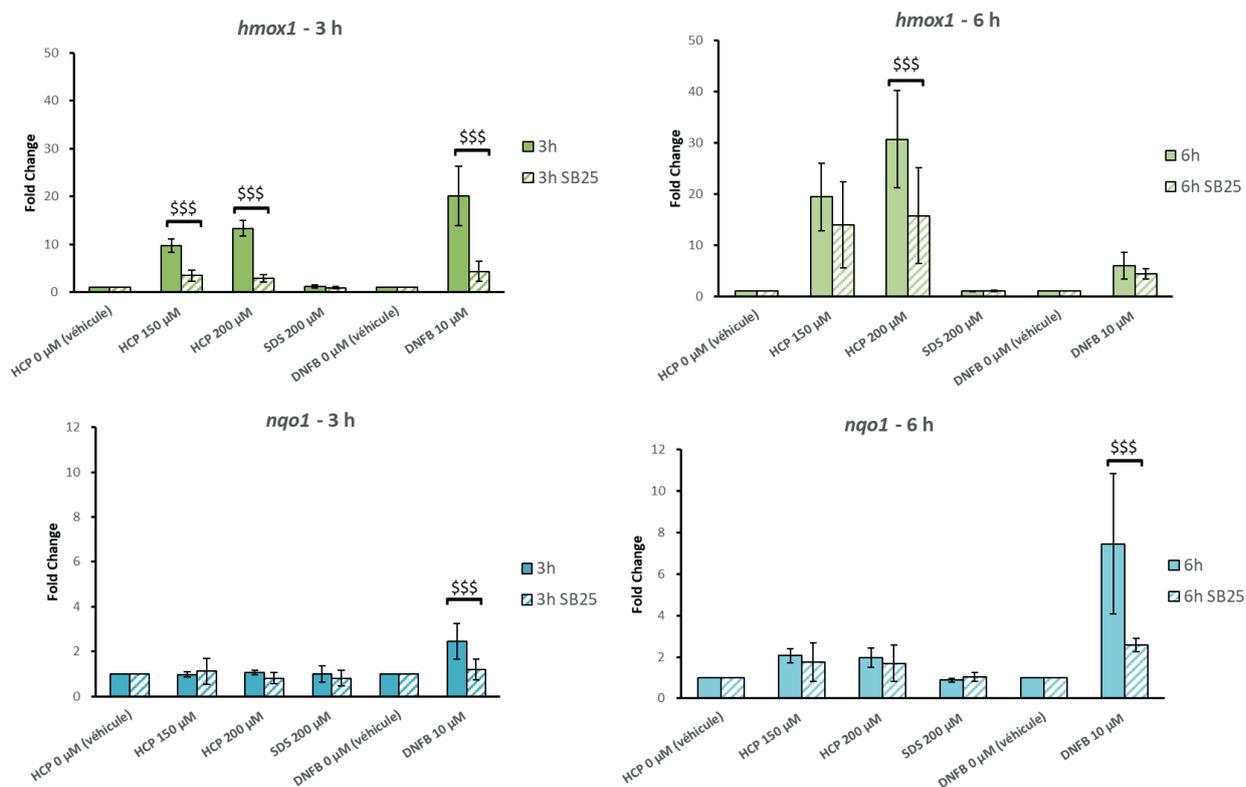
Au préalable, les DC ont été exposées ou non au SB203580 ou au SB202474. Les données montrées, exprimées en *stimulation index SI* (RFI Traité / RFI véhicule), sont celles obtenues après une seule expérience (N=1). Aucune analyse statistique n'a donc été réalisée. HCP : Hexachloroplatinate d'ammonium ; DNFB : Dinitrofluorobenzène ; tBHQ : *tert*-butylhydroquinone.

#### 7.4.2. Influence de p38 sur l'expression des gènes régulés par Nrf2

##### a. Test de sensibilisants de référence : DNFB et HCP

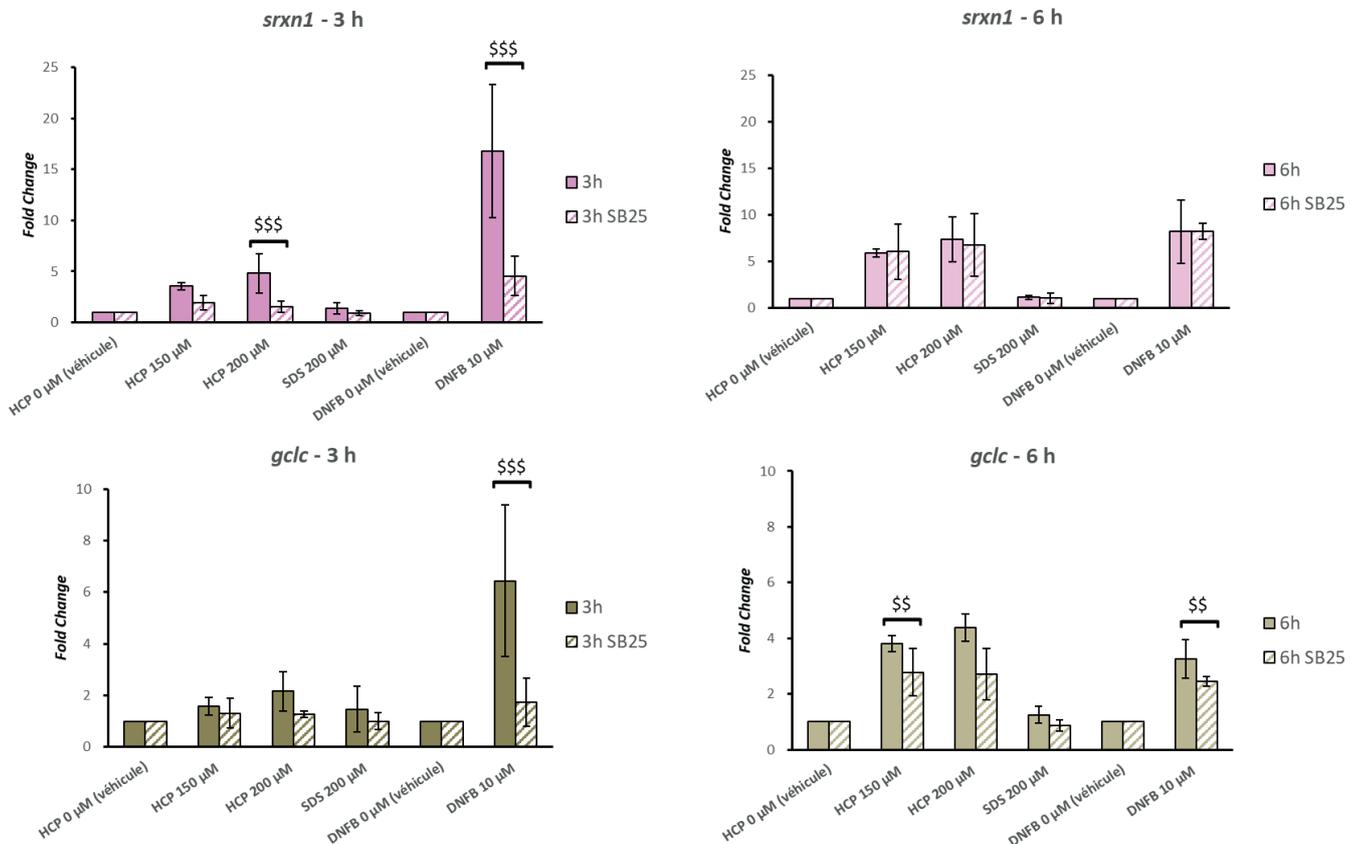
Afin de caractériser par un autre niveau d'analyse une éventuelle influence de la voie MAPK p38 sur l'activation de la voie Nrf2/Keap1, l'expression des gènes régulés par Nrf2 a été étudiée dans des DC exposées au DNFB ou à l'HCP en présence de SB203580 (**Figure 57** et **Figure 58**). Les premiers résultats montraient que cet inhibiteur entraînait une diminution significative de la surexpression de *hmox1* (3 h), *nqo1* (6 h), *srxn1* et *gclc* (6 h) pour les DC exposées au DNFB. Concernant l'exposition au sensibilisant respiratoire, l'HCP, nous observons également une inhibition significative de l'expression de 3 des 4 gènes étudiés, au moins pour une durée d'exposition et une concentration de sensibilisant. L'utilisation du SB203580 n'avait eu aucun effet sur l'expression des gènes étudiés pour les DC exposées au

SDS. Ces résultats montrent que l'inhibition de la voie p38 influence l'expression des gènes régulés par Nrf2 pour les DC exposées aux deux sensibilisants testés.



**Figure 57 : Expression des gènes *hmx1* et *nqo1* après exposition pendant 3 h ou 6 h au DNFB, à l'HCP ou au SDS avec ou sans ajout de SB203580.**

Les résultats sont exprimés en *fold change* ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ) correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes en triplicats (N=3 ; n=3) +/- l'écart-type par rapport à la moyenne. Chaque partie hachurée correspond à une condition avec ajout du SB203580 à 25  $\mu$ M (SB25). Inhibition significative de l'expression du gène après ajout de l'inhibiteur : \$\$ p-value < 0,01 ; \$\$\$ p-value < 0,001. HCP : Hexachloroplatinate d'ammonium ; DNFB : Dinitrofluorobenzène ; SDS : Sodium dodécyl sulfate.



**Figure 58 : Expression des gènes *srxn1* et *gclc* après exposition pendant 3 h ou 6 h au DNFB, à l'HCP ou au SDS avec ou sans ajout de SB203580.**

Les résultats sont exprimés en *fold change* ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ) correspondant à la moyenne de 3 expériences indépendantes en triplicats (N=3 ; n=3) +/- l'écart-type par rapport à la moyenne. Chaque graphique hachuré correspond à une condition avec ajout du SB203580 à 25  $\mu\text{M}$  (SB25). Inhibition significative de l'expression du gène après ajout de l'inhibiteur : \$\$ p-value < 0,01 ; \$\$\$ p-value < 0,001. HCP : Hexachloroplatinate d'ammonium ; DNFB : Dinitrofluorobenzène ; SDS : Sodium dodécyl sulfate.

b. Tests d'autres sensibilisants : résultats obtenus pour *hmox1* et *srxn1*

Les analyses d'expression de gènes précédemment décrites mettaient en évidence que *hmox1* et *srxn1* sont des gènes dont la surexpression après exposition au DNFB et à l'HCP était influencée par l'activation de p38. Un panel plus large de sensibilisants a été testé et l'impact de p38 MAPK sur l'expression de ces deux gènes a été vérifié. Il comprenait les sensibilisants cutanés cinnamaldéhyde (Cinn), naphtol (Nap), formaldéhyde (FOR), isoeugénol (IsoE) et les sensibilisants respiratoires chloramine T (ChT) et ATCP. Nous avons également testé des non-sensibilisants, l'HHP, le TPCH et le MSA. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous (**Tableau XX**).

Contrairement aux non-sensibilisants, les sensibilisants testés entraînaient une surexpression de *hmox1* et *srxn1*, qu'ils soient cutanés ou respiratoires. Néanmoins, nous avons observé pour certains sensibilisants testés un « effet dose inversé ». Par exemple, les DC exposées au cinnamaldéhyde pendant 3 h montraient une diminution de la surexpression de *hmox1* avec des concentrations croissantes subtoxiques. Également, les DC exposées au formaldéhyde pendant 6 h montraient une surexpression de *srxn1* avec un effet « cloche » où cette surexpression augmentait aux concentrations 250 µM et 350 µM (*fold change* respectivement de 4,7 et 22,4) puis diminuait à la concentration 500 µM (*fold change* de 13,9).

Comme dit précédemment, l'impact de p38 sur l'expression des gènes *hmox1* et *srxn1* a été analysé. L'ajout du SB203580 diminuait la surexpression des gènes *hmox1* ou/et *srxn1* pour les DC exposées :

- au Cinn : diminution de la surexpression de *hmox1* (3 h et 6 h) et *srxn1* (3 h et 6 h)
- au Nap : diminution de la surexpression de *hmox1* (3 h et 6 h) et *srxn1* (3 h et 6 h)
- au FOR : diminution de la surexpression de *hmox1* (6 h) et *srxn1* (3 h et 6 h)
- à l'IsoE : diminution de la surexpression de *hmox1* (3 h et 6 h) et *srxn1* (3 h et 6 h)
- à la ChT : diminution de la surexpression de *hmox1* (3 h et 6 h) et *srxn1* (3 h et 6 h)
- à l'ATCP : diminution de la surexpression de *hmox1* (3 h et 6 h).

Tableau XX : Effet de l'inhibiteur de la voie MAPK p38 sur l'expression des gènes *hmx1* et *srxn1* dans des DC exposées à des sensibilisants cutanés, respiratoires et à des non-sensibilisants.

				<i>hmx1</i> (fold change)		<i>srxn1</i> (fold change)	
			Ajout inhibiteur	3 h	6 h	3 h	6 h
Sensibilisants cutanés	Cinn	100 µM	∅	82,4 ± 8,3***	69,8 ± 6,3***	30,7 ± 4,0***	28,1 ± 10,0***
			+ SB	27,4 ± 17,7***	46,3 ± 16,1***	8,2 ± 5,5*	22,6 ± 7,5***
		200 µM	∅	49,9 ± 28,2***	72,0 ± 68,0***	16,6 ± 9,5**	35,8 ± 36,5***
			+ SB	12,4 ± 15,9***	26,0 ± 21,5***	3,7 ± 0,6	16,6 ± 12,1**
		400 µM	∅	1,8 ± 0,9	3,3 ± 3,1	1,8 ± 0,6	3,6 ± 0,6
			+ SB	1,2 ± 1,0	1,1 ± 0,5	1,0 ± 0,7	2,1 ± 0,2
	Nap	300 µM	∅	1,8 ± 0,6	4,8 ± 1,7*	4,6 ± 1,4*	8,1 ± 3,9*
			+ SB	0,5 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,6 ± 0,5	3,2 ± 1,2
		600 µM	∅	4,6 ± 2,2*	29,8 ± 10,8***	10,7 ± 2,8**	29,9 ± 4,5***
			+ SB	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,3	3,8 ± 1,0
		750 µM	∅	3,4 ± 1,9*	23,2 ± 10,0***	10,2 ± 8,1**	39,4 ± 7,6***
			+ SB	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,0	2,4 ± 1,3	2,6 ± 1,0
	FOR	250 µM	∅	2,3 ± 0,0	2,0 ± 0,8	6,6 ± 1,0*	4,7 ± 2,5*
			+ SB	1,9 ± 1,2	2,0 ± 0,2	3,0 ± 1,5	6,5 ± 2,3*
		350 µM	∅	3,8 ± 0,5	4,6 ± 1,3*	6,6 ± 1,2*	22,4 ± 10,7***
			+ SB	1,9 ± 0,5	2,3 ± 0,2	2,8 ± 0,3	8,2 ± 2,7*
		500 µM	∅	2,1 ± 0,7	10,1 ± 1,8**	2,3 ± 0,2	13,9 ± 2,3**
			+ SB	1,4 ± 0,1	2,5 ± 0,4	1,9 ± 0,7	4,3 ± 0,8
	IsoE	250 µM	∅	1,4 ± 0,2	2,3 ± 0,6	2,8 ± 0,0	3,3 ± 0,8
			+ SB	1,1 ± 0,3	1,3 ± 0,5	1,9 ± 0,2	2,8 ± 1,6
		500 µM	∅	2,1 ± 0,8	4,4 ± 1,4*	6,0 ± 1,3*	8,8 ± 1,4*
			+ SB	0,7 ± 0,1	1,5 ± 0,5	2,3 ± 0,3	5,4 ± 2,7
		1000 µM	∅	5,6 ± 3,0*	24,3 ± 6,9***	15,5 ± 6,9**	54,2 ± 19,2
			+ SB	0,3 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,9 ± 0,2	6,5 ± 1,9

