



**HAL**  
open science

# Effets des sensibilisants sur la synthèse de la prostaglandine E2 : Mécanismes et intérêt dans la prédiction de l'allergie de contact

Aurelia del Bufalo

► **To cite this version:**

Aurelia del Bufalo. Effets des sensibilisants sur la synthèse de la prostaglandine E2 : Mécanismes et intérêt dans la prédiction de l'allergie de contact. Médecine humaine et pathologie. AgroParisTech, 2012. Français. NNT : 2012AGPT0003 . pastel-01016611

**HAL Id: pastel-01016611**

**<https://pastel.hal.science/pastel-01016611v1>**

Submitted on 30 Jun 2014

**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.

## Doctorat ParisTech

# THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries  
du Vivant et de l'Environnement**

**(AgroParisTech)**

**Spécialité : Immunotoxicologie**

*présentée et soutenue publiquement par*

**Aurélia DEL BUFALO**

Le 20 janvier 2012

## **Effets des molécules sensibilisantes de contact sur la synthèse de la prostaglandine E<sub>2</sub>: Mécanismes et intérêt dans la prédiction de l'allergie de contact**

Directeur de thèse : **Bernard PIPY**

Co-encadrement de la thèse : **Silvia TEISSIER-MARTINOZZI**

### **Jury**

**M. Marc PALLARDY**, Professeur, INSERM UMR-996, Université Paris Sud  
**M. Lhousseine TOUQUI**, Professeur, INSERM U874, Institut Pasteur  
**M. Pierre BRIOZZO**, Professeur, INRA UMR 1318, AgroParisTech  
**Mme Silvia TEISSIER-MARTINOZZI**, Docteur, Immunité cutanée, L'Oréal R&I  
**M. Bernard PIPY**, Professeur, INSERM-IFR150, Université de Toulouse

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur



## Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire « Allergie/Immunotoxicologie » de L'Oréal sous la co-direction du Dr. Silvia Teissier et du Pr. Bernard Pipy (INSERM IFR 150 – Université Paul Sabatier).

En premier lieu, je souhaiterais remercier Jean Roch Meunier, directeur du département « Méthodes et modèles prédictifs » pour m'avoir offert cette formidable opportunité de pouvoir réaliser cette thèse en parallèle de mon activité d'ingénieur de recherche chez L'Oréal et de m'avoir assuré de son soutien et de sa confiance tout au long de ces quatre années.

Je tiens ensuite à remercier le Pr. Bernard Pipy pour avoir accepté de m'accompagner dans cette aventure, pour son enthousiasme et son optimisme dans les moments de doute ainsi que pour ses nombreuses idées pour révolutionner la connaissance des U937 !

J'adresse ma plus grande reconnaissance à Silvia Teissier pour le rôle essentiel qu'elle a joué depuis quatre ans dans ma formation, pour sa rigueur scientifique riche d'enseignements et son écoute inconditionnelle. Merci d'avoir accepté de rendre possible la réalisation de ce travail, de m'avoir toujours bien conseillée, et d'avoir été présente et disponible à chacune des étapes, depuis la toute première « manip » jusqu'à la toute dernière ligne du manuscrit. C'est une chance pour moi d'avoir pu réaliser ce travail dans un environnement aussi enrichissant.

Je remercie le Pr. Marc Pallardy et le Pr. Lhousseine Touqui d'avoir analysé ce travail en qualité de rapporteurs. Mes remerciements s'adressent également au Pr. Pierre Briozzo qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examinateur.

Merci à Françoise Rousset, à la genèse du sujet. Merci pour son soutien, et son aide précieuse dans la rédaction de l'article et du manuscrit, pour ses commentaires pertinents, ses corrections et sa grande disponibilité pour partager son savoir.

Mes remerciements s'adressent également à tous mes collègues de L'Oréal qui m'ont soutenue durant cette aventure et en particulier :

A Denis Verda : pour sa générosité et son aide technique de tout instant.



A Fleur Tourneix : pour sa joie de vivre, son suivi critique et bienveillant du sujet lors de nos réunions de laboratoire.

Aux jeunes de l'équipe, Steven et Karima : pour vos encouragements, pour la bouffée d'oxygène que vous nous apportez !

A Daniel et Joan pour la richesse de nos discussions interminables sur les voies de détoxication des différents sensibilisants, pour vos cours de « chimie pour les nuls » et pour votre grande disponibilité et bienveillance. Merci également à Joan pour avoir rendu possible les dosages de GSH (je n'oublie pas Romain !)

A Charles et Jean-François pour tout le travail statistique mené sur le test PGE<sub>2</sub> et pour votre patience et votre pédagogie face à mes questions existentielles.

A Cécile et Caroline pour m'avoir confié le test PGE<sub>2</sub> et pour votre grande disponibilité.

A Stéphanie et Reine pour l'intérêt porté à mon sujet, pour l'input *in silico* et pour votre amitié qui m'a permise de bien rire pendant les moments de doute !

A Ourda pour son aide précieuse dans l'archivage de la bibliographie et pour son soin à me faire de belles reliures sur le manuscrit !

Enfin, un grand merci à tout mes proches qui ont été à mes côtés durant ce long travail....

A Thomas pour sa patience inconditionnelle, sa capacité à me faire relativiser, son dévouement et son aide durant l'importante période de rédaction...A charge de revanche, c'est promis !

A mes parents et à ma sœur qui m'ont toujours encouragée et soutenue.

A tous mes amies (Stéphanie, Emilie, Eliane, Mathilde...et les autres) qui, même en ne connaissant toujours pas le sujet de ma thèse ont toujours été à mon écoute, présentes pour me remonter le moral dans les moments de découragement.



# Sommaire

Liste des abréviations	9
Table des illustrations	21
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>29</b>
Contexte de la thèse	31
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>35</b>
<b>Partie I : L'allergie retardée de contact</b>	<b>37</b>
I. La peau, un organe de l'immunité	37
II. Allergie retardée de contact : épidémiologie et mécanismes	49
III. Evaluation du risque	83
<b>Partie II : Réponse cellulaire aux signaux de danger induits par les molécules sensibilisantes</b>	<b>89</b>
I. Signaux de danger induits par les molécules sensibilisantes de contact	89
II. Tests alternatifs à l'expérimentation animale pour prédire le potentiel sensibilisant des molécules chimiques	113
<b>Partie III : La prostaglandine E<sub>2</sub>, un métabolite de l'acide arachidonique</b>	<b>123</b>
I. Métabolisme de l'acide arachidonique (AA)	123
II. Synthèse des prostanoïdes	129
III. Effet des prostanoïdes sur le système immunitaire	149
<b>TRAVAUX DE RECHERCHE</b>	<b>161</b>
Objectifs de la thèse	163
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>169</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>199</b>
<b>Partie I : Présentation et caractérisation du modèle cellulaire d'étude (U937 PMA/LPS)</b>	<b>201</b>
I. Phénotype et morphologie des cellules	203
II. Métabolisme de l'acide arachidonique dans le modèle cellulaire U937 PMA/LPS	203
III. Cytokines et chimiokines produites par le modèle U937 PMA/LPS	211
IV. Activation du facteur de transcription Nrf2 dans le modèle U937 PMA/LPS	211
<b>PARTIE II: Etude des mécanismes d'action des sensibilisants sur le métabolisme de l'acide arachidonique dans le modèle U937 PMA/LPS</b>	<b>215</b>
I. Effet des sensibilisants sur la production de PGE <sub>2</sub> par les moDC	215
II. Inhibition de la synthèse de prostanoïdes produits par les U937 PMA/LPS par les sensibilisants de contact : une caractéristique commune pour des mécanismes d'action variés	217
III. Etude des voies de signalisation induites par les sensibilisants dans U937 PMA/LPS	243
<b>PARTIE III : Prédiction de l'allergie retardée de contact, mise en place du « Test PGE<sub>2</sub> »</b>	<b>251</b>
I. Le test PGE <sub>2</sub> , un test performant pour la prédiction du caractère sensibilisant des molécules chimiques	251



II.	Pertinence du test PGE <sub>2</sub> pour la prédiction du potentiel sensibilisant des molécules chimiques	255
III.	Positionnement du test PGE <sub>2</sub> dans la batterie de tests prédictifs disponibles	259

## **DISCUSSION** **263**

I.	Caractéristique du modèle expérimental U937 PMA/LPS	265
II.	Inhibition par les sensibilisants de contact de la production des prostanoïdes par U937 PMA/LPS : une même signature biologique pour des mécanismes d'action variés	273
III.	Effet des sensibilisants sur l'équilibre des voies de signalisation sous le contrôle des facteurs de transcription Nrf2 et NF-κB dans le modèle U937 PMA/LPS	283
IV.	Le test PGE <sub>2</sub> , performance et positionnement	289
V.	Interprétation biologique de l'inhibition de la production de PGE <sub>2</sub> par les sensibilisants de contact	299

## **CONCLUSION GENERALE** **305**

## **BIBLIOGRAPHIE** **307**

## **ANNEXES** **361**

I.	Annexe 1 : Résultats du test PGE <sub>2</sub>	363
II.	Annexe 2 : Coordonnées de la courbe ROC pour IR <sub>min</sub> de PGE <sub>2</sub> à 24h	371
III.	Annexe 3 : Résultats IR <sub>min</sub> et IR <sub>max</sub> pour marqueurs TNF-α et IL-1β	372
IV.	Annexe 4 : Résultats comparatifs des tests PGE <sub>2</sub> , MUSST, DPRA, Nrf2-HTS	374



## Liste des abréviations

AA : Acide Arachidonique

ABC : ATP Binding Cassette

AC : Adénylate Cyclase

ACD : Allergie de contact

ADN : Acide Desoxyribonucléique

AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien

AKR1C2 : Aldo-Kéto-Réductase famille 1, membre C2

AMPc : Adénylate Mono Phosphate cyclique

AP-1 : Activating Protein 1

APC : Cellule Présentatrice d'Antigène

ARE : Antioxydant Element Response

ARN : Acide Ribonucléique

ASC : Apoptosis-associated peck-like protein

ASK-1 : Apoptosis Signal-regulating Kinase 1

ATF-2 : Activating Transcription Factor 2

ATP : Adenosine Triphosphate

Ca<sup>2+</sup> : Calcium

CaLB : Domaine Calcium-dépendant

CBP : Transcription co-activator CREB binding Protein

CD34-DC : Cellules Dendritiques générées à partir des précurseurs CD34<sup>+</sup>

C/EBP : CCAAT Enhancer Binding Protein-β

CIN : Cinnamaldéhyde

CMH-I et II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I et II

COX : Cyclooxygénase

CRE : cAMP Response Element

CXCL : Cys-X-cys Chemokine Ligand

CXCR : Cys-X-cys Chemokine Receptor

Cys : Cystéine

DAG : Diacylglycerol



DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern  
DC : Cellule Dendritique  
DDC : Cellule Dendritique du Derme  
DHET : Acide Dihydroxyeicosatriénoïque  
DPCP : Diphenylcyclopropenone  
DPRA : Direct Peptide Reactivity Assay (test de peptide binding)  
Dpm : Désintégration par minute  
DNCB : 1-chloro-2,4-dinitrobenzène  
DNFB : 2,4-dinitrofluorobenzène  
DNTB : 2,4-dinitrothiocyanobenzene  
DTNB : 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)

EC : Effective dose Concentration  
E-cad : E-cadhérine  
ECVAM : Centre Européen de Validation des Méthodes Alternatives  
EET : Acide Epoxyeicosatriénoïque  
EGF : Epidermal Growth Factor  
ELK-1 : E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1  
EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay  
EP : Récepteur aux Prostaglandines  
ERK : Extra cellular signal Regulated Kinase  
EUG : Eugénoï

FITC : Isothiocyanate Fluoresceine

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor  
GPMT: Guinea Pig Maximisation Test  
GSH : Glutathion  
GSR : Glutathion Réductase  
GST : Glutathion-S-Transférerase

HCA : Hexyl Cinnamaldéhyde  
hCLAT : Human Cell Line Activation Test



HDAC3 : Histone Déacétylase  
HETE : Acide Hydroxy-Eicosatétraénoïque  
HO-1/HMOX : Heme Oxygénase 1  
HQ : Hydroquinone  
HPETE : acide hydroperoxy-eicosatétraénoïque  
HSRC : Hypersensibilité Retardée de Contact  
HPLC : Chromatographie Liquide de Haute Performance  
HSP : Heat Shock Protein

ICAM-1/CD54 : Intercellular Adhesion Molecule 1  
ICD : Irritant Contact Dermatitis  
IFN : Interféron  
IKK : IκB Kinase  
IL : Interleukine  
IP3 : Inositol-tri-Phosphate  
IRAK : Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase

JNK : c-Jun N terminal Kinase  
KC : Kératinocyte  
Keap1 : Kelch-like ECH associated Protein 1  
KO : Knock Out

LC : Cellule de Langerhans  
LLNA: Local Lymph Node Assay  
LOX / LIPOX: Lipoxygénase  
LPS : Lipopolysaccharide  
LTB<sub>4</sub> / LTC<sub>4</sub> : Leucotriène B<sub>4</sub>/ C<sub>4</sub>  
LT : Lymphocyte T  
LT eff : Lymphocyte T effecteur  
Lys : Lysine

Maf : Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma  
MAPEG : Membrane Associated Protein in Eicosanoid and Glutathion metabolism  
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase



MBD : Membrane Binding Domain  
MD2 : Myeloid Differentiation 2  
MEF2c : Myocyte-specific Enhancer Factor 2C  
MeOH : Méthanol  
MFI : Intensité Moyenne de Fluorescence  
MIP : Macrophage Inflammatory Protein  
MK : Magnusson Kligmann  
MKK/MEK : MAPK Kinase  
MKKK/MEKK : MAPK Kinase Kinase  
MMP : Metalloproteinase  
MoDC : Cellules dendritiques générées à partir de monocytes  
mPGES : Prostaglandine Synthase microsomale  
MRD : Multidrug Resistance Protein  
MRP : Multidrug Resistance related Proteine  
MUSST : Myeloïd U937 Skin Sensitization Test  
MyD88 : Myeloid Differentiation Factor 88

NAC : N-Acétyl-Cystéine  
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
NALP : NACHT, LRR and PYD domains-containing Protein  
NAT : N-Acetyl Transferase  
NEM : N-Ethylmaléimide  
NF-IL6 : Transcriptional regulator Nuclear Factor for Interleukin-6  
NF-κB : Nuclear Factor κ B  
NHEK : Kératinocytes humains normaux  
NiSO<sub>4</sub> : Nickel  
NKT : Cellule T Natural Killer  
NLR : NOD-Like Receptor  
NOD : Nucleotide Oligomerisation Domain  
NQO1 : NADPH Quinone Oxydoréductase  
Nrf-2 : Nuclear Factor-erythroid 2-related factor 2  
NS : Non Sensibilisant

OATP : Organic Anion-Transporting Polypeptide



PAMP : Pathogen-or microbe-Associated Molecular Pattern

PG : Propyl gallate

PGD<sub>2</sub>/E<sub>2</sub>/F<sub>2α</sub>/G<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/I<sub>2</sub> : Prostaglandine D<sub>2</sub>/E<sub>2</sub>/F<sub>2α</sub>/G<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/I<sub>2</sub>

15-dPGJ<sub>2</sub> : 5-deoxy-delta12,14-PGJ<sub>2</sub>

PD-L1 : Programmed cell Death 1 Ligand 1

PGT : Transporteur de Prostanoides

p-i : Pharmacological interaction with Immune receptor

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine Kinase C

PLA<sub>2</sub> : Phospholipase A<sub>2</sub>

PL : Phospholipide membranaire

PLC : Phospholipase C

PMA : Phorbol Myristate Acétate

PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

PPD/pPD : *para*-phénylènediamine

PPR : Pattern Recognition Receptor

PPRE : PPARγ Response Element

(Q)SAR : (Quantitative) Structure Activity Relationship

RANK/RANK-L : Receptor Activator of Nuclear factor kappa-B/Ligand

RANTES/CCL5 : Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted

RE : Reticulum Endoplasmique

ROC : Receiver Operating Characteristic

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène

S : Sensibilisant

SADBE : Acide Squarique Dibutyl Ester

SDS : Dodecyl Sulfate de Sodium

SEM : Erreur Standard à la Moyenne

Ser : Sérine

SFN : Sulforaphane

Sp1 : Specificity Protein 1

SULT : Sulfotransferase



TCR : T Cell Receptor  
Tc : Cellule T cytotoxique  
Teff : Cellule T effectrice  
TGF: Transforming Growth Factor  
Th : T helper / Cellule T auxiliaire  
TIMP : Tissue Inhibitors of Metalloproteinase  
TIRAP : TIR domain containing Adaptor Protein  
TLR : Toll Like Receptor  
TNBS : 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid  
TNCB : 2,4,6-trinitrochlorobenzene  
TNF : Tumor Necrosis Factor  
TRAF : TNF Receptor Associated Factor  
TRIF : TIR-domain-containing adapter-Inducing interferon- $\beta$   
Tr : Cellule T régulatrice  
Treg : Cellule T régulatrice de type CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>  
TRx : Thioredoxine  
TxB<sub>2</sub>: Thromboxane B<sub>2</sub>  
TxBS : Thromboxane Synthase

UGT : UDP-Glucuronosyltransferase  
UV : Ultra-Violet



## Table des illustrations

<b>Figure 1</b> : Structure de la peau	37
<b>Figure 2</b> : Anatomie de la peau et cellules effectrices	41
<b>Figure 3</b> : Oxydation de l'alcool cinnamique en aldéhyde cinnamique	53
<b>Figure 4</b> : Produits d'oxydation de la para-phénylènediamine	55
<b>Figure 5</b> : Représentation schématique de la physiopathologie de l'HSRC	62
<b>Figure 6</b> : Synapse immunologique DC : LT	73
<b>Figure 7</b> : Polarisation de la réponse T par les cytokines des DC	75
<b>Figure 8</b> : Schéma de synthèse des voies de signalisation induites par les sensibilisants de contact dans les DC conduisant à leur maturation	110
<b>Figure 9</b> : Métabolisme de l'acide arachidonique	64
<b>Figure 10</b> : Représentation schématique de la structure primaire de la cPLA <sub>2</sub>	135
<b>Figure 11</b> : Facteurs de transcription régulant l'expression du gène de COX-2	137
<b>Figure 12</b> : Activité catalytique de la COX-2	141
<b>Figure 13</b> : Voies de signalisation induites par les récepteurs EP1,2,3 et 4 de la PGE <sub>2</sub> .	147
<b>Figure 14</b> : Principaux prostanoïdes et leurs effets sur les cellules de l'immunité innée et adaptative	151
<b>Figure 15</b> : Structure chimique des 6 sensibilisants de contact étudiés	171
<b>Figure 16</b> : Principe des boîtes à moustache	195
<b>Figure 17</b> : Principe de construction d'une courbe ROC	197
<b>Figure 18</b> : Effet du DNCB en association avec PMA et PMA/LPS sur la production des médiateurs TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 et PGE <sub>2</sub>	200
<b>Figure 19</b> : Cinétique de libération d'acide arachidonique dans le surnageant de culture des U937 traitées ou non avec PMA et/ou LPS	202
<b>Figure 20</b> : Principales voies métaboliques de l'AA dans les cellules U937 PMA/LPS	204



<b>Figure 21</b> : Quantités de TxB <sub>2</sub> et PGE <sub>2</sub> produites dans le surnageant de culture des cellules U937 traitées ou non avec PMA et/ou LPS	206
<b>Figure 22</b> : Quantité d'acide arachidonique radiomarqué ([ <sup>3</sup> H]AA) dans les cellules U937 traitées ou non avec PMA/LPS en présence ou absence des inhibiteurs BEL et MAFP	206
<b>Figure 23</b> : Expression des gènes <i>ptgs-1</i> (codant pour COX-1) et <i>ptgs-2</i> (codant pour COX-2) dans les cellules U937 traitées ou non avec PMA et/ou LPS	208
<b>Figure 24</b> : Expression des protéines COX-1 et COX-2 dans les cellules U937	208
<b>Figure 25</b> : Quantité de PGE <sub>2</sub> dans les surnageants de culture des cellules U937 traitées avec PMA/LPS en présence ou absence de l'inhibiteur NS-398	209
<b>Figure 26</b> : Quantité de TNF-α, IL-1β, IL-8, IL-6 et IL-10 produites par les cellules U937 traitées avec PMA/LPS en présence ou absence de l'inhibiteur BAY11-7085	210
<b>Figure 27</b> : Expression en cinétique de gènes cibles de Nrf2 ( <i>nqo1</i> , <i>ho-1</i> et <i>akr1c2</i> ) dans les cellules U937 traitées ou non avec PMA et/ou LPS	212
<b>Figure 28</b> : Effet des sensibilisants sur la production de PGE <sub>2</sub> par les DC différenciées à partir de monocytes (moDC) et par les cellules U937	214
<b>Figure 29</b> : Effet de la séquence des traitements sur l'inhibition de la production de PGE <sub>2</sub> par les sensibilisants	240
<b>Figure 30</b> : Effet des sensibilisants sur la répartition de la quantité de PGE <sub>2</sub> dans les fractions intra et extracellulaires des cellules U937 traitées avec PMA/LPS	240
<b>Figure 31</b> : Effet des sensibilisants sur la répartition des métabolites de COX-2 dans les fractions intra et extracellulaires des cellules U937 traitées avec PMA/LPS	242
<b>Figure 32</b> : Effet des sensibilisants sur la quantité de GSH intracellulaire des cellules U937 traitées avec PMA/LPS	244
<b>Figure 33</b> : Effet de la N-Acetyl-Cystéine (NAC) sur l'inhibition de la production de PGE <sub>2</sub> par les sensibilisants	244
<b>Figure 34</b> : Effet des sensibilisants sur la quantité de protéine IκB-α dans les cellules U937 traitées avec PMA/LPS ± sensibilisants	246



<b>Figure 35</b> : Effet des sensibilisants sur la quantité des cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ et IL-6 produites par les cellules U937 traitées avec PMA/LPS	246
<b>Figure 36</b> : Effet du sulforaphane (SFN) sur la production de PGE <sub>2</sub> et l'expression des gènes <i>ptgs-2</i> , <i>nqo1</i> et <i>ho-1</i> par les cellules U937 traitées avec PMA/LPS	248
<b>Figure 37</b> : Effet des sensibilisants sur l'expression relative des gènes <i>nqo1</i> et <i>ho-1</i> dans les cellules U937 traitées avec PMA/LPS	248
<b>Figure 38</b> : Effet des sensibilisants sur la quantité de chimiokine IL-8 produite par les cellules U937 traitées avec PMA/LPS	250
<b>Figure 39</b> : Analyse statistique des données du test PGE <sub>2</sub>	252
<b>Figure 40</b> : Effet dose du PG et de l'EUG sur la production PGE <sub>2</sub> par les cellules U937 traitées avec PMA/LPS	254
<b>Figure 41</b> : Distribution des valeurs d'IR <sub>min</sub> et IR <sub>max</sub> pour les cytokines TNF- $\alpha$ et IL-1 $\beta$ en fonction des potentiels sensibilisants des molécules	256
<b>Figure 42</b> : Représentativité des classes de réactivité de molécules classées S par le test PGE <sub>2</sub> et classées de la même façon ou différemment par la combinaison des 3 autres tests	258
<b>Figure 43</b> : Distribution (« boîtes à moustache ») des pourcentages de déplétion du peptide Cys du test DPRA en fonction de la classe (S vs NS) prédite par le test PGE <sub>2</sub>	260
<b>Figure 44</b> : Schéma de synthèse des effets du PMA et du LPS sur l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et Nrf2 ainsi que sur la synthèse de médiateurs inflammatoires	270
<b>Figure 45</b> : Schéma de synthèse des effets des sensibilisants (CIN, EUG, HQ, PG, PPD et DNCB) sur le métabolisme COX-2 de l'acide arachidonique conduisant à l'inhibition de la PGE <sub>2</sub> produite par les cellules U937 PMA/LPS	281
<b>Figure 46</b> : Schéma de synthèse des interrelation entre Nrf2 et NF- $\kappa$ B et tableau récapitulatif des effets des molécules testées sur chacune des deux voies de signalisation	287
<b>Tableau 1</b> : Fonctions chimiques électrophiles des haptènes, mécanismes de réaction associés en présence d'un nucléophile (Nu) et adduits formés.	59



<b>Tableau 2</b> : Principales activités biologiques des eicosanoïdes	127
<b>Tableau 3</b> : Protocole UHPLC	187
<b>Tableau 4</b> : Conditions d'élution UHPLC	187
<b>Tableau 5</b> : Phénotype des cellules U937 traitées ou non avec PMA et/ou LPS	202
<b>Tableau 6</b> : Quantité d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$ , d'IL-8, d'IL-6 et d'IL-10 dosées à 24h dans le milieu de culture des cellules U937 traitées avec PMA ou LPS	210
<b>Tableau 7</b> : Performances prédictives du test PGE2 : statistiques de Cooper	252
<b>Tableau 8</b> : Distribution des valeurs d'EC(40) en fonction des potentiels sensibilisants des molécules, détermination de seuils	254
<b>Tableau 9</b> : Performances individuelles des tests MUSST, DPRA, Nrf2-HTS et PGE2	256
<b>Tableau 10</b> : Matrice de corrélation des prédictions du caractère sensibilisant (S vs NS) des tests DPRA, MUSST et Nrf2-HTS par rapport au test PGE2	258
<b>Tableau 11</b> : Tableau comparatif des prédictions des tests PGE2, MUSST, DPRA, Nrf2 et LLNA	297



## **INTRODUCTION GENERALE**



## Contexte de la thèse

L'allergie retardée de contact, réaction inflammatoire cutanée d'origine immunitaire dirigée contre une molécule chimique appelée sensibilisant de contact, est relativement répandue au sein des maladies professionnelles des pays industrialisés et en ce sens, son impact socio-économique est important. Ainsi, il est indispensable pour garantir la sécurité des consommateurs et des travailleurs de pouvoir évaluer le potentiel sensibilisant de nouvelles molécules. Actuellement, les toxicologues basent leur évaluation du risque sur des données animales issues de tests réglementaires *in vivo*, tels que le test du « Local Lymph Node Assay » (LLNA) réalisé chez la souris, capable de prédire et quantifier le potentiel sensibilisant (extrême, fort, modéré, faible) de molécules chimiques. Toutefois, le 7<sup>ième</sup> amendement de la directive cosmétique européenne, qui interdit à partir de 2013 l'utilisation des tests sur animaux pour l'évaluation toxicologique d'ingrédients cosmétiques, rend urgent et impératif le développement de tests alternatifs pour prédire le potentiel sensibilisant de molécules. A l'heure actuelle, un certain nombre de tests *in silico* / *in vitro*, modélisant les événements précoces de l'allergie retardée de contact sont développés. Ces tests simples comparativement à la complexité des mécanismes immunologiques mis en jeu dans l'allergie, ont montré leur efficacité pour la détection des molécules sensibilisantes (détection du danger : sensibilisant *versus* non sensibilisant). Certains d'entre eux sont aujourd'hui en pré-validation au Centre Européen de Validation des Méthodes Alternatives (ECVAM) et sont utilisés chez L'Oréal en interne depuis de nombreuses années, dans l'évaluation amont de la sensibilisation, en soutien au développement de nouvelles molécules. Toutefois, la quantification du potentiel sensibilisant reste encore limitée et certains paramètres actuellement manquants dans la batterie de tests (pénétration, métabolisme, inflammation...) pourraient permettre une appréciation plus quantitative de ce potentiel.

De par leur réactivité chimique, les sensibilisants de contact ont la capacité d'induire un « signal de danger » déclenchant, au sein de la peau, une cascade d'événements conduisant à la production de médiateurs inflammatoires. Ce signal est déterminant pour la maturation des cellules dendritiques (DC) et la mise en place de la réponse immunitaire spécifique qui suit. Les cytokines/chimiokines produites par la peau en réponse à des sensibilisants (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) sont bien décrites (Enk and Katz, 1992). Par ailleurs, on sait que les médiateurs lipidiques et notamment la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) jouent un rôle déterminant dans la maturation des DC (Harizi and Gualde, 2005) mais à l'heure actuelle, très peu d'éléments sont décrits concernant les effets des sensibilisants sur la production de prostaglandines.



Ainsi, dans la perspective d'enrichir la batterie de tests *in vitro* déjà existants avec des tests mettant en jeu des marqueurs complémentaires, nous nous sommes intéressés à étudier comment les sensibilisants modulent la production de médiateurs inflammatoires et notamment les médiateurs lipidiques de type prostaglandines.

Au cours de cette thèse, notre objectif a été de caractériser les mécanismes d'action des sensibilisants de contact sur le métabolisme de l'acide arachidonique (AA) conduisant à la production de prostaglandines. En parallèle de cette étude mécanistique, nous avons cherché à évaluer, sur la base d'une étude statistique, dans quelle mesure l'effet des sensibilisants sur la production de PGE<sub>2</sub> corrèle avec le potentiel sensibilisant des molécules et nous avons tenté de préciser le positionnement de ce nouveau marqueur PGE<sub>2</sub> par rapport aux autres tests actuellement utilisés pour la prédiction de l'allergie de contact.

La première partie de ce mémoire est une revue bibliographique des différents éléments relatifs à notre travail. Après une description de la peau, nous aborderons les principaux événements cellulaires impliqués dans l'allergie de contact. Dans un deuxième temps, nous détaillerons les voies de signalisation induites par les sensibilisants et la traduction de cette connaissance dans les tests *in silico/ in vitro* en cours de développement. Enfin, nous présenterons le métabolite lipidique PGE<sub>2</sub> avec un intérêt particulier sur ses fonctions immunomodulatrices.

La seconde partie de ce mémoire est composée de travaux de recherche comprenant 1) une caractérisation du modèle expérimental, 2) l'étude mécanistique de l'effet des sensibilisants sur le métabolisme de l'acide arachidonique présenté sous la forme d'un article paru dans « Toxicology and Applied Pharmacology » et de résultats complémentaires et 3) une analyse statistique du test PGE<sub>2</sub> et sa mise en œuvre dans un test de détection du potentiel sensibilisant.

Enfin, la dernière partie de cette thèse présente une discussion des résultats obtenus et les diverses perspectives de notre travail de recherche dans la construction d'une batterie de tests alternatifs à l'expérimentation animale pour l'industrie cosmétique.



## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**



## Partie I : L'allergie retardée de contact

### I. La peau, un organe de l'immunité

#### A) Organisation de la peau

La peau est une barrière anatomique vivante, interface entre l'environnement extérieur et l'organisme. Elle constitue ainsi la première ligne de défense à de diverses agressions (UV, pathogènes, xénobiotiques...).

La peau est constituée de nombreux types cellulaires différents, pourvus de fonctions spécifiques et variées suivant leur localisation. Comme présenté dans la figure 1, elle est organisée en trois couches principales (de l'extérieur vers l'intérieur : l'épiderme, le derme et l'hypoderme) traversées par des terminaisons nerveuses ainsi que par différents appendices, tels que le follicule pileux ou la glande sébacée que nous ne détaillerons pas ici.