Sensibilisants respiratoires	ChT	750 $\mu$ M	$\emptyset$	24,7 $\pm$ 6,5***	21,4 $\pm$ 1,1**	6,1 $\pm$ 2,1*	12,3 $\pm$ 1,4*
			+ SB	10,8 $\pm$ 2,3**	12,8 $\pm$ 4,0***	3,7 $\pm$ 1,0	9,0 $\pm$ 2,3**
		1000 $\mu$ M	$\emptyset$	29,3 $\pm$ 5,7***	29,4 $\pm$ 3,8***	6,7 $\pm$ 1,5*	19,9 $\pm$ 1,4***
			+ SB	9,5 $\pm$ 3,0*	20,1 $\pm$ 2,0***	3,2 $\pm$ 0,6	13,8 $\pm$ 1,0**
		1200 $\mu$ M	$\emptyset$	20,6 $\pm$ 7,8**	41,1 $\pm$ 2,4***	5,0 $\pm$ 1,8*	26,2 $\pm$ 1,9***
			+ SB	5,9 $\pm$ 2,4*	18,9 $\pm$ 3,9***	2,5 $\pm$ 0,8	13,3 $\pm$ 2,3**
	ATCP	100 $\mu$ M	$\emptyset$	2,3 $\pm$ 1,0	5,0 $\pm$ 3,1*	1,7 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 1,2
			+ SB	1,4 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,7	1,2 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,2
		150 $\mu$ M	$\emptyset$	4,1 $\pm$ 0,9*	8,1 $\pm$ 2,5*	2,3 $\pm$ 0,6	2,9 $\pm$ 1,0
			+ SB	1,8 $\pm$ 0,4	3,6 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,3
		200 $\mu$ M	$\emptyset$	5,1 $\pm$ 2,1*	11,8 $\pm$ 2,1**	2,6 $\pm$ 1,0	3,4 $\pm$ 1,1
			+ SB	2,1 $\pm$ 0,4	4,1 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,5

Non sensibilisants	HHP	200 $\mu$ M	$\emptyset$	1,0 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,6
	TPCH	400 $\mu$ M	$\emptyset$	0,8 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,3
	MSA	1000 $\mu$ M	$\emptyset$	1,2 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,2

Les résultats sont exprimés en *fold change* ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ) correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes en triplicats (N=3 ; n=3) +/- l'écart-type par rapport à la moyenne. Pour les sensibilisants cutanés et respiratoires, l'effet de l'inhibition de la voie p38 sur l'expression est indiqué (+SB). Différence significative entre le traité et le véhicule : \*\*\* p-value<0,001 ; \*\*p-value<0,01 ; \*p-value<0,05.  $\emptyset$  : pas d'ajout d'inhibiteur ; +SB : ajout de SB203580 à 25  $\mu$ M. Cinn : Cinnamaldéhyde ; Nap : Naphtol ; FOR : Formaldéhyde ; IsoE : Isoeugénol ; Ch T : Chloramine T ; ATCP : Tétrachloroplatinate d'ammonium ; HHP : Hydrogen hexahydroxyplatinate ; TPCH : Tetraamineplatinum(II) chloride hydrate ; MSA : Méthyl Salicylate.

L'analyse de l'expression des gènes régulés par Nrf2 montrent que les sensibilisants surexpriment *hmx1* et *srxn1* dans les DC. Cette surexpression est diminuée en présence de l'inhibiteur de la MAPK p38, ce qui indique que celle-ci module au moins en partie le rôle du facteur de transcription Nrf2.

### 7.5. Impact de la voie MAPK p38 sur l'activité de la protéine Nrf2

Une mesure d'activité a été réalisée sur des DC exposées à notre panel de sensibilisants : le DNFB, l'HCP, l'IsoE, le Nap et le FOR avec ou sans inhibiteur de MAPK p38, le SB203580 (Figure 59).

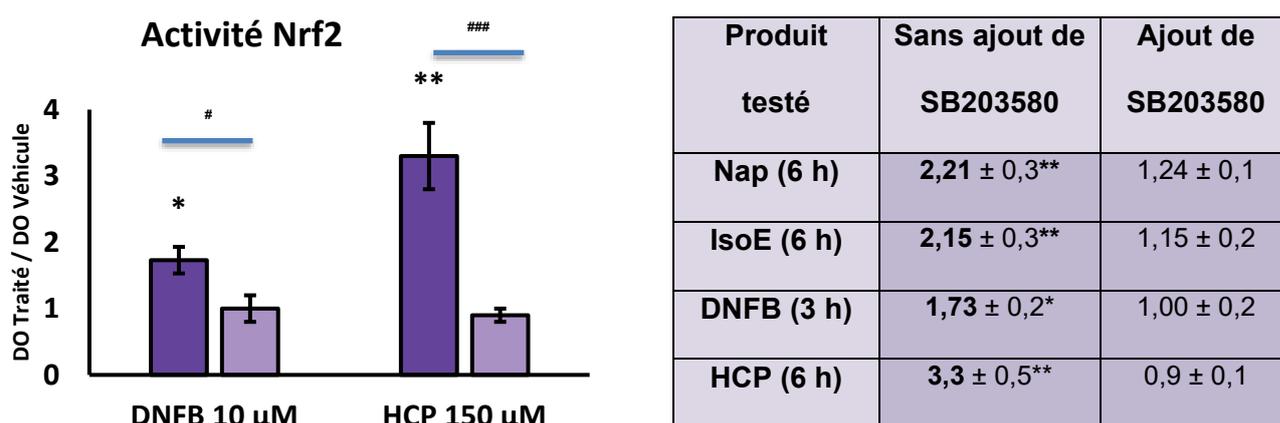


Figure 59 : Influence de p38 sur l'activité de la protéine Nrf2.

Les DC sont exposées pendant 3 h ou 6 h au DNFB et à l'HCP en présence ou non de SB203580. En complément, un tableau récapitule les résultats obtenus avec tous les produits testés. Le SB203580, un inhibiteur de p38, est utilisé 1 h avant l'exposition au produit. Les histogrammes violet foncé correspondent à la condition sans inhibiteur et les histogrammes violet clair correspondent à la condition avec inhibiteur. Les résultats sont exprimés en variation de DO qui compare la DO du traité par rapport à celle du véhicule. Pour chaque produit est indiqué la moyenne des rapports traité / témoin de 3 expériences indépendantes (N=3). Différence significative entre le traité et le véhicule : \*p-value<0,05 ; \*\*p-value<0,01. Effet inhibiteur du SB203580 pour une même concentration : #p-value<0,05 ; ###p-value<0,001. Nap : Naphtol ; IsoE : Isoeugéol ; DNFB : Dinitrofluorobenzène ; HCP : Hexachloroplatinate d'ammonium.

Les mesures d'activité indiquaient une augmentation significative de l'activité Nrf2 pour les DC exposées à tous les sensibilisants testés. La durée optimale pour observer le maximum d'augmentation d'activité n'était pas la même selon le sensibilisant testé. En effet, certains produits comme le DNFB répondaient mieux à 3 h tandis que d'autres comme l'HCP, l'IsoE et le Nap répondaient mieux à 6 h. En revanche, l'ajout de SB203580 réduisait toujours et parfois totalement cette augmentation d'activité pour tous les sensibilisants testés.

Ces derniers résultats sont en accord avec ceux obtenus après la mesure d'accumulation de la protéine Nrf2, et ceux relatifs à la surexpression des gènes dépendant de ce facteur. Ils confirment l'implication de la voie p38 MAPK dans l'activation de Nrf2/Keap1 induite par les sensibilisants, respiratoires ou cutanés dans notre modèle cellulaire de DC.

## Discussion

L'hypersensibilité allergique a un véritable impact sur la santé des travailleurs. Les substances responsables de ces pathologies sont appelées « sensibilisants » et peuvent être de nature protéique ou chimique. Afin d'éviter l'apparition d'allergies professionnelles, il faut limiter l'exposition à ces agents, et pour ce faire, il est nécessaire de les identifier. Depuis 2007, le règlement REACH aspire à une meilleure connaissance des effets des substances chimiques sur la santé humaine et sur l'environnement pour une gestion plus efficace des risques liés à l'utilisation de ces produits (Source : ANSES). Entré en vigueur en 2009, le règlement CLP est une réponse aux attentes de REACH dans le sens où il impose l'évaluation des dangers de tout produit chimique pour en informer l'utilisateur à travers l'étiquetage (Source : ECHA).

Depuis la directive européenne de 2010 relative à l'expérimentation animale et son application en France, en 2013, les laboratoires de recherche doivent s'engager à limiter l'expérimentation animale lorsque cela est possible.

En 2017, l'annexe VII du règlement CE n°1907/2006 sur la sensibilisation cutanée indique que les expériences *in vitro* et *in chemico* doivent être réalisées en première intention. Dans le cas de la sensibilisation cutanée, le modèle *in vivo* n'est donc plus une démarche à effectuer d'emblée. D'une façon générale, toutes les directives ou tous les règlements conditionnent la façon dont on doit élaborer un test et montrent à quel point l'évaluation du danger reste un enjeu majeur. Ces évolutions s'imposent à nous et, comme évoqué dans la partie « introduction », il existe déjà différents modèles pouvant se substituer à l'approche *in vivo* pour évaluer le potentiel sensibilisant cutané.

Les différents événements clés conduisant à une sensibilisation cutanée font l'objet d'un AOP qui fait consensus. Très récemment, les lignes directrices n°497 de l'OCDE décrivent l'approche définie pour évaluer le potentiel sensibilisant cutané [121]. Cette démarche intègre l'utilisation de plusieurs modèles qui couvrent différents événements clés de l'AOP, l'objectif

étant d'améliorer l'exactitude de l'évaluation de la sensibilisation cutanée. Parmi ces événements clés, l'activation des DC joue un rôle majeur dans la mise en place de cette sensibilisation.

Contrairement à la sensibilisation cutanée, il n'existe pas encore d'AOP validé pour la sensibilisation respiratoire ; celui-ci est actuellement en cours de construction (AOP 39) [133].

Si on se réfère à l'historique de mise à jour de cet AOP, force est de constater qu'il n'est pas souvent enrichi ; peut-être en raison du manque de données mécanistiques ou cliniques.

Malgré le manque d'informations notoire relatif à l'AOP 39, il est bien établi que, comme pour la sensibilisation cutanée, les DC jouent un rôle crucial dans le mécanisme conduisant à l'hypersensibilité respiratoire.

Dans ce contexte, l'INRS a développé un modèle *in vitro* basé sur des DC de souris, appelées BMDC. Initialement, ce modèle était destiné à mesurer différents marqueurs de surface cellulaire, exprimés lors de la maturation des DC. Sur cette simple base, il n'est pas en mesure de discriminer un sensibilisant cutané d'un sensibilisant respiratoire [119].

Les DC jouent un rôle pivot par leur capacité à polariser les lymphocytes T naïfs vers une réponse Th1 ou Th2, respectivement associée à la sensibilisation cutanée et à la sensibilisation respiratoire. Il existe donc des mécanismes intracellulaires induits par l'exposition des DC aux sensibilisants qui sont propres à cette polarisation et qui pourraient nous permettre de distinguer les mécanismes inhérents à la sensibilisation cutanée de ceux inhérents à la sensibilisation respiratoire.

Compte tenu de ce constat, la thèse avait pour objectif d'étudier dans les DC, l'activation des voies de signalisation en réponse à des sensibilisants de nature différente : cutanée et respiratoire. Après avoir caractérisé les DC, un premier axe de recherche comprenait l'étude des mécanismes intracellulaires, en particulier ceux des voies MAPK et STAT. Un deuxième axe de recherche s'était focalisé sur l'étude d'une voie d'intérêt dans la sensibilisation : la voie Nrf2/Keap1. Enfin, un dernier axe d'étude a découlé des deux premiers, pour comprendre le lien entre la voie p38 MAPK et la voie Nrf2/Keap1.

**Quelles sont les caractéristiques des DC utilisées pour évaluer le potentiel sensibilisant ?**

Les cellules de notre modèle ont été caractérisées afin de mieux connaître le type de DC que nous utilisons pour évaluer le potentiel sensibilisant. Les résultats décrits précédemment montraient que, avec nos conditions de culture, la majorité des cellules dérivées de la moelle de souris étaient des DC de type conventionnel (cDC) ; nous ne retrouvons aucune DC plasmacytoïde (pDC). Cette absence peut être expliquée par l'utilisation du GM-CSF dans notre milieu de culture, connu pour réprimer la différenciation du progéniteur de la DC en pDC [132]. Concernant les cDC, ils sont décrits comme ayant une forte compétence pour présenter l'antigène aux lymphocytes T [134]. Cette caractérisation des cellules de notre modèle renforce les résultats précédemment obtenus dans l'équipe, montrant la fonctionnalité des DC activées à induire la prolifération et la différenciation des lymphocytes T [135]. Ainsi, ces résultats permettent de montrer que l'utilisation des BMDC est pertinente pour étudier les mécanismes de la sensibilisation.

Nous avons pu par la suite étudier notre premier axe de recherche qui était l'analyse des voies MAPK et STAT. Dans le cadre de ce premier axe, nous nous sommes interrogés sur la problématique ci-dessous.

**Quelles sont les voies intracellulaires activées par les sensibilisants cutanés ou respiratoires ?**

Afin d'identifier les voies pertinentes à analyser, une étape de criblage par *proteome array* a été réalisée avec deux sensibilisants de référence, le DNFB, un sensibilisant cutané, et l'HCP, un sensibilisant respiratoire. Ce criblage a mis en évidence que les voies MAPK et STAT seraient intéressantes à étudier. C'est donc vers ces voies que ce sont portées nos premières

expérimentations. Nous avons testé un panel de produits comprenant 5 sensibilisants cutanés, 4 sensibilisants respiratoires et 4 non-sensibilisants.

Les résultats obtenus sur les facteurs de transcription STAT ont montré une activation des STAT1, STAT3 et STAT5 uniquement pour les DC exposées aux deux sensibilisants respiratoires de la famille des sels de platine : HCP et ATCP. Or, la littérature indique que le facteur de transcription STAT1 est impliqué dans la maturation des DC [136]. Les facteurs de transcription STAT3 et STAT5 sont, quant à eux, impliqués dans la mise en place de la réponse Th2 [80, 81]. Bien que l'AOP de la sensibilisation respiratoire décrite précédemment ne soit pas validé, il est admis que les sensibilisants respiratoires induisent une réponse immunitaire de type Th2. Il est donc raisonnable de penser que l'activation des STAT3 et STAT5 soit une signature de la polarisation Th2 dans notre modèle de DC. En revanche, nous n'avons observé aucune activation des STAT en réponse à l'isocyanate TMI, qui est pourtant un sensibilisant respiratoire. Dans nos conditions expérimentales, les STAT ne sont donc pas obligatoirement activées par un sensibilisant respiratoire. L'activation de ces voies ne peut donc pas constituer un marqueur nécessaire pour qualifier un produit de sensibilisant respiratoire.

Concernant les sensibilisants cutanés testés, seule l'activation de STAT1 a été observée et ce, uniquement pour les DC exposées au naphthol. Il n'y a pas d'activation des STAT3 et STAT5 en réponse à aucun des sensibilisants cutanés testés. La polarisation Th1, associée à la réponse à cette classe de sensibilisant, pourrait expliquer l'absence d'activation de ces marqueurs qui sont plutôt spécifiques de la réponse Th2. La mesure d'activation des STAT n'est donc pas suffisante, à elle seule, pour discriminer un sensibilisant cutané d'un sensibilisant respiratoire. À ce stade, il n'est pas encore possible d'affirmer ou non que les marqueurs STAT pourraient contribuer à cette discrimination. D'autres produits, en particulier des sensibilisants respiratoires, nécessiteraient d'être testés afin de confirmer ou d'infirmer cette possibilité.

L'analyse par cytométrie des signalisations MAPK n'a pas révélé d'activation des voies ERK1/2 et JNK avec aucun des sensibilisants testés avec notre modèle. Les données de la

littérature sont hétérogènes concernant ces deux voies dont l'activation semble dépendre à la fois du sensibilisant et du modèle cellulaire. Ainsi, les travaux d'Arrighi *et al.* montrent que le DNFB active faiblement ERK1/2 mais pas JNK dans des cellules dendritiques dérivées de monocyte humains [119]. Par contre, lorsque ce même type cellulaire est exposé au DNCB, un analogue du DNFB, la voie JNK est activée contrairement à ERK1/2 [71]. De la même manière, Ferreira *et al.* n'ont pas observé d'activation de la voie ERK1/2 contrairement à p38 et JNK, dans des cellules d'une lignée humaine (THP-1) exposées au DNFB [71, 137]. Au contraire, sur un modèle de DC dérivées de la peau de souris, Matos *et al.* ont montré que le DNFB induit une activation de ERK1/2 et de JNK [138]. Au regard de ces dernières études, Trompezinski *et al.* qui, dans un modèle de DC humaines, montrent une activation de JNK mais non de ERK1/2, avancent que l'implication de la voie ERK en réponse au DNFB serait différente entre les DC murines et humaines [139]. Nos résultats, comme ceux publiés par Arrighi *et al.*, infirment cette hypothèse [119]. L'espèce dont sont issus les modèles cellulaires n'est pas le paramètre expliquant la divergence des résultats. En effet, outre le type de DC utilisé, le sensibilisant testé conditionne également la réponse des voies MAPK ERK1/2 et JNK. Ainsi, si le DNCB ou le thimerosal, un autre sensibilisant cutané, n'induisent pas de réponse de ERK1/2, les sels de nickel, également sensibilisants cutanés, activent cette voie ainsi que JNK dans des DC humaines [71]. Ces données bibliographiques appuient notre conclusion statuant que, dans notre modèle, ERK et JNK ne constituent pas des marqueurs intéressants pour évaluer le potentiel sensibilisant et *a fortiori* pour discriminer sensibilisant cutané de sensibilisant respiratoire.

Concernant p38, nos résultats montrent que cette voie MAPK est activée par tous les sensibilisants testés, qu'ils soient cutanés ou respiratoires. Les données obtenues avec le DNFB sont en accord avec celles observées dans un modèle de DC murines dérivées de la peau [128, 138] ou encore celles obtenues dans la lignée humaine THP-1 [130][140]. Comme décrit par ailleurs, nous mesurons une phosphorylation de p38 qui dépend de la concentration des sensibilisants testés, ce qui renforce l'intérêt de ce marqueur pour caractériser ces produits [71, 119, 131]. Nous observons également une activation de p38 dans les DC

exposées au sensibilisant respiratoire HCP, précédemment observée dans la lignée THP-1 [140]. Au contraire, l'exposition au non-sensibilisant SDS n'entraîne pas d'activation de p38, contrairement aux résultats obtenus par Mizuashi *et al.* sur des DC humaines dérivées de monocyte [141]. Le SDS est un produit connu comme étant un faux positif dans le test LLNA réalisé sur la souris, certainement du fait de ses propriétés irritantes. Sa non-positivité en ce qui concerne les marqueurs étudiés au cours de cette thèse, en dépit de l'origine murine de notre modèle cellulaire, est prometteur sur les performances de notre test quant à sa capacité à discriminer les sensibilisants cutanés ou respiratoires des irritants.

Si les résultats relatifs à l'activation des voies n'ont pas permis de distinguer les sensibilisants cutanés des sensibilisants respiratoires, les résultats obtenus sur p38 ont mis en lumière l'importance de la cinétique d'activation de cette voie en fonction de la nature des sensibilisants. En effet, nous avons remarqué que l'amplitude d'activation de p38 variait en fonction de la durée d'exposition testée. Par exemple, pour le sensibilisant cutané DNFB, l'activation de p38 est dite « précoce » car elle survient dès les premières minutes tandis que pour les sensibilisants respiratoires, elle est dite « retardée » car elle est détectée après plusieurs heures d'exposition. Nous aborderons plus en profondeur le sujet de la cinétique de p38 dans un paragraphe ultérieur.

### **Est-ce que la voie p38 intervient dans la maturation et dans l'expression d'*IL12p40* dans les DC en réponse aux sensibilisants ?**

L'analyse par phénotypage des différentes protéines de surface liées à la maturation des DC a montré l'implication de la voie p38 MAPK dans l'augmentation d'expression de ces différents marqueurs. Que ce soient les molécules du CMH-I et CMH-II, les molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86, ou la molécule d'adhésion CD54, l'inhibition de p38 réduit fortement l'expression de ces marqueurs en réponse aux sensibilisants DNFB et HCP ; l'inhibiteur seul de p38 n'ayant pas d'effet sur l'expression de ces marqueurs. Cela démontre que dans notre

modèle cellulaire, p38 joue un rôle dans la différenciation des DC en réponse aux sensibilisants.

L'impact de p38 dans la maturation des DC, et plus précisément dans l'expression des marqueurs phénotypiques associées, a été démontré par plusieurs équipes. Dans un autre modèle de DC, dérivées de monocytes issus de sang périphérique humain, l'inhibition de p38 influence également l'expression des molécules CD86 et CMH-I en réponse au DNCB, un sensibilisant cutané analogue du DNFB [73]. Dans des DC dérivées de sang périphérique, l'inhibition de p38 réduit fortement l'expression de CD86 et CMH-II en réponse au DNFB. Dans les cellules de lignée humaine THP-1, l'inhibition de p38 réduit l'expression de CD86, CD54 et CD40 en réponse au DNCB [142]. Enfin, une diminution de l'expression de CD40 dans des DC dérivées de la peau murine exposées au DNFB a été observée lorsque p38 est inhibée [138]. Toutes ces observations montrent que la MAPK p38 joue un rôle majeur dans la maturation des DC en réponse à des sensibilisants dont la majorité est de nature cutanée. Dans notre modèle, nous avons pu démontrer avec l'HCP que cet impact de p38 dans la maturation est également observé avec un sensibilisant respiratoire. Ces résultats apportent un argument supplémentaire sur la pertinence du modèle BMDC pour étudier les mécanismes de la sensibilisation cutanée mais également respiratoire.

Parallèlement aux voies MAPK et STAT, nous avons étudié l'expression du gène codant la protéine IL12p40. Cette protéine est connue pour jouer un rôle important dans le développement des lymphocytes T, dont la polarisation vers un profil Th1 est associée à la sensibilisation cutanée [143]. Dans de précédentes études, différents essais d'ELISA ou CBA avaient été réalisés afin de doser l'IL-12 dans le surnageant de culture des BMDC exposées à des produits chimiques. Parmi les différents produits testés (sensibilisants cutanés et respiratoires et non sensibilisants) seule l'exposition au LPS avait induit une sécrétion de la cytokine mesurable (données non publiées). L'impossibilité de détecter cette cytokine dans les essais réalisés en présence de sensibilisant pouvait révéler les limites des techniques d'immunodétection.

Afin d'étudier l'expression d'*IL-12p40* par une méthode plus sensible, nous avons donc réalisé des expériences de RT-qPCR pour mettre en évidence la présence d'ARN codant cette protéine. Les premières analyses ont été menées à partir de DC exposées pendant 3 h et 6 h à nos deux sensibilisants de référence le DNFB et l'HCP et au non-sensibilisant irritant, le SDS. Sur la base des résultats obtenus, nous avons pu observer une légère surexpression du gène dans les DC exposées au sensibilisant cutané DNFB mais également dans celles exposées à l'irritant SDS. Puisque les conditions ne semblaient pas optimales pour discriminer les sensibilisants du non sensibilisant, nous avons renouvelé les expériences de RT-qPCR après 24 h d'exposition, durée utilisée par ailleurs et permettant d'observer une surexpression d'ARN d'*IL12p40* dans d'autres modèles [82, 144]. Au cours d'expériences préliminaires, nous avons alors pu constater l'absence de surexpression du gène de l'*IL12p40* avec le SDS par rapport au véhicule ; en revanche la présence d'ARN correspondant était augmentée pour les deux sensibilisants testés. Le niveau de surexpression dans les DC exposées au sensibilisant respiratoire HCP était similaire à celui obtenu avec les DC exposées au sensibilisant cutané DNFB. Dans les conditions expérimentales testées, l'expression d'*IL-12p40* ne constitue donc pas un marqueur discriminant les deux classes de sensibilisant dans notre modèle, cette piste de recherche n'a donc pas été poursuivie.

### **La nature de la réponse p38 MAPK dépend-elle du sensibilisant ?**

Tous les sensibilisants testés induisaient une réponse de la MAPK p38. Au regard des différents résultats obtenus quant à cette activation, nous nous sommes demandés si la nature de cette réponse permettait de mieux caractériser le sensibilisant. Plus précisément, la cinétique d'activation de p38 pourrait-elle être un marqueur discriminant des sensibilisants cutanés et respiratoires. Également, l'amplitude de la réponse renseignerait-elle sur la puissance du sensibilisant ?

La cinétique d'activation de p38 pourrait-elle être un marqueur discriminant des sensibilisants cutanés et respiratoires ?

Comme cela a été évoqué précédemment, les premiers résultats obtenus avec le DNFB et l'HCP ont montré un délai de réponse différent pour l'activation de p38, avec une réponse précoce pour le DNFB et tardive pour l'HCP. La cinétique de réponse pourrait donc être un paramètre à prendre en compte pour la caractérisation des sensibilisants. L'importance du délai de réponse a été déjà soulevée par Ferreira *et al.* qui avaient observé des différences de cinétique d'activation pour différents marqueurs entre les deux classes de sensibilisants sur les cellules THP-1. Comme dans notre modèle, ils avaient constaté un délai de réponse plus précoce pour le sensibilisant cutané (DNFB) et retardé pour le sensibilisant respiratoire (trimellitic anhydride chloride) [137]. Les cellules dendritiques répondraient plus rapidement à un sensibilisant cutané qu'à un sensibilisant respiratoire.

Nous avons augmenté le nombre de sensibilisants, cutanés ou respiratoires, et de non-sensibilisants, à tester avec notre modèle pour savoir si cette différence de délai pouvait être généralisée. La majorité des sensibilisants cutanés testés ont induit une activation précoce de p38 alors que les sensibilisants respiratoires ont induit une activation retardée de p38.

Néanmoins, l'hypothèse d'un délai de réponse de p38 discriminant cutané et respiratoire a été mise en défaut avec les résultats obtenus avec l'hydroquinone. En effet, l'hydroquinone, considérée comme un sensibilisant cutané, a montré contre toute attente une activation retardée de p38. L'explication pourrait se trouver dans la littérature qui nous informe que ce produit induit une réponse immunitaire de type Th2, donc une réponse caractéristique des sensibilisants respiratoires [145]. Or, les sensibilisants respiratoires testés avec notre modèle induisent également une réponse de type Th2 qui activent de manière retardée la MAPK p38. Il est donc raisonnable de s'interroger sur l'existence d'un lien éventuel entre la cinétique d'activation et la réponse immunitaire Th1/Th2. Et cela pourrait expliquer, en partie tout au moins, pourquoi l'hydroquinone induit une réponse retardée dans nos DC. À l'exception du

produit divergent hydroquinone, le bilan des résultats obtenus montre que les sensibilisants cutanés sont activateurs de la voie p38 pour des temps d'exposition courts.

Quant aux sensibilisants respiratoires, nous avons pu constater que l'ATCP présente le même profil d'activation que l'HCP, c'est-à-dire une activation retardée de p38 et une activation des STAT. Ces deux produits appartiennent à la même famille de produits chimiques et possèdent une réactivité similaire [146]. Cela explique donc la similitude de leur réponse. Concernant le TMI, l'amplitude de la réponse est faible pour p38, si on la compare à celles des deux sensibilisants sels de platine. Néanmoins elle reste plus importante pour le temps d'exposition plus long. Malgré les réserves sur l'amplitude de la réponse, qui seront évoquées ci-dessous, le TMI induit donc une réponse avec un profil respiratoire.

La cinétique de l'activation de p38 est un paramètre important à prendre en compte et pourrait contribuer à distinguer les sensibilisants cutanés des sensibilisants respiratoires.

#### L'amplitude de la réponse renseignerait-elle sur la puissance du sensibilisant ?

Hormis pour le DNFB et l'HCP, une courbe « dose-réponse » n'a pas été établie pour tous les sensibilisants testés. Néanmoins, avec au minimum 3 concentrations testées, tous les sensibilisants induisent une activation de p38 avec une réponse plus importante pour les concentrations plus fortes. Cette observation permet d'envisager de prendre en compte l'amplitude de cette réponse pour caractériser plus précisément le sensibilisant. D'une manière générale, chaque sensibilisant est catégorisé en fonction de sa puissance, et plusieurs des tests cellulaires décrits dans l'introduction proposent de corréler l'amplitude de la réponse aux concentrations de sensibilisant afin de déterminer la puissance de ce dernier, comme cela est réalisé dans le LLNA. Pour reprendre les résultats de l'isocyanate (TMI) et des sels de platines évoqués précédemment, il est possible que l'HCP et l'ATCP possèdent une plus forte puissance que le TMI dans notre modèle. En effet, les données du modèle publiées en 2017 montraient un classement des produits testés selon la puissance [119]. Dans ce classement,

le TMI était un sensibilisant moins puissant que l'HCP ce qui expliquerait une activation de p38 moins forte pour l'isocyanate que pour le sel de platine. Il est encore un peu tôt pour conclure avec certitude sur l'origine de la différence de réponse du TMI. De la même manière, les sensibilisants réagissent différemment avec les protéines environnantes, rendant leur biodisponibilité variable ce qui pourrait également contribuer à des différences de réponse. La détermination de la puissance n'était pas l'objectif principal de cette étude, néanmoins il est intéressant de noter que ces travaux proposent une piste à explorer pour répondre à cette problématique. Dans tous les cas, une corrélation « concentration-réponse », devra être établie avec de nombreux sensibilisants appartenant à différentes catégories avant de conclure de façon certaine sur l'intérêt de p38 pour catégoriser les sensibilisants.

La MAPK p38 est une voie pertinente à étudier dans le cadre de l'étude des mécanismes de la sensibilisation. Rappelons que, contrairement aux non-sensibilisants, cette MAPK est activée par tous les sensibilisants que nous avons testés et que sa cinétique et son amplitude d'activation sont des paramètres intéressants à creuser.

Dans la même logique que précédemment, nous nous sommes interrogés sur la pertinence d'étudier la voie Nrf2/Keap1 en réponse à des sensibilisants cutanés et respiratoires.

### **La voie Nrf2/Keap1 est-elle activée dans notre modèle par les sensibilisants cutanés ou respiratoires ?**

Les sensibilisants sont des substances qui vont réagir avec les protéines environnantes et qui vont induire un stress chimique conduisant à de multiples perturbations cellulaires. Pour faire face à ces agressions, les cellules possèdent divers mécanismes de détoxification de xénobiotiques [87]. La voie Nrf2/Keap1 en fait partie. C'est un mécanisme intracellulaire très largement étudié dans la sensibilisation cutanée [89]. L'activation de cette voie est par ailleurs analysée dans plusieurs tests réglementaires pour évaluer le potentiel sensibilisant cutané [147, 148]. En effet, beaucoup de sensibilisants sont connus comme ayant la capacité de provoquer un fort stress oxydant au niveau des cellules, induisant une activation de la voie Nrf2/Keap1. La mesure de l'activation cellulaire pourrait également être pertinente pour déterminer si ce mécanisme est impliqué différemment selon la nature du sensibilisant.