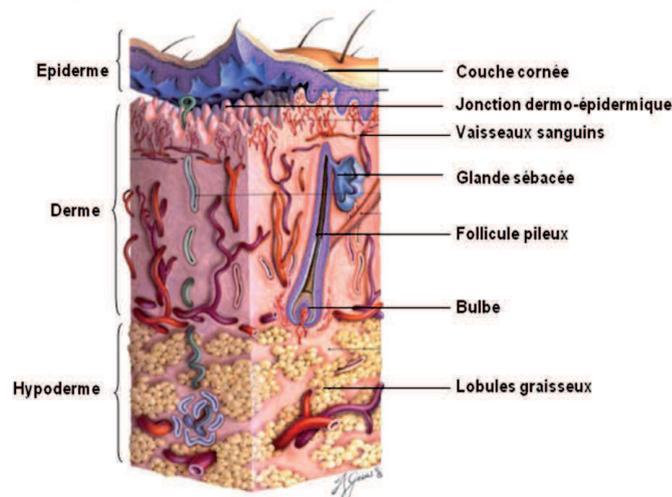


Figure 1 : Structure de la peau

- L'épiderme, composé de la couche cornée et de l'épiderme vivant, est la couche la plus superficielle de la peau. Il s'agit d'un épithélium de revêtement, stratifié, pavimenteux comportant principalement des kératinocytes (KC). Il assure une protection mécanique, chimique (sueur et sébum) et physiologique contre les agressions physiques, comme celles du soleil, chimiques ou infectieuses. On peut décomposer l'épiderme en quatre couches distinctes (fig. 2) : la couche basale (*stratum basale*), au dessus de la jonction dermo-épidermique, la couche épineuse (*stratum spinosum*), la couche granuleuse



(*stratum granulosum*) et la couche cornée (*stratum corneum*). Les KC prolifèrent au niveau de la couche basale, puis se différencient en progressant vers la couche cornée, tout en synthétisant la kératine. Au niveau de la couche cornée, couche superficielle de l'épiderme, les KC sont différenciés en cornéocytes, cellules plates sans noyau, attachées les unes aux autres par les cornéodesmosomes. La cohésion et la souplesse de l'ensemble sont renforcées par une couche imperméable de lipides (céramides, cholestérol, acides gras). Au-delà des kératinocytes, l'épiderme est constitué de mélanocytes (responsables de la pigmentation), des cellules de Merkel, exprimant des marqueurs de cellules nerveuses et des cellules de Langerhans (LC), cellules de l'immunité dont les caractéristiques seront détaillées ci-dessous.

- le derme, couche inférieure de la peau, correspond à un tissu conjonctif de soutien, dix à quarante fois plus épais que l'épiderme (fig. 1). Il est séparé de l'épiderme par la jonction dermo-épidermique. Il comprend des cellules entourées d'une abondante matrice extracellulaire, constituée de mucopolysaccharides, de fibres élastiques, de collagène et de réticuline. L'ensemble est richement vascularisé et innervé. Le derme est constitué de plusieurs types de cellules résidentes : d'une part les fibroblastes qui produisent le collagène et d'autre part, les cellules de l'immunité dont les cellules dendritiques [composées des cellules dendritiques du derme (DDC) et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)], les mastocytes, les macrophages, les lymphocytes T (LT), les cellules NKT (Natural Killer T cells) ou encore les granulocytes (fig. 2). Le derme est également le lieu de transit de LC migrant de l'épiderme pour rejoindre les vaisseaux lymphatiques ainsi que des précurseurs de LC migrant vers l'épiderme.
- l'hypoderme, la couche la plus profonde, joue un rôle énergétique important. Il est constitué d'un réseau collagénique définissant des alvéoles renfermant des lobules graisseux produits par des cellules appelées adipocytes. Par l'hypoderme arrive un réseau vasculaire important (veineux, artériel et lymphatique) (fig. 1).



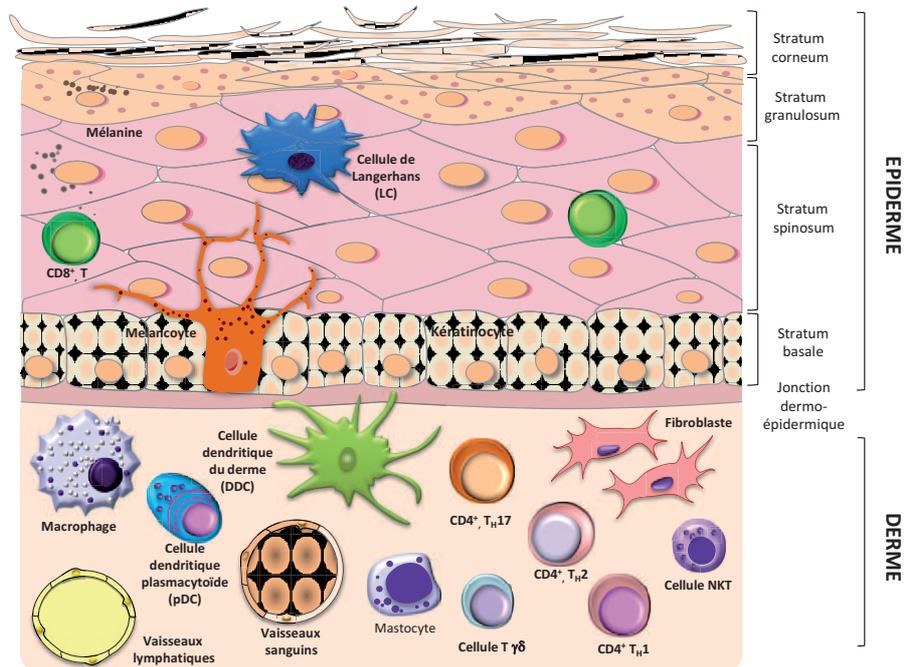


Figure 2 : Anatomie de la peau et cellules effectrices (Nestle *et al.*, 2009)

Les cellules spécialisées de l'épiderme comprennent les mélanocytes qui produisent la mélanine et les cellules de Langerhans (LC). On trouve également quelques cellules T pour la plupart des cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Le derme contient de nombreuses cellules spécialisées : des sous-populations de cellules dendritiques (DC) incluant les cellules dendritiques du derme (DDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et des sous-populations de cellules T incluant des T auxiliaires « helper » Th1, Th2 et Th17, des cellules T  $\gamma\delta$  et des « natural killer » T (NKT). Au-delà, les macrophages et les fibroblastes sont présents. Les vaisseaux lymphatiques et sanguins sont présents dans le derme.

## B) Les acteurs immunitaires de la peau

De par sa composition, la peau constitue une barrière mécanique et immunologique efficace contre les agressions extérieures telles que les rayonnements UV, les xénobiotiques (polluants, allergènes) ainsi que les infections diverses (bactéries, parasites, virus, champignons). Le système de défense immunitaire spécialisé de la peau regroupe des acteurs cellulaires résidents (kératinocytes, cellules dendritiques, fibroblastes, mastocytes, macrophages, cellules endothéliales) ou recrutés (lymphocytes/granulocytes) ainsi qu'une grande variété de médiateurs inflammatoires solubles (cytokines, chimiokines). Par ses différents composants cellulaires, matriciels et facteurs solubles, elle assure le maintien de l'homéostasie et la défense de l'organisme contre les agressions extérieures. Dans la suite de ce chapitre nous détaillerons



le rôle de certains acteurs cellulaires résidents : les kératinocytes, les cellules dendritiques et les macrophages.

### 1) Les kératinocytes

Au-delà de leur rôle dans la structure de la peau, les KC jouent un rôle central dans l'immunité innée de ce tissu (Williams and Kupper, 1996). Tout d'abord les KC sont capables de produire des protéines anti-microbiennes (cathélicidines et défensines), qui assurent une première ligne de défense en agissant directement sur les pathogènes extérieurs. Ensuite, en tant que principale source de cytokines de la peau, les KC assurent le recrutement et l'activation des cellules hématopoïétiques (DC, neutrophiles...) en produisant un large panel de cytokines (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6), chimiokines (IL-8, IP-10/CXCL-10, MCP-1/CCL-2, MIP-3 $\alpha$ /CCL-20, MIP-1 $\alpha$ /CCL-3) et facteurs de croissance (GM-CSF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) qui sont synthétisés de façon constitutive ou en réponse à des stimuli externes non spécifiques tels les rayons UV et les substances chimiques, ou par des composants bactériens et viraux, reconnus par des récepteurs spécifiques [par ex. les récepteurs de type toll (TLR)], voire par d'autres cellules (cellules T, macrophages...).

Au-delà de ces médiateurs, lorsqu'ils sont stimulés par l'IFN- $\gamma$  (interféron- $\gamma$ ), les KC peuvent exprimer le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) qui leur confère des caractéristiques de cellules présentatrices d'antigènes (APC) et leur permet, en plus du CMH-I constitutif, de présenter de manière plus complète des antigènes aux cellules T. D'autre part, la molécule d'adhésion ICAM-1 (« Intercellular Adhesion Molecule-1 », CD54), leur permet l'adhésion des LT (Dustin *et al.*, 1988) et des molécules de co-stimulation dont PD-L1 (« Programmed cell death 1 ligand 1 ») semblent impliquées dans l'induction de la tolérance (Cao *et al.*, 2003).

### 2) Les cellules dendritiques cutanées (DC)

Les DC, cellules sentinelles, sont définies pour leur capacité à 1) percevoir les signaux de danger et capter antigènes de leur environnement (Gallucci and Matzinger, 2001), 2) apprêter et transporter ces antigènes vers les organes lymphoïdes secondaires 3) présenter les antigènes aux LT naïfs et stimuler ces derniers. Ainsi, les DC constituent un véritable lien entre les systèmes immunitaires inné et acquis en participant à l'élaboration d'une réponse adaptative qui se traduira soit par réponse immune tolérogène soit par une réponse immune effectrice (Banchereau and Steinman, 1998). Pour ce faire, les DC possèdent un ensemble de récepteurs qui leur permettent d'analyser en permanence leur environnement [récepteurs de type PPR



(« Pattern recognition Receptor») tels les TLR, lectines de type C : CD207, DEC-205 (CD205), CD206, DC-SIGN (CD209)], de migrer en réponse à des chimiokines (CCR6, CCR7...) et en tant qu'APC elles expriment les molécules de CMH et notamment le CMH-II fortement induit au cours de leur activation. Il existe différentes populations de DC dont les deux principales qui se distinguent par leur localisation sont les cellules de Langerhans (LC) de l'épiderme et les cellules dendritiques du derme (DDC).

Les LC sont situées en position suprabasale de l'épiderme. Leur corps cellulaire de forme étoilée se prolonge par de longues dendrites qui leur permettent d'être en contact entre elles, d'entourer les KC et de capturer les corps étrangers qui auraient franchi la barrière cutanée (*stratum corneum*). Les LC humaines sont caractérisées par l'expression d'une lectine de type C, la Langerin (CD207) et par une forte expression de surface des molécules CD1a, CD1c et CD11c ainsi que par la présence de granules de Birbeck. Ces granules formés à partir d'invagination de la membrane cytoplasmique semblent être impliqués dans le transport intracellulaire et l'apprêtement des antigènes internalisés (Stossel *et al.*, 1990).

Les DDC constituent une population hétérogène : chez l'homme l'expression de la lectine DC-SIGN/CD209 distingue les DC des autres populations du derme (Geijtenbeek *et al.*, 2000; Turville *et al.*, 2002). Chez la souris on distingue 5 sous-populations de DDC selon certains critères phénotypiques (Henri *et al.*, 2010).

### 3) Les macrophages

Les macrophages résidents dans le derme dérivent de monocytes du sang. Une fois fixés dans les tissus, les macrophages revêtent des aspects cytologiques et des fonctions distinctes de celles des monocytes. Les monocytes/macrophages, issus de précurseurs myéloïdes, représentent une famille hétérogène par leur morphologie et leur localisation, assurant des fonctions de phagocytose (élimination des microorganismes, cellules apoptotiques, complexes immuns, débris cellulaires...) et de présentation de l'antigène. Les macrophages expriment des marqueurs spécifiques (CD68, CD11b, CD14) et en tant qu'APC ils expriment également le CMH-II. Ils synthétisent un très grand nombre d'enzymes dont la peroxydase et l'hydrolase, expriment plusieurs classes de TLR et sont capables de sécréter diverses cytokines inflammatoires. Les macrophages dermiques sont des acteurs essentiels des processus inflammatoires : dans les maladies inflammatoires cutanées comme le psoriasis, les macrophages sont présents en grand nombre dans la peau (van den Oord and de Wolf-Peeters, 1994). Par ailleurs, ils interviennent aussi dans les phénomènes de réparation et de cicatrisation.



### C) La peau, première ligne de défense vis-à-vis des signaux de danger

Ainsi lors d'une agression extérieure comme une blessure, une infection ou une exposition à des xénobiotiques, différents niveaux de défense sont mobilisés : la couche cornée constitue la première barrière. Lorsque celle-ci est traversée et/ou altérée, les cellules et médiateurs de l'immunité innée sont mobilisés pour assurer une reconnaissance rapide des signaux de danger et les éliminer. Lorsque ce deuxième niveau est dépassé, une réponse inflammatoire est alors mise en place par les cellules résidentes de l'épiderme et du derme, induisant le recrutement de cellules immunitaires circulantes (monocytes, leucocytes...). Enfin dans certains cas, le système immunitaire adaptatif mémoire est activé par les DC, qui en tant qu'interface entre les deux systèmes inné et acquis ont la capacité d'orienter la réponse immunitaire. Lorsque les interactions entre le système immunitaire inné et acquis sont appropriées cela conduit à une reconnaissance et une élimination efficace des pathogènes. Toutefois, dans certains cas les interactions entre les deux systèmes conduisent à des réponses immunologiques exacerbées comme dans les cas d'allergie ou d'auto-immunité.

Ainsi, dans la suite de ce chapitre nous allons développer le cas de l'allergie de contact (ACD).



## II. Allergie retardée de contact : épidémiologie et mécanismes

### A) Description générale et épidémiologie

L'allergie de contact [« Allergic contact dermatitis » (ACD)], allergie de type IV, encore appelée hypersensibilité retardée de contact (HSRC) est une pathologie inflammatoire de la peau, relativement répandue dans les pays industrialisés notamment parmi les maladies professionnelles, et en ce sens, son impact socio-économique est important. Elle est caractérisée cliniquement par un eczéma de contact résultant de l'application sur la peau de molécules chimiques sensibilisantes. Contrairement aux phénomènes d'irritation, qui sont l'expression des effets toxiques et pro-inflammatoires de xénobiotiques, l'ACD est une réaction immunologique à médiation cellulaire, engendrée par une réponse spécifique mémoire dirigée contre la molécule donnée. Cette réaction, causée par des molécules chimiques de faible poids moléculaire, plutôt lipophiles, fortement réactives, appelées haptènes, se déroule en deux temps : la première phase, dite de sensibilisation est asymptomatique et aboutit à la génération de cellules mémoires, spécifiques du sensibilisant. Lors des contacts suivants avec le sensibilisant, la deuxième étape, appelée élicitation/révélation, conduit à l'apparition de l'eczéma de contact survenant entre 6 et 96 heures après l'exposition à la molécule.

En Europe, environ 20% de la population générale souffre d'ACD à au moins un sensibilisant de contact. Parmi les causes les plus communes d'ACD, on trouve l'exposition au nickel, aux parfums, aux conservateurs, aux colorants capillaires et aux antibiotiques appliqués topiquement. Plus de 4000 molécules sont connues pour être des sensibilisants de contact. L'ACD compte parmi les premières maladies professionnelles dans de nombreux pays avec un taux d'incidence annuelle de 0.5-1.9‰ (Diepgen and Coenraads, 1999; Diepgen *et al.*, 2003). Dans le domaine professionnel on peut citer comme exemple de substances sensibilisantes certains composants des ciments, les amines aromatiques, le formaldéhyde, les amines aliphatiques ou encore les résines époxy. Les professions les plus touchées sont les métallurgistes, les coiffeurs, les agents d'entretien ou encore le milieu médical. L'allergie la plus fréquente dans la population générale est l'allergie au nickel, métal répandu dans la vie courante (bijoux fantaisie, boucles de ceinture...). La sensibilisation au nickel est observée chez 10 à 25% de la population générale suivant les pays, selon l'exposition de la population à cette molécule.

Il apparait qu'un haptène donné ne va pas sensibiliser tous les individus de la même manière, ni dès la première exposition et, entre les individus, pour un même haptène les manifestations



cliniques peuvent présenter des intensités diverses. Un certain nombre de facteurs peuvent expliquer ces différences (altération de la barrière cutanée, exposition, facteur génétique au niveau des enzymes du métabolisme des xénobiotiques...) (Peiser *et al.*, 2011). Ainsi, par exemple, il existe une plus forte prévalence d'ACD chez des patients atteints d'ulcères variqueux dont la fonction barrière au niveau des lésions est altérée, ce qui amplifie l'exposition aux différents haptènes contenus dans les traitements topiques (conservateurs, antibiotiques...) (Machet *et al.*, 2004).

Il existe également des différences de force entre les différents haptènes : le DNCB (1-chloro-2,4-dinitrobenzène), par exemple, est connu pour sensibiliser dès la première application 100% des individus alors que l'on sait que dans le cas du nickel, malgré une forte exposition, seulement 10-20% des individus sont sensibilisés et le plus souvent seulement après plusieurs contacts.

### B) Manifestation clinique

Cliniquement, l'eczéma de contact se présente sous forme d'érythème et d'œdème de l'épiderme avec des lésions prurigineuses. Ces lésions, initialement localisées au niveau du site de contact du sensibilisant (Krasteva *et al.*, 1999) sont difficilement différenciables des lésions provoquées par une molécule irritante. Néanmoins contrairement à la dermatite d'irritation, l'ACD est souvent accompagnée d'un important prurit. Dans sa phase aiguë, des papules, vésicules et suintements peuvent apparaître. Dans le cas d'un eczéma chronique, la peau devient fissurée, lichénifiée et pigmentée (Saint-Mezard *et al.*, 2004). Sur le plan histologique, l'événement le plus commun de la phase aiguë de l'eczéma de contact est la spongiose épidermique, qui résulte d'un œdème intracellulaire. Des vésicules se forment pouvant rompre la surface épidermique, les vaisseaux papillaires du derme sont dilatés, entourés d'infiltrats lympho-monocytaires, constitués essentiellement de lymphocytes, de macrophages et de polynucléaires éosinophiles et neutrophiles (Komura *et al.*, 1980). Quelques jours après l'application de l'haptène, les vésicules intercellulaires se rompent, provoquant un suintement épidermique. Après plusieurs jours, les KC sont vacuolisés, présentent des noyaux pycnotiques et leur différenciation altérée aboutit à la formation des squames.

Après cette introduction générale sur l'ACD, nous allons dans la suite de cette partie décrire les mécanismes cellulaires impliqués dans son développement en partant de la molécule sensibilisante, l'haptène.



## C) L'haptène

### 1) Les caractéristiques physico-chimiques générales des haptènes

Les haptènes sont des molécules de faible poids moléculaire (<1000 Da), suffisamment lipophiles pour être capables de pénétrer la couche cornée de la peau, mais trop petites pour être immunogènes par elles-mêmes. De par leur réactivité chimique (électrophilie), elles réagissent avec des résidus nucléophiles des protéines de la peau et les modifient (Landsteiner and Jacobs, 1935). Le complexe antigénique ainsi formé (complexe haptène-protéine) est à l'origine du phénomène de sensibilisation puisqu'il est alors pris en charge par les APC et présenté, en tant que peptide du soi modifié, aux cellules T engendrant une réponse immunitaire.

### 2) Le concept de pro-haptène et de pré-haptène

Dans la plupart des cas les sensibilisants de contact possèdent un caractère intrinsèque électrophile marqué et sont appelés les haptènes vrais. Cependant de nombreuses molécules ne contiennent pas cette fonction chimique réactive mais l'acquièrent lors des processus de transformation. Selon que le processus nécessite ou non la contribution d'un système métabolique ces composés sont qualifiés de pro ou de pré-haptènes.

Dans le cas des pro-haptènes, les processus de détoxification cutanée, impliquant les isoenzymes cytochrome P450, les époxydes hydrolases, les transférases, les réductases ou les peroxydases peuvent dans certains cas être responsables de la formation de nouvelles espèces chimiques très réactives. La molécule qui était au départ non sensibilisante devient alors un haptène vrai, donc sensibilisante. C'est le cas de l'alcool cinnamique, utilisé en parfumerie qui n'est pas un sensibilisant mais dont le produit d'oxydation, l'aldéhyde cinnamique (cinnamaldéhyde), contient une fonction aldéhyde réactive, sensibilisante (fig. 3).

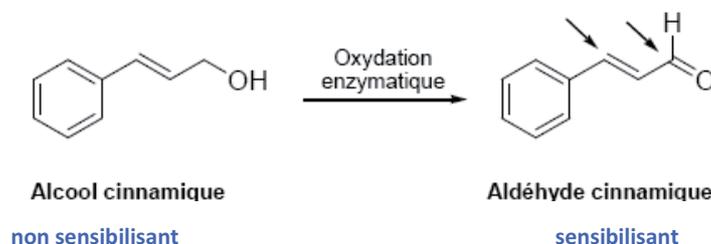


Figure 3 : Oxydation de l'alcool cinnamique en aldéhyde cinnamique  
Les flèches indiquent les positions réactives.



Le terme de pré-haptène, introduit par Lepoittevin (2006), désigne des molécules initialement non réactives vis-à-vis des protéines et qui n'ont pas besoin d'être prises en charge par un système métabolique pour devenir des haptènes vrais (Lepoittevin, 2006). A titre d'exemple simple, de nombreux terpènes non sensibilisants comme le *d*-limonène, présents dans les agrumes, peuvent donner des hydroperoxydes sensibilisants après oxydation par l'air (Karlberg *et al.*, 1994). Un autre exemple plus complexe est le cas de la *para*-phénylènediamine (PPD), utilisée dans la composition de colorants comme les teintures capillaires, les colorants pour textiles et les colorants incorporés dans les caoutchoucs, qui est rapidement oxydée à l'air favorisant la formation d'un ensemble de molécules réactives (fig. 4).

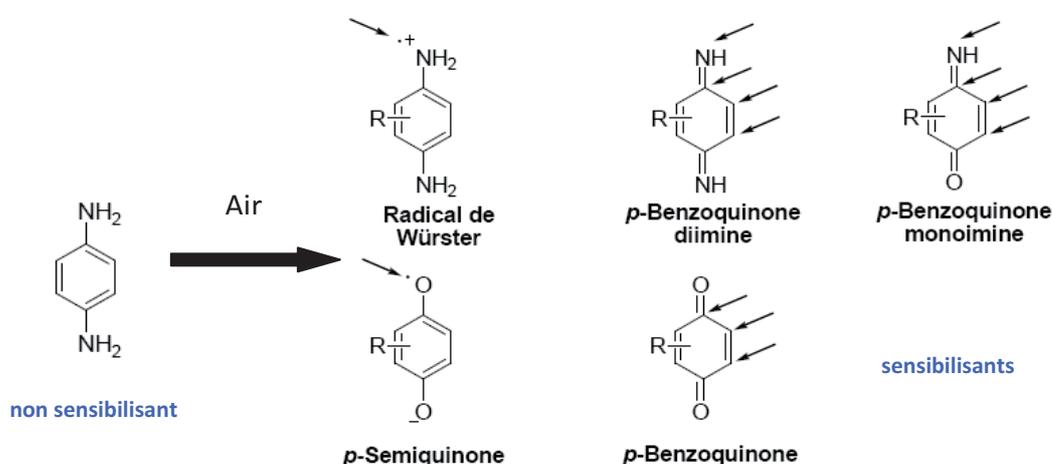


Figure 4 : Produits d'oxydation de la *para*-phénylènediamine

Les flèches indiquent les positions réactives

### 3) Réactivité des haptènes

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

#### a) Liaisons covalentes

L'étude chimique d'un grand nombre de sensibilisants de référence [DNFB (2,4-dinitrofluorobenzène); DNCB (1-chloro-2,4-dinitrobenzène); HCA (Héxyl cinnaldéhyde)...] indique que dans la grande majorité des cas, une liaison covalente se forme entre l'haptène et la protéine, selon un mécanisme classique à deux électrons du type nucléophile-électrophile. De nombreux acides aminés constituant les protéines possèdent sur leurs chaînes latérales des



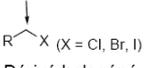
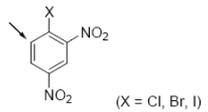
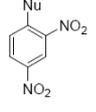
groupes nucléophiles riches en électrons, susceptibles d'interagir avec les haptènes. Les plus couramment cités sont la lysine (Lys) et la cystéine (Cys), mais l'histidine, la méthionine, la tyrosine, le tryptophane ou l'arginine, possédant tous des hétéroatomes nucléophiles, peuvent également être impliqués dans ce type de réaction. Le tableau 1 synthétise les principales fonctions chimiques électrophiles des molécules sensibilisantes, le mécanisme de réaction avec les fonctions nucléophiles des protéines et les différents adduits susceptibles de se former. Ainsi, les principales réactions impliquées dans la formation de liaisons covalentes entre les haptènes et les résidus protéiques peuvent être classées en 3 groupes :

- les réactions de substitution nucléophile sur un centre saturé (dérivés halogénés, époxydes) ou insaturé (dérivés halogénés aromatiques, esters) (Divkovic *et al.*, 2005).
- les réactions d'addition sur une fonction carbonyle ou réaction de condensation (dérivés carbonylés) (Tracey and Shuker, 1997).
- les réactions d'addition nucléophile de type Michael 1, 4 (système  $\alpha$ ,  $\beta$ , insaturés).



Tableau 1: Fonctions chimiques électrophiles ( $\searrow$ ) des haptènes, mécanismes de réaction associés en présence d'un nucléophile (Nu) et adduits formés.

Légende : Les flèches indiquent les centres nucléophiles ; Nu : résidus nucléophiles d'acides aminés.

Sites réactifs électrophiles	Mécanismes de réaction	Adduits formés
 Dérivé halogéné (X = Cl, Br, I)	Substitution nucléophile sur un centre saturé	$R-CH_2-Nu$
 Dérivé halogéné aromatique (X = Cl, Br, I)	Substitution nucléophile aromatique	
 Epoxyde	Substitution nucléophile sur un centre saturé	
Ester : $R' = OR''$ Amide : $R' = NHR''$ 	Substitution nucléophile sur un centre insaturé	$R-C(=O)-Nu$
Aldéhyde : $R' = H$ Cétone : $R' = \text{alkyle, aryle}$	Addition nucléophile	$R-C(OH)(Nu)-R'$
 Systèmes carbonyle $\alpha,\beta$ -insaturés	Addition nucléophile de type Michael	
 Lactone, lactame (X = O, NH)	Substitution nucléophile sur un centre insaturé	$HX-CH_2-CH_2-CH_2-C(=O)-Nu$

Récemment, il a également été montré que des liaisons covalentes peuvent être formées par des réactions via la génération de radicaux libres (Karlberg *et al.*, 2008).

### b) Liaisons de coordination

Les liaisons de coordination sont souvent associées aux allergies aux sels de métaux (Ni, Cr, Co, etc...). Ces métaux forment des liaisons de coordination suffisamment stables pour être reconnues par le système immunitaire (Thierse *et al.*, 2005). Le nickel possède en effet six sites de coordination dont trois sont connus pour former un pont entre le récepteur spécifique des cellules T (TCR) et les molécules de CMH des DC.



Ainsi nous venons de décrire les différents mécanismes physico-chimiques conduisant à la formation d'un complexe haptène-protéine antigénique. Nous allons ensuite détailler les principaux mécanismes de l'ACD.

#### D) Les mécanismes cellulaires de l'allergie retardée de contact

Comme décrit précédemment (II.A), la réaction d'allergie de contact est une réaction biphasique (Enk and Katz, 1992; Krasteva *et al.*, 1999): une première phase de sensibilisation suivie d'une phase d'élicitation appelée aussi révélation. Nous allons ici décrire les grands événements cellulaires impliqués dans chacune des phases pour ensuite développer la partie résolution cellulaire de l'allergie de contact.

L'ensemble de ces événements sont schématisés dans la figure de synthèse (fig. 5) à laquelle nous nous référerons à chacune des étapes. Dans l'ensemble de ce chapitre le terme de DC sera utilisé de façon générique pour définir aussi bien les LC que les DDC. Nous n'aborderons en effet pas précisément la question du rôle respectif de chacune de ces sous-populations de DC dans l'ACD.

Figure 5 : Représentation schématique de la physiopathologie de l'HSRC. (Vocanson *et al.*, 2009)

**A) Phase de sensibilisation :**

- 1) L'haptène pénètre dans la peau, modifie les protéines induisant l'activation des cellules de l'immunité innée conduisant notamment à la production de médiateurs inflammatoires (IL-18, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, ATP, ROS, histamine, LTB<sub>4</sub>) par les cellules résidentes cutanées.
- 2) Recrutement rapide de leucocytes des vaisseaux dont des monocytes CCR2<sup>+</sup> qui vont se différencier en DC
- 3) Activation/maturation/migration des DC hapténisées (résidentes dermiques et épidermiques, recrutées par précurseurs de DC) vers le ganglion lymphatique accompagnés de changement phénotypiques [molécules d'adhésion (augmentation CD54, diminution E-cadhérine), molécules de co-stimulation (induction CD86, CD80, CD83), augmentation CMH-II, récepteurs aux chimiokines (diminution CCR6, augmentation CCR7), induction MMP-2/9...]
- 4) Dans le ganglion, activation par les DC matures de cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'haptène (produisant IFN- $\gamma$  et/ou IL-17). Les LT se différencient et prolifèrent pour former des LT mémoires.
- 5) Contrôle de l'activation des LT CD8<sup>+</sup> par les Treg (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>)
- 6) Migration des LT CD8<sup>+</sup> et des CD4<sup>+</sup> du ganglion vers le sang et recirculation des LT spécifiques de l'haptène.