L'activation de cette voie a été analysée à différents niveaux : l'accumulation de la protéine Nrf2, l'activité de la protéine Nrf2 et l'expression des gènes régulés par Nrf2. Les premières expérimentations entreprises pour évaluer l'accumulation intracellulaire de Nrf2 ont été réalisées par *western-blot*. Cette technique appliquée à notre modèle présentait des limites méthodologiques notamment inhérentes aux performances des anticorps disponibles, déjà rencontrées par d'autres équipes [149, 150]. Ainsi nous avons été contraints d'abandonner la technique de *western blot* au profit de la cytométrie en flux pour quantifier l'accumulation de la protéine Nrf2. Cette méthode a été validée avec plusieurs sensibilisants cutanés et respiratoires et a fait l'objet d'une publication (**Annexe 1**) [151]. Après exposition à nos sensibilisants de référence DNFB et HCP, nous avons observé une accumulation de la protéine Nrf2 dans les DC. Le mécanisme Nrf2/Keap1 serait donc bien impliqué dans la réponse des DC à ces deux produits. Appliquées à d'autres substances chimiques, les analyses ont montré que l'accumulation de la protéine augmente en réponse à d'autres sensibilisants cutanés tels que le cinnamaldéhyde, le naphthol, le formaldéhyde et l'isoeugénol, mais également avec le sensibilisant respiratoire ATCP. Concernant les 3 premiers produits,

l'accumulation de Nrf2 avait un profil surprenant puisque la présence de la protéine, après avoir augmenté pour les premières concentrations, décroît à partir d'un certain seuil. De nombreux cas de réponses de ce type qualifiées d'hormétiques ont été décrites et attribuées à un mécanisme faisant intervenir la voie Nrf2/Keap1 [152]. Un tel comportement hormétique peut biaiser les résultats et compromettre l'utilisation de cette voie pour l'évaluation du potentiel sensibilisant des produits d'autant que ces derniers peuvent avoir une puissance très variable (de faible à extrême). Si l'on ignore ce phénomène, cela peut poser problème pour une approche méthodologique dans laquelle les DC seraient exposées à une concentration « élevée ». Parfois, la concentration est d'ores et déjà beaucoup trop forte et se situe dans la phase descendante de l'hormèse.

Malgré la présence d'un effet hormétique, les travaux d'étude de l'accumulation de la protéine Nrf2 montrent que les sensibilisants respiratoires peuvent activer la voie Nrf2/Keap1 dans les DC.

En parallèle, nous avons étudié l'expression de gènes régulés par Nrf2, comme *hmox1*, *srxn1*, *gclc* ou *nqo1* en présence du DNFB et de l'HCP. Les résultats présentés précédemment indiquent *hmox1*, *srxn1* et *nqo1* comme étant les gènes les plus fortement régulés parmi ceux analysés. Les résultats obtenus avec les autres sensibilisants ont également montré une augmentation de l'expression de ces trois gènes, en particulier pour *hmox1* et *srxn1*. L'augmentation de l'expression de ces gènes est en accord avec les observations faites par d'autres équipes [85, 153]. Pour chaque produit sensibilisant, nous avons testé plusieurs concentrations. Parmi les produits testés, le cinnamaldéhyde et le naphthol, deux sensibilisants cutanés, ont entraîné une surexpression des gènes étudiés moins importante à partir d'une certaine concentration. Cette fois encore, l'effet d'hormèse a pu être constaté à travers l'expression des gènes. Comme observé précédemment avec l'accumulation de la protéine Nrf2, les différents produits testés n'induisent pas des amplitudes de surexpressions géniques équivalentes. En effet, on a constaté que le cinnamaldéhyde est un produit qui régule plus fortement les gènes étudiés que le formaldéhyde. Mais cette caractéristique n'explique pas les

différences de sensibilisation puisque le cinnamaldéhyde est un sensibilisant modéré tandis que le formaldéhyde est un sensibilisant fort. Donc l'amplitude de l'activation de la voie Nrf2/Keap1 ne permet pas de statuer sur la puissance du sensibilisant.

En ce qui concerne les mesures d'activité de la protéine Nrf2, nous n'avons pas analysé tous les produits testés précédemment. Pour les produits de référence, le DNFB et l'HCP, une augmentation de l'activité de la protéine Nrf2 a été mesurée, ce qui confirme une fois de plus l'activation de la voie Nrf2/Keap1 par des sensibilisants cutanés et respiratoires. Dans la littérature, il existe de nombreuses publications décrivant l'activation de Nrf2 par des sensibilisants bien souvent cutanés [85, 148, 154]. En revanche, l'observation d'une activation de la voie Nrf2/Keap1 par des sensibilisants respiratoires est peu documentée. Par les résultats présentés dans ce manuscrit, nous avons montré qu'il est possible qu'un sensibilisant respiratoire active la voie Nrf2/Keap1 dans des DC. Jusqu'à maintenant, l'activation de la voie Nrf2/Keap1 par des sensibilisants respiratoires n'avait été constatée que dans des cellules épithéliales pulmonaires humaines BEAS-2B [155].

D'après la littérature, nous savons qu'il existe des similitudes et des différences entre la sensibilisation cutanée et la sensibilisation respiratoire [101, 156]. Parmi les différences décrites, la formation d'adduits stables avec les protéines de l'hôte en est une. Une hypothèse était que la réactivité du produit sensibilisant déterminait sa nature cutanée ou respiratoire. Plus précisément, cette hypothèse avançait que les sensibilisants respiratoires formaient des adduits en se fixant sur les résidus lysines, tandis que les sensibilisants cutanés formaient des adduits sur les résidus cystéines. Plusieurs équipes ont tenté de discriminer via le modèle DPRA les sensibilisants cutanés des sensibilisants respiratoires sur la base de cette réactivité envers les résidus lysines ou cystéine [157-160]. Parmi les théories évoquées par les travaux de Lalko, une d'entre elles soulignait que les sensibilisants respiratoires n'étaient pas capables d'activer la voie Nrf2/keap1 du fait qu'ils étaient réactifs aux lysines. Il est souvent décrit que le complexe Nrf2/Keap1 change de conformation et entraîne un détachement mutuel lorsqu'il y a une attaque des résidus cystéines de Keap1 [87]. Sur la base de ce mécanisme, il était raisonnable de penser que les sensibilisants cutanés, qui sont réactifs à la cystéine, seraient

les seuls types de sensibilisants à pouvoir activer la voie Nrf2/Keap1. Mais nous avons obtenu une activation de la voie Nrf2/Keap1 en réponse à deux sensibilisants respiratoires, l'HCP et l'ATCP.

Alors comment expliquer l'activation de cette voie par ces deux produits ?

Une équipe a démontré via le DPRA que l'HCP et l'ATCP étaient tous les deux réactifs à la cystéine [146], ce qui pourrait expliquer l'activation de la voie Nrf2/Keap1.

Les résultats obtenus dans cette thèse mettent en valeur l'activation de la voie Nrf2/Keap1 par les sensibilisants respiratoires et le fait que ces mêmes sensibilisants puissent provoquer des adduits en se fixant sur la cystéine. Il s'agit là d'une similitude que peuvent partager un sensibilisant cutané et un sensibilisant respiratoire. Cette caractéristique pose un réel problème pour distinguer le potentiel sensibilisant cutané du potentiel sensibilisant respiratoire par le biais de l'activation de la voie Nrf2/Keap1. Aujourd'hui, il n'est donc pas possible d'utiliser la seule activation de cette voie de signalisation pour discriminer les deux types de sensibilisant.

Nous avons vu que la voie p38 jouait un rôle central dans la réponse aux sensibilisants. Cette protéine est un régulateur de nombreuses voies dont la voie Nrf2/Keap1. Nous nous sommes donc interrogés sur les éventuelles interrelations entre ces deux voies dans le contexte de la sensibilisation.

### **La voie p38-Nrf2, une potentielle nouvelle voie décrite dans le mécanisme de la sensibilisation ?**

Afin de déterminer si l'activation de p38 influence celle de la voie Nrf2/Keap1, un inhibiteur sélectif de p38 a été utilisé. Avant de s'intéresser à la voie Nrf2/Keap1, nous avons tout d'abord voulu confirmer que p38 n'avait pas d'influence sur les autres voies étudiées, MAPK ou STAT. Les résultats présentés précédemment indiquent que l'inhibition de p38 n'influence pas le niveau d'activation des autres MAPK et STAT. En parallèle, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de p38 sur la maturation des DC. L'analyse des marqueurs phénotypiques en réponse au DNFB ou à l'HCP a montré que l'inhibition de p38 réduisait fortement l'expression de ces marqueurs. La MAPK p38 régule donc la maturation des DC, confortant l'hypothèse que cette protéine jouerait un rôle central dans la sensibilisation au niveau de ces cellules.

En ce qui concerne la voie Nrf2/Keap1, les résultats obtenus ont montré que l'activation de p38 influence celle de la voie Nrf2, à travers l'accumulation de la protéine, l'expression des gènes régulés par Nrf2 et, pour certains produits pour lesquelles cette analyse a pu être faite, l'activité de la protéine Nrf2. Dans d'autres domaines d'étude, nous savons que p38 peut être, comme d'autres kinases, impliquée dans la phosphorylation activatrice de Nrf2. Bien que nous ne puissions pas confirmer que p38 soit directement responsable de son activation, nous pouvons affirmer que dans notre modèle, cette MAPK régule la voie Nrf2/Keap1.

Les voies MAPK, les voies STAT, la voie Nrf2/Keap1 sont autant de mécanismes intracellulaires activés par les sensibilisants dans les DC. Il n'était pas possible de tous les étudier mais les résultats obtenus au cours de cette thèse confirment l'intérêt de certains marqueurs, notamment p38 et Nrf2. Le rôle central de p38 dans la réponse des DC aux sensibilisants est résumé dans la **Figure 60**.

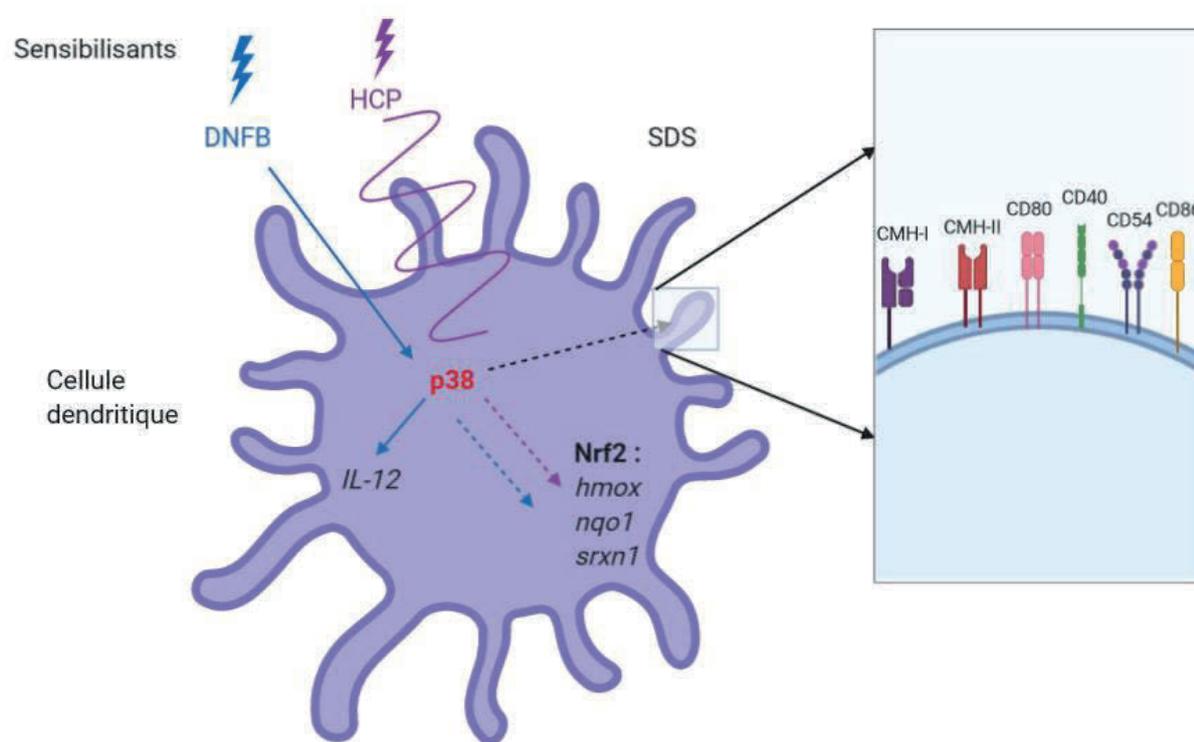


Figure 60 : Schéma récapitulatif du rôle central de p38 dans la réponse des DC aux sensibilisants cutanés et aux sensibilisants respiratoires.

**Quels sont les impacts de ces résultats pour l'évaluation du potentiel sensibilisant ?**

Parmi les différentes problématiques posées dans l'étude de la sensibilisation allergique, la question ci-dessous reste posée :

*Pourquoi certains sensibilisants chimiques provoquent une sensibilisation respiratoire, tandis que d'autres provoquent une sensibilisation cutanée, voire dans certains cas deux sensibilisations ?*

La réglementation CLP imposant l'étiquetage des produits et la caractérisation de leurs dangers, il ne s'agit pas simplement d'une problématique académique mais bel et bien de trouver la réponse à cette question, réponse qui permettrait d'élucider les différences mécanistiques entre les classes d'allergènes chimiques et d'identifier des sensibilisants respiratoires. L'évaluation de la puissance des sensibilisants reste également une problématique à résoudre. Pour rappel, cette évaluation se réalise via une démarche dite « *Weight of Approach* » qui consiste à récolter l'ensemble des données, humaines ou animales, pour déterminer cette puissance. Le modèle BMDC pourrait compléter ces données exploitables. L'étude des voies MAPK a permis de montrer que p38 pourrait être un marqueur intéressant dans l'étude de la sensibilisation. D'ailleurs, la cinétique d'exposition et la concentration sont des paramètres importants qui pourraient être utilisés pour distinguer les sensibilisants respiratoires mais également évaluer la puissance des sensibilisants. Pour cela, il faudrait confirmer cette hypothèse en testant une plus grande variété de sensibilisants, issus des catégories 1A ou 1B et comparer nos critères d'évaluation avec ceux obtenus par des données humaines ou animales.

Bien que nos résultats mettent en valeur de nouvelles voies de signalisation activées par les sensibilisants, le faible nombre de produits sensibilisants respiratoires testés reste un handicap pour conclure. Ce faible nombre traduit bien les obstacles que l'on rencontre en voulant étudier la sensibilisation respiratoire. D'une part, le nombre de sensibilisants

respiratoires avérés est moins important que celui des sensibilisants cutanés ; par ailleurs, il existe très peu de données humaines cliniques ou épidémiologiques permettant une meilleure connaissance des sensibilisants respiratoires [161]. Cela crée un déséquilibre de données relatives aux sensibilisants cutanés vs les sensibilisants respiratoires. D'autre part, la méthode de culture cellulaire de type « immergé » est incompatible avec l'utilisation de certains produits comme les anhydrides qui s'hydrolysent rapidement en milieu de culture, biaisant les résultats. Également, il existe des colorants décrits comme étant des sensibilisants respiratoires mais leur niveau de pureté ne correspond pas à nos critères. Plusieurs pistes pour résoudre ces limites seront abordées dans les perspectives.

Dans ce contexte, comment établir des modèles prédictifs sur la base de peu de témoins positifs exclusifs à la sensibilisation respiratoire ? Il y a pourtant de nombreuses équipes qui tentent de relever le défi et pour autant aucun modèle aujourd'hui n'a encore été validé pour évaluer le potentiel sensibilisant respiratoire. Il faut donc approfondir nos connaissances concernant cette sensibilisation. C'est pourquoi cette thèse s'est en grande partie focalisée sur l'aspect mécanistique car il y a un véritable manque d'informations dans ce domaine. Ainsi, le modèle BMDC s'est avéré être un très bon outil pour étudier les mécanismes intracellulaires de la sensibilisation et il nous a permis de mettre en évidence des voies de signalisation activées pour les deux catégories de sensibilisants. En tant que test pour évaluer le potentiel sensibilisant, il est encore aujourd'hui difficile de conclure sur les capacités du modèle BMDC à prédire le potentiel sensibilisant respiratoire ou encore pour caractériser la puissance des sensibilisants. Néanmoins, le stade encore précoce de l'évaluation du potentiel sensibilisant respiratoire nécessite de donner des directions de recherches. Les travaux réalisés au cours de cette thèse mettent en exergue l'intérêt d'étudier les voies de signalisation car ils ont permis de définir les limites d'étude de certaines voies mais également d'observer de nouveaux marqueurs intéressants à intégrer dans de futurs tests. Ces observations donnent des directions de recherche qui pourront être explorées dans d'autres modèles.

# Conclusions et perspectives

L'objectif principal était de définir des profils d'activation de voies de signalisation identifiées dans le modèle BMDC, pour tenter de discriminer un sensibilisant cutané d'un sensibilisant respiratoire.