**B) Phase d'élicitation :**

- 7) Une nouvelle exposition de l'haptène est suivie de l'hapténisation des protéines de la peau et de l'activation des cellules de l'immunité innée avec la même séquence d'évènements que décrits plus haut, production de médiateurs inflammatoires (IL-18, IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, ATP, histamine) par les cellules résidentes cutanées et des chimiokines CCL2, CCL5, CCL20
- 8) Recrutement de leucocytes du sang dont les LT mémoires spécifiques de l'haptène dès 6-12h
- 9) Activation des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'haptène (produisant IFN- $\gamma$ , IL-17 et TNF- $\alpha$ ) par cellules de la peau présentant l'haptène via le CMH I
- 10) Les LT induisent l'apoptose des kératinocytes via les activités cytotoxiques Fas/FasL et perforine/granzyme
- 11) Libération de nouveaux médiateurs inflammatoires (CXCL9, CXCL-10) par cellules résidentes, en particulier les mastocytes (TNF- $\alpha$ , IL-8) ce qui induit une seconde vague de leucocytes, neutrophiles, NK cell et Treg (notamment via CXCR3) qui amplifient la réponse inflammatoire
- 12) Apparition de l'eczéma de contact (24-48h)

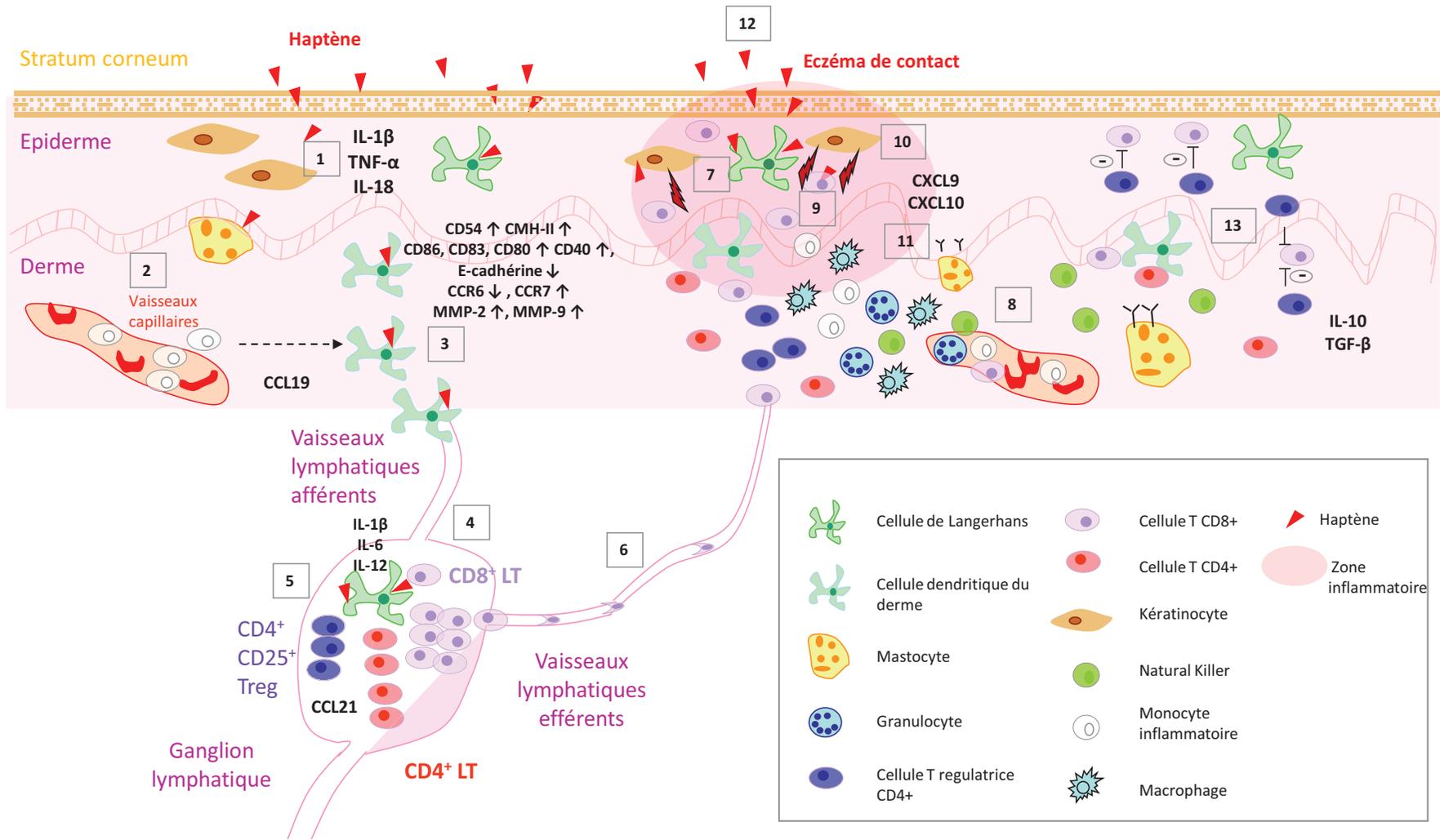
**C) Phase de résolution :**

- 13) Résolution progressive des lésions eczémateuses suite à l'intervention de LT CD4<sup>+</sup> régulateurs (Tr1 produisant de l'IL-10 ou Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>)

**A PHASE DE SENSIBILISATION**

**B PHASE D'ELICITATION**

**C PHASE DE RESOLUTION**





## 1) Phase de sensibilisation

Lorsque l'haptène pénètre par son côté lipophile dans les couches superficielles de l'épiderme, il réagit avec des protéines pour former un complexe haptène-protéine internalisé par les cellules dendritiques. Au contact de l'haptène avec la peau, les DC sont activées et subissent un certain nombre de modifications morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles, conduisant à leur maturation ainsi qu'à leur migration. L'ensemble de ces événements fortement liés les uns aux autres, se déroulent en parallèle et sont appelés événements pré-immuns.

Une fois arrivé dans la zone paracorticoïde des ganglions lymphatiques, l'haptène est présenté via les molécules du CMH-I et II aux LT naïfs (Weltzien *et al.*, 1996), conduisant à la prolifération de cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> mémoires spécifiques de l'haptène (Xu *et al.*, 1996). Les lymphocytes ainsi activés émigrent du ganglion lymphatique via les vaisseaux sanguins et circulent entre la peau et les organes lymphoïdes. Cette phase de sensibilisation dure de 10 à 15 jours chez l'homme et entre 5 et 7 jours chez la souris mais reste silencieuse sur le plan clinique. L'ensemble des grandes étapes de la phase de sensibilisation sont détaillées ci-dessous.

### a) *Événements pré-immuns*

#### (i) *Apprêtement de l'haptène et maturation des cellules dendritiques*

Au contact avec les cellules de l'épiderme, l'haptène va modifier des protéines qui deviennent potentiellement immunogènes et sont internalisées par les DC comme tout autre antigène d'origine virale ou pathogène.

Les DC immatures disposent en effet de tout un équipement leur permettant de percevoir et de capturer efficacement les antigènes. L'internalisation est réalisée via différents mécanismes : la macropinocytose (capture et ingestion de gouttelettes de liquide extracellulaire) et la phagocytose (capture et ingestion de particules solides) peu spécifiques ainsi que l'endocytose faisant intervenir des récepteurs membranaires tels que les lectines de type C (CD206, CD207/langerine, CD205/DEC205, CD209/DC-SIGN, dectine-1) ou les récepteurs « scavenger » (CD36) (Jiang *et al.*, 1995; Valladeau *et al.*, 2000). Les DC possèdent également une machinerie enzymatique (endosomes, lysosomes, transporteurs...) qui leur permet de dégrader les antigènes capturés en fragments de quelques dizaines d'acides aminés (peptides antigéniques).



Suivant que la modification par l'haptène concerne une protéine extra ou intracellulaire, les mécanismes de prise en charge et d'apprêtement de ce dernier par les DC diffèrent. Classiquement, les protéines endogènes de la cellule présentes au niveau du cytosol empruntent la voie de présentation du CMH-I, alors que les protéines pénétrant par endocytose ou phagocytose rejoignent la voie de présentation du CMH-II. Toutefois, dans certains cas les DC présentent des antigènes exogènes via les molécules de CMH-I, phénomène que l'on appelle présentation croisée ou « cross presentation ».

De par leurs propriétés physico-chimiques (lipophilie) les sensibilisants peuvent modifier à la fois des protéines extra et intracellulaires et peuvent donc être présentés par les deux types de CMH. De plus, dans certains cas, les haptènes peuvent se lier directement au complexe peptide-CMH présent en surface des DC, sans passer par le système d'apprêtement des cellules. C'est le cas des métaux qui entreprennent des liaisons de coordination entre le TCR et la molécule de CMH (Romagnoli *et al.*, 1991), de certains médicaments qui interagissent avec le TCR de manière pharmacologique (concept du « p-i » « Pharmacological interaction with Immune receptor ») (Pichler, 2002) ou enfin du DNCB qui réagit de manière covalente directement avec le peptide présenté par une molécule du CMH (Pickard *et al.*, 2007). A l'heure actuelle la proportion de ces cas de figure reste peu décrite.

Au-delà de la modification de protéine, l'haptène par lui-même ou via la génération de médiateurs, induit au sein de la peau un signal de danger conduisant à la maturation des DC. Les mécanismes d'action induits par ces signaux de danger seront détaillés dans la partie II de l'introduction.

Au cours de ce processus de maturation, les DC évoluent du statut de cellules immatures capables de capturer l'antigène en cellules matures présentatrices professionnelles, capables de présenter l'antigène aux cellules T. En effet, les cellules une fois activées perdent leur capacité à internaliser et apprêter des antigènes exogènes via la diminution de l'expression des récepteurs d'endocytose. Les granules de Birbeck des LC disparaissent et la machinerie intracellulaire contrôlant la macropinocytose et la phagocytose est bloquée (Garrett *et al.*, 2000). En revanche, les molécules du CMH-II sont fortement surexprimées (Girolomoni *et al.*, 1990; Becker *et al.*, 1992) et celles du CMH-I, déjà exprimées en basal, sont augmentées de façon plus modérée (Bouloc *et al.*, 1998). De plus, une série de molécules membranaires d'adhésion comme CD54 (ICAM-1) et CD58 (LFA-3, « Lymphocytes function associated antigen 3 ») (Moulon *et al.*, 1993) ainsi que des molécules de co-stimulation telles CD40, CD80, CD83 et



CD86, essentielles au niveau de la synapse avec les cellules T, sont induites (Reiser and Schneeberger, 1996; Aiba *et al.*, 1997; Banchereau and Steinman, 1998; Coutant *et al.*, 1999; Stoitzner *et al.*, 2003; Sallusto and Mackay, 2004).

Lors de leur maturation en réponse à des sensibilisants les DC produisent également de nombreuses cytokines et chimiokines telles IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, MIP-2 et IP-10 (Enk and Katz, 1992) leur permettant d'attirer les LT et de polariser la réponse T. Le profil des cytokines produites par les DC dans les ganglions drainants est en effet déterminant pour l'orientation de la réponse immunitaire (détaillé dans le paragraphe suivant). En particulier, une production d'IL-12 au niveau des ganglions, suite à l'application d'un sensibilisant de contact a pu être mise en évidence (Dearman *et al.*, 1999; Warbrick *et al.*, 1999) et récemment Martin et collaborateurs (2008) ont montré deux mécanismes possibles d'induction de l'HSRC : une voie de signalisation dépendante de l'IL-12 et une autre indépendante, passant par les TLR 2/4 (Martin *et al.*, 2008).

#### (ii) Migration des cellules dendritiques

Au contact de l'haptène et en réponse aux signaux de danger perçus, les DC quittent la peau et migrent vers le paracortex des ganglions lymphatiques proximaux, via les canaux lymphatiques afférents. Des études de migration des DC suite à l'application d'un haptène naturellement fluorescent, le FITC (isothiocyanate fluorescéine), montrent que 12 à 48 heures après des DC fluorescentes sont observées dans les ganglions drainants (Macatonia *et al.*, 1986; Macatonia *et al.*, 1987; Kripke *et al.*, 1990) et se positionnent au niveau de la zone paracorticale, riche en LT. Les LT naïfs présents dans le sang circulent en permanence au niveau de cette zone ganglionnaire. Les DDC migrent plus rapidement vers les ganglions drainants que les LC de l'épiderme, respectivement un à deux jours et quatre jours après l'application de l'haptène (Kamath *et al.*, 2002; Kissenpfennig *et al.*, 2005), suggérant un rôle important des DC dermiques dans la sensibilisation.

La migration des DC s'effectue en réponse à des signaux de danger impliquant des cytokines telles que IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-18, GM-CSF, IL-6, IL-8, IL-10, MIP-2 et IP-10 induites dans la peau au contact de l'haptène (Cumberbatch and Kimber, 1992; Enk and Katz, 1992; Kondo *et al.*, 1994; Mohamadzadeh *et al.*, 1994; Cumberbatch *et al.*, 1997; Cumberbatch *et al.*, 2003). Plusieurs molécules d'adhésion, de métalloprotéases et de récepteurs aux chimiokines modulés par ces cytokines sont impliqués dans la migration des DC activées.

Dans un premier temps, l'expression de la molécule d'interaction KC-DC, l'E-cadhérine (E-cad), est fortement diminuée chez les LC suite à l'application sur la peau de sensibilisants



(Schwarzenberger and Udey, 1996), ce qui permet aux LC de se détacher des KC et de quitter l'épiderme; de plus, les LC ne sont plus retenues dans l'épiderme puisque l'expression à la surface des LC de CCR1, CCR2, CCR5 et CCR6, récepteurs des chimiokines CCL3, CCL4 et CCL20 produites par la peau est fortement diminuée (Dieu *et al.*, 1998). Parallèlement, de nouvelles molécules d'adhésion permettant aux DC de se fixer à la matrice extracellulaire et aux cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques sont induites. Par exemple, l'expression d'ICAM-1/CD54 à la surface des DC semble essentielle à leur migration puisque des souris ICAM-1<sup>-/-</sup> présentent une réponse d'HSRC au DNFB beaucoup plus faible que des souris sauvages (Sligh *et al.*, 1993). Pour pouvoir gagner le derme, les LC doivent ensuite franchir la jonction dermo-épidermique. La production par les LC de métalloprotéases (MMP) et notamment des MMP-2 et 9, qui dégradent les composants de la matrice extracellulaire comme le collagène IV, permettent aux LC de traverser la lame basale et le derme (Ratzinger *et al.*, 2002). Le rôle des MMP dans l'HSRC a été mis en évidence chez des souris déficientes pour MMP-9, pour lesquelles la migration des DC en réponse à divers sensibilisants (oxazolone, rhodamine B, DNFB) est fortement diminuée (Kobayashi *et al.*, 1999; Ratzinger *et al.*, 2002). Au niveau du derme, l'expression de CCR7 est induite (Geissmann *et al.*, 2002; Boisleve *et al.*, 2004) et les DC répondent alors aux chimiokines CCL19 et CCL21, respectivement exprimées par les cellules endothéliales du derme et les cellules stromales des zones T (Gunn *et al.*, 1998). Le couple récepteur/ligand CCR-7/CCL21 joue un rôle important dans la réaction d'HSRC puisqu'il a été montré que l'administration d'un anticorps anti-CCL21 au moment de la sensibilisation de souris au DNFB inhibe la réaction d'HSRC (Engeman *et al.*, 2000) et que d'autre part des souris CCR7<sup>-/-</sup> ne déclenchent pas de réaction d'HSRC en réponse au FITC (Forster *et al.*, 1999).

Par ailleurs, plusieurs études ont montré l'implication de médiateurs lipidiques comme le leucotriène C<sub>4</sub> et la PGE<sub>2</sub> dans la migration des DC, en mettant en évidence que lorsque leur sécrétion par les protéines transmembranaires MRD1 (« Multidrug Resistance protein 1 ») et MRP1/4 (« Multidrug Resistance related Protein1/4 ») est bloquée, la migration des DC est inhibée (Randolph, 2001; van de Ven *et al.*, 2008).

### **b) Activation des cellules T mémoires spécifiques de l'haptène**

Une fois parvenues au ganglion lymphatique, les DC matures ont la capacité d'induire une activation des LT spécifiques de l'haptène. Une combinaison de trois signaux distincts est nécessaire à l'activation des cellules T (fig. 6). Le premier signal est donné par une interaction entre le CMH de la DC et le TCR du LT, récepteur spécifique de l'haptène présenté, permettant



la formation de la synapse immunologique. Des études *in vitro* ont montré que les deux classes de CMH sont déterminantes dans la présentation de l'allergène (Martin *et al.*, 1992; Kohler *et al.*, 1997). Un deuxième signal d'activation est ensuite donné par les molécules de co-stimulation de la famille B-7 (CD86, CD80) et leurs ligands respectifs exprimés par les LT (CD28, CTLA-4). La liaison de CD80/CD86 au CD28 est indispensable au développement de l'HSRC puisque des souris déficientes pour CD28 présentent une réaction au DNFB et à l'oxazolone diminuée (Kondo *et al.*, 1996). De plus, l'utilisation d'anticorps bloquants anti-CD86 a montré qu'en l'absence de CD86 l'activation des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> est empêchée et la réaction d'HSRC ne se développe plus (Xu *et al.*, 1997). D'autres couples de ligands/récepteurs participent à l'activation des LT : (TNF)/TNF-R; RANK/RANK-L (« Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B/Ligand ») et CD40/CD40L. Leurs interactions conduisent à l'augmentation d'OX40-L sur les DC qui, en interagissant avec la molécule OX40, exprimée par les LT, induit la surexpression de CD80 et CD86 et ainsi amplifie l'activation des LT. A l'inverse, pour éviter une activation excessive des LT, des signaux de rétrocontrôle négatif sont également délivrés lors de l'interaction DC-T. L'engagement des couples de molécules CD80-CD86/CTLA-4 et PD-L1-PD-1 permet un contrôle fin de la réponse (non présenté dans la figure 6) (Greenwald *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006).

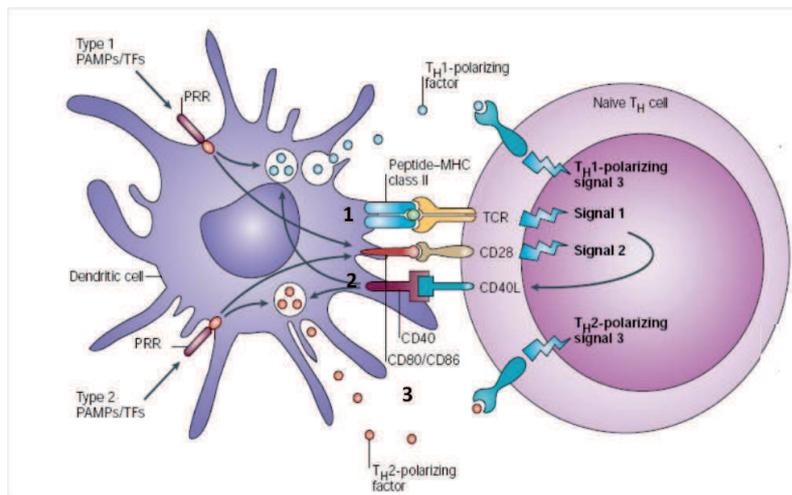


Figure 6 : Synapse immunologique DC : LT. (Kapsenberg, 2003).

- 1) Interaction CMH/TCR
- 2) Interaction molécules de co-stimulation/ligands
- 3) Production de cytokines

Un troisième signal déterminant dans la réponse immunitaire et son orientation vers une tolérance ou vers une réaction effectrice est la balance de différents signaux (cytokines et médiateurs lipidiques) produits par les DC. Concernant les cytokines, le TGF- $\beta$  différencie des



cellules T en T régulatrices (Treg) (produisant IL-10 et TGF- $\beta$ ), l'IL-12 différencie des cellules T naïves en cellules de type 1 (Th1 « LT helper » /Tc1 « LT cytotoxiques ») produisant de l'IFN- $\gamma$ , IL-2 et TNF- $\alpha$  ; l'IL-4 conduit à des cellules de type 2 (produisant IL-4, IL-13 et IL-5) et l'IL-1 ou un cocktail d'IL-6/IL-21/IL-23  $\pm$  TGF- $\beta$  conduit à des cellules de type 17 (produisant IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22) (fig. 7). Dans l'allergie de contact l'orientation de la réponse est de type 1 et 17 (Vocanson *et al.*, 2009). Le rôle des médiateurs lipidiques dans l'orientation des LT sera abordé dans la partie III de l'introduction.

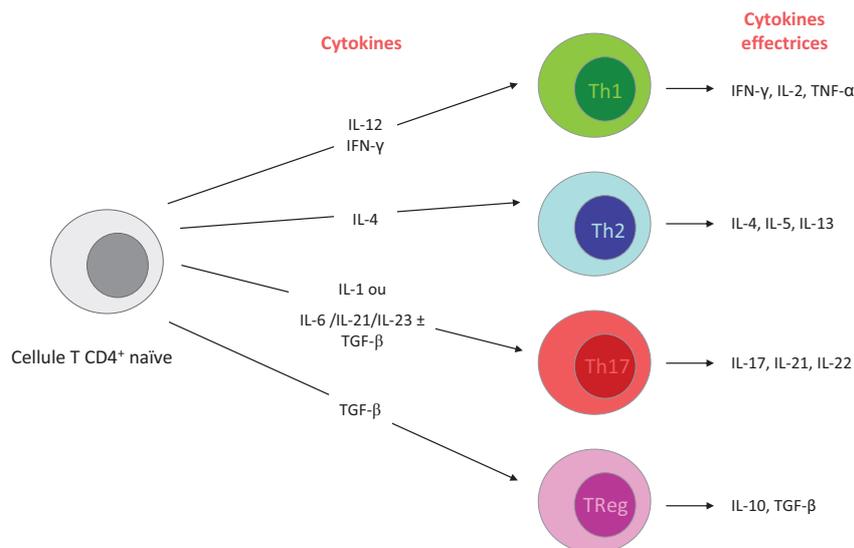


Figure 7 : Polarisation de la réponse T par les cytokines des DC

## 2) Phase d'élicitation

La phase d'élicitation, appelée également phase de révélation, phase symptomatique ou phase efférente, a lieu lorsqu'un individu sensibilisé à un haptène se trouve à nouveau en contact avec ce dernier. L'ensemble des étapes pré-immunes de la phase de sensibilisation a lieu et le recrutement d'un infiltrat dermique et épidermique de diverses populations cellulaires dont des LT mémoires spécifiques de l'haptène va provoquer une destruction cellulaire ainsi qu'une forte réaction inflammatoire aboutissant à l'apparition d'un eczéma de contact dans les 6 à 72 heures suivant l'exposition. Les grandes étapes de ce processus sont développées ci-dessous.



### **a) Inflammation et recrutement des cellules T**

Le contact de l'haptène sur la peau induit de la même façon que pendant la phase de sensibilisation une libération de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  (Enk and Katz, 1992), suivie de la production de cytokines et chimiokines (CCL2, CCL5, CCL20, CCL22, CCL17) qui induisent le recrutement du sang vers le derme et l'épiderme des cellules T spécifiques mémoire de l'haptène, dans un premier temps les LT effecteurs CD8<sup>+</sup> de type 1 suivis des populations régulatrices (Akiba *et al.*, 2002). Askenase et collaborateurs (2008) ont également rapporté une contribution des lymphocytes B et des cellules NKT au recrutement des LT effecteurs (Teff) sur le site du challenge (Campos *et al.*, 2006; Kerfoot *et al.*, 2008).

Une fois les LT recrutés dans la peau, ces derniers reconnaissent le complexe haptène-protéine présenté par les cellules cutanées, via les molécules du CMH de classes I et II. L'engagement du TCR des cellules T induit la libération d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  activant la production par la peau d'un certain nombre de cytokines/chimiokines (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, GM-CSF, CXCL10, CXCL11, CXCL9, CCL17, CCL18) qui amplifient la réponse inflammatoire initiée par l'haptène, et aboutit à une infiltration massive de leucocytes (neutrophiles polynucléaires, monocytes inflammatoires capables de se différencier en macrophages et dendritiques, cellules T...). Au-delà des CD8<sup>+</sup>, les LT de type 17 contribuent également activement et en synergie avec l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  à la production de cytokines inflammatoires par les KC (Albanesi *et al.*, 1999). En effet, un nombre important de LT produisant de l'IL-17 a pu être détecté chez des patients allergiques (Albanesi *et al.*, 1999; Albanesi *et al.*, 2000). De plus, des souris déficientes pour cette cytokine montrent une réaction d'HSRC diminuée (Nakae *et al.*, 2002) et la neutralisation de la sécrétion d'IL-17 par les LT CD8<sup>+</sup> supprime l'élicitation de l'HSRC chez la souris (He *et al.*, 2006). Toutefois, les mêmes observations ont pu être faites pour des souris déficientes pour l'IFN- $\gamma$  ou pour son récepteur (Wakabayashi *et al.*, 2005). Ainsi les deux médiateurs semblent avoir un rôle important dans l'ACD mais des études complémentaires sont cependant nécessaires afin de déterminer les contributions relatives des LT CD8<sup>+</sup> de type 1 et/ou de type 17 ainsi que le rôle respectif de chaque cytokine dans le développement de l'inflammation.

### **b) Activité cytotoxique des LT CD8+**

La libération d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-17 par les LT CD8<sup>+</sup> n'est cependant pas suffisante pour le développement complet de la réaction d'ACD. En effet l'activité cytotoxique des LT CD8<sup>+</sup>, événement majeur du processus, est indispensable, puisqu'il a été montré que des souris déficientes pour les deux voies de signalisation Fas/Fas-L et perforine sont incapables de



développer une réaction d'HSRC même si de l'IFN- $\gamma$  est produit (Kehren *et al.*, 1999). Ainsi les cellules T CD8<sup>+</sup> sont les cellules effectrices de l'ACD principalement via leur cytotoxicité et les KC sont les cibles principales de ces LT spécifiques de l'haptène puisque le nombre de KC en apoptose augmente de façon concomitante au nombre de LT CD8<sup>+</sup> infiltrés dans la peau (Akiba *et al.*, 2002). La libération de perforine est également associée à la production des médiateurs CCL5/RANTES (« Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted »), MIP-1 $\alpha$  (« Macrophage Inflammatory Protein ») et MIP-1 $\beta$  qui viennent amplifier le recrutement des monocytes et granulocytes exprimant les récepteurs CCR1 et CCR5. A l'issue de ce pic d'inflammation (24-48h), une phase de résolution s'engage peu à peu grâce à un mécanisme de rétrocontrôle négatif, limitant les dommages tissulaires et rétablissant l'intégrité de la peau.

### 3) La résolution de l'ACD et le rôle des T régulateurs

Initialement l'arrêt de la réaction d'ACD était attribué à une élimination rapide de l'haptène quelques jours après son application par la peau. Des études ont pourtant montré que des haptènes expérimentaux comme le FITC pouvaient rester plus de deux semaines dans l'épiderme après une simple application (Saint-Mezard *et al.*, 2003). Depuis, un certain nombre de mécanismes régulateurs supprimant l'inflammation ont pu être mis en évidence : l'élimination des DC chargées de l'antigène par les cellules effectrices CD8<sup>+</sup> (Yang *et al.*, 2006), la production de cytokines anti-inflammatoires par les cellules de la peau (IL-10, TGF- $\beta$ ) (Cavani *et al.*, 2007), l'engagement par les cellules tissulaires des ligands régulateurs (PD-L1, RANK-L...) conduisant à l'inhibition des récepteurs immuns (Keir *et al.*, 2008), et enfin, l'activation de cellules T possédant des propriétés régulatrices.

Au cours de l'ACD, dans les heures qui suivent le contact avec l'allergène et la production par la peau de médiateurs inflammatoires, des cytokines immunorégulatrices comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$  sont produites par les cellules cutanées (Cavani *et al.*, 2007). L'effet immunosuppresseur de l'IL-10 intervient à différents niveaux : inhibition de la production des médiateurs inflammatoires (IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), modulation de la maturation des DC et inhibition consécutive de l'activité des LTeff (O'Garra *et al.*, 2004).

L'importante quantité d'IFN- $\gamma$  libérée pendant l'inflammation induit l'expression des molécules de CMH-II par les KC, ce qui stimule leur d'APC ; toutefois l'absence du signal des molécules de co-stimulation entraîne l'anergie ou la mort des LT qui ont engagé leur TCR avec les KC (Cavani *et al.*, 2003). Même si l'ensemble de ces mécanismes est relativement important dans le rétrocontrôle négatif de l'inflammation, des expériences ont pu montrer que l'annulation de



l'ACD est préférentiellement due à un mécanisme actif médié par une sous-population des LT CD4<sup>+</sup>.

De nombreuses sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> ont été décrites comme ayant des propriétés régulatrices : les LT CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> (Treg), Tr1, Th17 ou encore NKT (Dubois *et al.*, 2003); pourtant peu de choses sont connues sur leur contribution relative dans le contrôle de la résolution de l'ACD. Il apparait toutefois que dans l'ACD les Treg exercent la première ligne de contrôle. En effet, *in vivo*, la déplétion des Treg (utilisation d'un anticorps anti-CD25) au moment de la phase de sensibilisation augmente l'activation des Teff CD8<sup>+</sup> et accroît la réaction d'ACD (Dubois *et al.*, 2003; Kish *et al.*, 2005). De plus Ring et collaborateurs (2006) ont montré que les Treg suppriment la réaction d'ACD en empêchant l'efflux des Teff dans les tissus inflammés (Ring *et al.*, 2006). Même si l'importance des Treg dans la résolution de l'HSRC est établie, un certain nombre de questions subsiste sur l'origine de ces LT, leur mode d'action, leur spécificité à un antigène donné ou encore leur site d'action.

Ainsi nous venons de voir que l'ACD est une pathologie complexe qui se situe dans différents compartiments (peau, ganglion) et qui fait intervenir un nombre important d'acteurs cellulaires et moléculaires. Dans la suite de cette première partie d'introduction, nous allons nous intéresser à décrire les aspects cliniques de son diagnostic ainsi que les tests réglementaires de prédiction du potentiel sensibilisant de molécules.

### E) Le diagnostic clinique

En général, la localisation et l'apparence clinique des lésions allergiques renseignent sur le facteur étiologique lorsque le patient consulte pour la première fois pour un eczéma de contact. Des dermatites au niveau des premiers sites de contact avec des bijoux, boutons de jeans, bracelets de montre sont souvent identifiées pour des allergies au nickel. De façon générale c'est donc le questionnement du patient qui permet d'orienter le diagnostic qui est complété par des tests épicutanés appelés «patch tests». Les «patch tests» reproduisent dans des conditions expérimentales une ACD et sont appliqués en occlusif sur une zone limitée, en général le haut du dos. Les conditions du patch test sont standardisées (notamment au niveau de la concentration des allergènes utilisés) afin de pouvoir avoir des résultats comparables entre les différents dermatologues (Lachapelle *et al.*, 1997). La plupart des allergènes utilisés dans les « patch tests » sont bien caractérisés, en général il s'agit de la batterie standard européenne regroupant les 23 substances les plus fréquemment en cause, mais il existe aussi des batteries spécialisées thématiques comme par exemple les batteries coiffure, peinture, etc... Après 48h



d'application, la sévérité de l'érythème, de l'œdème, de la présence d'infiltrations, de papules et de vésicules est appréciée et notée 20 min et 24h après le retrait du patch. Il n'existe pas de possibilité de désensibiliser les patients atteints d'ACD, la seule recommandation fiable reste l'évitement de la molécule sensibilisante.

### III. Evaluation du risque

Etant donnée la complexité du système que nous venons de décrire, le fort impact de cette pathologie et l'impossibilité de désensibiliser et donc de guérir les patients atteints d'ACD, il est de la responsabilité des industriels de garantir l'innocuité de leurs produits pour éviter tout nouveau cas de sensibilisation. Pour cela, il est important d'évaluer le risque qu'une molécule donnée soit sensibilisante et pour ce faire, un certain nombre de tests réglementaires chez l'animal sont actuellement utilisés afin de prédire le potentiel sensibilisant de matières premières.

#### A) Tests du « Guinea Pig Maximisation Test » et du « Buehler »

Pendant plusieurs décennies le cobaye a été l'animal de choix pour les études de prédiction du potentiel sensibilisant cutané d'une molécule. Parmi les tests les plus classiques, on peut citer le « Guinea Pig Maximisation Test » (GPMT) également appelé MK pour « Magnusson Kligman » (Magnusson and Kligman, 1969) et le test de « Buehler » (BUEHLER, 1965). Dans le GPMT la molécule testée est toujours injectée en association avec un adjuvant par voie intra-dermique sur un groupe d'une dizaine de cobayes, en parallèle d'un groupe contrôle non sensibilisé. Après 7 jours, un patch occlusif est disposé pendant 48 heures sur les sites d'injections. Au 21<sup>ème</sup> jour, le challenge est réalisé par un patch occlusif appliqué pendant 24 heures. La réaction inflammatoire d'élicitation est ensuite évaluée visuellement (œdème, rougeur, épaisseur...) 24 et 48 heures plus tard (Magnusson and Kligman, 1969). Le potentiel sensibilisant du produit testé est classé d'après la fréquence des réponses positives des animaux et non d'après l'intensité des réponses, en 5 classes (Classe 1, très faible pour moins de 10% des animaux à classe 5 très fort pour plus de 80% des animaux ayant répondu). Ces tests présentent toutefois certaines limites, puisque dans le cas du GPMT comme pour le test de Buehler (même principe que le GPMT mais sans adjuvant) qui visent à évaluer la phase d'élicitation de la réaction l'HSRC, l'évaluation visuelle des symptômes peut entraîner une variabilité importante liée au manipulateur et d'autre part il s'agit de techniques consommatrices d'animaux. De plus, l'injection par voie intra-dermique de la molécule en association avec un



adjuvant ne reflète pas les conditions réelles de contact et peut avoir tendance à maximaliser les effets.