Les travaux de cette thèse ont répondu à cet objectif en mettant en évidence des similitudes et des différences en termes d'activation de voies de signalisation entre les sensibilisants cutanés et les sensibilisants respiratoires. Tous les sensibilisants que nous avons testés activent p38, précocement pour les sensibilisants cutanés et de manière retardée pour les sensibilisants respiratoires. Contrairement à la majorité des sensibilisants cutanés, certains sensibilisants respiratoires activent tous les facteurs de transcription STAT testés.

De plus, l'analyse de la voie Nrf2/Keap1 a montré que les sensibilisants respiratoires étaient capables, tout comme les sensibilisants cutanés, d'induire son activation. Le déclenchement de cette voie Nrf2/Keap1 s'est montrée modulée par la MAPK p38. Les différences (cinétique de p38, activation des STAT pour des sensibilisants respiratoires) pourraient constituer des marqueurs intéressants pour le test BMDC pour discriminer les sensibilisants cutanés des sensibilisants respiratoires. Les similitudes, aussi bien que les différences, sont importantes à décrire dans le cadre de la recherche des mécanismes de la sensibilisation respiratoire. L'activation de la MAPK p38, des STAT et de la voie Nrf2 pourrait être autant de mécanismes à soumettre pour enrichir l'AOP sur la sensibilisation respiratoire, plus précisément pour renseigner l'évènement clé n°4 (activation des DC : induction de voies de signalisation intracellulaires).

L'évaluation du pouvoir sensibilisant respiratoire est encore à ses débuts. À ce jour, même si aucun modèle n'a encore été validé, il est important de continuer à déterminer les mécanismes induits par les produits sensibilisants, notamment les sensibilisants respiratoires. C'est

pourquoi d'autres produits devront être testés afin de compléter nos tableaux de données, notamment de vérifier si la cinétique de p38 peut être un marqueur discriminant.

Au cours de la thèse, nous avons plusieurs pistes possibles pour étudier les mécanismes de la sensibilisation dans le modèle BMDC, certaines restent encore à étudier, comme la voie NF- $\kappa$ B qui est liée à la voie Nrf2/Keap1 [89].

Les interleukines jouent un rôle important et impactent le microenvironnement cellulaire. Elles influencent la réponse immunitaire Th1 ou Th2. Plusieurs cytokines telles que les IL-1 $\beta$ , IL-8, IL12p70, IL-6, TNF- $\alpha$  ou encore IFN- $\gamma$  pourraient être étudiées dans l'espoir de découvrir un profil cytokinique différent entre les sensibilisants cutanés et les sensibilisants respiratoires.

En prévision de ces différentes études, il y a des progrès méthodologiques à faire pour faciliter la discrimination entre sensibilisants cutanés et respiratoires. En effet, certains produits ont une solubilisation difficile dans les solvants disponibles ou sont le substrat d'une hydrolyse rapide en milieu de culture. La préparation de telles substances dans de la paraffine liquide [162] ou une vectorisation liposome pourrait améliorer le modèle en augmentant le nombre de sensibilisants respiratoires testés. Il existe également des travaux que nous pourrions reprendre sur la nanoencapsulation des substances chimiques dans des nanoparticules lipidiques, qui pourraient permettre une exposition adaptée aux DC en culture immergée [163].

De récents travaux ont également montré l'utilisation d'un modèle de co-culture basé sur un système à interface air-liquide pour évaluer le potentiel sensibilisant respiratoire [164]. Ce modèle utilise un Vitrocell, un dispositif permettant d'exposer les composants cellulaires de la co-culture à des sensibilisants respiratoires gazeux, liquides ou encore solides. Le développement d'un tel système pourrait être intéressant à appliquer au modèle BMDC car il permettrait à la fois de tester des sensibilisants respiratoires peu solubles mais également de mimer les interactions entre les cellules épithéliales et les cellules dendritiques. Ce système permettrait de tester les différents marqueurs mis en évidence dans le modèle BMDC, tels que p38 ou encore les marqueurs phénotypiques de la maturation des DC.

À l'image du GARDair, il pourrait être également intéressant de déterminer, par une approche transcriptomique, la signature de gènes spécifiques des sensibilisants cutanés et celle des sensibilisants respiratoires. En effet, l'analyse des voies de signalisation nous a permis de mettre en évidence des voies principalement activées comme la MAPK p38 ou les STAT. La sélection de l'expression des gènes analysée par transcriptomique pourrait se faire en lien avec ces voies activées.

Toutes ces pistes sont autant de voies à explorer pour améliorer les performances du modèle et nos connaissances mécanistiques de la sensibilisation. Elles permettraient enfin de développer un test évaluant le potentiel sensibilisant respiratoire. Comme cela a été indiqué précédemment, l'AOP de la sensibilisation respiratoire est en cours de construction et, à ce jour, aucun modèle n'a pu être validé quel que soit l'évènement clé étudié. Les données acquises au cours de cette thèse et les futures expériences qui en découleront pourraient permettre d'enrichir cet AOP toujours en construction. Dans le futur, plusieurs tests basés sur ces mécanismes pourraient voir le jour et, à l'image de la sensibilisation cutanée, une combinaison de tests incluant le modèle BMDC pourrait permettre d'évaluer le potentiel sensibilisant respiratoire et ainsi de prévenir les hypersensibilités allergiques en milieu professionnel.

# Références bibliographiques

1. Publication, N., *The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds*, D.o.H.a.H. Services, Editor. 1999.
2. MacKay, C., M. Davies, *et al.*, *From pathways to people: Applying the adverse outcome pathway (AOP) for skin sensitization to risk assessment*. ALTEX - Alternatives to animal experimentation, 2013. **30**(4): p. 473-486.
3. *An Adverse Outcome Pathway for Sensitization of the Respiratory Tract by Low-Molecular-Weight Chemicals: Building Evidence to Support the Utility of In Vitro and In Silico Methods in a Regulatory Context*. Applied In Vitro Toxicology, 2017. **3**(3): p. 213-226.
4. Pepin, E., M. Goutet, *et al.*, *Murine bone marrow-derived dendritic cells as a potential in vitro model for predictive identification of chemical sensitizers*. Toxicol Lett, 2007. **175**(1-3): p. 89-101.
5. (UN), U.N. *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*. 2013; Available from: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html).
6. Anderson, S.E. and B.J. Meade, *Potential health effects associated with dermal exposure to occupational chemicals*. Environ Health Insights, 2014. **8**(Suppl 1): p. 51-62.
7. Tan, C.H., S. Rasool, *et al.*, *Contact dermatitis: allergic and irritant*. Clin Dermatol, 2014. **32**(1): p. 116-24.
8. Tan, J. and J.A. Bernstein, *Occupational asthma: an overview*. Curr Allergy Asthma Rep, 2014. **14**(5): p. 431.
9. Couraud, S., C. Planus, *et al.*, *[Platinum salts hypersensitivity]*. Rev Pneumol Clin, 2008. **64**(1): p. 20-6.
10. travail, A.e.p.l.s.e.l.s.a. *Factsheet\_40 : Sensibilisants cutanés*. 2003 [cited 2022; Available from: <https://osha.europa.eu/fr/publications/factsheet-40-skin-sensitisers>].
11. Nicholson, P.J., D. Llewellyn, *et al.*, *Evidence-based guidelines for the prevention, identification and management of occupational contact dermatitis and urticaria\**. Contact Dermatitis, 2010. **63**(4): p. 177-186.
12. AFSEET. *Asthme, allergies et maladies respiratoires*. 2006 [cited 2022; Available from: <https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/afsset.pdf>].
13. Sit, G., N. Letellier, *et al.*, *Occupational Exposures to Organic Solvents and Asthma Symptoms in the CONSTANCES Cohort*. Int J Environ Res Public Health, 2021. **18**(17).
14. Assurance\_Maladie, *Rapport annuel 2020 de l'Assurance Maladie - Risques professionnels*. 2020.
15. Nicolas, J.-F., *Hypersensibilité aux médicaments*. La revue du praticien, 2015. **65**: p. 967-971.
16. Kaplan, D.H., B.Z. Igyarto, *et al.*, *Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(2): p. 114-24.
17. Karlberg, A.-T., M.A. Bergström, *et al.*, *Allergic Contact Dermatitis—Formation, Structural Requirements, and Reactivity of Skin Sensitizers*. Chemical Research in Toxicology, 2008. **21**(1): p. 53-69.
18. Lepoittevin, J.P., *Les bases chimiques de l'allergie de contact*. Revue Française d'Allergologie, 2011. **51**(3): p. 208-211.
19. Gerberick, G.F., *The Use of Peptide Reactivity Assays for Skin Sensitisation Hazard Identification and Risk Assessment*. Alternatives to Laboratory Animals, 2016. **44**(5): p. 437-442.
20. Thierse, H.J., K. Gamerdinger, *et al.*, *T cell receptor (TCR) interaction with haptens: metal ions as non-classical haptens*. Toxicology, 2005. **209**(2): p. 101-7.

21. Lepoittevin, J.P., *Metabolism versus chemical transformation or pro- versus prehapten?* Contact Dermatitis, 2006. **54**: p. 73-74.
22. Matura, M., A. Goossens, *et al.*, *Oxidized citrus oil (<em>R</em>-limonene): A frequent skin sensitizer in Europe.* Journal of the American Academy of Dermatology, 2002. **47**(5): p. 709-714.
23. Honda, T., G. Egawa, *et al.*, *Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis.* J Invest Dermatol, 2013. **133**(2): p. 303-15.
24. Arlettaz, L., C. Barbey, *et al.*, *CD45 isoform phenotypes of human T cells: CD4(+)/CD45RA(-)/RO(+)* memory T cells re-acquire CD45RA without losing CD45RO. Eur J Immunol, 1999. **29**(12): p. 3987-94.
25. Hammad, H. and B.N. Lambrecht, *Dendritic cells and airway epithelial cells at the interface between innate and adaptive immune responses.* Allergy, 2011. **66**(5): p. 579-87.
26. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *The immunology of asthma.* Nat Immunol, 2015. **16**(1): p. 45-56.
27. Ding, X. and L.S. Kaminsky, *Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003. **43**: p. 149-73.
28. Kim, J.H., M.E. Sherman, *et al.*, *Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers.* Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **199**(3): p. 210-9.
29. Besnard, A.G., D. Togbe, *et al.*, *IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation.* Eur J Immunol, 2011. **41**(6): p. 1675-86.
30. Bartemes, K.R. and H. Kita, *Dynamic role of epithelium-derived cytokines in asthma.* Clin Immunol, 2012. **143**(3): p. 222-35.
31. Ito, T., Y.J. Liu, *et al.*, *Cellular and molecular mechanisms of TSLP function in human allergic disorders--TSLP programs the "Th2 code" in dendritic cells.* Allergol Int, 2012. **61**(1): p. 35-43.
32. Holgate, S.T. and R. Polosa, *Treatment strategies for allergy and asthma.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 218-30.
33. Deckers, J., K. De Bosscher, *et al.*, *Interplay between barrier epithelial cells and dendritic cells in allergic sensitization through the lung and the skin.* Immunol Rev, 2017. **278**(1): p. 131-144.
34. Eisenbarth, S.C., *Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function.* Nat Rev Immunol, 2019. **19**(2): p. 89-103.
35. Cook, P.C. and A.S. MacDonald, *Dendritic cells in lung immunopathology.* Semin Immunopathol, 2016. **38**(4): p. 449-60.
36. Vroman, H., B. van den Blink, *et al.*, *Mode of dendritic cell activation: the decisive hand in Th2/Th17 cell differentiation. Implications in asthma severity?* Immunobiology, 2015. **220**(2): p. 254-61.
37. Ohl, L., M. Mohaupt, *et al.*, *CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions.* Immunity, 2004. **21**(2): p. 279-88.
38. Kashem, S.W., M. Haniffa, *et al.*, *Antigen-Presenting Cells in the Skin.* Annu Rev Immunol, 2017. **35**: p. 469-499.
39. Newton, K. and V.M. Dixit, *Signaling in innate immunity and inflammation.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(3).
40. Schaefer, L., *Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns.* J Biol Chem, 2014. **289**(51): p. 35237-45.
41. Ainscough, J.S., G. Frank Gerberick, *et al.*, *Danger, intracellular signaling, and the orchestration of dendritic cell function in skin sensitization.* J Immunotoxicol, 2013. **10**(3): p. 223-34.
42. Kawai, T. and S. Akira, *Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors.* Trends Mol Med, 2007. **13**(11): p. 460-9.
43. O'Neill, L.A., D. Golenbock, *et al.*, *The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity.* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(6): p. 453-60.

44. Chen, G., M.H. Shaw, *et al.*, *NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease*. *Annu Rev Pathol*, 2009. **4**: p. 365-98.
45. Hardison, S.E. and G.D. Brown, *C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity*. *Nat Immunol*, 2012. **13**(9): p. 817-22.
46. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 805-20.
47. Tiberio, L., A. Del Prete, *et al.*, *Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration*. *Cellular & molecular immunology*, 2018. **15**(4): p. 346-352.
48. Sozzani, S., W. Vermi, *et al.*, *Trafficking properties of plasmacytoid dendritic cells in health and disease*. *Trends Immunol*, 2010. **31**(7): p. 270-7.
49. Cook, D.N., D.M. Prosser, *et al.*, *CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue*. *Immunity*, 2000. **12**(5): p. 495-503.
50. O'Neill, D.W., S. Adams, *et al.*, *Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer*. *Blood*, 2004. **104**(8): p. 2235-46.
51. Banchereau, J., F. Briere, *et al.*, *Immunobiology of dendritic cells*. *Annu. Rev. Immunol*, 2000. **18**: p. 767-811.
52. Real, E., A. Kaiser, *et al.*, *Immature dendritic cells (DCs) use chemokines and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin, to stimulate CD4+ T cells in the absence of exogenous antigen*. *J Immunol*, 2004. **173**(1): p. 50-60.
53. Kim, M.K. and J. Kim, *Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration*. *RSC Advances*, 2019. **9**(20): p. 11230-11238.
54. Wang, C., W. Sun, *et al.*, *Bioengineering of Artificial Antigen Presenting Cells and Lymphoid Organs*. *Theranostics*, 2017. **7**(14): p. 3504-3516.
55. Zundler, S. and M.F. Neurath, *Interleukin-12: Functional activities and implications for disease*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015. **26**(5): p. 559-68.
56. Roubourdin-Combe, C., P. Bertolino, *et al.*, *La présentation de l'antigène aux lymphocytes T*. *médecine/sciences*, 1991. **7**: p. 674-680.
57. Luckheeram, R.V., R. Zhou, *et al.*, *CD4(+)T cells: differentiation and functions*. *Clin Dev Immunol*, 2012. **2012**: p. 925135.
58. Ma, C.S., N. Wong, *et al.*, *Unique and shared signaling pathways cooperate to regulate the differentiation of human CD4+ T cells into distinct effector subsets*. *J Exp Med*, 2016. **213**(8): p. 1589-608.
59. Akdis, M., O. Palomares, *et al.*, *TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection*. *J Allergy Clin Immunol*, 2012. **129**(6): p. 1438-49; quiz1450-1.
60. Anderson, A.C., G.M. Lord, *et al.*, *T-bet, a Th1 transcription factor regulates the expression of Tim-3*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(3): p. 859-66.
61. Bechara, R., M. Nabhan, *et al.*, *IL-27 Production and Regulation in Human Dendritic Cells Treated with the Chemical Sensitizer NiSO4*. *Chem Res Toxicol*, 2018.
62. Usatine, R.P. and M. Riojas, *Diagnosis and Management of Contact Dermatitis*. *American Family Physician*, 2010. **82**: p. 249-255.
63. Chary, A., J. Hennen, *et al.*, *Respiratory sensitization: toxicological point of view on the available assays*. *Arch Toxicol*, 2018. **92**(2): p. 803-822.
64. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases*. *Science*, 2002. **298**: p. 1911-1912.
65. Garrington, T.P. and G.L. Johnson, *Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways*. *Cell Biology*, 1999. **11**: p. 211-218.
66. Xia, Z., M. Dickens, *et al.*, *Opposing Effects of ERK and JNK-p38 MAP Kinases on Apoptosis*. *Science*, 1995. **270**: p. 1326-1331.
67. Soares-Silva, M., F.F. Diniz, *et al.*, *The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids*. *Front Microbiol*, 2016. **7**: p. 183.