### B) Test du "Local Lymph Node Assay" (LLNA)

Dans la perspective de la règle des 3R (« Refinement » : amélioration du bien être des animaux, « Reduction » : diminution du nombre d'animaux et/ou « Remplacement » : pas d'utilisation d'animaux) le test du « Local Lymph Node Assay » (LLNA) a été développé chez la souris. Par rapport aux autres méthodes décrites précédemment, ce test ne fait appel qu'à la phase de sensibilisation de l'HSRC sans qu'il n'y ait déclenchement des symptômes, ce qui réduit considérablement le nombre d'animaux et la durée de l'expérience et n'engendre pas de souffrance puisque les animaux sont sacrifiés avant de développer d'HSRC. Le LLNA a été validé par le Centre Européen de Validation des Méthodes Alternatives (ECVAM) en 2000. Cette méthode de raffinement mesure la prolifération des cellules ganglionnaires par incorporation de thymidine tritiée après application topique de l'haptène sur les oreilles. En pratique, la molécule à tester ou le véhicule seul est appliqué une fois par jour pendant trois jours consécutifs sur la face dorsale des oreilles des souris. La dose maximale non irritante est au préalable déterminée par une évaluation de l'épaississement de l'oreille. A partir de cette dose, une gamme d'au moins trois doses est déterminée pour être testée. Les souris sont laissées au repos pendant deux jours complets, puis une injection par la veine caudale de thymidine tritiée est réalisée le jour suivant. Cinq heures plus tard les souris sont sacrifiées et les ganglions drainants l'oreille sont prélevés. Les résultats de radioactivité sont exprimés en indice de stimulation (SI) qui est égal au rapport de la radioactivité incorporée dans les ganglions de la souris traitée par la molécule d'intérêt sur celle incorporée dans les ganglions de la souris traitée avec le solvant seul (Gerberick *et al.*, 2000; Basketter *et al.*, 2002). Les composés qui induisent un SI supérieur au seuil de 3 sont considérés comme sensibilisants (Kimber *et al.*, 1995; Loveless *et al.*, 1996; Basketter *et al.*, 1999b). La concentration pour laquelle le SI est égal à 3 est appelé EC(3) (« Effective dose concentration »). Sur la base de cette EC(3) différentes classes de potentiel sensibilisant ont été déterminées (Van Och *et al.*, 2000; de Jong *et al.*, 2002). Ainsi, au-delà de la simple détection des sensibilisants le LLNA permet d'évaluer leur potentiel de façon quantitative. De plus, l'EC(3) permet de déterminer une dose maximale sans effet chez l'homme peut être extrapolée et pour cette raison les toxicologues s'en servent dans leur évaluation du risque. Cependant, un certain nombre de limitations sont décrites, notamment le manque de sensibilité du test pour détecter les molécules les plus faiblement sensibilisantes (Ikarashi *et al.*, 1993; Basketter *et al.*, 1999a). D'autre part, des réponses faussement positives par rapport aux



données de références cliniques peuvent être obtenues. Ces « faux positifs » se trouvent essentiellement parmi les molécules tensioactives, les surfactants, pouvant provoquer une irritation engendrant une prolifération non spécifique dans les ganglions drainants (Loveless *et al.*, 1996; Ball *et al.*, 2011); la question des irritants systématiquement « faux positifs » dans le LLNA fait toutefois encore débat (Basketter and Kimber, 2011). Enfin, les métaux et notamment le nickel ne sont pas détectés dans le LLNA alors qu'il a une prévalence très forte chez l'homme.

Comme nous venons de leur voir, actuellement, un certain nombre de tests *in vivo* réglementaires et notamment le LLNA qui prédit le potentiel sensibilisant de molécules, permettent aux toxicologues d'évaluer le risque et de garantir l'innocuité des produits cosmétiques. Toutefois le 7<sup>ième</sup> amendement à la directive cosmétique européenne (2003/15/CE), adopté en 2003 et interdisant l'utilisation d'animaux dans les tests pour produits cosmétiques, rend indispensable et urgente la mise au point de méthodes alternatives à l'animal (*in vitro* et/ou *in silico*). Un certain nombre de tests alternatifs en développement modélisent les événements précoces pré-immuns. Ainsi dans la prochaine partie de cette introduction nous nous intéresserons à décrire les mécanismes d'action des sensibilisants sur les cellules de la peau et les voies de signalisation induites pour mieux comprendre la traduction de cette connaissance dans les principaux tests *in silico/in vitro* les plus utilisés aujourd'hui.



## Partie II : Réponse cellulaire aux signaux de danger induits par les molécules sensibilisantes de contact

### I. Signaux de danger induits par les molécules sensibilisantes de contact

#### A) Concept du signal de danger et cas des molécules sensibilisantes de contact

En 1994, Matzinger introduit la théorie du « signal de danger » qui correspond au « signal ultime qui détermine si la reconnaissance de l'antigène conduit à la tolérance ou à une réponse immunitaire effective » (Matzinger, 1994). Cette théorie est basée sur le fait que l'antigénicité d'un xénobiotique n'est pas suffisante à l'induction complète de la réponse primaire. La cellule dendritique a en effet besoin pour initier une réponse immunitaire complète de « signaux de danger » produits lors de dommages tissulaires, d'une réaction inflammatoire, d'un stress ou encore d'une mort cellulaire par nécrose (Gallucci and Matzinger, 2001). Ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), la libération de protéases, de nucléotides intracellulaires (ATP), de protéines de choc thermique (HSP70) ou encore d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) participent à la maturation complète des DC (Aiba, 2007).

Comme nous venons de le voir dans le chapitre précédent, la réactivité chimique vis-à-vis des protéines est indispensable à un sensibilisant de contact pour former l'épitope reconnu par les cellules T. Toutefois cette même caractéristique confère également à l'haptène la capacité d'activer le système immunitaire inné et d'induire une réponse de stress au niveau de la cellule (Martin *et al.*, 2008; Freudenberg *et al.*, 2009). En ce sens, les haptènes se distinguent des antigènes protéiques (pathogènes d'origine bactérienne ou virale) qui nécessitent l'addition d'un adjuvant (LPS, adjuvant de Freund...) pour induire le système immunitaire. Récemment, Martin et collaborateurs (2011) ont proposé le terme de « xénoinflammation » pour nommer l'inflammation induite par des molécules exogènes (Martin *et al.*, 2011). Cette xénoinflammation est nécessaire lors de la phase de sensibilisation de l'HSRC pour l'activation des DC par le sensibilisant, leur migration vers le ganglion lymphatique pour activer des cellules T spécifiques de l'haptène et durant la phase d'élicitation, la réponse inflammatoire entraîne le recrutement dans la peau des Teff et autres leucocytes. De façon importante, la réponse inflammatoire innée est donc un pré-requis pour l'activation et l'orientation de la réponse adaptative.

Ainsi dans la suite de ce chapitre nous nous attacherons à détailler les différents signaux de danger mis en jeu par les sensibilisants et les voies de signalisation induites aboutissant à cette



xénoinflammation. L'ensemble des éléments décrits est illustré dans le schéma de synthèse présenté en figure 8.

### B) Modification de l'équilibre redox par les sensibilisants de contact

L'état intracellulaire redox est déterminé par les proportions relatives des formes réduites et oxydées des couples redox prédominants dans la cellule. Le stress oxydant cellulaire, causé par des agents et stimuli endogènes ou exogènes à l'organisme, est classiquement défini comme étant l'altération de la balance redox intracellulaire en faveur des conditions oxydantes. Parmi les différentes substances potentiellement nocives produites, on peut répertorier les espèces réactives de l'oxygène (ROS) issues de la réduction incomplète de l'oxygène [radicaux hydroxyles (OH.), anion superoxyde ( $O_2^-$ ), peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou encore oxygène singulet ( $^1O_2$ )], les espèces réactives de l'azote, les radicaux libres et hydroperoxydes organiques ou encore des composés électrophiles. L'accumulation excessive des substances pro-oxydantes représente une attaque potentiellement toxique puisqu'elles exercent des effets délétères incluant la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines qui induisent des dysfonctionnements membranaires, l'oxydation de l'ADN et des autres composants cellulaires. L'organisme possède un système intracellulaire de défense antioxydante très sophistiqué constitué de composants non-enzymatiques, enzymatiques et des transporteurs membranaires permettant de réguler l'homéostasie redox en neutralisant ces substances pro-oxydantes. La première ligne de défense antioxydante est assurée par des systèmes de piègeurs non-enzymatiques très réactifs dont les trois plus importants trouvés communément dans les cellules sont : le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH/NADP<sup>+</sup>), la thioredoxine ( $TRX_{red}/TRX_{ox}$ ), et le glutathion (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyglycine ; GSH) qui est le thiol cellulaire prédominant dont les changements de ratio  $[GSH]/[GSSG]$  reflètent directement les altérations redox intracellulaires. Cette première ligne de défense agit en synergie avec des enzymes de détoxification (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et glutathion-S-transférase). Enfin, dans un dernier temps, les produits finaux des enzymes de détoxification peuvent être conjugués au GSH et évacués par des transporteurs membranaires appelés « Multidrug Resistance protein » (MRP).

Les sensibilisants sont décrits pour perturber la balance redox des cellules. *In vivo*, Schmidt et Chung (1992) ont montré que dans la peau des souris, les taux de GSH et de GSSG sont modifiés 12 heures après l'application de DNCB ou d'autres analogues, avec en particulier une diminution du taux de GSH (Schmidt and Chung, 1992). Des antioxydants thiol-dépendants



(augmentant le ratio GSH/GSSG cellulaire) comme la NAC (N-Acetyl-Cystéine) ont de plus montré leur capacité à bloquer chez la souris les réactions allergiques au TNCB (2,4,6-trinitrochlorobenzène) (Senaldi *et al.*, 1994), indiquant l'importance de la modification de la balance GSH/GSSG dans l'HSRC.

*In vitro*, Mizuashi et collaborateurs (2005) ont démontré que les sensibilisants (NiCl<sub>2</sub>, DNCB, MnCl<sub>2</sub> et le thimerosal), contrairement aux non sensibilisants (SDS, chlorure de benzalkonium) induisent un stress oxydant dans la cellule (moDC et lignée THP-1), se traduisant par la diminution du rapport GSH/GSSG (Mizuashi *et al.*, 2005). Plus récemment, Migdal et collaborateurs (2010) ont montré que le DNCB, le chlorure de mercure et le thimerosal induisent dans la lignée cellulaire U937 la déplétion du GSH ainsi que la génération de ROS essentiellement d'origine mitochondriale (Migdal *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent que l'altération du statut redox est un effet important de la réponse cellulaire aux sensibilisants. La modification de la balance redox par les sensibilisants est à l'origine d'importants événements en cascade, puisque des expériences réalisées en présence de NAC montrent que dans ces conditions la phosphorylation des p38 MAPK et l'augmentation de l'expression de CD86 induites par les sensibilisants sont annulées (Mizuashi *et al.*, 2005; Migdal *et al.*, 2010).

### C) Induction par les sensibilisants du facteur de transcription Nrf2, senseur cellulaire du stress oxydant

En réponse à une stimulation électrophile ou à une oxydation, les cellules induisent la transcription des gènes appartenant à la famille des éléments de réponse anti-oxydante de phase II [« Antioxidant Element Response » (ARE)] via le facteur de transcription Nrf2 (« Nuclear Factor-erythroid 2-related factor 2 »). Dans des cellules non stimulées, la protéine Keap1 (« Kelch-like ECH associated protein 1 ») est associée au facteur de transcription Nrf2 et induit son ubiquitination et sa dégradation consécutive par le protéasome. Lorsque les résidus cystéine de Keap1 sont oxydés, le complexe Keap1/Nrf2 se dissocie et Nrf2 ainsi libéré « transloque » au niveau du noyau. En association avec les protéines Maf et d'autres co-facteurs, Nrf2 active la transcription de ses gènes cibles contenant la séquence ARE dans leur promoteur comme la glutathion synthase, la glutathion réductase (GSR), les thioredoxine synthase et réductase, l'hème oxygénase 1 (HO-1/HMOX) et la NADPH quinone oxydoréductase (NQO1) (Dinkova-Kostova *et al.*, 2005; Kensler *et al.*, 2007).

Ainsi des molécules électrophiles comme les sensibilisants peuvent modifier les résidus cystéine de Keap1 et induire la réponse anti-oxydante (Copple *et al.*, 2010). L'implication du facteur de



transcription Nrf2 dans la réponse cellulaire à des sensibilisants été étudiée par Ade et collaborateurs (2009) sur des DC issues de cellules CD34<sup>+</sup> (CD34-DC) ainsi que sur la lignée THP-1 en montrant que seuls les sensibilisants ont la capacité d'induire l'expression d'HO-1 et de NQO1 et qu'une pré-incubation des cellules avec la NAC inhibe cette induction (Ade *et al.*, 2009). Dans la majorité des études de génomique menées *in vitro* sur des DC, KC ou épidermes reconstruits afin de déterminer des gènes spécifiques de la signature de sensibilisants, il apparait que les gènes cibles de Nrf2 permettent de discriminer les sensibilisants des irritants (Hooyberghs *et al.*, 2008; Python *et al.*, 2009; McKim *et al.*, 2010). L'induction spécifique de Nrf2 par les sensibilisants fait l'objet d'un test développé par Givaudan que nous détaillerons en fin de ce chapitre.

Le rôle de la voie de signalisation Keap1/Nrf2 dans l'allergie de contact a été confirmé *in vivo* par Kim et collaborateurs (2008) qui ont montré que la diminution de l'intensité de la réaction d'allergie de contact liée l'âge est accentuée lorsque le gène Nrf2 est inactivé et que cette diminution est rétablie par l'administration par voie orale de sulforaphane, activateur de Nrf2 (Kim *et al.*, 2008).

En conclusion, l'ensemble de ces données bibliographiques démontre un rôle complexe du stress oxydant dans le façonnement de la réponse immunitaire aux sensibilisants de contact puisque d'une part ce signal semble nécessaire pour l'activation des DC et la réponse d'HSRC mais que dans le même temps il induit une réponse cytoprotectrice anti-oxydante, permettant aux cellules de dépasser ce stress.

#### D) Activation par les sensibilisants des récepteurs de l'immunité innée

L'effet dit « adjuvant » des sensibilisants de contact est lié à leur capacité à activer le système immunitaire inné. Chez la souris, il a été montré que la force de l'irritant détermine la sévérité de la réponse d'HSRC et oriente la balance immunité/tolérance (Bonneville *et al.*, 2007; Lass *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2008).

Les mécanismes moléculaires d'activation de l'immunité innée par les sensibilisants ont longtemps été peu connus, mais récemment, il a pu être montré que les DAMPs (« Damage-Associated Molecular Pattern »), de manière analogue aux structures conservées PAMPs (« Pathogen-or microbe-Associated Molecular Pattern ») des pathogènes microbiens, activent la réponse immunitaire innée via différents récepteurs dits PRR (« Pattern Recognition Receptor ») dont les TLR (« Toll Like Receptor ») associés à la membrane et les NLR (« Nod Like Receptor ») cytosoliques.



### **1) Les récepteurs « Toll like » (TLR) et leur activation par les sensibilisants de contact**

La famille des TLR est composée chez la souris comme chez l'homme d'au moins 13 récepteurs transmembranaires (Leulier and Lemaitre, 2008). Chez les mammifères, les TLR sont des homologues des protéines toll des drosophiles, mises en évidence par J. Hoffmann, prix Nobel 2011 et décrites pour permettre aux drosophiles une résistance aux infections fongiques pendant leur développement. Ces récepteurs, de par leur large site extracellulaire différent pour chacun des types de TLR, reconnaissent une grande variété de constituants microbiens hautement conservés (PAMP) et permettent ainsi une détection rapide des microorganismes (bactéries, virus, parasite, levures) par les cellules. Les TLR 1, 2, 4, 5, 6 et 11, principalement impliqués dans la reconnaissance de composantes des microorganismes (lipopeptides, glycolipides, protéines), sont essentiellement localisés à la surface des cellules tandis que les TLR 3, 7, 8, 9 et 13, impliqués dans la reconnaissance des structures de type acide nucléique sont intracellulaires, se situent sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (Anderson, 2000).

L'activation des TLR conduit à la synthèse de chimiokines et d'un grand nombre de cytokines (IFN, pro-IL1- $\beta$ , pro-IL-18, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10...) via les voies de signalisation MyD88 (« Myeloid Differentiation Factor 88 ») (production de cytokines) et TRIF (« TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  »)-dépendantes (production IFN de type 1 et de cytokines). De façon plus précise, suite à la fixation de leur ligand, les TLR forment un complexe récepteuriel homo ou hétérodimérique et changent de conformation afin de permettre en intracellulaire le recrutement des molécules de signalisation. Dans des complexes activés, le domaine intracellulaire du TLR interagit avec les protéines adaptatrices MyD88 et IRAK (« Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase »), conduisant à l'activation de la molécule adaptatrice associée au récepteur TRAF6 (« TNF-receptor-associated factor 6 ») (Cao *et al.*, 1996). Une fois activée, la protéine TRAF6 active à son tour une cascade de protéines conduisant à la phosphorylation du complexe IKK (« I $\kappa$ B Kinase ») et des MAPK, aboutissant à l'activation et la translocation des facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B et AP-1, permettant la production de cytokines inflammatoires. Le TLR4 possède la particularité d'induire aussi une signalisation intracellulaire indépendante de MyD88, puisque des souris MyD88<sup>-/-</sup> sont toujours capables de répondre au LPS (Kawai *et al.*, 1999), via l'intermédiaire des protéines TIRAP/MAL (« TIR domain-containing adapter protein »), voie non canonique.



Récemment, Martin et collaborateurs (2008) dans des études utilisant des souris KO (« Knock out ») ont mis en évidence que certains sensibilisants activent les TLR2 et 4 (Martin *et al.*, 2008). En effet, des mutations délétères sur les TLR chez des souris ( $\Delta$ TLR2/ $\Delta$ TLR4 ou alternativement  $\Delta$ TLR2 ou 4/ $\Delta$ IL-12R $\beta$ 2) annulent la sensibilisation aux TNCB, oxazolone et FITC. De plus, en absence de TLR2 ou de TLR4 l'activation des DC par les sensibilisants n'est que partielle puisqu'au-delà de l'augmentation des molécules de co-stimulation la production de cytokines pro-inflammatoires n'a pas lieu. D'autre part, il apparait que des souris déficientes en MyD88, à l'inverse des souris déficientes pour TRIF, ne sont pas sensibilisées au DNFB (Klekotka *et al.*, 2010), indiquant l'importance de la voie dépendante de la protéine MyD88 dans la réponse aux sensibilisants de contact.

Après avoir identifié les TLR impliqués dans la reconnaissance des sensibilisants, des expériences complémentaires ont permis de préciser la nature des ligands de ces récepteurs. Des souris exemptes de pathogènes présentent une réponse d'HSRC au TNCB normale ce qui suggère que la composante bactérienne présente sur la peau ne joue pas de rôle dans l'induction des TLR par les sensibilisants. Des dérivés de la matrice extracellulaire tels que l'acide hyaluronique de faible poids moléculaire, dégradés par les sensibilisants, via la génération d'espèces réactives de l'oxygène (Soltes *et al.*, 2006; Naik and Dixit, 2011), pourraient être des ligands endogènes des TLR2 et TLR4 (Schaefer *et al.*, 2005; Babelova *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2011). Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'en bloquant les fonctions de l'acide hyaluronique chez des souris exemptes de tout pathogène, la réponse d'HSRC est sensiblement diminuée (Martin *et al.*, 2008). Toutefois, dans le cas de certains métaux, il a été montré que le nickel est capable de se fixer directement sur TLR4 humain et d'activer les voies de signalisation en aval (Schmidt *et al.*, 2010).

En conclusion, la fonctionnalité des TLR2/4 dans les cellules dendritiques semble un premier élément essentiel à la réaction de sensibilisation. Bien que les ligands de ces TLR ne soient pas identifiés avec certitude, il apparait que dans le cas du nickel et du cobalt, les molécules se fixent directement sur les récepteurs tandis que dans les autres cas, les ligands semblent être des composés générés par le stress oxydant induit par les sensibilisants et notamment des fragments d'acide hyaluronique.



## 2) Le complexe NLR- inflammasome et son activation par les sensibilisants de contact

De la même façon que pour les autres récepteurs de l'immunité innée, les NLR sont hautement conservés tout au long de la phylogénie et possèdent une structure qui rappelle les protéines R des cellules des plantes responsables de la défense contre les bactéries pathogènes. Chez l'homme les NLR comptent au moins 23 membres. Comme les TLR, les NLR sont des senseurs de ligands bactériens comme les peptidoglycans, la flagelline, les toxines bactériennes ou encore les acides nucléiques. De plus, ils reconnaissent également des ligands endogènes comme l'ATP (Creagh and O'Neill, 2006; Mariathasan and Monack, 2007). Les NLR sont entre autre des constituants des complexes de protéines cytosoliques, contenant les molécules adaptatrices ASC et servant à l'activation des caspases (Martinon *et al.*, 2009). En particulier, le NLRP3, également appelé NALP3 est le plus décrit. En association avec les protéines CARDINAL et ASC, il forme l'inflammasome et induit l'activation de la caspase 1 qui va cliver les formes pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18, synthétisées suite à l'activation des TLR, aboutissant ainsi à la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 actives. L'inflammasome NLRP3 semble activé par des signaux de danger métaboliques comme l'efflux potassique qui survient suite à la disruption de la membrane plasmique ou bien en réponse à l'augmentation intracellulaire de l'ATP via le transporteur purinergique P2X<sub>7</sub>. Parmi les activateurs cliniques du NLRP3 on trouve également l'acide urique, les cristaux de cholestérol, la silice, l'aluminium et l'amiante.

L'activation de l'inflammasome semble importante dans l'HSRC puisque des souris déficientes pour le NLRP3 ou pour la protéine ASC présentent une réponse d'HSRC au TNCB diminuée (Watanabe *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2008). De la même façon, des souris déficientes pour la caspase-1 ou pour le récepteur à l'IL-1 $\beta$  (IL-1R) ne développent pas d'HSRC (Watanabe *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2008). Le parallèle a pu être établi entre le faible potentiel sensibilisant (voire tolérogène) d'une molécule comme le DNTB (2,4-dinitrothiocyanobenzène) et son incapacité à activer l'inflammasome, puisque lorsque du SDS (activateur de l'inflammasome) ou de l'IL-1 $\beta$  sont ajoutés, le DNTB est capable d'induire une HSRC chez la souris (Watanabe *et al.*, 2008).

Les mécanismes par lesquels les sensibilisants sont capables d'induire l'inflammasome sont encore peu connus. Il a cependant été montré que l'ATP, libéré par les cellules endommagées interagit avec les récepteurs purinergiques, notamment le récepteur P2X<sub>7</sub> qui induit un efflux de



potassium hors de la cellule, nécessaire à l'activation du NLRP3 inflammasome (Martinon *et al.*, 2009; Martinon, 2008). *In vivo*, le TNCB et l'oxazolone induisent une libération d'ATP par les cellules cutanées, résultant potentiellement en l'activation du NLRP3 via le P2X<sub>7</sub>, puisqu'on note l'absence d'HSRC chez des souris déficientes en P2X<sub>7</sub> (Weber *et al.*, 2010). De plus, il apparaît que des DC hapténisées provenant de souris P2X<sub>7</sub><sup>-/-</sup> ne sont pas capables de sensibiliser des souris sauvages tandis que l'inverse est vrai. Les DC issues de souris P2X<sub>7</sub><sup>-/-</sup> ne sont par ailleurs pas capables de produire de l'IL-1β suite à une stimulation avec le LPS ou l'ATP mais recouvrent cette fonction lorsque l'ATP est remplacé par de l'aluminium, capable d'induire directement l'inflammasome. L'ensemble de ces études montre donc que le P2X<sub>7</sub>, l'ASC et le NLRP3 sont des éléments essentiels pour la sensibilisation et doivent être fonctionnels chez les DC.

### E) Les principales voies de signalisation induites par les sensibilisants

Ainsi après avoir décrit les principaux senseurs cellulaires potentiellement activés par les sensibilisants de contact, nous allons nous intéresser aux voies de signalisation en aval induites permettant l'activation des KC et la maturation des DC.

#### **1) Activation par les sensibilisants de la cascade des MAPK**

Les « Mitogen-Activated Protein Kinases » (MAPK) sont des protéines sérine/thréonine kinases qui répondent aux stimuli extracellulaires et régulent de nombreuses activités des cellules comme l'expression de gènes, la mitose, la différenciation cellulaire ainsi que la survie/apoptose des cellules. On distingue trois sous-familles principales de MAPK : les « Extracellular signal Regulated Kinases » (ERK1/p44 et ERK2/p42) qui sont essentiellement activées après un stimulus de prolifération ou de différenciation, les p38 MAPK (p38, avec les isoformes principales α, β, β<sub>2</sub> et secondaires γ, δ) et les « c-Jun N terminal Kinases » (essentiellement JNK1 et JNK2 chacune avec les isoformes p46 et p54), dont l'activation est généralement attribuée à des signaux de stress tels que le choc osmotique, les UV, la réponse aux cytokines pro-inflammatoires IL-1β et TNF-α ainsi que la signalisation induite par les TLR. La cascade d'activation des MAPK s'organise sur 3 niveaux de phosphorylation : le signal de stress (ex. diminution du ratio GSH/GSSG) induit les « MAPK Kinase Kinases » (MKKK ou MEKK) (ex. ASK-1) qui activent les MKK (ou MEK) qui phosphorylent à leur tour les MAPK. Les MAPK ont essentiellement des facteurs de transcription comme substrat de leur activité de kinase : les protéines ERK phosphorylent Fos ainsi qu'Elk-1 (Chang *et al.*, 2003), p38 phosphoryle des



facteurs de transcription comme ATF-2, CHOP/gadd153, Elk-1 et MEF2c qui initient la transcription de c-Jun (Treisman, 1996) et JNK phosphoryle les facteurs de transcription de la famille Jun qui en s'homo ou s'hétérodimérisant avec les protéines Fos forment les complexes AP-1. Au niveau nucléaire, la protéine p38 participe aussi à la transcription de gènes régulés par d'autres facteurs de transcription que ses substrats. Par exemple, certains gènes dépendant de NF- $\kappa$ B ont besoin de l'activité de p38 pour être transcrits (Beyaert *et al.*, 1996; Sacconi *et al.*, 2002). D'autre part, une fois les facteurs de transcription activés, au niveau du cytoplasme, les MAPK toujours phosphorylées participent à la régulation post-transcriptionnelle des gènes en stabilisant leur ARNm. Par exemple, p38 stabilise l'ARNm de protéines comme l'enzyme COX-2 (cyclooxygénase 2) et les cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IL-6 (Lasa *et al.*, 2000; Clark *et al.*, 2003).

Les sensibilisants de par leur capacité à induire un stress cellulaire sont des activateurs des MAPK et en particulier de p38 (Mizuashi *et al.*, 2005). De nombreuses études *in vitro* confirment l'implication des MAPK dans la réponse des DC aux sensibilisants avec toutefois des profils différents en fonction des sensibilisants : le DNCB par exemple active p38 et JNK et l'induction de la maturation des DC (CD86, IL-8) en réponse au DNCB est dépendante de p38 tandis que le NiSO<sub>4</sub> active p38, JNK et ERK1/2 mais la maturation des DC en réponse au NiSO<sub>4</sub> semble dépendante d'autres facteurs que de p38 (Aiba *et al.*, 2003; Boislevé *et al.*, 2004; Boislevé *et al.*, 2005; Ade *et al.*, 2007; Trompezinski *et al.*, 2008). Au-delà de l'exemple du DNCB et du NiSO<sub>4</sub>, au laboratoire, nous avons pu montrer pour plus de 30 sensibilisants dans la lignée U937 que p38 est induit (données internes). *In vivo*, via l'utilisation d'inhibiteur pharmacologiques de p38 ainsi qu'en utilisant des souris hétérozygotes pour p38 $\alpha$ , il a été également montré que p38 participe à l'HRSC (Takanami-Ohnishi *et al.*, 2002).

## 2) Activation par les sensibilisants du facteur de transcription NF- $\kappa$ B

La famille des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B joue un rôle fondamental dans la régulation de l'immunité innée et spécifique (Li and Verma, 2002; Oeckinghaus *et al.*, 2011). La famille de NF- $\kappa$ B comprend cinq membres : NF- $\kappa$ B p50 (p105/ NF- $\kappa$ B1), NF- $\kappa$ B p52 (p100/ NF- $\kappa$ B2), p65 (RelA), RelB et cRel. NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription dimérique formé suite à l'homo ou l'hétérodimérisation de ses membres. Deux voies d'activation ont été décrites pour NF- $\kappa$ B : une voie dite classique canonique et une voie dite alternative non-canonique. L'activation des TLR induit la voie classique, la voie alternative étant activée par les récepteurs CD40. En ce qui concerne la voie classique, en l'absence de stimulation, le dimère NF- $\kappa$ B (p50/p65) est séquestré sous une forme inactive dans le cytoplasme par les molécules de la famille I $\kappa$ B. Suite



à son activation, IKK phosphoryle I $\kappa$ B, ce qui conduit à sa polyubiquitination et sa dégradation dans le protéasome 26S (Scherer *et al.*, 1995), libérant ainsi NF- $\kappa$ B. Les dimères NF- $\kappa$ B migrent alors au niveau du noyau et activent les gènes cibles en se liant dans les promoteurs à leurs sites  $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B est connu pour réguler l'expression d'un large spectre de gènes qui participent principalement aux réponses immunes et inflammatoires (COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , chimiokines...), des gènes codant pour des protéines de réponse au stress (iNOs) ou encore pour des protéines anti-apoptotiques (Oeckinghaus *et al.*, 2011).

Dans la DC, NF- $\kappa$ B joue un rôle dans la régulation de son développement, de sa maturation et de sa fonctionnalité. Plus particulièrement NF- $\kappa$ B participe à l'induction de l'expression de CD40, HLA-DR, CD86, CD83 et CD80 en réponse aux ligands des TLR (Yoshimoto *et al.*, 1997; O'Sullivan *et al.*, 2000; Arrighi *et al.*, 2001; Yoshimura *et al.*, 2001; Aiba *et al.*, 2003; Boislevé *et al.*, 2005; Tas *et al.*, 2005; Neves *et al.*, 2009). Dans les moDC la production d'IL-12, d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  induite par le LPS est sous le contrôle de NF- $\kappa$ B (Yoshimoto *et al.*, 1997; Ouaziz *et al.*, 2002; Severa *et al.*, 2005; Tas *et al.*, 2005).

L'implication de la voie NF- $\kappa$ B dans l'HSRC a été peu étudiée. Chez la souris, lorsque la signalisation NF- $\kappa$ B est inhibée dans les cellules T, les réponses d'HSRC sont sévèrement diminuées (Aronica *et al.*, 1999). De même, la mutation d'I $\kappa$ B- $\beta$  entraîne chez les souris transgéniques une diminution de la réponse d'HSRC au FITC par une diminution du taux de cellules T CD8<sup>+</sup>.

L'étude *in vitro* du rôle de NF- $\kappa$ B dans les DC en réponse aux sensibilisants a été initiée par Aiba et collaborateurs (2003). Les auteurs montrent que le NiCl<sub>2</sub> induit dans des moDC la phosphorylation d'I $\kappa$ B- $\alpha$  et l'activation de NF- $\kappa$ B de façon spécifique puisque ni le sodium lauryl sulfate (SLS) ni le chlorure de benzalkonium n'affecte cette voie (Aiba *et al.*, 2003). Plus récemment, Ade et collaborateurs (2007) ont montré que le NiSO<sub>4</sub> induit la maturation des CD34-DC via notamment l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (en activant la dégradation d'I $\kappa$ B- $\alpha$ ) tandis que le DNCB inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B (Ade *et al.*, 2007). Ce travail a récemment été étendu à d'autres haptènes métalliques indiquant que le NiSO<sub>4</sub> et le CoCl<sub>2</sub>, contrairement au K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, activent NF- $\kappa$ B dans des CD34-DC (Antonios *et al.*, 2009). D'autre part, l'absence d'activation de NF- $\kappa$ B par le DNCB et ses analogues a été confirmée par Megherbi et collaborateurs (2009) sur la lignée THP-1 (Megherbi *et al.*, 2009). L'implication du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans la maturation des DC semble être dépendante du sensibilisant considéré : en effet, l'ajout du BAY-117085, inhibiteur de NF- $\kappa$ B, inhibe



partiellement ou totalement l'expression de CD83, CD86, CD40 et HLA-DR induite par le NiSO<sub>4</sub> tandis qu'elle n'a aucun effet sur l'induction de l'expression de CD40 et HLA-DR par le DNCB.

En conclusion, un sensibilisant de contact, pour aboutir à la maturation de la DC induit un signal de stress et un déséquilibre de la balance redox cellulaire activant un ensemble de voies de signalisation qui vont agir de manière coopérative pour aboutir à l'expression de molécules de co-stimulation et à la production de médiateurs inflammatoires. Parmi les différents marqueurs que nous venons de décrire, certains (GSH, p38, Nrf2, CD86, CD54 ou encore IL-8) ressortent de manière récurrente et concordante au travers de différentes études menées dans différentes équipes. Cette connaissance des mécanismes d'action des sensibilisants a permis de développer des tests permettant de prédire le potentiel d'une molécule à être sensibilisante. Dans les paragraphes qui suivent les principaux tests actuellement utilisés seront détaillés.

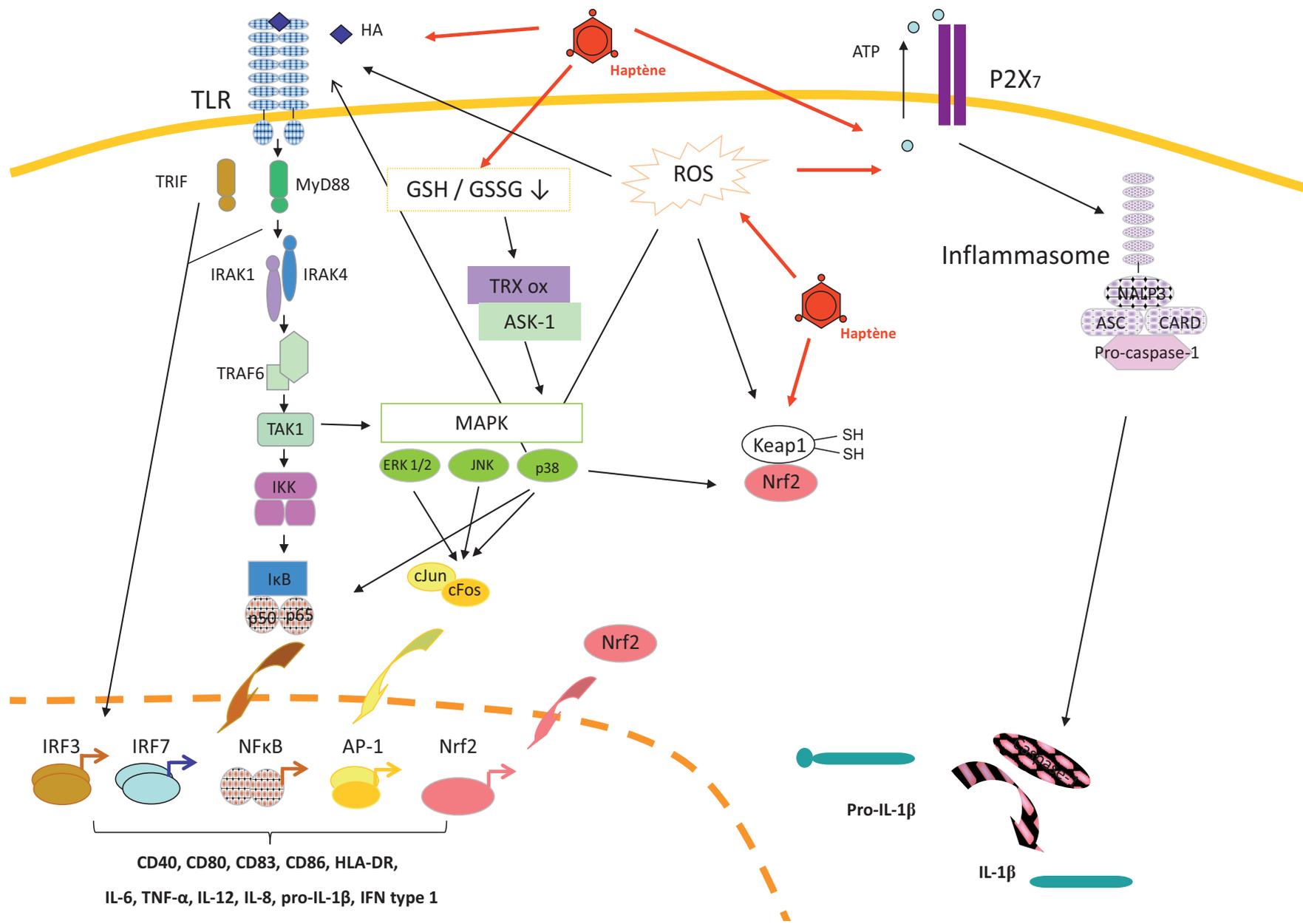
Figure 8 : Schéma de synthèse des voies de signalisation induites par les sensibilisants de contact dans les DC conduisant à leur maturation (Martin *et al.*, 2011).

Les sensibilisants (haptènes) agissent sur les DC à différents niveaux : ils induisent un déséquilibre de la balance redox [génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), diminution du ratio GSH/GSSG]. Ce stress va induire l'oxydation de la thioredoxine (TRX<sub>ox</sub>) qui va induire la phosphorylation de la MAPK Kinase Kinase ASK-1, qui à son tour phosphoryle une MKK qui phosphoryle les MAPK (ERK1/2, JNK et p38). Les MAPK phosphorylent ensuite les facteurs de transcription : par exemple elles activent c-Jun et cFos qui en se dimérisant forment le facteur de transcription AP-1.

Les sensibilisants de manière directe (réaction sur les résidus cystéine de Keap-1) et/ou indirecte (ROS, phosphorylation de Nrf2 par p38 MAPK) induisent le facteur de transcription Nrf2 qui après s'être détaché de Keap-1 « transloque » au noyau pour activer les gènes possédant la séquence ARE dans leur promoteur.

D'autre part les sensibilisants activent les récepteurs TLR2 et 4 en se liant soit directement (métaux type nickel) ou via la génération de ligands endogènes comme l'acide hyaluronique (HA) (i.e. activation par les ROS générés de hyaluronidases, enzymes dégradant la matrice extracellulaire). L'activation des TLR aboutit selon la voie MyD88 à l'induction du facteur de transcription NF-κB induisant l'expression de cytokines/chimiokines (IL-6, TNF-α, pro IL-1β...) et selon la voie TRIF à l'induction des facteurs de transcription IRF3/IRF7 permettant l'expression d'IFN-γ.

Enfin, les sensibilisants sont capables d'activer le complexe NALP3-inflammasome en induisant une libération d'ATP qui va induire le récepteur purinergique P2X<sub>7</sub> et consécutivement l'inflammasome. L'activation de l'inflammasome résulte en l'activation de la caspase-1 qui va cliver la pro-forme d'IL-1β pour donner une IL-1β active et sécrétée par les cellules.





## II. Tests alternatifs à l'expérimentation animale pour prédire le potentiel sensibilisant de molécules

Un certain nombre de paramètres sont à prendre en compte dans le développement de tests. Dans un premier temps les tests doivent démontrer leur reproductibilité, robustesse et pertinence dans leur capacité à discriminer des molécules sensibilisantes par rapport à des molécules non sensibilisantes, et ce, avec le même degré de performances que les modèles animaux actuellement utilisés, voire avec de meilleures performances vis-à-vis de la prédiction de l'homme. De plus, dans une perspective industrielle ces tests doivent permettre un débit relativement important, être faciles à mettre en œuvre et donc transférables et enfin, en lien avec les besoins des toxicologues dans l'évaluation du risque associé à une molécule donnée, l'approche alternative doit permettre de déterminer de manière quantitative le potentiel sensibilisant de la molécule. Actuellement il est admis qu'un seul test ne permettra pas de remplir tous ces critères et qu'une batterie de tests doit être développée (Jowsey *et al.*, 2006; Natsch *et al.*, 2009). De nombreux tests sont en cours de développement, à un stade plus ou moins avancé et visent à analyser les différentes propriétés des sensibilisants (pénétration dans les couches cornées de l'épiderme, réactivité chimique vis-à-vis de nucléophiles, capacité d'activer la réponse innée au niveau des cellules cutanées, induction de la prolifération de LT spécifiques de l'haptène...). Certains sont déjà au stade de la validation pour une acceptation réglementaire (Aeby *et al.*, 2010). Dans les paragraphes suivants nous détaillerons les tests alternatifs résultant de la connaissance des mécanismes d'action pré-immuns des sensibilisants en résumant leurs principes et leurs performances de prédiction.

### A) Approches in silico ou toxicologie computationnelle

Les méthodes de prédiction *in silico* sont basées sur le postulat que les propriétés des molécules (dont les propriétés biologiques) dépendent de leur nature intrinsèque et peuvent être prédites directement à partir de leur structure moléculaire et/ou déduites des propriétés de composés proches dont l'activité est connue. Ces méthodes comprennent les modèles structures activité quantitatives ou non [(Quantitative) Structure Activity Relationship –(Q)SAR] ainsi que les approches de groupement/catégorisation chimiques et *read across* (extrapolation). Les (Q)SAR sont donc des modèles théoriques qui rattachent la structure et les propriétés physico-chimiques d'une molécule à des activités biologiques/toxicologiques, grâce à la définition de descripteurs moléculaires. Dans le cas des modèles SAR, les liens sont qualitatifs



tandis que les modèles QSAR permettent une quantification du potentiel. Parmi les approches (Q)SAR on distingue les modèles empiriques/statistiques qui prédisent à partir de règles statistiques établies sur un grand nombre de données (par ex. TOPKAT), des modèles mécanistiques ou modèles experts qui prédisent à partir de connaissances sur les mécanismes d'action des molécules (par ex. DEREK) (Sanderson and Earnshaw, 1991; Barratt *et al.*, 2000). Il existe également des modèles hybrides qui combinent les deux approches (e.g. TIMES-SS) (Patlewicz *et al.*, 2007b). Ces modèles peuvent ensuite être catégorisés en modèles locaux ou globaux, selon qu'ils s'appliquent pour une classe chimique bien spécifique ou pour des classes multiples avec plusieurs mécanismes d'action. Un certain nombre de modèles, disponibles commercialement, présentent des modules de prédiction de la sensibilisation : TOPKAT, DEREK, TOPS-MODE, Multi-CASE et TIMES-SS. Dans ce dernier, un simulateur de métabolisme cutané est intégré.

En plus des modèles prédisant le caractère sensibilisant des molécules, il existe des modèles comme TOXTREE qui associent les molécules à un domaine mécanistique de réactivité (Dimitrov *et al.*, 2005; Patlewicz *et al.*, 2008). Ainsi, dans le cas de la sensibilisation, cinq classes de mécanismes réactionnels ont été identifiées : accepteurs de Michael, électrophiles de type S<sub>N</sub>Ar, électrophiles S<sub>N</sub>2, bases de Schiff et agent acylants (Aptula *et al.*, 2005; Aptula and Roberts, 2006), comme décrits dans le chapitre « Réactivité des haptènes ».

Des études de performances des différents outils ont été réalisées par le passé mais sont difficilement comparables car varient en fonction de la taille des sets d'évaluation, des espaces chimiques couverts et des versions de logiciel considérées (Patlewicz *et al.*, 2007a; Roberts *et al.*, 2007). De plus, de façon encore plus marquée que pour les autres tests, la notion de domaine d'application est déterminante pour les outils *in silico*.

### B) Approches *in chemico*, test DPRA ("Direct Peptide Reactivity Assay")

Comme nous l'avons vu précédemment, la majorité des haptènes sont des électrophiles et réagissent de ce fait avec des nucléophiles cellulaires comme le GSH ou des résidus des protéines comme la cystéine (Cys) ou la lysine (Lys), le plus souvent en formant des liaisons covalentes. Cette caractéristique peut être mesurée en utilisant des tests de réactivité peptidique. Différentes méthodes existent (Roberts *et al.*, 2008): la mesure de la réactivité en cinétique, la détermination de la dose donnant 50% de réaction à un temps donné ou encore la quantification du pourcentage de déplétion. La plupart des tests mesure soit la disparition du nucléophile soit la formation de l'adduit entre l'électrophile et le nucléophile et ce par différentes méthodes analytiques [HPLC (chromatographie liquide de haute performance) UV ou HPLC



couplée à la spectrométrie de masse]. Dans un cas le test est rapide, quantitatif et adapté à l'évaluation en routine et dans l'autre, le test permet une connaissance plus fine de la réaction et des mécanismes réactionnels mis en jeu. Les nucléophiles souvent utilisés dans les tests sont des peptides de synthèse avec un ou plusieurs résidus Lys, His ou Cys (Gerberick *et al.*, 2004; Gerberick *et al.*, 2007; Gerberick *et al.*, 2008; Natsch and Emter, 2008; Natsch and Gfeller, 2008). Le GSH, tripeptide et thiol le plus abondant dans les cellules, est également utilisé (Bohme *et al.*, 2009).

Le protocole du test DPRA, développé par les équipes de Gerberick et Lepoittevin (2004) mesure par HPLC UV la déplétion par une molécule de deux peptides de synthèse contenant des résidus Cys ou Lys (Gerberick *et al.*, 2004; Gerberick *et al.*, 2007). Le modèle prédictif du test utilise un arbre de décision aboutissant à la définition de catégories de réactivité (Gerberick *et al.*, 2007). En utilisant ce test, la réactivité ainsi mesurée montre une très bonne corrélation (>80%) avec les catégories de potentiel mesurées par le LLNA. Le DPRA est à présent dans une phase de pré-validation à l'ECVAM.

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

### C) Tests d'activation des cellules myéloïdes, MUSST (« Myeloïd U937 Skin Sensitization Test »)

Comme nous l'avons vu précédemment, lors du contact avec l'haptène et en réponse aux signaux de danger perçus, la DC est activée (*i.e.* augmentation des molécules de co-stimulation et d'adhésion, sécrétion de cytokines, perte des fonctions de capture d'antigènes). Les DC et leurs mécanismes de maturation étant bien documentés, elles sont largement utilisées pour le développement de tests *in vitro* de détection du potentiel sensibilisant. Parmi les différents types de cellules de type DC on distingue deux sources principales : les DC différenciées à partir de cellules précurseurs du sang [à partir de monocyte CD14<sup>+</sup> (mo-DC) ou de cellules souches de sang de cordon CD34<sup>+</sup> (CD34-DC)] et les lignées cellulaires myéloïdes. Bien que de nombreuses études montrent que les DC issues de précurseurs de sang, modèle le plus pertinent physiologiquement, ont la capacité de discriminer les molécules sensibilisantes sur la



base d'un set de marqueurs (dos Santos *et al.*, 2009), leur mise en œuvre reste limitée pour des problèmes d'approvisionnement, de coût et en raison de la complexité de leur préparation et surtout de l'importante variabilité qu'il existe entre différents donneurs (Casati *et al.*, 2005). Pour pallier aux problèmes de variabilité, des lignées cellulaires myéloïdes comme les lignées THP-1, U937, KG-1 et MUTZ-3 sont utilisées. Les différentes lignées ainsi que les paramètres associés utilisés pour détecter le pouvoir sensibilisant des molécules a récemment été synthétisé (dos Santos *et al.*, 2009). Actuellement deux tests (h-CLAT et MUSST) sont bien avancés dans le processus de validation auprès de l'ECVAM. Dans le test MUSST développé par L'Oréal et Cosmital SA, Procter & Gamble (Rousset *et al.*, 2000; Ade *et al.*, 2006; Python *et al.*, 2007), les cellules U937 sont exposées en plaques 96 puits pendant 48h à une gamme de six concentrations de la molécule à tester. La viabilité cellulaire ainsi que l'expression de la molécule de co-stimulation CD86 sont analysées en cytométrie en flux. 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. Les performances générales du test sont supérieures à 80%.

Par ailleurs, plusieurs études génomiques ont été réalisées sur des DC (moDC, CD34-CD, lignées U937 et THP-1) (Ryan *et al.*, 2004; Gildea *et al.*, 2006; Cluzel-Tailhardat *et al.*, 2007; Schoeters *et al.*, 2007; Python *et al.*, 2009). Ces études ont permis de mettre en évidence non seulement des sensibilisants forts (DNCEB) mais également des sensibilisants faibles et modérés (eugenol, hexyl cinnamic aldéhyde, hydroxycitronellal). Même si le set de gènes permettant de discriminer les sensibilisants des autres molécules diffère en fonction des conditions expérimentales, la plupart des études met en évidence des gènes cibles de Nrf2 (*nqo1*, *ho-1*, *il-8* ...) sous le contrôle du promoteur ARE comme marqueurs spécifiquement modulés par les sensibilisants. Actuellement plusieurs tests de prédiction issus de ces approches génomiques sont disponibles et présentent de relativement bonnes performances [Vitosens<sup>®</sup> (Hooyberghs *et al.*, 2008; Lambrechts *et al.*, 2009), Sensitiv GARD<sup>®</sup> (Johansson *et al.*, 2011)].

#### D) Activation des KC, le test KeratinoSens

L'importance de la voie de signalisation de réponse au stress oxydant (voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE) suite à l'application d'un sensibilisant a été traduite dans un test par le groupe Givaudan (Parfumeur) via la construction d'une lignée contenant un gène rapporteur constitué des séquences ARE du gène humain AKR1C2 inséré en amont du gène codant pour la luciférase (Natsch and Emter, 2008; Natsch *et al.*, 2011). La lignée de kératinocytes HaCaT a



ainsi été transféctée de manière stable et elle est à présent utilisée sous le nom de la lignée rapportrice KeratinoSens. L'induction de la luciférase est utilisée pour évaluer des sensibilisants. Les performances de prédiction ont été analysées sur un set de 67 molécules de références et une concordance générale de 85% a été déterminée. Une étude inter-laboratoires récemment achevée montre que le test est simple à mettre en œuvre, transférable et reproductible (Natsch *et al.*, 2011). Pour toutes ces raisons, le test est considéré comme un bon candidat pour une pré-validation à l'ECVAM.

Ainsi un certain nombre de tests, basés sur la connaissance des mécanismes d'action moléculaires et cellulaires des sensibilisants, existent. Au-delà des cytokines et des chimiokines et de leurs voies de signalisation, les médiateurs lipidiques et en particulier les prostaglandines sont décrites pour participer à la maturation des DC et ont un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire. Dans la dernière partie de cette introduction nous nous intéresserons à la prostaglandine E<sub>2</sub>, sa synthèse, ses fonctions immunomodulatrices ainsi que ses liens éventuels avec les mécanismes de l'HSRC.



## Partie III : La prostaglandine E<sub>2</sub>, un métabolite de l'acide arachidonique

### I. Métabolisme de l'acide arachidonique (AA)

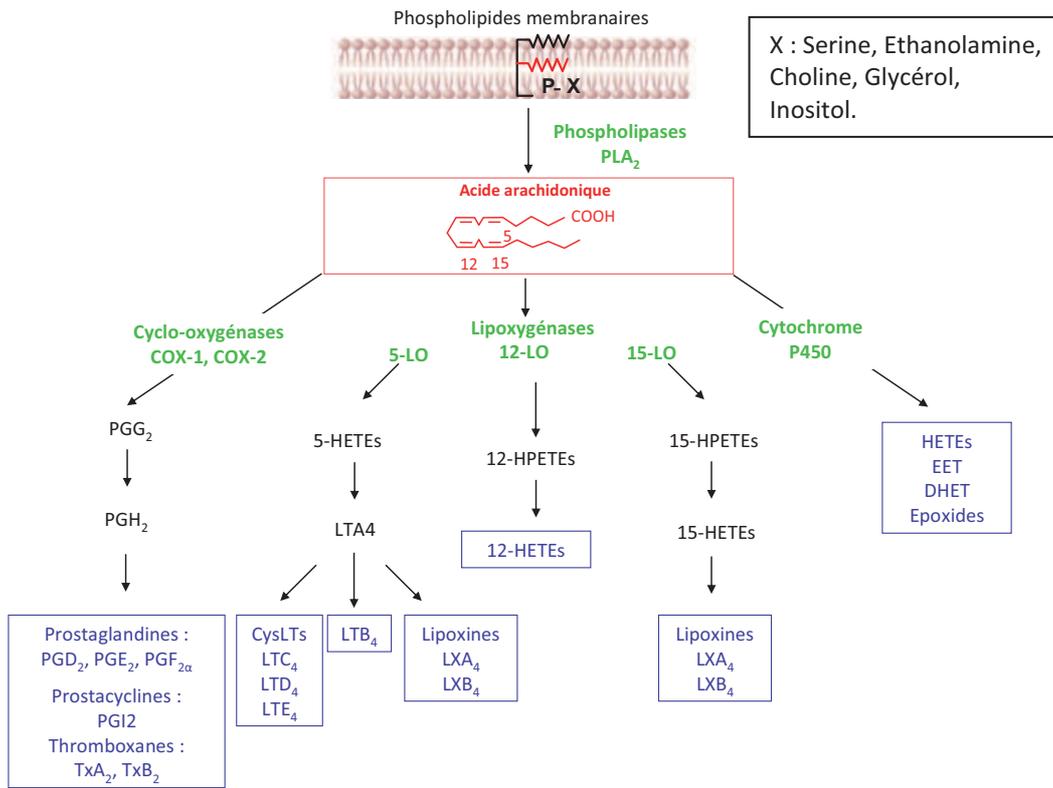
Les eicosanoïdes sont des médiateurs lipidiques intervenant notamment dans les réactions inflammatoires. Ils sont issus de la métabolisation d'acides gras polyinsaturés comportant 20 atomes de carbone et 3 à 5 doubles liaisons *cis*. Parmi les constituants des lipides cellulaires, l'acide arachidonique (AA) ou acide 5, 8, 11, 14 eicosatétraénoïque C<sub>20:4</sub> est l'acide gras prépondérant. Suite à sa libération des lipides membranaires sous l'action des phospholipases, l'AA peut être métabolisé par la voie des cyclooxygénases (COX) conduisant à la synthèse de prostanoides (prostaglandines, thromboxanes et prostacyclines) (Smith, 1992), par la voie des lipoxygénases (LOX) conduisant à la synthèse des leucotriènes, des acides hydroperoxy- et hydroxy-eicosatétraénoïques (HPETEs et HETEs) et des lipoxines (Goetzl *et al.*, 1995), et/ou par la voie des monooxygénases dépendantes du cytochrome P450 conduisant à la formation des acides époxyeicosatriénoïques (EET) qui sont rapidement hydrolysés par l'époxyde hydrolase en acides dihydroxyeicosatriénoïques (DHET) (Holtzman, 1991; Spector, 2009). Ces différentes voies de métabolisation sont schématisées dans la figure 9A.

Chez l'homme, les eicosanoïdes produits en réponse à un stimulus agissent par voie autocrine (Narumiya *et al.*, 1999) ou paracrine (Yokomizo *et al.*, 1997). De par leurs multiples fonctions biologiques (résumées dans le tableau 2) les eicosanoïdes sont d'importants médiateurs des événements physiologiques. Ils contribuent également aux différents aspects d'une réaction inflammatoire aiguë (fièvre, douleur, œdème) et sont impliqués dans différentes pathologies à composante inflammatoire parmi lesquelles on peut citer l'asthme, la polyarthrite rhumatoïde, les leucémies pour les leucotriènes et le cancer, les maladies cardiovasculaires et intestinales pour les prostanoides.

Dans la suite de ce chapitre, nous nous focaliserons sur l'une des familles de métabolites de l'AA, les prostanoides et plus particulièrement sur la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), en détaillant la voie métabolique des cyclooxygénases conduisant à leur synthèse. Nous nous intéresserons enfin à leur mode d'action, leurs fonctions immunomodulatrices ainsi que leurs liens éventuels avec les mécanismes de l'HSRC.



A



B

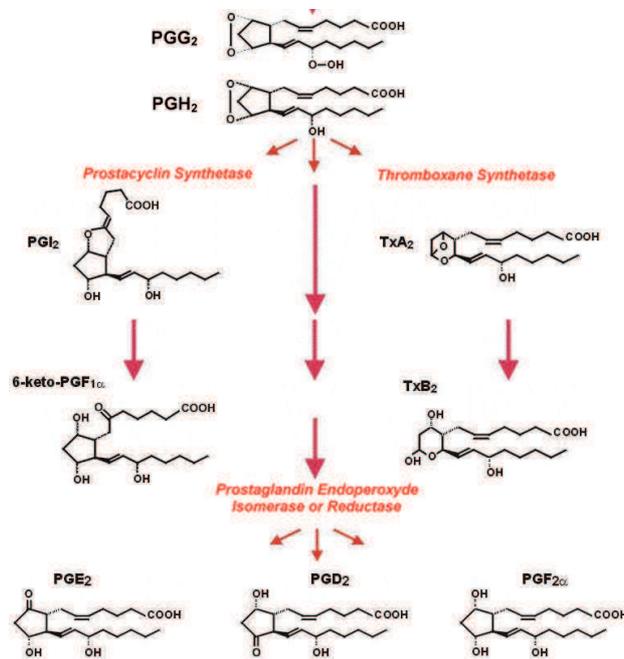


Figure 9 : Métabolisme de l'acide arachidonique

A) Cascade métabolique de l'AA par la voie des COX, LOX et CYP450

B) Métabolisme de la COX-2, détail des structures chimiques des métabolites



**Tableau 2 : Principales activités biologiques des eicosanoïdes**

<b>Eicosanoïdes</b>	<b>Effet biologique majeur</b>
PGD <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bronchoconstriction</li> <li>• Faible inhibiteur de l'agrégation plaquettaire</li> </ul>
PGE <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stimulation réponse hyperalgique (douleur)</li> <li>• Promotion inflammation</li> <li>• élévation du point de thermorégulation dans l'hypothalamus antérieur (fièvre)</li> <li>• Vasodilatation rénale et bronchiale</li> <li>• Inhibiteur de l'agrégation plaquettaire</li> <li>• Réduction des sécrétions gastriques acides</li> <li>• Stimulation relaxation du muscle lisse de l'utérus</li> </ul>
PGF <sub>2α</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bronchoconstriction, vasoconstriction</li> <li>• Stimulation contraction muscle lisse utérin</li> </ul>
TXB <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bronchoconstriction, vasoconstriction,</li> <li>• Agrégation plaquettaire</li> </ul>
PGI <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasodilatation, bronchodilatation</li> <li>• Inhibition de l'agrégation plaquettaire</li> <li>• Relaxant utérin</li> <li>• Augmentation de la perméabilité vasculaire</li> <li>• Amplification de la réponse nerveuse (douleur)</li> </ul>
LTB <sub>4</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Migration, adhésion et activation des leucocytes</li> <li>• Mucosécrétion</li> </ul>
LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> , LTE <sub>4</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bronchoconstriction, vasoconstriction</li> <li>• Augmentation de la perméabilité vasculaire</li> <li>• Recrutement des leucocytes</li> </ul>
5- ou 12- HPETE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasodilatation circulation gastrique (animaux)</li> </ul>
5- ou 12- HETE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agrégation leucocytes</li> <li>• Promotion chimiotactisme</li> </ul>
Lipoxine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition recrutements leucocytes</li> </ul>



## II. Synthèse des prostanoïdes

La première prostaglandine, isolée par M. W. Goldblatt et U.S. von Euler en 1935 à partir des glandes de la prostate et du liquide séminal, avait été caractérisée pour sa capacité à induire la contraction du muscle lisse et à réduire la pression sanguine. La plupart des cellules synthétise des niveaux basaux quasiment indétectables de prostaglandines, mais, suite à leur activation, les cellules sont rapidement capables de synthétiser *de novo* des prostaglandines, qui agissent de façon para ou autocrine. Un large spectre de stimuli (cytokines, facteurs de croissance, traumatisme mécanique, agents pathogènes...) régule cette synthèse. La prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) aussi appelée dinoprostone est la prostaglandine la plus abondante de la voie métabolique des cyclooxygénases. Il s'agit d'un acide carboxylique insaturé constitué d'une chaîne principale à 20 carbones contenant un cycle cyclopentane. Les prostaglandines E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), la prostacycline I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) ainsi que le thromboxane B<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>), appartiennent tous aux prostaglandines de la série 2 puisqu'ils comportent deux doubles liaisons sur leurs chaînes latérales mais ils diffèrent cependant par leur degré d'oxydation (fig. 9B) (Smith *et al.*, 2000; Funk, 2001; Harris *et al.*, 2002; Simmons *et al.*, 2004). La cascade métabolique conduisant à la synthèse de ces prostanoïdes qui sera détaillée par la suite comprend trois principales étapes : 1) la mobilisation de l'AA par les phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), 2) l'oxydation/peroxydation de l'AA en prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) sous l'action des COX et 3) la métabolisation de PGH<sub>2</sub> en différents prostanoïdes sous l'action des synthases.

### A) Déclenchement de la cascade métabolique, le rôle des phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) dans la mobilisation de l'acide arachidonique (AA)

#### 1) Les phospholipases A<sub>2</sub>

L'AA est présent dans la cellule sous forme estérifiée au niveau des phospholipides membranaires en position *sn*-2. Les phospholipides membranaires concernés sont principalement la phosphatidylcholine mais aussi la phosphatidylsérine, le phosphatidylinositol, la phosphatidyléthanolamine et le phosphatidylglycérol. L'AA peut également être lié aux lipides neutres sous forme d'acylglycérol ou peut se trouver sous forme estérifiée au cholestérol.

La première étape de la synthèse des prostanoïdes est la libération de l'AA à partir des phospholipides membranaires. Cette étape limitante fait intervenir des PLA<sub>2</sub>.

La famille des PLA<sub>2</sub> est un groupe important et diversifié d'enzymes qui sont regroupées en plusieurs sous-familles principales basées sur leur homologie de structure et leur localisation cellulaire. Les PLA<sub>2</sub> hydrolysent la liaison ester des phospholipides en *sn*-2 en libérant un



acide gras et en formant un lysophospholipide. Les PLA<sub>2</sub> des mammifères peuvent être regroupées en 3 familles principales : les formes sécrétées (sPLA<sub>2</sub>), les formes cytosoliques calcium-indépendantes (iPLA<sub>2</sub>) et les formes cytosoliques calcium-dépendantes (cPLA<sub>2</sub>) (Burke and Dennis, 2009).

Les PLA<sub>2</sub> sécrétées (sPLA<sub>2</sub>) sont généralement caractérisées par un faible poids moléculaire (14-19 kDa), comportent l'histidine et l'acide aspartique dans leur site catalytique et ne sont pas spécifiques d'acide gras. Le calcium sert de cofacteur catalytique dans l'activité des sPLA<sub>2</sub>. Alors que le rôle des PLA<sub>2</sub> cytosoliques (du groupe IVA) est bien établi dans la synthèse des eicosanoïdes, l'implication des sPLA<sub>2</sub> dans ce processus n'est pas clairement identifié (Lambeau and Gelb, 2008). Toutefois, il est bien établi que la sPLA<sub>2</sub> du groupe IIA s'accumule à un niveau élevé au cours de l'inflammation, par exemple, dans le fluide synovial de patients souffrant d'arthrite, en particulier de polyarthrite rhumatoïde, et dans le sérum des patients septiques. La fonction biologique la mieux comprise des sPLA<sub>2</sub> est leurs rôles dans l'immunité innée comme un puissant agent antimicrobien.

Les iPLA<sub>2</sub> font parties du groupe VI de la famille des PLA<sub>2</sub>. De même que pour la cPLA<sub>2</sub>, le poids moléculaire de la iPLA<sub>2</sub> est plus élevé (65 et 85 kDa respectivement). Toutes les enzymes de ce groupe sont caractérisées par une activité catalytique en absence de calcium. Comme les cPLA<sub>2</sub>, les iPLA<sub>2</sub> présentent une sérine dans le site actif pour catalyser le clivage de la liaison ester en *sn*-2, mais contrairement aux cPLA<sub>2</sub>, elles ne montrent pas de spécificité pour l'AA. Les iPLA<sub>2</sub> interviendraient à l'état basal dans le remaniement des acides gras dans les phospholipides membranaires (Balsinde and Dennis, 1997).