68. Jiang, Y., C. Chen, *et al.*, *Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta)*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(30): p. 17920-6.
69. Lechner, C., M.A. Zahalka, *et al.*, *ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation*. *Cell Biology*, 1996. **93**: p. 4355-439.
70. Jiang, Y., H. Gram, *et al.*, *Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(48): p. 30122-8.
71. Arrighi, J.F., M. Rebsamen, *et al.*, *A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers*. *J Immunol*, 2001. **166**(6): p. 3837-45.
72. Shaul, Y.D. and R. Seger, *The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1773**(8): p. 1213-26.
73. Aiba, S., H. Manome, *et al.*, *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*, 2003. **120**(3): p. 390-9.
74. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation*. *Physiological Reviews*, 2001. **81**: p. 807-869.
75. Cuevas, B.D., A.N. Abell, *et al.*, *Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration*. *Oncogene*, 2007. **26**(22): p. 3159-71.
76. Park, J.G., N. Aziz, *et al.*, *MKK7, the essential regulator of JNK signaling involved in cancer cell survival: a newly emerging anticancer therapeutic target*. *Therapeutic advances in medical oncology*, 2019. **11**: p. 1758835919875574-1758835919875574.
77. Nakahara, T., H. Uchi, *et al.*, *Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells*. *Int Immunol*, 2004. **16**(12): p. 1701-9.
78. Jatiani, S.S., S.J. Baker, *et al.*, *Jak/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: approaches for targeted therapies*. *Genes Cancer*, 2010. **1**(10): p. 979-993.
79. Watford, W.T., M. Moriguchi, *et al.*, *The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses*. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2003. **14**(5): p. 361-368.
80. Stritesky, G.L., R. Muthukrishnan, *et al.*, *The transcription factor STAT3 is required for T helper 2 cell development*. *Immunity*, 2011. **34**(1): p. 39-49.
81. Bell, B.D., M. Kitajima, *et al.*, *The transcription factor STAT5 is critical in dendritic cells for the development of TH2 but not TH1 responses*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(4): p. 364-71.
82. Antonios, D., P. Rousseau, *et al.*, *Mechanisms of IL-12 synthesis by human dendritic cells treated with the chemical sensitizer NiSO4*. *J Immunol*, 2010. **185**(1): p. 89-98.
83. Baker, S.J., S.G. Rane, *et al.*, *Hematopoietic cytokine receptor signaling*. *Oncogene*, 2007. **26**(47): p. 6724-37.
84. Esser, P.R., U. Wolfle, *et al.*, *Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e41340.
85. Ade, N., F. Leon, *et al.*, *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*, 2009. **107**(2): p. 451-60.
86. Ma, Q. and X. He, *Molecular basis of electrophilic and oxidative defense: promises and perils of Nrf2*. *Pharmacol Rev*, 2012. **64**(4): p. 1055-1081.
87. Vomund, S., A. Schafer, *et al.*, *Nrf2, the Master Regulator of Anti-Oxidative Responses*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(12).
88. Lo, S.-C., X. Li, *et al.*, *Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling*. *The Embo Journal*, 2006. **25**: p. 3065-3617.
89. Helou, D.G., S.F. Martin, *et al.*, *Nrf2 Involvement in Chemical-Induced Skin Innate Immunity*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 1004.
90. Zhang, D.D., S.C. Lo, *et al.*, *Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(24): p. 10941-53.

91. Huang, H.-C., T. Nguyen, *et al.*, *Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**: p. 12475–12480.
92. Huang, H.C., T. Nguyen, *et al.*, *Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42769-74.
93. Rybin, V.O., J. Guo, *et al.*, *Stimulus-specific differences in protein kinase C delta localization and activation mechanisms in cardiomyocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 19350-61.
94. Yu, R., C. Chen, *et al.*, *Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 39907-13.
95. Alam, J., C. Wicks, *et al.*, *Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor*. J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 27694-702.
96. Wardyn, J.D., A.H. Ponsford, *et al.*, *Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF-kappaB response pathways*. Biochem Soc Trans, 2015. **43**(4): p. 621-6.
97. Tian, H., B. Zhang, *et al.*, *Keap1: one stone kills three birds Nrf2, IKKbeta and Bcl-2/Bcl-xL*. Cancer Lett, 2012. **325**(1): p. 26-34.
98. Ankley, G.T., R.S. Bennett, *et al.*, *Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment*. Environ Toxicol Chem, 2010. **29**(3): p. 730-741.
99. OCDE, *The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins*. 2014.
100. Sullivan, K.M., S.J. Enoch, *et al.*, *An Adverse Outcome Pathway for Sensitization of the Respiratory Tract by Low-Molecular-Weight Chemicals: Building Evidence to Support the Utility of In Vitro and In Silico Methods in a Regulatory Context*. Applied In Vitro Toxicology, 2017. **3**(3): p. 213-226.
101. Kimber, I., A. Poole, *et al.*, *Skin and respiratory chemical allergy: confluence and divergence in a hybrid adverse outcome pathway*. Toxicol Res (Camb), 2018. **7**(4): p. 586-605.
102. Rovida, C., N. Alepee, *et al.*, *Integrated Testing Strategies (ITS) for safety assessment*. ALTEX, 2015. **32**(1): p. 25-40.
103. OCDE, *Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation*. 2021.
104. Gerberick, G.F., J.D. Vassallo, *et al.*, *Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens*. Toxicol Sci, 2004. **81**(2): p. 332-43.
105. Gerberick, G.F., J.A. Troutman, *et al.*, *Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system*. Toxicol Sci, 2009. **112**(1): p. 164-74.
106. Natsch, A., T. Haupt, *et al.*, *Predictivity of the kinetic direct peptide reactivity assay (kDPRA) for sensitizer potency assessment and GHS subclassification*. Altex, 2020. **37**(4): p. 652-664.
107. Natsch, A. and R. Emter, *Nrf2 Activation as a Key Event Triggered by Skin Sensitisers: The Development of the Stable KeratinoSens Reporter Gene Assay*. ATLA, 2016. **44**: p. 443–451.
108. Roggen, E.L., *In Vitro Approaches for Detection of Chemical Sensitization*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2014. **115**(32-40): p. 32-40.
109. Ramirez, T., A. Mehling, *et al.*, *LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification*. Toxicol In Vitro, 2014. **28**(8): p. 1482-97.
110. Ramirez, T., N. Stein, *et al.*, *Intra- and inter-laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: A reporter gene-cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers*. Toxicol In Vitro, 2016. **32**: p. 278-86.
111. Cottrez, F., E. Boitel, *et al.*, *Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model. Development of the SENS-IS assay*. Toxicology in Vitro, 2015. **29**(4): p. 787-802.

112. Cottrez, F., E. Boitel, *et al.*, *SENS-IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: Reproducibility and predictivity results from an inter-laboratory study*. *Toxicology in Vitro*, 2016. **32**: p. 248-260.
113. Python, F., C. Goebel, *et al.*, *Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007. **220**(2): p. 113-24.
114. Ade, N., S. Martinozzi-Teissier, *et al.*, *Activation of U937 cells by contact sensitizers: CD86 expression is independent of apoptosis*. *J Immunotoxicol*, 2006. **3**(4): p. 189-97.
115. dos Santos, G.G., J. Reinders, *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**(3): p. 372-82.
116. Sakaguchi, H., T. Ashikaga, *et al.*, *Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT*. *Toxicol In Vitro*, 2006. **20**(5): p. 774-784.
117. Johansson, H., A.S. Albrekt, *et al.*, *The GARD assay for assessment of chemical skin sensitizers*. *Toxicol In Vitro*, 2013. **27**(3): p. 1163-9.
118. Forreryd, A., H. Johansson, *et al.*, *Prediction of chemical respiratory sensitizers using GARD, a novel in vitro assay based on a genomic biomarker signature*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0118808.
119. Battais, F., C. Huppert, *et al.*, *In vitro detection of chemical allergens: an optimized assay using mouse bone marrow-derived dendritic cells*. *Contact Dermatitis*, 2017. **77**(5): p. 311-322.
120. Huppert, C., C. Paris, *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. **79**(2): p. 67-75.
121. OCDE, *Ligne directrice n° 497 : Approches définies pour la sensibilisation cutanée*. 2021.
122. Neves, B.M., M. Goncalo, *et al.*, *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*, 2011. **250**(2): p. 87-95.
123. Arrighi, J.F., M. Rebsamen, *et al.*, *A Critical Role for p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in the Maturation of Human Blood-Derived Dendritic Cells Induced by Lipopolysaccharide, TNF-, and Contact Sensitizers*. *The Journal of Immunology*, 2001. **166**(6): p. 3837-3845.
124. Boislevé, F., S. Kerdine-Romer, *et al.*, *Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF-alpha and MAPK*. *J Invest Dermatol*, 2004. **123**(3): p. 494-502.
125. Iijima, N., Y. Yanagawa, *et al.*, *Role of early- or late-phase activation of p38 mitogen-activated protein kinase induced by tumour necrosis factor-alpha or 2,4-dinitrochlorobenzene during maturation of murine dendritic cells*. *Immunology*, 2003. **110**(3): p. 322-8.
126. Lopez, S., E. Gomez, *et al.*, *Betalactam antibiotics affect human dendritic cells maturation through MAPK/NF-kB systems. Role in allergic reactions to drugs*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015. **288**(3): p. 289-99.
127. Antonios, D., N. Ade, *et al.*, *Metallic haptens induce differential phenotype of human dendritic cells through activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways*. *Toxicol In Vitro*, 2009. **23**(2): p. 227-34.
128. Matos, T.J., C.B. Duarte, *et al.*, *Role of oxidative stress in ERK and p38 MAPK activation induced by the chemical sensitizer DNFB in a fetal skin dendritic cell line*. *Immunol Cell Biol*, 2005. **83**(6): p. 607-14.
129. Arkusz, J., M. Stepnik, *et al.*, *Interleukin-1beta expression in murine J774A.1 macrophages exposed to platinum compounds: the role of p38 and ERK 1/2 mitogen-activated protein kinases*. *Toxicol In Vitro*, 2007. **21**(3): p. 371-9.
130. Commission, E. *Annex VI Skin*. 2009 [cited 2019 4 April]; Available from: [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific\\_committees/docs/annex6\\_skin.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/docs/annex6_skin.pdf).
131. Commission, E. *Annex VI respiratory*. 2009 [cited 2019 4 April]; Available from: [https://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/docs/annex6\\_respiratory.pdf](https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/docs/annex6_respiratory.pdf).

132. Gilliet , M., A. Boonstra , *et al.*, *The Development of Murine Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors Is Differentially Regulated by FLT3-ligand and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor*. *Journal of Experimental Medicine*, 2002. **195**(7): p. 953-958.
133. Ezendam, J., S. Cochrane, *et al.*, *An adverse outcome pathway for respiratory sensitization by chemicals: The way forward?* *Toxicology Letters*, 2017. **280**: p. S60-S61.
134. Dress, R.J., A.Y. Wong, *et al.*, *Homeostatic control of dendritic cell numbers and differentiation*. *Immunol Cell Biol*, 2018. **96**(5): p. 463-476.
135. Huppert, C., *Development of a dendritic cells-T cells coculture model to assess the hazard of sensitizers*

*Développement d'un modèle de coculture cellules dendritiques lymphocytes T pour l'évaluation du danger des substances sensibilisantes*. 2018, Université de Lorraine.

136. Jackson, S.H., C.R. Yu, *et al.*, *Dendritic cell maturation requires STAT1 and is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling*. *J Immunol*, 2004. **172**(4): p. 2307-15.
137. Ferreira, I., A. Silva, *et al.*, *Nature and kinetics of redox imbalance triggered by respiratory and skin chemical sensitizers on the human monocytic cell line THP-1*. *Redox Biol*, 2018. **16**: p. 75-86.
138. Matos, T.J., C.B. Duarte, *et al.*, *DNFB activates MAPKs and upregulates CD40 in skin-derived dendritic cells*. *J Dermatol Sci*, 2005. **39**(2): p. 113-23.
139. Trompezinski, S., C. Migdal, *et al.*, *Characterization of early events involved in human dendritic cell maturation induced by sensitizers: cross talk between MAPK signalling pathways*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008. **230**(3): p. 397-406.
140. Mitjans, M., B. Viviani, *et al.*, *Role of p38 MAPK in the selective release of IL-8 induced by chemical allergen in naive THp-1 cells*. *Toxicol In Vitro*, 2008. **22**(2): p. 386-95.
141. Mizuashi, M., T. Ohtani, *et al.*, *Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells*. *J Invest Dermatol*, 2005. **124**(3): p. 579-86.
142. Miyazawa, M., Y. Ito, *et al.*, *Role of MAPK signaling pathway in the activation of dendritic type cell line, THP-1, induced by DNCB and NiSO4*. *J Toxicol Sci*, 2008. **33**(1): p. 51-9.
143. Heufler, C., F. Koch, *et al.*, *Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells*. *Eur J Immunol*, 1996. **26**(3): p. 659-68.
144. Macoch, M., C. Morzadec, *et al.*, *Nrf2-dependent repression of interleukin-12 expression in human dendritic cells exposed to inorganic arsenic*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015. **88**: p. 381-390.
145. Bando, K., Y. Tanaka, *et al.*, *Mouse Model of Hydroquinone Hypersensitivity via Innate and Acquired Immunity and its Promotion by Combined Reagents*. *J Invest Dermatol*, 2017. **137**(5): p. 1082-1093.
146. Hemming, J.D.C., M. Hosford, *et al.*, *Application of the direct peptide reactivity assay (DPRA) to inorganic compounds: a case study of platinum species*. *Toxicol Res (Camb)*, 2019. **8**(6): p. 802-814.
147. Emter, R., J.W. van der Veen, *et al.*, *Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events*. *Toxicol In Vitro*, 2013. **27**(8): p. 2225-32.
148. Natsch, A., *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*, 2010. **113**(2): p. 284-92.
149. Lau, A., W. Tian, *et al.*, *The predicted molecular weight of Nrf2: it is what it is not*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **18**(1): p. 91-3.
150. Kemmerer, Z.A., N.R. Ader, *et al.*, *Comparison of human Nrf2 antibodies: A tale of two proteins*. *Toxicol Lett*, 2015. **238**(2): p. 83-9.