## 2) La cPLA<sub>2</sub>

Les phospholipases de type IV cytosoliques (cPLA<sub>2</sub>) sont centrales dans la synthèse des prostaglandines à partir de l'AA puisque des cellules déficientes pour cette isoforme ne sont pas capables de produire de prostaglandines (Bonventre *et al.*, 1997). Les cPLA<sub>2</sub> sont des enzymes largement distribuées et leurs transcrits sont exprimés à un niveau relativement constant dans tous les tissus humains, y compris dans les KC. En revanche, elles sont totalement absentes des lymphocytes B et T matures. Une variété de cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), de facteurs de croissance (CSF) ont été décrits comme capables d'induire la synthèse et l'activité des cPLA<sub>2</sub>. En effet, le promoteur du gène de la cPLA<sub>2</sub> contient des sites de fixation pour les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, NF-IL6, AP-1, AP-2, PEA3, OCT, C/EBP et des éléments de réponse à l'IFN- $\gamma$  ainsi qu'aux glucocorticoïdes. D'autre part, il a été montré que certains facteurs comme le phorbol myristate acétate (PMA), des facteurs de croissance ou encore le sérum exercent une régulation post-transcriptionnelle sur la cPLA<sub>2</sub>, en augmentant la demi-vie de l'ARNm de la cPLA<sub>2</sub> dans des cellules mésenchymateuses de rat (Tay *et al.*,



1994). Parmi les neufs résidus cystéine qui composent l'enzyme et assurent sa stabilité en milieu réducteur, certains, dont la Cys<sup>331</sup> sont proches du site actif et semblent indispensables pour l'activité de la cPLA<sub>2</sub>, puisqu'il a été montré *in vitro* que leur modification par des actifs réagissant avec les thiols (ex. DTNB) entraîne la perte d'activité de l'enzyme (Li *et al.*, 1996; Kramer and Sharp, 1997) (fig. 10). D'autre part, plusieurs faisceaux de preuves convergent à démontrer que la cPLA<sub>2</sub> contient une sérine nucléophile dans son site actif. Précisément, des études ont montré que des mutations sur la Ser<sup>228</sup> entraînent la perte de l'activité catalytique, suggérant le rôle prépondérant de cette Ser dans le site actif (Leslie, 1997) (fig. 10). L'enzyme est constituée de deux domaines avec des fonctions structurale et fonctionnelle distinctes: l'extrémité N-terminale qui se lie à la membrane et l'extrémité C-terminale responsable de l'activité catalytique. La cPLA<sub>2</sub> a besoin de calcium pour son activité, plus nécessaire à la liaison de l'enzyme à la membrane ou aux vésicules phospholipidiques que pour l'activité catalytique elle-même. En effet, la cPLA<sub>2</sub> contient un domaine de liaison aux phospholipides calcium-dépendant (CaLB) dans son extrémité N-terminale qui présente une forte homologie avec les domaines C2 des formes conventionnelles de la PKC. Ainsi, lorsque la concentration intracellulaire en Ca<sup>2+</sup> augmente, l'enzyme « transloque » depuis le cytosol vers les membranes du Golgi ou périnucléaires. Quatre des cinq groupes acides qui sont supposés se lier au Ca<sup>2+</sup> (Asp<sup>37</sup>, Asp<sup>43</sup>, Asp<sup>93</sup> et Glu<sup>100</sup>) sont présents dans le domaine de CaLB (Leslie, 1997). Une concentration de calcium entre 0,3 et 1 μM favorise la liaison de la cPLA<sub>2</sub> à la membrane et ce résultat corrèle avec les concentrations nécessaires pour stimuler *in vitro* l'activité catalytique de l'enzyme. Dans de nombreux types cellulaires, une augmentation stable de l'activité de la cPLA<sub>2</sub> est observée en présence d'agonistes induisant la phosphorylation des Ser. Plus précisément, il a été montré que la cPLA<sub>2</sub> requiert une phosphorylation de la Ser<sup>505</sup> et/ou de la Ser<sup>727</sup>, induite par les MAPK, dont la p38 (Clark *et al.*, 1995). D'autres types de kinases comme les PKC ou la protéine kinase A (PKA) peuvent phosphoryler la cPLA<sub>2</sub> *in vitro*. *In vivo*, il n'y a pas en revanche de preuve d'une phosphorylation directe de la cPLA<sub>2</sub> par les PKC. L'activation des PKC doit donc agir indirectement sur la phosphorylation via l'activation de la cascade de kinases conduisant *in fine* à l'activation de MAPK, telles p42, p43, p38 ou encore JNK qui ont montré la capacité *in vitro* de phosphoryler directement la cPLA<sub>2</sub> (Kramer *et al.*, 1996). Dans certains types cellulaires, une mutation au niveau de la Ser<sup>505</sup> n'a pas d'effet sur la translocation de l'enzyme mais annule la mobilisation d'AA ; ces résultats montrent bien la nécessité d'avoir l'ensemble des signaux pour que l'activité de l'enzyme soit optimale : 1) une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et 2) la phosphorylation de l'enzyme.



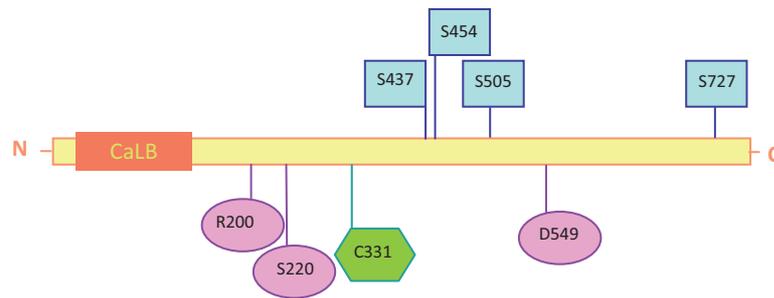


Figure 10 : Représentation schématique de la structure primaire de la cPLA<sub>2</sub> (Leslie, 1997).

La partie N-terminale contenant le domaine CaLB (orange) permet la liaison à la membrane calcium dépendante. La Serine<sup>505</sup> est phosphorylée par les MAPK. Les résidus essentiels à l'activité catalytique sont représentés en violet. La Serine<sup>228</sup> constitue le site actif nucléophile. La modification du thiol de la Cysteine<sup>331</sup> (vert) conduit à la perte de l'activité de l'enzyme.

## B) Le devenir de l'AA libéré, la voie des cyclo-oxygénases (COX)

### 1) Les cyclooxygénases

La synthèse de prostanoides étant conditionnée par la quantité d'AA libéré, l'AA mobilisé par la cPLA<sub>2</sub> est immédiatement métabolisé au niveau de l'extrémité luminale des membranes nucléaires et du réticulum endoplasmique (RE) en un intermédiaire prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) sous l'action des COX.

Les COX, également appelées « prostaglandine endoperoxyde synthases » en référence à leur activité enzymatique, catalysent en effet deux réactions successives (fig. 11/12A) : 1) une cyclo-oxygénation : insertion d'oxygène moléculaire (en position 9, 11 endoperoxyde) concomitante à une cyclisation, formant le 15-hydroperoxyde de l'AA et conduisant à la production de la prostaglandine G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) ; 2) une peroxydation : réduction de l'hydroperoxyde pour former l'hydroxyle correspondant (réaction d'hydroperoxydation) conduisant à la formation de la PGH<sub>2</sub>. L'enzyme COX, existe sous trois isoformes (Smith *et al.*, 2000; Simmons *et al.*, 2004; Park and Christman, 2006). La forme exprimée constitutivement, COX-1 est responsable de la synthèse des prostanoides au niveau basal ainsi que lors d'une stimulation pour une synthèse immédiate de prostanoides, tandis que COX-2 est induite par des cytokines, facteurs de croissance et essentiellement impliquée dans la régulation de la réponse inflammatoire. Récemment, une troisième isoforme, COX-3, a été décrite. Il s'agit d'une variante par épissage alternatif de COX-1 exprimée surtout dans le cerveau et le cœur.

Les COX sont composées de 4 domaines distincts dans leur structure protéique : un domaine EGF-like (« Epidermal Growth Factor ») dans la partie N-terminale, un domaine de



liaison à la membrane (MBD/« Membrane Binding Domain ») et un grand domaine correspondant aux deux sites catalytiques (cyclo-oxygenase et peroxydase) de l'enzyme comportant la partie hémique (Simmons *et al.*, 2004). La partie C-terminale, de taille très restreinte, appelée PTEL pour COX-1 et STEL pour COX-2 correspond au peptide signal de rétention dans le RE. La structure des COX, comprenant des hélices à 50 acides aminés, permet un ancrage hydrophobe à la membrane. En effet, COX-1 et COX-2 sont hémimembranaires, localisées dans le RE (côté luminale) ainsi que sur la membrane nucléaire (Otto and Smith, 1994; Spencer *et al.*, 1998). La demi-vie catalytique des COX est relativement courte (1 à 2 minutes) quand elles sont exposées à des concentrations d'AA proches de V<sub>max</sub>. Ceci s'explique par la formation de peroxyde arachidonique et autres espèces radicalaires comme le malondialdéhyde qui attaquent directement la structure des enzymes.

## 2) COX-2

L'isoforme COX-2, pas ou peu exprimée dans les tissus normaux, est induite par des cytokines, facteurs de croissance, oncogènes ou encore des promoteurs de tumeur. La structure du gène, situé sur le même chromosome que la cPLA<sub>2</sub> (chromosome1q25), se compose de 10 exons et code pour une protéine de 74 kDa que l'on trouve sous la forme d'un homodimère. En amont du gène, on trouve des éléments de régulation transcriptionnelle, notamment Sp1 et AP-2 identiques à la région régulatrice de COX-1 mais également AP-1, NF-κB, CRE/E box (Sirois and Richards, 1993) (fig. 11). De plus, PPAR-γ régule aussi la transcription du gène codant pour COX-2 (PPRE) (Chene *et al.*, 2007). En Western Blot l'enzyme est fréquemment observée sous une forme pluri-glycosylée (multiples bandes), dont la fonction à ce jour n'est pas connue (Nemeth *et al.*, 2001).

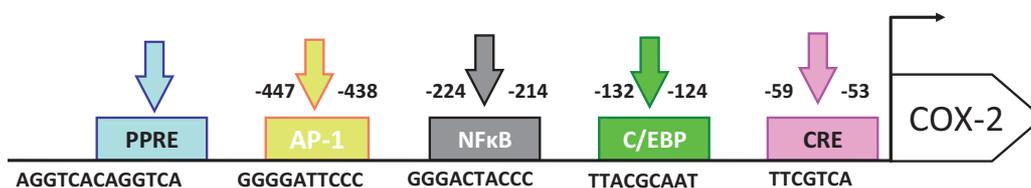


Figure 11 : Facteurs de transcription régulant l'expression du gène de COX-2.

PPRE : PPAR<sub>γ</sub> Response Element ; AP-1 : Activation Protein 1 ; NF-κB : Nuclear Factor kappa B ; C/EBP : CCAAT Enhancer Binding Protein-α ; CRE : cAMP Response Element.

Les deux homodimères de l'enzyme sont maintenus via des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogènes et des ponts salins entre les domaines de dimérisation de chaque monomère. Trois ponts disulfures maintiennent le complexe et un quatrième joint le domaine



de dimérisation au domaine catalytique globulaire. La présence de liaisons disulfures, qui nécessitent un environnement oxydant, est en cohérence avec la localisation des COX, côté luminal des membranes nucléaire, golgienne ou endoplasmique, qui ont un état redox significativement plus oxydant que le cytosol. COX-2 est une enzyme bifonctionnelle avec deux sites actifs distincts (fig. 12B). Le site actif cyclooxygénase est un tunnel étroit, d'approximativement 8 Angstroms de large et 25 de long, qui s'ouvre sur le domaine de liaison à la membrane. Ce site accepte l'AA libéré. Les acides aminés qui le constituent sont relativement hydrophobes et servent de « solvant » au substrat lui-même hydrophobe (Picot and Garavito, 1994). L'Arg<sup>119</sup> établit une liaison de coordination avec le groupe carboxyl de l'AA par un pont salin ou une liaison hydrogène. La Tyr<sup>385</sup> contenue dans le site actif forme un radical tyrosyl essentiel à l'initiation de la réaction de cyclooxygénation par abstraction de l'hydrogène de l'AA. A l'inverse du site actif cyclooxygénase, le site actif peroxydase globulaire constitué de deux lobes distincts forme une cavité accessible à la surface de l'enzyme éloigné de la membrane. C'est sur ce site que l'hème est lié via une liaison de coordination Fer-Histidine. Les deux réactions cyclooxygénase et peroxydase sont interconnectées. L'activation de l'enzyme COX nouvellement synthétisée via la phosphorylation de la Tyr<sup>385</sup> pour produire le radical tyrosyl, nécessite, au niveau du site peroxydase, la présence de l'hème dont le radical protoporphyrine est réduit en Fer IV. D'autre part, le radical tyrosyl convertit ensuite l'AA en un radical arachidonyl qui réagit avec deux molécules d'oxygène pour former la PGG<sub>2</sub>, qui diffuse ensuite vers le site peroxydase pour y être réduit en PGH<sub>2</sub>. Ainsi, l'activité cyclooxygénase est dépendante de l'oxydation de l'hème, soit de l'activité peroxydase mais cette dépendance est limitée à l'initiation de l'activité car ensuite, le radical tyrosyl est régénéré à chaque cycle catalytique (fig. 12C). La demi-vie des COX est courte à cause du phénomène d'auto-inactivation, peu décrit mais dans lequel on suspecte le radical Tyr de modifier des protéines de l'enzyme.

Parmi les inhibiteurs spécifiques de COX-2 on trouve le celcoxib, le meloxicam, le nimesulfide et le NS-398. Des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), à l'exception de l'aspirine inhibent de façon compétitive le site actif de la cyclooxygénase. L'acide acétylsalicylique (aspirine), quant à lui, est un inhibiteur partiel de COX-2 via l'acétylation d'une sérine en position 516. Au-delà de l'inhibition de la PGH<sub>2</sub> et donc des prostanoïdes qui s'en suit, l'activité peroxydase résiduelle confère à l'enzyme traitée par l'aspirine une activité anti-inflammatoire supplémentaire en produisant de l'acide 15R-hydroxy eicosatétraénoïque (15R-HETE) qui sous l'action d'une lipoxigénase pourra générer de la 15-epi-lipoxine A<sub>4</sub>, un puissant anti-inflammatoire (Chiang *et al.*, 2004).



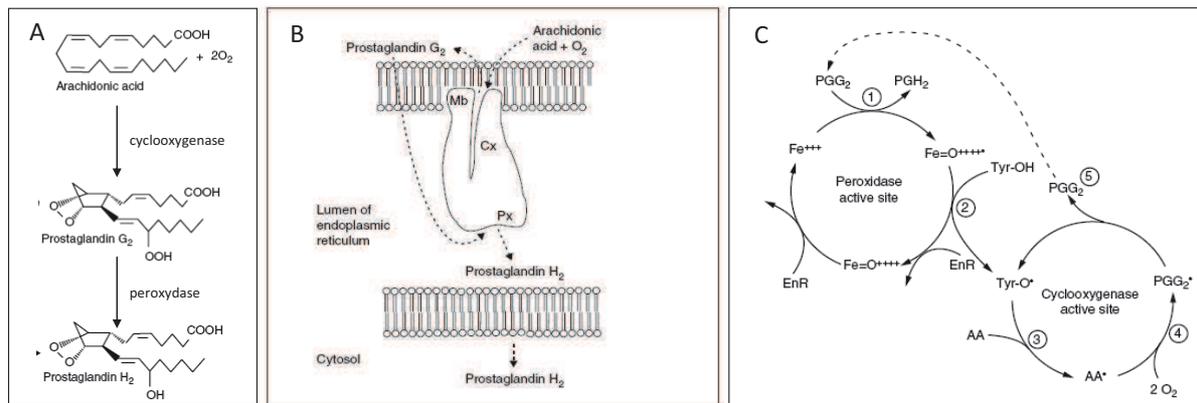


Figure 12 : Activité catalytique de la COX-2 (Chandrasekharan and Simmons, 2004)

A) Les deux réactions enzymatiques de la COX-2

La conversion de l'AA en PGG<sub>2</sub> par l'activité cyclooxygénase et la conversion de la PGG<sub>2</sub> en PGH<sub>2</sub> par l'activité peroxydase.

B) Schéma de coupe transversale d'un monomère de COX dans le lumen du reticulum endoplasmique

Positionnement des deux sites catalytiques distincts (Cx : site catalytique cyclooxygénase ; Mb : domaine de liaison avec la membrane, Px : site catalytique peroxydase).

C) Mécanisme de réaction de la COX

1) Dans un premier temps le radical porphyrine ferryl-oxo FeIV de l'hème du site actif peroxydase est produit lorsque des oxydants endogènes oxydent l'hème ferrique FeIII en radical protoporphyrine ferryl-oxo FeIV. 2) la Tyr<sup>385</sup> du site actif cyclooxygénase est activée par le radical protoporphyrine ferryl-oxo FeIV pour produire un radical tyrosyl. 3) Dans les premières étapes du processus d'oxydation, le 13-pro(S) hydrogène de l'AA du site actif de COX réagit avec le radical tyrosyl pour former un radical arachidonyl. 4) Il s'en suit une réaction du radical arachidonyl avec deux molécules d'oxygène pour former la PGG<sub>2</sub>. 5) La PGG<sub>2</sub> diffuse vers le site actif peroxydase (ligne en pointillés) où elle est réduite en PGH<sub>2</sub> par l'activité peroxydase (1). Abréviations : AA : Acide arachidonique, EnR : Réducteur endogène, Fe<sup>+++</sup> : hème ferrique, Fe=O<sup>++++</sup> : radical porphyrine ferryl-oxo FeIV, Tyr-OH : tyrosine du site actif, Tyr-O : radical tyrosyl.



### C) De PGH<sub>2</sub> aux prostaglandines finales, le rôle des prostaglandines synthases

A partir de la PGH<sub>2</sub>, les différents prostanoides (TxA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> et PGF<sub>2a</sub>) sont respectivement formés par l'intermédiaire de la thromboxane et des prostaglandines synthases. Concernant PGE<sub>2</sub>, il existe au moins 3 types de prostaglandine synthases chez l'homme : une forme cytosolique, la cPGES, et deux formes associées à la membrane/microsomaux, mPGES-1 et mPGES-2. La cPGES est exprimée de manière constitutive relativement abondamment et de préférence associée à COX-1. L'expression de la mPGES-1, rare au niveau constitutif, (même si rapportée dans certains types cellulaires) est induite par des cytokines, facteurs de croissance et le LPS et souvent associée à COX-2. Dans de nombreux cas, l'induction de la mPGES-1 est en effet concomitante d'une induction de COX-2, et cette induction coordonnée, ainsi que l'augmentation attenante de production de PGE<sub>2</sub>, est annulée par des anti-inflammatoires de type glucocorticoïdes (Murakami *et al.*, 2000). Toutefois, des différences au niveau des cinétiques d'induction suggèrent que les mécanismes de régulation de l'expression sont différents (Stichtenoth *et al.*, 2001). La comparaison des séquences promotrices des deux gènes met en effet un certain nombre de différences en évidence, notamment, le promoteur du gène *mpges-1* est riche en éléments GC mais ne possède pas de TATA box, contrairement à celui de *ptgs-2* (codant pour COX-2). La mPGES-1 appartient à la famille des MAPEG (« Membrane Associated Protein in Eicosanoid and Glutathion metabolism »). La structure de la mPGES-1 en complexe avec le GSH est constituée de 3 sous-unités pour former un homotrimère. La mPGES-1 comme la cPGES est en effet dépendante du GSH qui agit en tant que co-facteur essentiel à son activité (Murakami *et al.*, 2000; Samuelsson *et al.*, 2007). Les premières études démontrant le rôle critique de mPGES-1 dans la production induite de PGE<sub>2</sub> *in vivo*, publiées en 2002 (Uematsu *et al.*, 2002) montrent que la biosynthèse de PGE<sub>2</sub> dans des macrophages péritonéaux induite par le LPS est totalement annulée pour des cellules mPGES-1<sup>-/-</sup>. L'induction montrée à la fois *in vitro* et *in vivo* de mPGES-1 en réponse à des stimuli pro-inflammatoires comme l'IL-1, le TNF mais aussi le PMA et le LPS suggèrent fortement que mPGES-1 est un élément essentiel de la production de PGE<sub>2</sub> durant une réaction inflammatoire (Murakami *et al.*, 2000; Stichtenoth *et al.*, 2001; Samuelsson *et al.*, 2007). D'autre part, dans le modèle d'arthrite induite par le collagène, la réponse est plus faible dans des souris mPGES-1<sup>-/-</sup> que chez les souris sauvages. De même, chez la souris dans les tests de stimulation par implantation sous-cutanée de fil de coton, la formation de tissus granuleux inflammatoires et l'angiogénèse attenante sont réduits dans des souris mPGES-1<sup>-/-</sup> (Kamei *et al.*, 2004).



## D) Transport et mode d'action

### 1) **Transporteur des prostanoïdes**

Pour agir en tant que molécules médiatrices, les prostanoïdes synthétisés doivent être excrétés des cellules qui les ont produits. Plusieurs membres de la famille des polypeptides OAT (OATP) ont montré leur capacité à transporter des prostanoïdes (Schuster, 2002; Hagenbuch and Meier, 2003). Le transporteur le mieux caractérisé est le transporteur de prostanoïdes (PGT) qui a pu montrer *in vitro* dans des modèles cellulaires et des ovocytes une grande affinité pour des prostanoïdes (Kanai *et al.*, 1995). Comme le PGT peut catalyser l'échange prostanoïdes/lactate et que le gradient de lactate est dans la plupart des cellules dirigé de l'intérieur vers l'extérieur, il apparaît que le PGT est plus impliqué dans l'influx plutôt que dans l'efflux des prostanoïdes hors de la cellule (Chan *et al.*, 2002). De la même façon, des membres de la famille des OAT/ACT (SLC22A) ont montré leur capacité à transporter PGE<sub>2</sub> et PGF<sub>2α</sub> mais il semble également que ce soit dans le sens extra-intra cellulaire (Enomoto *et al.*, 2002; Kimura *et al.*, 2002). Initialement, l'efflux des prostanoïdes de leur site de synthèse avait été décrit comme le fait d'une diffusion passive au travers de la membrane. En effet, d'après Schuster (2002) la forte concentration intracellulaire en [H<sup>+</sup>], exerce une force permettant la diffusion des prostanoïdes (Schuster, 2002). Toutefois il apparaît que cette diffusion passive reste limitée puisque les prostanoïdes sont peu solubles dans les milieux aqueux et qu'ils sont eux même chargés négativement au pH physiologique. Ainsi il apparaît que la diffusion passive des prostanoïdes n'est pas suffisamment importante et rapide pour expliquer leur efflux et qu'un transporteur est nécessaire pour augmenter le taux d'efflux. Les transporteurs MRP (« Multidrug Resistance Protein ») et en particulier le MRP4 a récemment été identifié comme probablement impliqué dans ce processus puisqu'il est capable de transporter PGE<sub>2</sub> *in vitro*. Les MRP, membres de la sous-famille C des « ATP binding cassette ABC » sont des pompes actives qui lient et hydrolysent l'ATP pour permettre la translocation du substrat à travers la membrane dans le sens inverse du gradient de diffusion (Russel *et al.*, 2008). Ainsi le transporteur MRP4 a la capacité de transporter (efflux) des molécules impliquées dans la signalisation (nucléotides cycliques, eicosanoïdes) (Russel *et al.*, 2008) et notamment PGE<sub>2</sub> avec une affinité supérieure aux autres MRP (Deeley *et al.*, 2006). D'autres prostanoïdes comme TxB<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> et les LTC<sub>4</sub> et LTB<sub>4</sub> sont également substrats des MRP pour leur excrétion. Ce transporteur est exprimé dans de nombreux tissus comme l'intestin, les neurones, la prostate, les vaisseaux sanguins et le rein. Des études récentes ont montré que des souris déficientes pour *mrp4* montrent une diminution des prostanoïdes dans le plasma et une augmentation du seuil de douleur à l'inflammation, comparativement aux souris sauvages (Lin *et al.*, 2008b). De nombreux AINS



sont de puissants inhibiteurs de MRP4 (Reid *et al.*, 2003) et l'on peut penser qu'au-delà de leur action sur la synthèse des prostanoides les AINS agissent également en inhibant leur sécrétion.

## 2) Les récepteurs aux prostanoides et leurs voies de signalisation

De par leur importante instabilité (thromboxane et prostacycline ont une demi-vie *in vivo* qui n'excède pas 30 secondes), les prostanoides doivent agir localement à proximité du site de synthèse et sécrétion. L'action de ces composés lipidiques se fait par voie auto ou paracrine via des récepteurs. Il existe au moins 9 formes de récepteurs aux prostanoides connus chez la souris et l'homme (Hirai *et al.*, 2001; Monneret *et al.*, 2001; Sugimoto and Narumiya, 2007). Quatre d'entre eux se lient à la PGE<sub>2</sub> (EP1-4), deux à la PGD<sub>2</sub> (DP1-DP-2) tandis que la PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , la PGI<sub>2</sub> et le TxB<sub>2</sub> se lient respectivement aux FP, IP, TP. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à la protéine G avec différents messagers secondaires en aval. Si on s'intéresse plus particulièrement au cas de la PGE<sub>2</sub>, les quatre récepteurs montrent des propriétés similaires en termes de liaison au ligand mais ont des propriétés de transduction du signal différentes (fig. 13). Par exemple, l'EP1, très probablement couplé à G<sub>q</sub>, induit l'élévation de la concentration de calcium ; les récepteurs EP2 et EP4, associés à la protéine G<sub>s</sub> contrôlent la concentration intracellulaire d'AMPc (adénylate mono-phosphate cyclique) et l'EP3, considéré comme un récepteur « inhibiteur », couplé à la protéine G<sub>i</sub> diminue la formation d'AMPc. Ainsi les effets des prostanoides diffèrent en fonction du type de récepteur impliqué dans la transduction du signal et les effets de la PGE<sub>2</sub> vont dépendre du récepteur par lequel le signal est transduit.

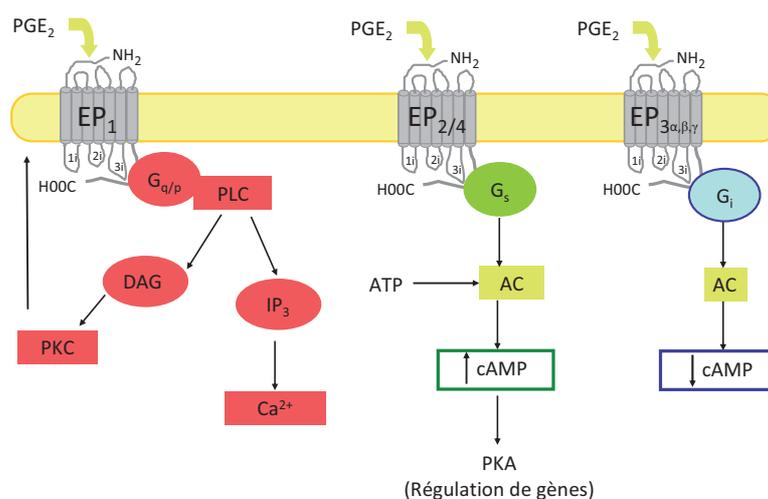


Figure 13 : Voies de signalisation induites par les récepteurs EP1,2,3 et 4 de la PGE<sub>2</sub>.

G : protéine G ; AC : Adénylate cyclase ; DAG : Diacylglycérol ; IP<sub>3</sub> : Inositoltriphosphate ; PKA : Protéine Kinase A ; PKC : Protéine Kinase C ; PLC : phospholipase C.



### 3) Catabolisme

La magnitude des effets des prostanoïdes ne dépend pas seulement de leur production mais également de leur métabolisme. Comme décrit précédemment, le transporteur de prostaglandines PGT (Kanai *et al.*, 1995), transporteur organique anionique, connu pour son rôle dans l'influx cellulaire des prostanoïdes depuis le compartiment extracellulaire, induit la fin de l'interaction entre les prostanoïdes et leur récepteur. Le PGT conduit les prostanoïdes à l'enzyme cytoplasmique 15-OH-PG-déhydrogénase qui les oxyde et ainsi les inactive (Schuster, 2002; Nomura *et al.*, 2004). Les enzymes majoritairement responsables de l'inactivation rapide (quelques minutes) de la PGE<sub>2</sub> sont les enzymes cytosoliques 15-céto-prostaglandine- $\Delta$ 13-réductase et 15-hydroxyprostaglandine deshydrogénase.

Notons que certains métabolites des prostanoïdes sont également des composés actifs et ont la capacité d'activer des voies de signalisation. C'est le cas de la 15-deoxy-delta12,14-PGJ<sub>2</sub> (15-dPGJ<sub>2</sub>), métabolite final de la PGD<sub>2</sub>, décrit comme un ligand endogène de PPAR $\gamma$  et connu également pour activer l'activité transcriptionnelle de Nrf-2 (Kim and Surh, 2006).

## III. Effet des prostanoïdes sur le système immunitaire

### A) Aspects généraux

Les prostanoïdes et en particulier la PGE<sub>2</sub> sont produits par la quasi-totalité des cellules humaines, soit de façon constitutive, soit suite à une stimulation. Les cellules intervenant dans l'immunité innée, incluant les macrophages, les DC et les granulocytes sont des contributeurs majeurs à la production locale d'eicosanoïdes (Harizi and Gualde, 2004; Harizi and Gualde, 2005). En fonction des enzymes exprimées par les différents types cellulaires, la production de prostanoïdes varie suivant les cellules présentes sur les sites inflammatoires. Ainsi, les mastocytes produisent la PGD<sub>2</sub> de façon prédominante tandis que les macrophages synthétisent plutôt PGE<sub>2</sub> et TxB<sub>2</sub>. Les cellules dendritiques issues de la moelle osseuse de souris sont capables de produire PGE<sub>2</sub> mais pas PGD<sub>2</sub>. Elles sont également une source importante de LTB<sub>4</sub>.

Comme nous venons de le voir, la signalisation induite par les prostanoïdes sur les cellules cibles se fait au travers de récepteurs divers, les effets biologiques de ces médiateurs sont extrêmement variés, complexes, dépendants de la quantité de prostanoïdes dans le microenvironnement tissulaire, ainsi que du type de récepteurs EP exprimé par les cellules cibles (Funk, 2001; Harris *et al.*, 2002; Sugimoto and Narumiya, 2007). La figure 14 synthétise les principaux effets des prostanoïdes sur les cellules de l'immunité.



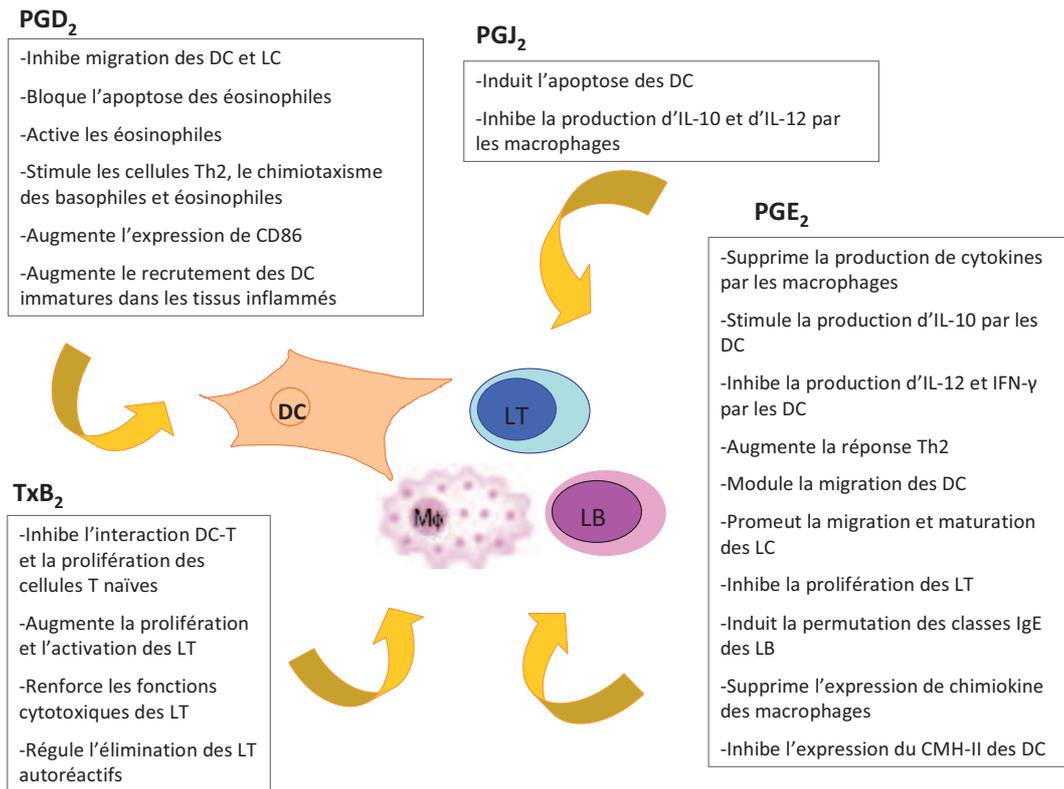


Figure 14 : Principaux prostanoïdes et leurs effets sur les cellules de l'immunité innée et adaptative

Dans l'inflammation, PGE<sub>2</sub> est impliqué dans l'ensemble des processus conduisant aux signes classiques de l'inflammation : rougeur, douleur, gonflement (Funk, 2001; Harris *et al.*, 2002). La rougeur et l'œdème résultent de l'augmentation du flux sanguin dans les tissus inflammés, suite à une dilatation artérielle médiée par PGE<sub>2</sub> et une augmentation de la perméabilité microvasculaire. L'hyperalgie est également liée à un signal induit par PGE<sub>2</sub> via le récepteur EP1 des neurones périphériques. Du fait de son rôle dans ces réponses inflammatoires communes, PGE<sub>2</sub> a longtemps été décrit comme un médiateur pro-inflammatoire. Cette catégorisation est renforcée par le fait que les traitements de cette inflammation sont souvent des AINS, qui suppriment la production des prostaglandines, via l'inhibition enzymatique de COX (Simmons *et al.*, 2004).

Cependant, un certain nombre d'éléments laissent également penser que PGE<sub>2</sub> et les prostanoïdes en général ont des effets anti-inflammatoires et seraient également responsables de la phase de résolution de l'inflammation : d'une part certains de leurs métabolites, comme la 15dPGJ<sub>2</sub> sont décrits pour activer le facteur de transcription Nrf2 et donc pour mettre en place une réponse anti-oxydante et anti-inflammatoire de la cellule, et d'autre part, PGE<sub>2</sub> pourrait avoir un rétrocontrôle négatif sur sa propre synthèse, puisqu'il a été montré que PGE<sub>2</sub> est capable d'inhiber le facteur de transcription NF-κB (Scher and Pillinger, 2009).



Ainsi, le rôle de PGE<sub>2</sub> dans la régulation de la réponse immunitaire est relativement plus complexe que la simple dichotomie pro/anti-inflammatoire. Des études sur des souris KO pour différents récepteurs EP montrent que PGE<sub>2</sub> possède également des propriétés immunomodulatrices sur le système adaptatif (Sugimoto and Narumiya, 2007). Au niveau des macrophages, PGE<sub>2</sub> possède un effet inhibiteur pour la réponse de type 1 puisque la prostaglandine inhibe l'expression des récepteurs à l'IL-12, la production de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 et IL-12 par le macrophage (van der Pouw Kraan *et al.*, 1995; Nataraj *et al.*, 2001). Sur les DC, la PGE<sub>2</sub> a des effets contrastés (stimulateur ou inhibiteur) en fonction du site de production. Dans les tissus périphériques, PGE<sub>2</sub> semble avoir un effet stimulateur, induisant la maturation des DC. La PGE<sub>2</sub> est également impliquée dans la migration de DC : d'une part PGE<sub>2</sub> modifie la balance (TIMP-1) « Tissue Inhibitors of Metalloproteinase-1 » / (MMP-9) « Metalloproteinase 9 » permettant à la cellule de se déplacer au sein de la matrice extracellulaire du derme avant de rejoindre les vaisseaux lymphatiques (Yen *et al.*, 2008). De plus, il a été montré que des moDC étaient capables de migrer en réponse aux chimiokines CCL-19 et CCL21 seulement lorsqu'elles sont maturées en présence de PGE<sub>2</sub>, qui, via le récepteur EP4 augmente la quantité cytosolique d'AMPc et permet l'activation consécutive de la PKA qui permet la phosphorylation de la phospholipase C (PLC) et l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, facilitant ainsi la transduction du signal CCL19/CCL21/CCR-7 (Scandella *et al.*, 2002; Scandella *et al.*, 2004).

Une fois dans le ganglion lymphatique, la PGE<sub>2</sub> a plutôt tendance à inhiber les DC et leur capacité à présenter l'antigène aux cellules T (Harizi *et al.*, 2001). Comme déjà décrit dans la partie I de l'introduction, l'environnement cytokinique de la DC est déterminant pour le type de réponse adaptative qu'elle va ensuite induire au contact des cellules T. Or, il est à présent établi de façon précise que les eicosanoïdes et en particulier PGE<sub>2</sub> ont un rôle important dans cette régulation. En modifiant le profil de sécrétion des cytokines produites par les APC, les eicosanoïdes orientent la balance Th1/Th2. Ainsi des DC maturées en présence de PGE<sub>2</sub> perdent leur capacité à produire l'IL-12 et produisent d'importantes quantités d'IL-10 (Kalinski *et al.*, 1997). De même, la PGE<sub>2</sub> produite par les DC inhibe la production d'IL-2 et IFN- $\gamma$  et supprime la prolifération *in vitro* des LT humains (Goodwin and Ceuppens, 1983; Betz and Fox, 1991). A l'inverse, les DC maturées avec de la PGE<sub>2</sub> induisent la différenciation des LT naïfs en Th2. L'action différentielle de PGE<sub>2</sub> sur Th1/Th2 s'explique par le fait que PGE<sub>2</sub> induit l'augmentation intracellulaire de l'AMPc via EP2 et EP4 qui est décrit pour avoir un effet suppresseur de Th1.

De plus, il a d'abord été montré que la PGE<sub>2</sub> supprimait la différenciation en Th17, via l'inhibition des cytokines IL-6 et de TGF- $\beta$  (Chen *et al.*, 2009). Toutefois, Boniface et collaborateurs (2009) rapportent qu'en combinaison avec l'IL-1 $\beta$  et l'IL-23, la PGE<sub>2</sub> promeut la production d'IL-17 de cellules Th17 via l'augmentation des récepteurs à l'IL-23 et à l'IL-1 $\beta$



au travers de la voie EP2/EP4-AMPC (Boniface *et al.*, 2009). D'autre part, Chizzolini et collaborateurs (2008) ont pu montrer qu'en synergie avec l'IL-23, la PGE<sub>2</sub> augmente le nombre de cellules Th17 différenciées à partir de LT mémoires mais pas à partir de LT naïfs, ce qui confirme bien que PGE<sub>2</sub> facilite la différenciation en Th17 mais ne l'induit pas (Chizzolini *et al.*, 2008).

L'étude des tumeurs a mis en évidence la capacité de PGE<sub>2</sub> à contourner le système immunitaire en induisant l'expression de FoxP3 chez des LT CD4<sup>+</sup> et ainsi de développer un phénotype de Treg (Ahmadi *et al.*, 2008). D'autre part, la présence de PGE<sub>2</sub> augmente les fonctions inhibitrices des Treg humaines (Baratelli *et al.*, 2005a; Baratelli *et al.*, 2005b).

En conclusion, au-delà de ses fonctions dans la réponse inflammatoire, PGE<sub>2</sub> possède d'importantes propriétés immunomodulatrices au niveau de la réponse adaptative. Dans la partie suivante nous nous sommes donc intéressés à identifier les éléments de la littérature impliquant PGE<sub>2</sub> dans l'HSRC.

### B) Rôle de la voie COX-2/PGE<sub>2</sub> dans allergie retardée de contact

D'après les propriétés que nous venons de décrire, l'action des prostanoïdes et de PGE<sub>2</sub> en particulier peut se situer à différents niveaux au sein de la réaction d'HSRC ; un rôle au cours de la phase d'élicitation, de par ses propriétés inflammatoires, mais également au cours de la phase de sensibilisation, de par sa capacité à moduler la balance Th1/Th2. Dans la littérature, il existe un nombre très limité d'études *in vivo* mettant en évidence le rôle du métabolisme de l'acide arachidonique dans l'HSRC et ces études sont relativement anciennes. Les premiers éléments montrent des taux élevés de PGE<sub>2</sub> et PGF<sub>2α</sub> dans le liquide de bulle de patients allergiques (Greaves and Donald-Gibson, 1972). L'analyse des métabolites de COX présents chez le cobaye traité avec du DNCB confirme un changement du métabolisme de l'AA suite au traitement avec le sensibilisant : les quantités de PGD<sub>2</sub> produites à partir d'AA exogène diminuent et la PGE synthase semble devenir prépondérante, puisque le taux de PGE<sub>2</sub> augmente (Ruzicka and Printz, 1982). D'autre part, des preuves indirectes d'études menées chez la souris montrent qu'un inhibiteur de la synthèse des prostanoïdes comme l'indométacine appliqué topiquement supprime l'érythème et l'œdème chez la souris sensibilisée à l'oxazolone (Lowe *et al.*, 1977); dans le cas d'un traitement au ketoprofène, autre AINS, il apparaît que le développement de l'allergie de contact au chlorure de picryl est supprimé (Atarashi *et al.*, 2009). Dans la même perspective, une récente étude clinique menée en double aveugle sur des patients atteints d'allergie de contact (nickel, fragrance mix, parabènes mix ...) précise que le groupe test traité topiquement avec un inhibiteur de PLA<sub>2</sub> présente une diminution de la sévérité des



signes cliniques tandis qu'aucune évolution n'est observée pour le groupe placebo (Ingber *et al.*, 2007). Tous ces éléments convergent vers une contribution des métabolites de l'AA dans l'allergie de contact à la fois au niveau de la phase de sensibilisants (orientation de la balance Teff/Treg et Th1/Th2) et de la phase d'élicitation (inflammation).

Il semble toutefois que les effets modulateurs des prostanoïdes soient dépendants du type de récepteurs impliqués. Par exemple, des souris KO pour le récepteur EP2 à la PGE<sub>2</sub> présentent une réaction d'HSRC au DNFB normale, tandis qu'un traitement avec un antagoniste d'EP4 supprime la réaction d'HSRC et diminue la quantité de LT Th1 spécifiques de l'antigène dans le ganglion (Kabashima *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2009). Ces résultats indiquent que la voie PGE<sub>2</sub>-EP4 est impliquée dans le développement des Th1 spécifiques de l'antigène et que cette voie semble dominante dans la phase de sensibilisation de la réaction d'HSRC au DNFB (Kabashima *et al.*, 2003).

### C) Modulation du métabolisme de l'acide arachidonique par les sensibilisants de contact

Comme nous l'avons décrit en début de cette partie, les prostanoïdes et en particulier PGE<sub>2</sub> sont impliqués dans de nombreuses situations pathologiques et de ce fait leur voie de synthèse est une cible souvent utilisée dans le développement de molécules. Parmi les molécules décrites pour inhiber la production de PGE<sub>2</sub>, nous avons pu identifier que certaines sont des sensibilisants de contact : dans certains cancers, le resvératrol et le curcumin, deux molécules pour lesquelles quelques cas de sensibilisation ont pu être rapportés, sont utilisées pour leurs capacités à inhiber COX-2, réduisant la carcinogénèse (Kawamori *et al.*, 1998; Tive, 2000; Sexton *et al.*, 2006; Surh and Chun, 2007).

Dans la même perspective, l'alopecie inflammatoire dite *areata*, réaction auto-immune conduisant à la perte de cheveux causée par l'infiltration de LT CD4<sup>+</sup> au niveau des bulbes pileux, est souvent traitée avec un certain succès et peu d'effets secondaires par des molécules sensibilisantes comme le dinitrochlorobenzene (DNCB), le diphenylcyclopropenone (DPCP) et l'acide squarique dibutyl ester (SADBE) (McMichael and Henderson, 2004). Les mécanismes d'action de ces molécules restent cependant encore incertains et controversés : dans certaines études, les sensibilisants de contact agiraient en produisant des cytokines (IL-10, IL-8, IL-2, TNF- $\alpha$ ), qui, en particulier pour l'IL-10 inhiberait les LT au niveau des lésions (Hoffmann *et al.*, 1994). Or on sait par ailleurs que l'IL-10 agit négativement sur PGE<sub>2</sub>, on peut donc penser que via l'augmentation d'IL-10, les sensibilisants inhibent la production de PGE<sub>2</sub> (Harizi and Gualde, 2006). Toutefois, dans une autre étude, les auteurs proposent les mécanismes d'action suivants : les cytokines inflammatoires produites sous l'effet des sensibilisants, induiraient la production de PGE<sub>2</sub> via l'activité de COX-2, qui inhiberait la production de cytokines de type Th1 et induirait la



production d'IL-4, cytokine majeure de la réponse Th2 (Namazi, 2006). A ce jour aucun mécanisme d'action précis n'a pu être arrêté et malgré les divergences ces études illustrent la capacité des sensibilisants à moduler l'expression de PGE<sub>2</sub>.

Dans des études *in vitro* récentes, Moeller et collaborateurs (2008) ont montré que le sensibilisant de contact, la PPD à forte dose (400 µM) induit l'expression de COX-2 et la production de PGE<sub>2</sub> par la lignée kératinocytaire humaine HaCat (Moeller *et al.*, 2008). Plus généralement, dans une étude transcriptomique *full genome* menée sur des CD34-DC, visant à identifier des gènes discriminant les molécules sensibilisantes de non sensibilisantes, le gène *ptgs-2* (codant pour COX-2) a été identifié comme permettant de discriminer les deux familles de molécules (Hooyberghs *et al.*, 2008). Par la suite l'induction du marqueur COX-2, spécifique des sensibilisants a été confirmée au niveau de la protéine sur 3 sensibilisants (Lambrechts *et al.*, 2010; Lambrechts *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces études montrent clairement la capacité des sensibilisants à moduler le métabolisme de l'AA, cependant le sens de cette variation (inhibition ou induction) varie selon les modèles.



## **TRAVAUX DE RECHERCHE**



## Objectifs de la thèse

Dans le contexte du 7<sup>ième</sup> amendement de la directive cosmétique européenne, le développement de tests alternatifs à l'expérimentation animale pour prédire le potentiel sensibilisant des molécules chimiques est devenu un enjeu majeur pour les industriels. Un certain nombre de tests *in silico* / *in vitro* modélisant les événements précoces de l'allergie retardée de contact ont été développés. Ces tests présentent de bonnes performances pour la détection du danger (sensibilisant *versus* non sensibilisant), mais la quantification du potentiel reste toutefois limitée. Il est accepté de tous que la combinaison de plusieurs de ces tests *in vitro* et méthodes *in silico* dans une batterie prédictive devrait permettre de prédire de manière quantitative le potentiel sensibilisant. Au-delà de la construction de cette batterie, avec les tests déjà disponibles, certains paramètres manquants dans le panorama actuel des tests (pénétration, métabolisme, inflammation) permettraient de moduler les réponses apportées par les tests *in vitro* utilisés jusqu'ici. Dans cette perspective, nous nous sommes intéressés à caractériser les médiateurs inflammatoires produits par les cellules en réponse à des sensibilisants pour identifier dans quelle mesure cette réponse peut adresser la question du potentiel sensibilisant des molécules.

Comme nous venons de le voir tout au long de la revue bibliographique, les sensibilisants de contact, en tant que molécules réactives, ont la capacité d'induire un « signal de danger » déclenchant au sein de la peau une cascade d'événements conduisant à la maturation des DC, à savoir un changement de phénotype ainsi que la production d'un certain nombre de cytokines/chimokines. Les médiateurs inflammatoires produits par la peau en réponse à des sensibilisants (IL-8, IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6) sont bien décrits dans des modèles *in vivo* (Enk and Katz, 1992; Grabbe and Schwarz, 1998) mais restent souvent limités à des études transcriptomiques sur des modèles *in vitro* (Pichowski *et al.*, 2001; Python *et al.*, 2007). Au-delà de ces médiateurs protéiques, les eicosanoïdes et en particulier les prostaglandines sont bien connues pour jouer un rôle majeur dans la maturation des DC (Harizi *et al.*, 2001) mais très peu d'éléments sont décrits sur leur modulation par les sensibilisants de contact.

Afin d'étudier la réponse inflammatoire, les modèles cellulaires *in vitro* de type DC disponibles sont d'une part les cellules dendritiques différenciées à partir de monocytes (moDC) ou de précurseurs CD34<sup>+</sup> (CD34-DC) et d'autre part les lignées cellulaires myéloïdes telles qu'U937, THP-1, MUTZ-3 et KG-1. Dans la perspective de développer un test, les moDC et CD34-DC, bien que plus physiologiques sont des modèles qui restent limitants en raison de la complexité de leur préparation, des nombreuses variantes de protocole, de l'importante variabilité qu'il existe entre les donneurs ainsi que pour des raisons de difficulté et de coût d'approvisionnement (Casati *et al.*, 2005). Au laboratoire, depuis le



début des années 1997, nous nous sommes focalisés sur la lignée humaine pro-monocytaire U937 pour ses capacités à répondre aux sensibilisants et c'est notamment sur cette lignée que le test MUSST actuellement en pré-validation à l'ECVAM a été développé (Rousset *et al.*, 2002). Toutefois, contrairement aux moDC et CD34-DC pour lesquelles un certain nombre de médiateurs solubles a pu être mis en évidence en réponse aux sensibilisants (Aiba *et al.*, 1997; Coutant *et al.*, 1999; Aiba *et al.*, 2000; Pichowski *et al.*, 2000; Tuschl *et al.*, 2000; Pichowski *et al.*, 2001; De Smedt *et al.*, 2002; Aiba *et al.*, 2003; Aeby *et al.*, 2004; Toebak *et al.*, 2006; Szameit *et al.*, 2008; Toebak *et al.*, 2008), les lignées myéloïdes et en particulier la lignée U937 ne produisent pas de médiateurs solubles suite à un traitement avec un sensibilisant (données internes). Les cellules U937 possèdent par ailleurs la capacité à être différenciées principalement en macrophages (Rasaiyaah *et al.*, 2007). Parmi les différentes conditions testées, l'association phorbol myristate acetate (PMA) et le lipopolysaccharide bactérien (LPS) induit la production par les U937 d'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 ainsi que de nombreux prostanoïdes. De façon surprenante, en présence de sensibilisants, on observe une diminution significative de la production de prostaglandines induite par l'association PMA/LPS.

Ainsi, au cours de la thèse, notre objectif a été de mieux caractériser cette signature *in vitro* des sensibilisants et d'évaluer dans quelle mesure cette réponse corrèle avec le potentiel sensibilisant des molécules. Notre étude s'articule autour de trois grandes parties. Dans une première partie nous avons caractérisé le modèle d'étude de cellules U937 traitées avec l'association PMA/LPS (U937 PMA/LPS) afin de préciser les effets propres de chacun des activateurs. Pour cela, nous nous sommes intéressés aux principales étapes de la cascade métabolique de l'acide arachidonique et des enzymes clés (PLA<sub>2</sub>, COX-2). Au-delà des eicosanoïdes, nous avons également caractérisé les cytokines produites dans le modèle ainsi que le niveau d'activation des facteurs de transcription Nrf2 et NF- $\kappa$ B.

Dans une deuxième partie des résultats nous avons disséqué les mécanismes d'action des sensibilisants conduisant à l'inhibition de la production de PGE<sub>2</sub> observée. Ce travail s'est focalisé sur six sensibilisants de référence de potentiels variés : le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (DNCB), le 1,4-dihydroquinone (HQ), la 1,4-para-phenylenediamine (PPD) et le n-propyl gallate (PG), en tant que sensibilisants extrêmes/forts, le cinnamaldehyde (CIN) en tant que modéré et l'eugénol (EUG) en tant que sensibilisant faible. De plus, la diversité des mécanismes de réaction est représentée au sein de notre set puisque le DNBCB et le CIN sont des haptènes vrais, la PPD, l'HQ et le PG des pré-haptènes tandis que l'EUG est un pro-haptène. Cette partie se présente sous la forme d'un article paru dans « Toxicology and Applied Pharmacology » et de résultats complémentaires.

En parallèle de cette approche mécanistique, nous avons analysé la pertinence du marqueur « inhibition de la PGE<sub>2</sub> » en tant que test de prédiction du caractère sensibilisant d'une



molécule, en évaluant un set d'environ 170 molécules. Dans la troisième partie des résultats, sont détaillés les résultats du test, la définition de son modèle prédictif ainsi que l'analyse statistique de ses performances. Enfin, nous avons initié une réflexion sur le positionnement relatif du test PGE<sub>2</sub> par rapport aux autres tests *in vitro* DPRA, MUSST et Nrf2, utilisés en interne.



## **Matériel et méthodes**



## I. Réactifs

Le dimethyl sulfoxide (DMSO), le lipopolysaccharide (LPS), le phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA), le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (DNCB, CAS 97-00-7), le 1,4-dihydroquinone (HQ, CAS 123-31-9), la 1,4-phenylenediamine (pPD, CAS 106-50-3), le n-propyl gallate (PG; CAS 121-79-9), le cinnamaldéhyde (CIN, CAS 104-55-2), l'eugénol (EUG, CAS 97-53-0), l'acide lactique (LA, CAS 50-21-5), le glycérol (Gly, CAS 56-81-5), le tween 20 (T20, CAS 9005-64-5) et la N-Acetyl-L-cystéine (NAC, CAS 616-91-1) ont été fournis par Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France and Saint Louis, USA) au degré de pureté le plus élevé (souvent >98%). Les inhibiteurs pharmacologiques, le N-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]-methanesulfonamide (NS-398, CAS 123653-11-2), bromoenol lactone (BEL, CAS 478288-90-3) ont été fournis par Cayman Chemical (Ann Arbor, USA), le (E)3-[(4-*t*-Butylphenyl)sulfonyl]-2-propenenitrile (BAY 11-7085, CAS 196309-76-9) par Calbiochem Merck Chemicals (Nottingham, UK) et le methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP, CAS 149301-79-1), le MK886, inhibiteur de la 5-lipoxyenase activating protein par Enzo Lifesciences (Villeurbanne, France). L'AA marqué par du tritium ( $[^3\text{H}]\text{AA}$ ) en positions 5-6-8-9-11-12-14-15 à été fourni par Perkin-Elmer (Courtaboeuf, France).

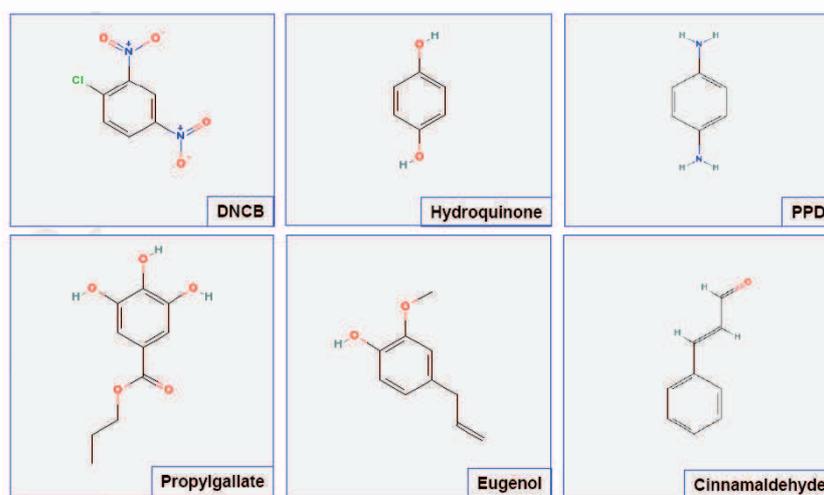


Figure 15 : Structure chimique des 6 sensibilisants de contact étudiés

## II. Cellules

Dans cette étude nous avons utilisé la lignée pro-monocytaire U937 (CRL-1593.2, ATCC, Manassas, USA). Ces cellules ont été cultivées à une densité comprise entre  $2 \times 10^5$  et  $1 \times 10^6$  cellules/mL dans du milieu RPMI1640 (Gibco-Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Biowest, Nuillé, France), 2mM de glutamine, 100 U/ml de pénicilline et 0,1mg/mL de streptomycine selon les protocoles et les appareils classiques pour la culture cellulaire. Des renouvellements de milieux (passages)



ont été réalisés toutes les 48 heures pour maintenir les cellules dans une phase de croissance exponentielle. La numération des cellules a été faite sur cellule de Malassez, après dilution au dixième dans une solution de bleu de Trypan.

Nous avons également utilisé des cellules dendritiques issues de monocytes (moDC). Les monocytes issus du sang périphérique ont été fournis par l'EFS Lyon (France) : en pratique les cellules mononuclées du sang ont été isolées sur Ficoll puis les monocytes ont été purifiés par gradient de densité et leur expression en CD14 a été contrôlée par cytométrie en flux. Les monocytes ont été différenciés en cellules dendritiques pendant 5 jours dans des plaques 6 puits cultivés à une densité de  $1 \times 10^6$  cellules/mL dans du RPMI en présence de 100 ng/mL GM-CSF (# 300-03, Preprotech) et de 100 ng/mL d'IL-4 (# 200-04, Preprotech).

### III. Traitement des cellules

Pour le traitement des cellules U937,  $1 \times 10^6$  cellules ont étéensemencées dans un puits de plaque 24 puits et mises en présence de PMA (60 ng/mL) et/ou LPS (10 $\mu$ g/mL) en présence ou en absence de différentes concentrations de sensibilisants ou inhibiteurs pharmacologiques dans un volume final de 2 mL. De façon comparable, les moDC ont étéensemencées dans des plaques 24 puits, à  $0.5 \times 10^6$  cellules/mL dans 2mL, en présence de LPS (10 $\mu$ g/mL) en présence ou absence de différentes concentrations de sensibilisants ou inhibiteurs pharmacologiques.

Le DNCB, le CIN, l'EUG et les inhibiteurs pharmacologiques ont été dissouts dans du DMSO tandis que la pPD, l'HQ, le PG, LA, le Gly et le T20 ont été solubilisés dans du RPMI et ajoutés simultanément au PMA/LPS. La concentration finale de DMSO est constante quelque soit la concentration du sensibilisant et égale à 0,4% (v/v). Après 24h d'incubation avec les différentes molécules, la viabilité des cellules a été mesurée par AlamarBlue, UptiBlue Viable cell (Counting Reagent, Interchim, France), d'après les instructions du fournisseur.

### IV. Etude du phénotype des cellules U937 par cytométrie en flux

Après traitement, les cellules ont été lavées une fois dans le PBS froid supplémenté avec 10% de SVF, puis lorsque nécessaire (dans le cas du marquage CD68), perméabilisées selon le protocole décrit dans la « *Analyse de l'expression de la protéine COX-2* » ci-dessous, puis incubées sur la glace pendant 30 min dans 100 $\mu$ L de PBS contenant 5 $\mu$ L d'anticorps monoclonaux de souris couplés à la fluorescéine (FITC) [ou à la phycoérythrine (PE) dans le cas du CD14] et dirigés contre le CD86 humain (FUN-1, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA), CD1a humain (HI149, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA), CD14 humain (M5E2, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) ou CD68



humain (KPI, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA). Pour chaque condition un aliquot de cellules a été marqué avec l'anticorps isotypique de contrôle (IgG1 ou IgG2a) de souris couplé au FITC (fournis par BD Biosciences). Les cellules ont ensuite été lavées deux fois dans du PBS à 10% SVF et une fois dans le PBS seul. La viabilité a été analysée par incorporation de 7-AAD. Les cellules ont ensuite été analysées en cytométrie en flux sur un FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) en utilisant le logiciel CellQuest™ Software (Becton Dickinson).

### **V. Etude du métabolisme de l'AA dans les cellules U937 par radiomarquage**

#### **Incorporation de l'acide arachidonique marqué ( $[^3\text{H}]\text{AA}$ )**

Pour incorporer l' $[^3\text{H}]\text{AA}$  dans les lipides cellulaires, les cellules U937 ont été cultivées pendant 24h dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> (5x10<sup>5</sup> cellules/mL) en présence d' $[^3\text{H}]\text{AA}$  à la concentration de 1  $\mu\text{Ci/mL}$ . Après incorporation de l' $[^3\text{H}]\text{AA}$  les cellules ont été centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes. Le culot cellulaire a été lavé deux fois dans du RPMI puis les cellules ont étéensemencées et traitées comme décrit précédemment.

#### **Récupération des métabolites de l'acide arachidonique (eicosanoïdes) et des lipides cellulaires**

##### *Eicosanoïdes extracellulaires*

Les cultures cellulaires ont été transférées dans des tubes, puis centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes. Les surnageants, contenant les métabolites extracellulaires de l'AA, ont été conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.

##### *Eicosanoïdes intracellulaires*

Pour extraire les eicosanoïdes cellulaires, les culots cellulaires ont été repris avec 1 mL de méthanol (MeOH) à 15%. Les échantillons obtenus ont été lysés par trois cycles de congélation (à -80°C), décongélation et sonication. Les lysats cellulaires ont ensuite été centrifugés à 10 000 rpm pendant 5 minutes. Les surnageants recueillis, contenant les eicosanoïdes intracellulaires, ont été conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.

##### *Lipides cellulaires*

Pour extraire les phospholipides, les lipides neutres et les esters de cholestérol, les culots cellulaires ont été repris dans 1,1 mL d'hexane/isopropanol (dans les proportions 3:2). Les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.



**Extraction et analyse des eicosanoïdes**

Les surnageants contenant les eicosanoïdes extracellulaires ont été repris avec 15% de méthanol. Les surnageants des eicosanoïdes intra et extracellulaires ont ensuite été acidifiés à pH=3,5 avec de l'acide chlorhydrique à 1N. L' $[^3\text{H}]$ AA et ses métabolites sécrétés par les cellules U937 ont été extraits sur une plateforme d'extraction automatique RapidTrace (Biotage, Upsala, Suède) à l'aide de colonnes d'extraction en phase solide (SPE) (C18, 100 mg). Les colonnes ont été conditionnées avec 5 mL de méthanol (débit de 2 mL/min) et lavées avec 5 mL d'eau (2 mL/min). Les échantillons ont été déposés sur les colonnes (1 mL/min) puis les colonnes ont été lavées avec 5 mL d'eau (2 mL/min), suivi par 2 mL d'hexane (15 ml/min) et par une insufflation d'azote pendant 30s. Les métabolites de l' $[^3\text{H}]$ AA ont été élués des colonnes C18 avec 2 mL de MeOH (1 mL/min). Le MeOH contenant les métabolites de l'AA a été évaporé à 37°C sous un courant d'azote à l'aide d'un TurboVap (Biotage, Upsala, Suède). L'extrait sec a ensuite été repris dans 40  $\mu\text{L}$  de MeOH, et appliqué quantitativement (30  $\mu\text{L}$ ) sur une plaque de gel de silice pour chromatographie (TLC) (LK6DF, Whatman) à l'aide du déposeur automatique (automatic TLC Sampler 4, Camag, Muttenz, Switzerland). La chromatographie sur plaque a été réalisée comme décrit précédemment (Escoubet *et al.*, 2000). Les plaques ont été développées dans la phase organique du mélange acétate d'éthyle/eau/isooctane/acide acétique (110:100:50:20, v/v). Les standards d' $^3\text{H}$ [AA] et des métabolites radiomarqués des cyclooxygénases et de la 5-lipoxygénase Perkin-Elmer (Courtaboeuf, France) ont permis de déterminer les facteurs de rétention sur les chromatogrammes des différents métabolites produits par les cellules U937. Le facteur de rétention (Rf) de l' $[^3\text{H}]$ AA est 0,85, ceux pour les différents prostaglandines sont : 6ceto-PGF $_{1\alpha}$  : 0,18 ; PGF $_{2\alpha}$  : 0,25 ; PGE $_2$  : 0,36 ; PGD $_2$  : 0,48 ; PGA $_2$  : 0,61 ; pour TxB $_2$  : 0,32. Pour les métabolites de la voie de la 5-lipoxygénase, LTB $_4$  : 0,7 ; LTC $_4$ /D $_4$ /E $_4$  : 0,01 et 5-HETE : 0,76. Les pics des différents métabolites ont été visualisés à l'aide d'un lecteur de radioactivité sur couche mince (Radiolotope Thin layer Analyser, RITA), qui détecte la position de la radioactivité des métabolites de l' $[^3\text{H}]$ AA sur la plaque. Les pics des métabolites radiomarqués produits par les cellules U937 ont été identifiés en tenant compte du Rf propre à chaque métabolite radiomarqué et ont été quantifiés en tenant compte du rendement d'extraction des métabolites radioactifs et du pourcentage de radioactivité correspondant à chaque métabolite séparé par TLC. A chaque stade de l'extraction des métabolites de l' $[^3\text{H}]$ AA, des prises d'essais ont été réalisées pour déterminer par comptage de la radioactivité en scintillation liquide (compteur 1217 Rackbeta, LKB-PerkinElmer), les rendements d'extractions.