151. Audry, A., J. Mathiot, *et al.*, *A new cytometry-based method reveals an accumulation of Nrf2 in dendritic cells exposed to two respiratory sensitizers*. *Toxicology Research*, 2021. **10**(6): p. 1223-1227.
152. Calabrese, E.J. and W.J. Kozumbo, *The hormetic dose-response mechanism: Nrf2 activation*. *Pharmacol Res*, 2021. **167**: p. 105526.
153. Miyazawa, M. and A. Takashima, *Development and validation of a new in vitro assay designed to measure contact allergen-triggered oxidative stress in dendritic cells*. *J Dermatol Sci*, 2012. **68**(2): p. 73-81.
154. El Ali, Z., C. Gerbeix, *et al.*, *Allergic skin inflammation induced by chemical sensitizers is controlled by the transcription factor Nrf2*. *Toxicol Sci*, 2013. **134**(1): p. 39-48.
155. Remy, S., S. Verstraelen, *et al.*, *Gene expressions changes in bronchial epithelial cells: markers for respiratory sensitizers and exploration of the NRF2 pathway*. *Toxicol In Vitro*, 2014. **28**(2): p. 209-17.
156. Kimber, I., R.J. Dearman, *et al.*, *Chemical respiratory allergy: reverse engineering an adverse outcome pathway*. *Toxicology*, 2014. **318**: p. 32-9.
157. Dik, S., E. Rorije, *et al.*, *Can the Direct Peptide Reactivity Assay Be Used for the Identification of Respiratory Sensitization Potential of Chemicals?* *Toxicol Sci*, 2016. **153**(2): p. 361-71.
158. Lalko, J.F., I. Kimber, *et al.*, *Chemical reactivity measurements: potential for characterization of respiratory chemical allergens*. *Toxicol In Vitro*, 2011. **25**(2): p. 433-45.
159. Lalko, J.F., I. Kimber, *et al.*, *The direct peptide reactivity assay: selectivity of chemical respiratory allergens*. *Toxicol Sci*, 2012. **129**(2): p. 421-31.
160. Lalko, J.F., I. Kimber, *et al.*, *The selective peptide reactivity of chemical respiratory allergens under competitive and non-competitive conditions*. *J Immunotoxicol*, 2013. **10**(3): p. 292-301.
161. Sadekar, N., F. Boisleve, *et al.*, *Identifying a reference list of respiratory sensitizers for the evaluation of novel approaches to study respiratory sensitization*. *Crit Rev Toxicol*, 2022: p. 1-13.
162. Narita, K., P.T.H. Vo, *et al.*, *Preventing false-negatives in the in vitro skin sensitization testing of acid anhydrides using interleukin-8 release assays*. *Toxicol In Vitro*, 2017. **42**: p. 69-75.
163. Cortial, A.I., *New applications of organic nanoparticles : vectorisation of mix through the skin and development of in vitro assay for the diagnosis of fragrance allergy*
- Nouvelles applications des nanoparticules organiques : de la vectorisation d'un mélange d'actifs à travers la peau jusqu'au développement d'un test diagnostique in vitro de l'allergie aux parfums*. 2015, Université Claude Bernard - Lyon I.
164. Chary, A., T. Serchi, *et al.*, *An in vitro coculture system for the detection of sensitization following aerosol exposure*. *ALTEX*, 2019. **36**(3): p. 403-418.
165. Gerberick, F.G., C.A. Ryan, *et al.*, *Compilation of Historical Local Lymph Node Data for Evaluation of Skin Sensitization Alternative Methods*. *Dermatitis*<sup>®</sup>, 2005. **16**(4).
166. Lehmann, D.M., W.C. Williams, *et al.*, *Skin Sensitizing Potency of Halogenated Platinum Salts.*, in *Society of Toxicology (SOT) Annual Meeting*. 2011: San Francisco.
167. Wareing, B., D. Urbisch, *et al.*, *Prediction of skin sensitization potency sub-categories using peptide reactivity data*. *Toxicol In Vitro*, 2017. **45**(Pt 1): p. 134-145.
168. Lidén, C., K. Yazar, *et al.*, *Comparative sensitizing potencies of fragrances, preservatives, and hair dyes*. *Contact Dermatitis*, 2016. **75**(5): p. 265-275.
169. Basketter, D.A., F. Gerberick, *et al.*, *The local lymph node assay and the assessment of relative potency: status of validation*. *Contact Dermatitis*, 2007. **57**(2): p. 70-75.
170. Basketter, D.A., Z.M. Wright, *et al.*, *Human potency predictions for aldehydes using the local lymph node assay*. *Contact Dermatitis*, 2001. **45**(2): p. 89-94.
171. Selgrade, M., E.H. Boykin, *et al.*, *Inconsistencies between cytokine profiles, antibody responses, and respiratory hyperresponsiveness following dermal exposure to isocyanates*. *Toxicol Sci*, 2006. **94**(1): p. 108-17.





**Annexe 1 : Publication scientifique**  
**(AUDRY *et al*, 2021)**



# A new cytometry-based method reveals an accumulation of Nrf2 in dendritic cells exposed to two respiratory sensitizers

Adrien Audry<sup>1,\*</sup>, Julianne Mathiot<sup>1</sup>, Samuel Muller<sup>1</sup>, Amélie Coiscaud<sup>1</sup>, Isabelle Langonné<sup>1</sup>, Fabrice Battais<sup>1</sup>, Brigitte Leininger<sup>2</sup> and Isabelle Sponne<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Toxicology and Biometry, National Institute for Research and Safety (INRS), rue du Morvan – 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

<sup>2</sup>University of Lorraine, INSERM, UMR-1256, 9 Avenue de la Forêt de Haye – 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

\*Correspondence address. Department of Toxicology and Biometry, National Institute for Research and Safety (INRS), rue du Morvan – 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel: +33 3 83 50 20 00; E-mail: adrien.audry@inrs.fr

## Abstract

The mechanisms underlying chemical respiratory sensitization are incompletely understood. One of the major cell types involved in this pathology are dendritic cells. In this study, the mechanisms of the NRF2–Keap1 pathway were studied using a bone marrow-derived dendritic cell model exposed to two respiratory sensitizers: ammonium hexachloroplatinate (HCP) and ammonium tetrachloroplatinate (ATCP). Expression levels for two Nrf2-regulated genes, *hmx1* and *srxn1*, were analyzed by real time-quantitative polymerase chain reaction. A flow cytometry-based method was also developed to measure intracellular Nrf2 accumulation in dendritic cells following exposure. Exposure to HCP and ATCP increased both *hmx1* and *srxn1* gene expression, and was associated with accumulation of Nrf2 protein in cells. Overall, these results show that the respiratory sensitizers, in addition to skin sensitizers, can also induced markers associated with NRF2–Keap1 pathway activation in dendritic cells. This study contributes to a better understanding of the adverse outcome of respiratory sensitization.

**Keywords:** dendritic cells, flow cytometry, respiratory sensitizer, platinum salt, Nrf2

## Introduction

Respiratory allergy associated with asthma and rhinitis is an important health issue. In occupational and personal settings, allergies can be caused by exposure to chemicals that must be characterized as respiratory sensitizers [1]. Rather than waiting for clinical evidence, *in vitro* assays are needed to predict such properties. The mechanisms underlying chemical respiratory sensitization must be understood if we want to develop toxicological tools to detect chemical-induced allergy. Several studies have focused on skin sensitization, leading to the first described adverse outcome pathway (AOP). An AOP is a simplified organizational construct, which describes initiating molecular events and early key events (KE) at a low level of biological organization. These events subsequently lead to the adverse outcome (AO). In this context, AOPs serve as a support when developing tests to determine the sensitizing potential of a particular compound. Along the lines of the methods developed to identify skin sensitizers, we now need to develop *in vitro* assays to assess the respiratory sensitizing potential of chemicals [2].

The AOP for respiratory sensitization has yet to be validated [3]. However, it is generally recognized that the physiopathological mechanisms involved in respiratory

sensitization share common KE with skin sensitization. Among common events, dendritic cell (DC) activation (KE 3) has been identified [4].

We have developed a bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) assay based on this KE [5]. This *in vitro* assay was shown to identify some chemical respiratory sensitizers, notably the metal salt ammonium hexachloroplatinate (HCP), which has been linked to various allergic outcomes, including asthma and rhinitis [6, 7]. Indeed, HCP is considered to be a positive control for respiratory sensitization [8]. However, it must be admitted that little is known about the mechanism through which this compound and other platinum salts, such as ammonium tetrachloroplatinate (ATCP), cause sensitization. In particular, we do not know how they activate DC in *in vitro* assays [9]. One of the pathways that has been studied in the ‘cellular activation’ KEs is the NRF2–Keap1 pathway [9]. Nrf2 is a transcription factor that binds to the antioxidant response element (ARE) in the regulatory regions of several target genes. The repressor protein Keap1 promotes Nrf2 degradation by the proteasome [10]. Keap1 is a cysteine-rich protein, which can be modified by multiple oxidants and electrophiles, any of which may be sensitizers [10]. There are several ways to study activation of this pathway, such as by measuring Nrf2 pro-

Received: June 7, 2021. Revised: October 4, 2021. Accepted: October 12, 2021.

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

tein accumulation or its phosphorylation, or monitoring upregulation of Nrf2-targeted genes [11]. Activation of the NRF2-Keap1 pathway is used in the KeratinoSens™ assay as an indication of the skin-sensitizing power of chemicals [12]. In contrast to skin sensitizers, and in particular in dendritic cell assays, we lack information on whether this pathway is also activated by respiratory sensitizers.

The aim of the current study was to analyze the NRF2-Keap1 pathway, by monitoring Nrf2-regulated genes and protein accumulation, in response to the respiratory sensitizers HCP and ATCP in a BMDC model. For this purpose, we adopted an approach combining commonly used quantitative real-time PCR with a more original method, analysis of intracellular Nrf2 protein accumulation by flow cytometry.

## Materials and Methods

### Chemicals

Chemicals used were: 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (DNFB, CAS: 70-34-8), a skin sensitizer; ammonium hexachloroplatinate (HCP, CAS: 16919-58-7) and ammonium tetrachloroplatinate (ATCP, CAS: 13820-41-2), two respiratory sensitizers; sodium dodecyl sulfate (SDS, CAS: 151-21-3), an irritant non-sensitizer; and the Nrf2 activator tert-butylhydroquinone (tBHQ, CAS: 1948-33-0). All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (purity > 98%). HCP, ATCP, and SDS were prepared in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). DNFB and tBHQ were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). The final concentration of vehicle in the culture medium did not exceed 0.125%, at which levels it did not affect cell viability nor expression levels of the markers investigated (data not shown).

### Generation of immature BMDC and treatment

A murine model of dendritic cells (BMDC) was generated as described previously [5]. After 7 days of culture, cells were trypsinized, counted, and transferred to cytometry tubes at a concentration of  $2.10^6$  cells/mL. To induce an effect in cells, chemicals must be applied at a subtoxic concentration [13]. BMDC were treated with the effective concentration, which induced up to 25% mortality (EC25), as determined by trypan blue exclusion. In all experiments, cells were exposed for 3 h to one single chemical at EC25 concentration. The concentrations applied were as follows: 10  $\mu$ M for DNFB, 150  $\mu$ M for HCP, 200  $\mu$ M for ATCP, 200  $\mu$ M for SDS, and 100  $\mu$ M for tBHQ.

### RNA isolation and reverse transcription

After treatment, BMDC were lysed and total RNA was isolated with the RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Then, 0.5  $\mu$ g of RNA was reverse transcribed using the RT script kit (Bio-Rad).

Quantitative real-time PCR was performed using the SYBR GREEN kit from Bio-Rad, according to the manufacturer's instructions. Analysis focused on expression of the ARE-dependent genes *hmx1* and *srxn1*, and on expression of the housekeeping genes *actin* and *tbp* (tata

box binding protein). The forward and reverse primers used are listed in the Supplementary data 1. Data were processed using CFX manager software (Bio-Rad), and quantification was based on the  $\Delta\Delta Cq$  method.

### Flow cytometry protocol

Following exposure to chemicals, BMDC were fixed for 12 min at 37°C with Cytofix™ and permeabilized for 30 min at 4°C with Perm III™ buffer (BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol. Permeabilized cells were then stained for 1 h with the following monoclonal antibodies: BlueViolet650-CD11c (Dilution 1/100; Clone B-ly6 – BD Biosciences), Phycoerythrin-Nrf2 (Dilution 1/50; Clone D1AE – Cell Signaling Technology), and their corresponding isotype controls.

Samples were analyzed on a FORTESSA x20™ cytometer (BD Biosciences). Debris were excluded from the analysis by applying a gate based on forward- and side-scattering. As CD11c + cells correspond to dendritic cells, we analyzed Nrf2 antibody fluorescence in this population. At least 20 000 cells were analyzed for each sample.

Mean fluorescence intensities (MFI) were recorded and processed with Diva and FlowJo software. Relative fluorescence intensity (RFI) values corresponded to the MFI of each marker for chemical-treated cells minus the MFI of the corresponding isotype control. Results are expressed as fold-change with respect to control cells (vehicle-treated cells).

### Statistical analyses

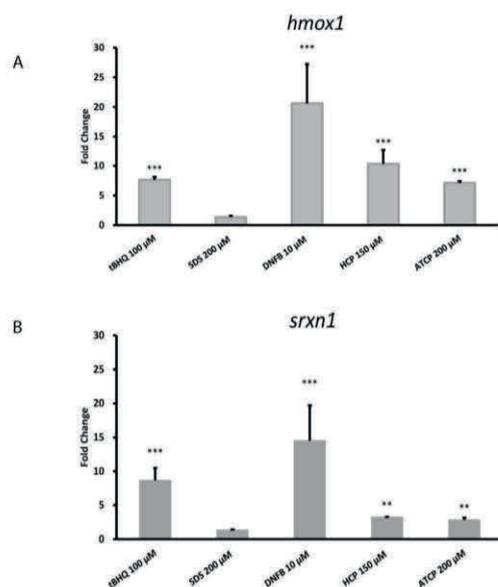
Results were statistically analyzed using a mixed linear regression model to estimate the effect of a product on Nrf2 accumulation, or *hmx1* and *srxn1* expression levels. For each experiment, results are presented as the mean value  $\pm$  standard error of the mean (SEM) determined from at least three independent experiments. Significance levels are indicated as follows: \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

## Results and Discussion

### Nrf2-targeted genes are modulated in BMDC in response to sensitizers

To investigate activation of the NRF2-Keap1 pathway, expression levels for two Nrf2 target genes, *hmx1* and *srxn1*, were studied. To do so, BMDC were treated with chemicals for 3 h, and the relative mRNA levels for these genes were measured by real time-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).

The Nrf2-activator tBHQ-induced upregulation of both *hmx1* (7.6-fold) and *srxn1* (8.6-fold) (Fig. 1). Transcription of these two ARE-dependent genes was even more markedly induced following exposure of BMDC to the skin sensitizer DNFB (fold-changes of 20.6 and 14.5, respectively). In contrast, the irritant SDS had no effect on expression of these genes. As mentioned above, the KeratinoSens™ assay uses activation of the NRF2-Keap1 pathway in a keratinocyte cell line as a marker of the skin sensitizing power of chemicals. In our BMDC model, the



**Figure 1.** Nrf2-regulated gene expression in BMDC is significantly enhanced by both skin and respiratory sensitizers. BMDC were exposed to HCP, ATCP, DNFB, SDS, and tBHQ for 3 h. The mRNA levels of *hmox1* (A) and *srxn1* (B) were determined by RT-qPCR. Data are represented as fold-change for expression levels normalized relative to vehicle-exposed cells. Data correspond to the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. Statistical analysis: linear mixed regression model. \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$  (comparison between treated and untreated cells). tBHQ: tert-butylhydroquinone, SDS: sodium dodecyl sulfate, DNFB: 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene, HCP: ammonium hexachloroplatinate, ATCP: ammonium tetrachloroplatinate.

skin sensitizer DNFB also activated this pathway. These results are in accordance with those of a previous study that demonstrated that the DC-like cell line THP-1 could upregulate Nrf2-regulated genes, such as *hmox1* or *nqo1*, in response to exposure to skin sensitizers [14].

The respiratory sensitizers tested, HCP and ATCP, also induced upregulation of *hmox1* (10.3- and 7.1-fold) and *srxn1* (3.3 and 2.8-fold) expression in BMDC. These results suggest that respiratory sensitizers can also upregulate ARE genes in this BMDC model, although the extent of upregulation was weaker than that observed with the skin sensitizer or with the Nrf2 activator. Previous reports on human DC-like "THP-1" cells indicated that the kinetics of the redox imbalance triggered by sensitizers depends on the nature of the sensitizer, with respiratory sensitizers taking longer than skin sensitizers to induce measurable effects [15]. Therefore, in other experiments, we examined gene expression after 6 h exposure to HCP and ATCP. In these conditions, stronger induction was observed (data not shown).

According to the literature, the two classes of sensitizers also showed non-equivalent potencies in the local lymph node assay (LLNA), with extreme sensitization reported for DNFB [11], and strong sensitization for HCP

and ATCP [16, 17]. These distinctions could at least partly explain the differences in expression induced here.

The RT-qPCR data showed that in the BMDC model, within a few hours, both skin and respiratory sensitizers induced overexpression of ARE-dependent genes in dendritic cells, whereas an irritant did not. Thus, with the products tested, expression levels of Nrf2-regulated genes could be used to distinguish between sensitizers and irritants.

### Intracellular Nrf2 accumulates in murine dendritic cells in response to sensitizers

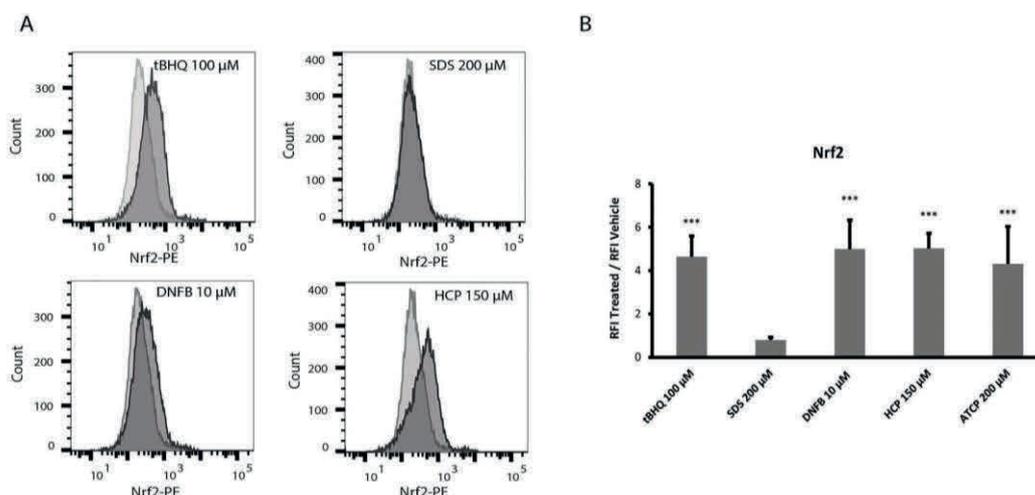
Since NRF2-Keap1 is a complex pathway with multistep-regulation, it was necessary to confirm the RT-qPCR results by a method exploring intracellular Nrf2 protein levels. We therefore performed a cytometry-based assay to measure the accumulation of Nrf2 protein in chemical- and vehicle-treated cells.

To validate the flow cytometry method, we used the Nrf2 activator tBHQ as a positive control. As expected, tBHQ increased Nrf2 accumulation by 4.6-fold compared to vehicle (Fig. 2).

As in the RT-qPCR assay, exposure to the irritant SDS had no effect on the cellular response. In contrast, exposure to DNFB, HCP, and ATCP significantly enhanced Nrf2 accumulation in BMDC, inducing an approximately 4-fold increase in accumulation compared to vehicle. In parallel, cells were co-exposed to sensitizers plus brusatol, a well-known Nrf2 inhibitor. This co-exposure reduced the signal measured for both sensitizers (data not shown), confirming the specificity of the response.

In complement, other chemicals such as naphtol, a skin sensitizer and methyl salicylate, an irritant non-sensitizer have been tested. They showed similar response to chemicals of their respective category (Supplementary data 2, Figs 1 and 2). Taken together, these results indicate that sensitizers induce upregulation of Nrf2-regulated genes, and lead to Nrf2 protein accumulation inside the cell. From a methodological point of view, the cytometry-based method developed here is an alternative to western blots (WB), which are extensively used in Nrf2-activation studies. The availability of an alternative method is a significant advance, as both we and others had difficulty unequivocally detecting Nrf2 in WB in murine *in vitro* models. These difficulties have been suggested to be the result of questionable specificity of commercial antibodies in WB applications [18, 19]. This method has many advantages such as it multiplexing capability – the possibility to analyze several proteins in the same sample for a defined population – and the quantifiable response it provides. Flow cytometry is also little time-consuming and easy to process with a basic cytometer.

The results obtained with the two methods tested showed that the respiratory sensitizers, HCP and ATCP, can activate the NRF2-Keap1 pathway in dendritic cells. Thus, NRF2-Keap1 pathway activation is not specific to skin sensitizers. Lalko [20] hypothesized that respiratory



**Figure 2.** Nrf2 protein accumulates to a significant extent in murine BMDC following exposure to sensitizers. Cells were exposed to chemicals for 3 h. Intracellular Nrf2 accumulation was analyzed by flow cytometry using a specific antibody on permeabilized cells. Representative flow cytometry data from three independent experiments are shown and compare vehicle condition (light grey) to treated condition (dark grey) (A). MFI was measured by flow cytometry on a FORTRESSA x20, and data were analyzed using FlowJo. Results are presented as fold-change, determined as the ratio of the RFI for chemical-treated cells over the RFI for vehicle-treated cells (B). Statistical analysis: linear mixed regression model. \*\*\* $P < 0.001$  (comparison between treated and untreated cells). tBHQ: tert-butylhydroquinone, SDS: sodium dodecyl sulfate, DNFB: 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene, HCP: ammonium hexachloroplatinate, ATCP: ammonium tetrachloroplatinate.

sensitizers are lysine-reactive compounds, which have been suggested to be unable to activate the NRF2–Keap1 pathway [21]. Although HCP and ATCP may not be exclusive respiratory sensitizers, the results presented here do not support Lalko's theory. In accordance with our findings, HCP and ATCP were recently demonstrated to show a cysteine-depleting profile [16].

NRF2–Keap1 pathway activation in cutaneous epithelial cells is a marker of sensitizing capacity in the validated KeratinoSens™ method. In another model, the BEAS-2B epithelial pulmonary cell line was used to assess respiratory sensitizers [22], and HCP also activated NRF2–Keap1 pathway in this epithelial model. However, in this previous study, SDS – a non-sensitizing irritant that triggers a well-known false-positive response in the predictive LLNA assay – also activated the NRF2–Keap1 pathway. Similarly, in assays using the DC-surrogate THP-1 cell line, SDS induced overexpression of Nrf2-regulated genes [14]. The irritant property of SDS could explain these false-positive results. However, this type of cross-reaction between irritants and sensitizers is not universal. Consequently, in the BMDC model presented here, SDS induced no response in either the RT-qPCR or flow cytometry assays. Therefore, activation of the NRF2–Keap1 pathway in this model might serve to distinguish between sensitizing and irritant capacities for both skin and respiratory trigger compounds.

## Conclusion

In complement to measuring the expression of Nrf2-regulated genes by RT-qPCR, a cytometric method has

been developed to study NRF2–Keap1 activation. This method allows the analysis of intracellular Nrf2 protein levels. After validation with a well-known Nrf2 activator, tBHQ, this method was applied to BMDC exposed to sensitizers. Both skin and respiratory sensitizers induced protein accumulation, and confirmed in accordance with RT-qPCR results the activation of the NRF2–Keap1 pathway in dendritic cells. These results contribute to a better characterization of the mechanisms induced by respiratory sensitizers in the key event 'activation of dendritic cells'. More respiratory sensitizers will now need to be tested to confirm these observations.

Markers associated with the activation of the NRF2–Keap1 pathway in this model could serve to distinguish between sensitizers and non-sensitizers for both skin and respiratory trigger compounds.

## Supplementary Data

Supplementary data are available at TOXRES online.

## Authors' Contributions

Isabelle Sponne conceived the study. Adrien Audry performed data collection, data analysis, and produced the figured and scripts, with overall guidance from Isabelle Sponne. All authors wrote the manuscript. Isabelle Sponne and Adrien Audry deposited the data.

## Acknowledgements

The authors thank Aurélie Remy for her help with statistical analysis.

## Conflicts of Interest

There are no conflicts of interest to declare.

## References

- Basketter D, Poole A and Kimber I. Behaviour of chemical respiratory allergens in novel predictive methods for skin sensitisation. *Regul Toxicol Pharmacol* 2017;**86**:101–6.
- Cochrane S, Arts JHE, Ehnes C et al. Thresholds in chemical respiratory sensitisation. *Toxicology* 2015;**333**:179–94.
- Ezendam J, Cochrane S, Enoch S et al. An adverse outcome pathway for respiratory sensitization by chemicals: the way forward? *Toxicol Lett* 2017;**280**:S60–1.
- Kimber I, Poole A and Basketter DA. Skin and respiratory chemical allergy: confluence and divergence in a hybrid adverse outcome pathway. *Toxicol Res (Camb)*, 2018. **7**(4): 586–605.
- Battais F, Huppert C, Langonné 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.
- Cleare MJ, Hughes EG, Jacoby B and Pepys S. Immediate (type I) allergic responses to platinum compounds. *Clin Allergy* 1976;**6**: 183–95.
- Heederik D, Jacobs J, Samadi S et al. Exposure-response analyses for platinum salt-exposed workers and sensitization: a retrospective cohort study among newly exposed workers using routinely collected surveillance data. *J Allergy Clin Immunol*, 2016. **137**(3): 922–9.
- ECETOC. *Technical Report No.77: Skin and Respiratory Sensitisers*. Reference Chemicals Data Bank 2014.
- Arts J. How to assess respiratory sensitization of low molecular weight chemicals? *Int J Hyg Environ Health* 2020;**225**: 113469.
- Migdal C, Botton J, El Ali Z et al. Reactivity of chemical sensitizers toward amino acids in cellulose plays a role in the activation of the Nrf2-ARE pathway in human monocyte dendritic cells and the THP-1 cell line. *Toxicol Sci*, 2013. **133**(2): 259–74.
- Natsch A. 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*, 2010. **113**(2): 284–92.
- Emter R, van der Veen JW, Adamson G et al. Gene expression changes induced by skin sensitizers in the keratinosens cell line: discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol in Vitro*, 2013. **27**(8): 2225–32.
- Hulette BC, Ryan CA, Gildea LA and Gerberick GF. Relationship of CD86 surface marker expression and cytotoxicity on dendritic cells exposed to chemical allergen. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005. **209**(2): 159–66.
- Ade N, Leon F, Pallardy M, et al. 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*, 2009. **107**(2): 451–60.
- Ferreira I, Silva A, Martins JD et al. Nature and kinetics of redox imbalance triggered by respiratory and skin chemical sensitizers on the human monocytic cell line THP-1. *Redox Biol* 2018;**16**: 75–86.
- Hemming JDC, Hosford M and Shafer MM. Application of the direct peptide reactivity assay (DPRA) to inorganic compounds: a case study of platinum species. *Toxicol Res (Camb)*, 2019. **8**(6): 802–814.
- Lehmann DM, Williams WC, Copeland CB et al. Skin sensitizing potency of halogenated platinum salts. *Society of Toxicology (SOT) Annual Meeting*. 2011; San Francisco.
- Lau A, Tian W, Whitman SA and Zhang DD. The predicted molecular weight of Nrf2: it is what it is not. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **18**(1): 91–3.
- Kemmerer ZA, Ader NR, Mulroy SS and Eggler AL. Comparison of human Nrf2 antibodies: a tale of two proteins. *Toxicol Lett*, 2015. **238**(2): 83–9.
- Lalko JF, Kimber I, Dearman RJ et al. The selective peptide reactivity of chemical respiratory allergens under competitive and non-competitive conditions. *J Immunotoxicol*, 2013. **10**(3): 292–301.
- Helou DG, Martin SF, Pallardy M, et al. Nrf2 involvement in chemical-induced skin innate immunity. *Front Immunol* 2019;**10**:1004.
- Remy S, Verstraelen S, van den Heuvel R et al. Gene expressions changes in bronchial epithelial cells: markers for respiratory sensitizers and exploration of the NRF2 pathway. *Toxicol in Vitro*, 2014. **28**(2): 209–17.

## **Annexe 2 : Puissance des différents sensibilisants testés**

Nom du produit	Type de sensibilisant	EC3 (LLNA)	Puissance	Catégorisation SGH	Référence
Dinitrofluorobenzène (DNFB)	Sensibilisant cutané	0,03 %	Extrême	1A	[165]
Hexachloroplatinate d'ammonium (HCP)	Sensibilisant respiratoire	0,58 %	Fort	1A	[166]
Tétrachloroplatinate d'ammonium (ATCP)	Sensibilisant respiratoire	0,23 %	Fort	1A	[166]
Chloramine T (ChT)	Sensibilisant respiratoire	0,40 %	Fort	1A	[167]
Naphtol (Nap)	Sensibilisant cutané	1,3 %	Modéré	1A	[168]
Isoeugénol (IsoE)	Sensibilisant cutané	1,5 %	Modéré	1A	[169]
Cinnamaldéhyde (Cinn)	Sensibilisant cutané	2,0 %	Modéré	1A	[170]
p-Tolyl isocyanate (TMI)	Sensibilisant respiratoire	0,12 %	Fort	1A	[171]
Hydroquinone (HQ)	Sensibilisant cutané	0,15 %	Fort	1A	[169]
Formaldéhyde (FOR)	Sensibilisant cutané	0,35 %	Fort	1A	[170]

Valeurs de la concentration efficace (EC3) obtenues par le test *Local Lympho Node Assay*. La classification a été établie de la manière suivante : EC3 < 0,1 % : Sensibilisant extrême ; EC3 ≥ 0,1 - < 1 : Sensibilisant fort ; EC3 ≥ 1 - < 10 : Sensibilisant modéré.

La catégorisation SGH est déterminée de la manière suivante : EC3 ≤ 0,2 ou EC3 ≤ 0,2 => Catégorie 1A ; EC3 > 2 => Catégorie 1B.



# Résumé

Les allergies comptent parmi les maladies professionnelles les plus fréquentes. Ses manifestations les plus courantes sont d'ordre respiratoire ou cutané. L'allergie est définie comme une réaction d'hypersensibilité se déroulant en 2 phases : une phase de sensibilisation, asymptomatique et une phase de réponse ou de déclenchement, symptomatique. Cette pathologie est associée à l'exposition à des substances dites « sensibilisantes ». La détection des substances sensibilisantes repose sur des tests *in chemico* ou *in vitro*. Contrairement à la sensibilisation cutanée, il n'existe pas de test validé pour évaluer le potentiel sensibilisant respiratoire. Dans ce contexte, un modèle de cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris a été développé pour évaluer le potentiel sensibilisant. Il permet aujourd'hui d'évaluer le potentiel sensibilisant mais il n'est pas en mesure de différencier un sensibilisant cutané d'un sensibilisant respiratoire. Afin d'optimiser et d'améliorer ce test, des voies de signalisation impliquées dans la sensibilisation ont été étudiées afin de trouver des marqueurs intéressants qui pourraient être intégrés dans le modèle et d'étudier les mécanismes impliqués dans la sensibilisation. L'étude des voies MAPK et STAT a montré la MAPK p38 comme étant activée pour tous les sensibilisants testés. De plus, la voie Nrf2/Keap1 semble impliquée dans la réponse des DC aux sensibilisants et en approfondissant l'étude de cette voie, nous avons montré que la voie p38 MAPK régule positivement l'activation de cette voie. L'étude des mécanismes apportent des informations intéressantes sur le mécanisme de la sensibilisation respiratoire et offre des marqueurs prometteurs pouvant être intégrés dans le modèle BMDC, ce qui pourrait lui permettre à l'avenir, en combinaison d'autres tests, de distinguer un sensibilisant cutané d'un sensibilisant respiratoire.

**Mots-clés :** Cellules dendritiques, sensibilisation, MAPK, voie Nrf2/Keap1

# Abstract

Allergies are among the most frequent occupational diseases. Its most common manifestations are respiratory or cutaneous. Allergy is defined as a hypersensitivity reaction that takes place in two phases: a sensitization phase, which is asymptomatic, and a response or trigger phase, which is symptomatic. This pathology is associated with exposure to so-called "sensitizing" substances. The detection of sensitizing substances is based on *in chemico* or *in vitro* tests. Contrary to skin sensitization, there are no validated tests to assess the respiratory sensitizing potential. In this context, a mouse bone marrow-derived dendritic cell model has been developed to assess sensitizing potential. It allows to evaluate the sensitizing potential, but it is not able to discriminate a skin sensitizer from a respiratory sensitizer. To optimize and improve this test, signalling pathways involved in sensitization have been studied in order to identify interesting markers that could be integrated into the model and to study the mechanisms involved in sensitization. The study of the MAPK and STAT pathways showed the p38 MAPK to be activated for all sensitizers assessed. In addition, the Nrf2/Keap1 pathway seems to be involved in the DC response to sensitizers and by further studying this pathway, we showed that the p38 MAPK pathway positively regulates the activation of this pathway. The study of the mechanisms provides interesting information on the mechanism of respiratory sensitization and offers promising markers that can be integrated into the BMDC model, which could allow it in the future in combination with other tests to distinguish a skin sensitizer from a respiratory sensitizer.

**Keywords :** Dendritic cells, sensitization, MAPK, Nrf2/Keap1 pathway