**Analyse des lipides cellulaires (phospholipides, lipides neutres et du cholestérol arachidonate)**

Les extraits de lipides cellulaires dans l'hexane/isopropanol, ont été évaporés à 37°C sous un courant d'azote à l'aide d'un TurboVap (Biotage, Upsala, Suède). L'extrait sec a ensuite été repris dans 40 µl d'hexane/isopropanol, et appliqué quantitativement (30 µL) sur une plaque de gel de silice pour chromatographie (TLC) (LK6DF, Whatman) à l'aide du déposeur automatique (automatic TLC Sampler 4, Camag, Muttenz, Switzerland). La séparation des lipides cellulaires a été réalisée par chromatographie sur couche mince à l'aide d'une double migration dans le même sens, dans deux solvants différents. La première migration réalisée sur 10 cm avec le mélange chloroforme/ méthanol/ H<sub>2</sub>O/triéthylamine (30/ 34/ 8/ 35; v/ v/ v/ v), a permis de séparer les phospholipides (phosphatidylcholine ; phosphatidylserine; phosphatidyléthanolamine ; phosphatidylinositol et phosphatidylglycerol). La deuxième migration réalisée dans la même direction sur une distance supplémentaire de 6 cm avec le mélange éther de pétrole/ éther éthylique/ acide acétique (50/ 50/ 1; v/ v/ v) a permis la séparation des lipides neutres, monoacylglycérols, diacylglycerols, triacylglycerols, les acide gras et les esters de cholestérol. Les R<sub>f</sub> des lipides cellulaires ont été déterminés à l'aide de standards : acide arachidonique (0,79), de PC (0,12), PS (0,22), PI (0,25), PE (0,29), PG (0,37), triglycérides (0,87), diglycérides (0,71) monoglycérides (0,58) et cholestérol arachidonate (0,96). Les pics de ces lipides cellulaires radiomarqués par l' [<sup>3</sup>H]AA ont été identifiés et quantifiés comme décrit précédemment pour les eicosanoïdes.

**VI. Analyse des eicosanoïdes intracellulaires sans radioactivité****Préparation d'extraits cellulaires pour dosage des prostanoïdes intracellulaires**

Une fois les surnageants des cellules U937 récupérés, 1 mL d'H<sub>2</sub>O (15% méthanol) a été ajouté dans chaque puits et 3 cycles de congélation/décongélation (-80°C) ont été réalisés. Les lysats cellulaires ont ensuite été transférés dans des tubes Eppendorf de 2mL pour être soniqués dans un bain à ultrasons pendant 3 minutes et centrifugés pendant 10 minutes à 13000 g. Les surnageants (i.e. les lysats cellulaires) ont été stockés à -80°C pour des analyses ultérieures.

**Purification des échantillons par SPE(C-18)**

Brièvement, les surnageants de culture et les lysats cellulaires ont été acidifiés à pH=5,4 avec HCl 1 M. Les eicosanoïdes ont été extraits par chromatographie et purifiés par colonne SPE utilisant les colonnes Varian Bond Elut C18 comme décrit précédemment. Les métabolites de l'AA ont été élués avec 3 ml de méthanol et évaporés sous azote. Les résidus



ont été dissouts dans 1 ml RPMI pour quantification par EIA (voir ci-dessous) ajustée par le rendement d'extraction.

## VII. Analyse de l'expression de gènes par Real-Time PCR (RT-PCR)

Après récupération des surnageants de culture, les cellules adhérentes ont été lysées avec 500 µL de tampon RLT (Qiagen, Courtaboeuf, France), puis l'ARN total a été extrait en utilisant le kit "RNeasy RNA isolation", suivant les recommandations du fournisseur (Qiagen). La concentration de l'ARN a été déterminée à l'aide du kit « Ribogreen RNA quantitation kit » (Molecular Probes-Invitrogen, Cergy Pontoise, France) et la qualité contrôlée par le bioanalyseur 2100 (Agilent Technologies, Massy France). L'ARN a été conservé à -80°C. Un microgramme d'ARN total a été rétrotranscrit dans un volume de 20 µl à l'aide du kit « QuantiTect® Rev Transcription Kit » de (Qiagen). A la suite de cette rétrotranscription, 180 µl d'H<sub>2</sub>O ont été ajoutés et l'ADNc a été conservé à -20°C. La PCR en temps reel a été réalisée dans un Lightcycler 480 Roche Diagnostics, Meylan, France) en utilisant le kit QuantiTect® SYBR green (Qiagen), suivant les recommandations du fournisseur. Chaque réaction de PCR a été réalisée avec 2 µl d'ADNc dans un volume total de 10 µl (SYBR mix) contenant les amorces d'intérêt suivantes en fonction des gènes analysés : *ptgs-1* (QuantiTect® QT00210280), *ptgs-2* (QuantiTect® QT00040586), *nqo1* (QuantiTect® QT00050281), *ho-1* (QuantiTect® QT00092645) et *akr1c2* (QuantiTect® QT01876889). La réaction de PCR a été réalisée avec le programme suivant : les échantillons ont d'abord été dénaturés à 95°C pendant 15 min, puis les 40 cycles de PCR ont été réalisées avec une phase de dénaturation de 15 s à 94°C, une phase d'hybridation de 30 s à 55°C et une phase d'élongation de 30 s à 72°C. Pour chaque expérience une courbe standard réalisée par des dilutions en série d'un ADNc de référence a permis de vérifier l'efficacité de la PCR. L'expression relative d'un gène donné, calculée d'après la méthode du «  $\Delta\Delta Ct$  », est indiquée en quantité relative par rapport au témoin véhicule (RPMI ou DMSO) après normalisation par rapport à l'expression du gène de ménage *rpl-13* (QuantiTect® QT01671628).

## VIII. Analyse de l'expression des protéines COX-1 et COX-2

L'expression intracellulaire de la protéine COX a été menée par cytométrie en flux, suivant la méthode décrite par Moeller et collaborateurs (2008), en utilisant le kit de « Fixation/Permeabilization Kit » (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) (Moeller *et al.*, 2008). Les cellules ont été récoltés par une solution de trypsine/EDTA 0.25%, rincées deux fois avec du PBS et marquées pour leur viabilité par Live/dead® cell Viability Assay (Invitrogen Life Technology, Courtaboeuf, France) en suivant les recommandations du



fournisseur. Après deux lavages dans du PBS, les cellules ont été resuspendues dans 250 µl d'une solution de « Cytofix/Cytoperm » (BD Biosciences) et incubées 20 min à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec 100 µl de tampon Perm/Wash (centrifugation 5 min/300 g), resuspendues dans 100 µl de tampon Perm/Wash et marquées avec 5 µl d'un anticorps monoclonal de souris, conjugué au fluorochrome anti-COX-1 FITC/anti-COX-2 PE (ou le contrôle isotypique) (Ref #334090; #349526; BD Biosciences) pendant 30 min à 4°C. Après lavage, environ 10<sup>4</sup> cellules ont été analysées par cytométrie en flux sur FACSCalibur. Les données ont été analysées avec le logiciel CellQuest™Pro.

Les résultats sont exprimés en Ratio d'Induction = IR, calculé avec la formule suivante :

$$IR = \frac{[(MFI\ spe - MFI\ iso)_{traitées}]}{[(MFI\ spe - MFI\ iso)_{témoin\ véhicule}]}$$
, où la MFI est l'intensité moyenne de fluorescence des échantillons (traités ou véhicule) marqués par l'anticorps contrôle isotypique (iso) ou l'anticorps spécifique de l'antigène (spe).

### **IX. Test biochimique de mesure de l'activité de l'enzyme COX-2**

Le test de mesure de l'activité de l'enzyme COX-2 utilise une enzyme recombinante COX-2 issue de placenta d'ovine, fournie par Cayman Chemical (Ann Arbor, USA). En pratique, l'enzyme et l'hème ont été préincubés avec les sensibilisants ou un inhibiteur de référence (Dup-697), à température ambiante pendant 5 minutes dans 100 mM de Tris (pH 8.0). Chaque sensibilisant a été dissout dans le DMSO à 0.4% et testé à 6 concentrations (500, 100, 10, 5, 1, 0.1 µM). Un indicateur coloré, le N,N,N,N'-tetraméthyl-*p*-Phénylenediamine (TMPD), co-substrat de l'activité peroxydase de la COX-2 a été ajouté. La réaction a été initiée par l'addition de 50 µM d'acide arachidonique. Après 10 min d'incubation à température ambiante, la réaction a été arrêtée par 1M d'HCl et la fluorescence du composé oxydé TMPD a été mesurée à 590 nm.

### **X. Immunoblot de la protéine IκB-α**

L'analyse par Western Blot a été menée selon les procédures standards. En pratique, les cellules ont été lavées avec du PBS froid 1X. Les lysats cellulaires ont été préparés en resuspendant le culot cellulaire, soit 5x10<sup>6</sup> cellules dans 400 µL de tampon de lyse RIPA (Sigma) contenant 1X de cocktail d'inhibiteur de protéases et de phosphatases « Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail » (Pierce). Les cellules ont ensuite été vortexées et incubées pendant 5 min dans la glace, puis centrifugées 10 min à 10 000 g à 4°C. Les surnageants contenant les protéines ont été conservés à -80°C avant analyses.

La concentration en protéines a été déterminée par le test de l'acide bicinchoninique (BCA, Sigma). Pour chaque condition, 40 µg protéines ont été déposés dans un tampon de charge Laemli (BioRad) pour migration dans les puits du gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) en



gradient de 4 à 10% de polyacrilamide (Bio-Rad, Mini-Protean TGX Precast Gels 4-10%). Les protéines ont ensuite été transférées par westernblot sur une membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF) (Bio-Rad). Après saturation de la membrane pendant 1h30 avec du Régilait écrémé à 5%, les membranes ont été incubées avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-IKB- $\alpha$  (I0505, Sigma) dilué au 1/200<sup>ième</sup>, suivi d'une incubation avec un anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la Horseradish Peroxidase (dilué au 1/2000<sup>ième</sup>) (Cell Signaling Technology, Ozyme). La révélation a été réalisée par le kit « Supersignal West Pico chemiluminescent Substrate » (Pierce). Après un stripping de l'anticorps primaire réalisé pendant 4 min dans 20 mL de Restore Plus Western Blot stripping Buffer (Pierce), les membranes ont été lavées, de nouveau saturées avant d'être marquées avec un anticorps monoclonal de souris anti-actine  $\beta$  (AC-15, Sigma) dilué au 1/1000<sup>ième</sup> puis l'anticorps secondaire de chèvre anti IgG de souris (SC-2005, Santacruz), dilué au 1/2000<sup>ième</sup>. L'analyse densitométrique du blot a été réalisée par le logiciel « Quantity One » de Bio-Rad.

### **XI. Dosage du GSH et du GSSG intracellulaires**

Après 1h, 4h et 24h de traitement, les cellules U937, lavées, ont été lysées dans une solution de N-éthylmaléimide (NEM) à 0,5 mM ( $1 \times 10^6$  cellules dans 500  $\mu$ L) avec 3 cycles de congélation/décongélation et 10 min de bain à ultrasons. Les cellules ont été ensuite centrifugées 10 min à 10 000g à 4°C. Les surnageants contenant le GSH ont été conservés à -80°C avant analyses. La concentration en protéines a été déterminée par le test de l'acide bicinchoninique (BCA, Sigma). Pour doser le glutathion réduit couplé au NEM (GS-NEM), 25 $\mu$ L du surnageant a été dilué dans 975 $\mu$ L d'acide formique à 1% (1/40) dans un vial de 1 mL. Il a ensuite été dosé par rapport à une gamme de concentrations croissantes (50-100-200-300-400-500-600-nM) réalisée à partir d'une solution mère de GS-NEM à 1mM (3,1 mg ; 10  $\mu$ moles dans 10 mL d'une solution de NEM à 2,5 mM). Pour doser le glutathion oxydé, 100  $\mu$ L de surnageant a été transféré dans un insert vial de 1 mL. Il a ensuite été dosé par rapport à une concentration croissante de GSSG (0,4-0,8-1-2-4-8-12-16-20  $\mu$ M). La quantification du GSH et du GSSG a été réalisée par HUPLC selon le protocole représenté dans le tableau ci-après :



Tableau 3: Protocole UHPLC

Composés à analyser	GSH GSSG
Méthode chromatographique	UHPLC
Colonne	Acquity HSS T3 C18, 1,7 $\mu$ M, 2.1x50mm (Waters)
Eluant A	H <sub>2</sub> O + 1% HCOOH
Eluant B	CH <sub>3</sub> CN + 1% HCOOH
Volume injecté	10 $\mu$ l
Débit	600 – 800 $\mu$ l /min
Solvant de rinçage	H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> OH 50/50
Temps d'analyse	3,5 min
Température colonne	T <sub>amb</sub>
Température passeur échantillons	T <sub>amb</sub>

Tableau 4 : Conditions d'élution UHPLC

Temps (min)	Débit (ml/min)	Eluant A (%)	Eluant B (%)
0	0,6	99	1
0,7	0,6	99	1
2	0,6	5	95
2,01	0,8	5	95
2,7	0,8	5	95
2,71	0,6	99	1
3,5	0,6	99	1

## XII. Dosage de médiateurs solubles

Les quantités de PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, TxB<sub>2</sub>, 15-HETE, LTB<sub>4</sub> et cLT ont été mesurées dans le surnageant de culture et/ou dans les lysats cellulaires purifiés sur colonne SPE-(C18) (comme décrit précédemment), en utilisant respectivement le "High sensitivity PGE<sub>2</sub> Enzyme Immunoassay kit" (Assay Designs, Ann Arbor, US) ou « PGD<sub>2</sub> EIA kit », « TxB<sub>2</sub> EIA kit », « 15-HETE EIA kit », « LTB<sub>4</sub> EIA kit » ou « cLT EIA kit » (Cayman Chemicals, Ann Arbor, US).

Les concentrations d'IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  ont été déterminées dans les surnageants de cellules en utilisant les kits de dosage IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  EIA kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, US). Enfin les dosages multiplex d'IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-1 $\beta$  ont été réalisés par la



technologie Luminex (« Human cytokine/chemokine Immunoassay Milliplex MAP », Millipore), suivant les recommandations des fournisseurs.

### **XIII. Analyses statistiques**

Les résultats sont montrés comme moyennes  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM) ou écart type. Les différences statistiques entre deux groupes (traités vs contrôle véhicule) ont été évalués en utilisant le test de la variance de Bonferroni-Dunnett. Pour les résultats exprimés en ratio, l'effet du traitement est considéré comme significatif lorsque l'intervalle de confiance des données n'inclue pas la référence 100, en utilisant l'estimateur de Hodge-Lemman. Les différences sont considérées comme significatives lorsque  $p < 0,01$  et sont indiquées par deux astérisques.

### **XIV. Tests de prédiction du potentiel sensibilisant de molécules**

#### **Test DPRA (“Direct Peptide Reactivity Assay”)**

Le test de réactivité peptidique DPRA permet de classer les produits selon leur réactivité chimique apparente. Cette réactivité apparente est basée sur la mesure de la déplétion de deux peptides de synthèse ; peptide Cystéine (Ac-Arg-Phe-Ala-Ala-Ala-**Cys**-Ala-Ala-COOH) et peptide Lysine (Ac-Arg-Phe-Ala-Ala-Ala-**Lys**-Ala-Ala-COOH) mis au contact des molécules à tester :

- Le peptide cystéine a été mis en réaction avec 10 équivalents du composé à tester,
- Le peptide lysine a été mis en réaction avec 50 équivalents du composé à tester.

Les milieux réactionnels ont été laissés pendant 24 heures à température ambiante puis analysés par HPLC-UV. Les taux de peptides cystéine et lysine résiduels n'ayant pas réagi ont été mesurés. Ils ont été comparés à un contrôle réactionnel sans composé test permettant de calculer un taux de déplétion du peptide cystéine (TDCys) et un taux de déplétion du peptide lysine (TDLys). La moyenne des taux de déplétion des deux peptides est notée MTD. L'arbre de décision est proche de celui décrit par Gerberick et collaborateurs (2007) (Gerberick *et al.*, 2007). Une molécule est classée sensibilisante :

- lorsque les deux peptides ou le peptide Lys seul ont des taux de déplétion acceptables (i.e. mesure précise ou mesure minimale mais supérieure à la valeur limite) et que la MTD  $\geq$  6,4%
- lorsque seul le taux de déplétion du peptide Cys est acceptable et que la TDCys  $\geq$  13.8%

Une molécule est classée (INC) lorsque les taux de déplétion ne sont pas acceptables pour les deux peptides Cystéine (TDCys) et Lysine (TDLys) simultanément ou si un problème a été observé (interférences, solubilité...).



### **Test MUSST (“Myeloïd U937 Skin Sensitization Test”)**

Le test MUSST est un test cellulaire mesurant l'expression, par cytométrie en flux, de la molécule de co-stimulation CD86 à la surface des cellules U937 après 48h d'incubation avec une matière première à différentes doses. L'expression de CD86 est exprimée en % de cellules positives et un index de réactivité (IR) est calculé en % par rapport à l'expression basale (témoin non traité). Si l'IR > à 150 %, l'induction de l'expression de CD86 est considérée comme significative. Une potentialisation dose-dépendante de l'expression de CD86 est observée avec les sensibilisants (et pas avec les non sensibilisants ou les irritants). Un EC(150) peut alors être calculé et correspond à la concentration calculée par régression linéaire à partir de laquelle le seuil de positivité est atteint (IR> 150%). Une molécule est classée sensibilisante en MUSST si sur la majorité des expériences la molécule testée induit une expression significative de CD86 (IR> 150%), en dose réponse sur au moins 2 doses non cytotoxiques. Dans certains cas, les MP ne peuvent être classées sans ambiguïté et sont prédites « INConclusive ».

### **Test Nrf2-HTS**

La mesure de l'induction du facteur de transcription Nrf2 a été réalisée grâce au test CellSensor® ARE-*bla* HepG2 (Invitrogen), suivant les recommandations du fournisseur. En pratique, chaque molécule à tester (gamme identique pour toutes les molécules de 6 doses) a été incubée pendant 15h sur les cellules HepG2, transfectées de manière stable avec un gène rapporteur constitué des séquences ARE insérées en amont du gène codant pour l'enzyme  $\beta$ -lactamase. Après 15h de contact, l'activité de l'enzyme a été évaluée par ajout d'un substrat qui lorsqu'il est modifié par l'enzyme émet de la fluorescence à 447 nm. Pour chaque molécule, l'induction maximale d'induction de Nrf2 a été calculée comparativement à une molécule de référence positive, le TBHQ (*tert*-Butylhydroquinone), décrite pour induire le facteur de transcription Nrf2. Sur la base de cette induction relative au TBHQ, le seuil de 5% et 26% ont été identifiés et les règles de classification du caractère sensibilisant de molécules ont pu être établies :

- si la molécule n'atteint pas le seuil de 5% d'induction par rapport au TBHQ, ou si ce seuil est atteint pour une dose supérieure à 0,07 mg/mL, la molécule est classée non sensibilisante.
- si la molécule atteint le seuil de 5% d'induction par rapport au TBHQ à une doses inférieure à 0,07 mg/mL et si la molécule atteint le seuil de 26% d'induction par rapport au TBHQ, la molécule est classée sensibilisante.
- si la molécule atteint le seuil de 5% d'induction par rapport au TBHQ à une dose inférieure à 0,07 mg/mL mais si la molécule n'atteint le seuil de 26% d'induction par rapport au TBHQ, aucune conclusion ne peut être donnée.



## **XV. Outils statistiques**

### **Evaluation performance des tests (statistiques de Cooper)**

Pour l'évaluation des performances des tests des indicateurs de sensibilité, de spécificité et de concordances ont été réalisés.

- Sensibilité : Proportion de molécules qui sont sensibilisantes en LLNA et dont le test *vitro* ou *silico* est positif (vrais positifs).
- Spécificité : Proportion de molécules non sensibilisantes en LLNA et dont le test *vitro* ou *silico* est négatif (vrais négatifs).
- Concordance : Proportion des molécules bien classées par le test *vitro* ou *silico* (vrais positifs+ vrais négatifs) sur l'ensemble des molécules évaluées

### **Boîte à moustaches**

Les boîtes à moustaches ou diagramme en boîte sont des moyens rapides de figurer le profil essentiel d'une série statistique quantitative. Dans notre étude les boîtes nous ont également servi comme des indicateurs pour déterminer des règles d'affectation et pour visualiser les données (détection de valeurs atypiques) et déterminer a priori les variables les plus discriminantes. La boîte à moustaches comme schématisée dans la figure 16 résume quelques caractéristiques de position du caractère étudié (médiane, quartiles, minimum, maximum ou déciles). Ce diagramme est utilisé principalement pour comparer un même caractère dans deux populations de tailles différentes. En pratique cela consiste à tracer un rectangle allant du premier quartile au troisième quartile et coupé par la médiane. On ajoute alors des segments aux extrémités menant jusqu'aux valeurs extrêmes. Dans cette représentation on peut repérer les éléments atypiques ("*outlier*") correspondant aux valeurs distantes d'au moins 1,5 fois la longueur de la boîte à moustaches à partir du troisième quartile.



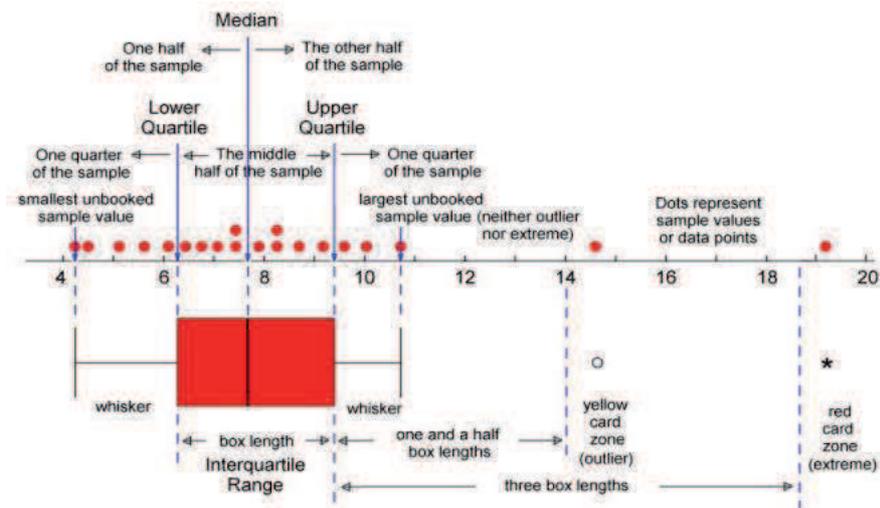


Figure 16 : Principe des boites à moustache

° correspond aux valeurs dites « outlier » (atypiques) qui sont supérieures à 1.5 fois « l'interquartile range »

\* correspond aux valeurs dites « extreme » (aberrantes) qui sont supérieures à 3 fois « l'interquartile range »

### Courbes ROC

La courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) permet d'étudier les variations de la spécificité et de la sensibilité d'un test pour différentes valeurs du seuil de discrimination. Le terme de courbe ROC permet de déterminer un seuil de façon empirique pour chaque paramètre, s'approchant le plus d'un compromis entre sensibilité et spécificité de prédiction. Un seuil est idéal s'il permet de séparer totalement tous les positifs des négatifs, sans faux positifs, ni faux négatifs. Il est donc défini par une sensibilité et une spécificité égales à 1. En pratique, on porte sur l'axe des abscisses, la variable '1-spécificité', cette variable est égale à l'effectif de faux positifs parmi les non sensibilisants. Sur l'axe des ordonnées, on retrouve la sensibilité, égale à l'effectif de vrais positifs parmi les sensibilisants. La courbe se construit de façon empirique en calculant la sensibilité puis la spécificité d'un test pour différents niveaux de seuils de discrimination. Un seuil est idéal s'il permet de séparer totalement tous les positifs des négatifs, sans faux positifs, ni faux négatifs. Il est donc défini par une sensibilité et une spécificité égales à 1.







# Résultats

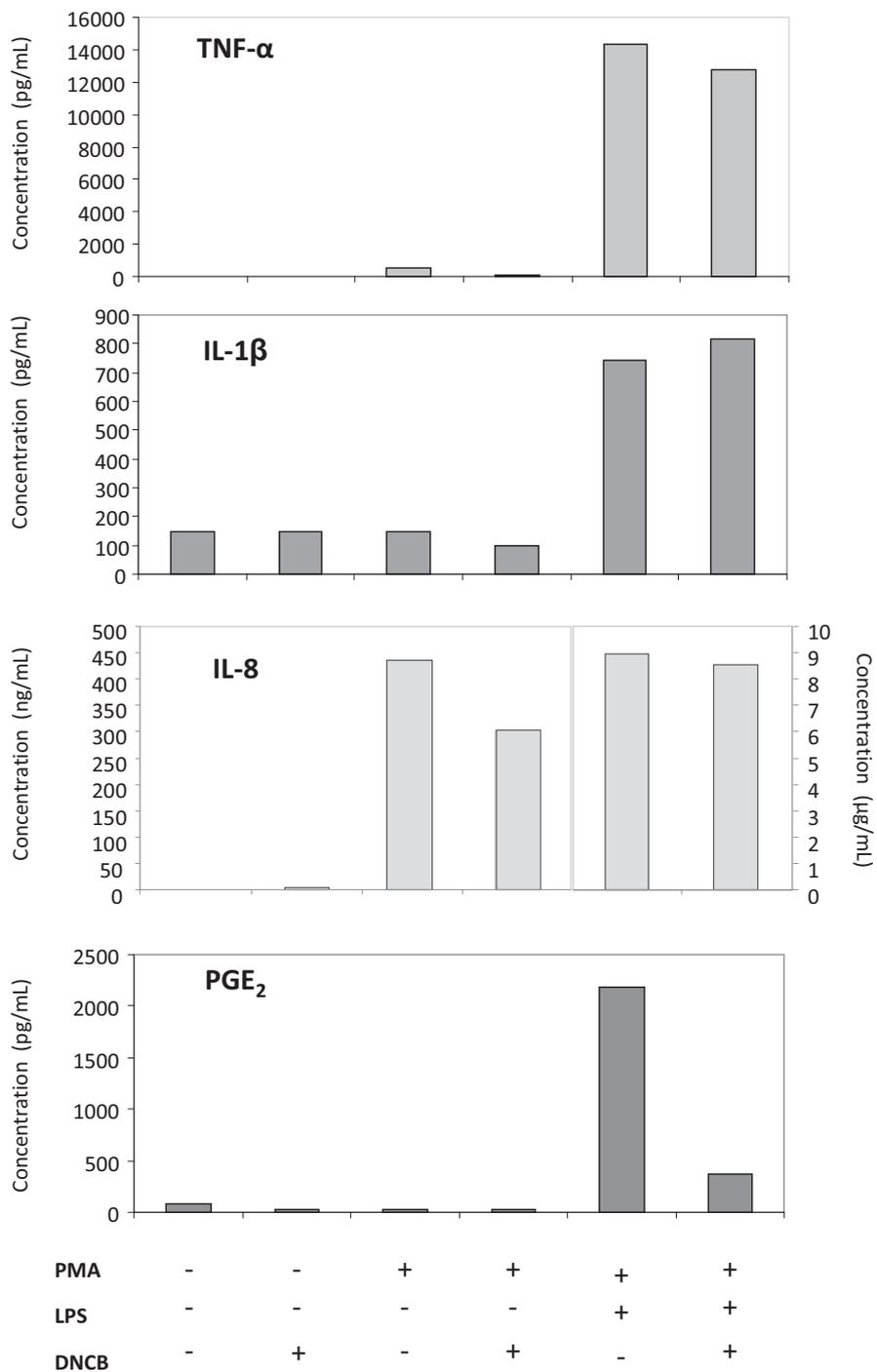


Figure 18 : Effet du DNCB en association avec PMA et PMA/LPS sur la production des médiateurs TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 et PGE<sub>2</sub>

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h avec PMA (60 ng/mL), DNCB (5  $\mu$ M) et PMA/DNCB en présence ou absence de LPS (10  $\mu$ g/mL). Les dosages des cytokines ont été réalisés dans le surnageant de culture par la technologie Luminex. Le dosage de PGE<sub>2</sub> a été réalisé par EIA. Les concentrations sont exprimées en pg/mL ou en ng et  $\mu$ g/mL (pour IL-8), pour une expérience représentative de n=4 expériences.

## Partie I : Présentation et caractérisation du modèle cellulaire d'étude (U937 PMA/LPS)

La lignée myéloïde U937, issue d'une leucémie monoblastique est décrite pour ses capacités à être différenciée (PMA, vitamine D, acide rétinoïque...) et notamment en cellules de type macrophage (Harris and Ralph, 1985; Sellmayer *et al.*, 1994). Comme déjà évoqué, sous leur forme indifférenciée les cellules U937 produisent peu de médiateurs solubles suite à un traitement avec un sensibilisant. Ainsi, dans la perspective d'évaluer si les cellules U937 différenciées ont une meilleure capacité à produire des médiateurs solubles en réponse à des sensibilisants, il a été entrepris dans une étude préliminaire de différencier puis stimuler les cellules U937 avec du phorbol myristate acetate (PMA) en présence ou absence d'un lipopolysaccharide d'*E. coli* (LPS) et d'évaluer la capacité des cellules à répondre à un sensibilisant de référence, le DNCB. La figure 18 présente les quantités de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 et PGE<sub>2</sub> produites par les cellules U937 en fonction des différents traitements (DNCB, PMA, PMA+DNCB  $\pm$  LPS). En l'absence de toute stimulation les cellules U937 ne produisent pas de TNF- $\alpha$  ni d'IL-8 et sécrètent environ 100 pg/mL d'IL-1 $\beta$  et de PGE<sub>2</sub>. Le sensibilisant de référence DNCB n'induit parmi les médiateurs analysés, que la production d'IL-8. Le PMA présente un léger effet activateur sur TNF- $\alpha$  (500 pg/mL), beaucoup plus marqué sur IL-8 (435 ng/mL) mais aucun effet synergique n'est observé avec l'ajout du DNCB, qui aurait même tendance à diminuer les quantités de TNF- $\alpha$  et d'IL-8 induites par le PMA ; les autres médiateurs (IL-1 $\beta$  et PGE<sub>2</sub>) ne sont modulés par aucune des stimulations. En revanche, la combinaison PMA/LPS augmente de manière très nette la production par les U937 de l'ensemble des médiateurs inflammatoires étudiés, avec respectivement des inductions de x 7, x 16, x 40 et x 140 pour IL-1 $\beta$ , IL-8, PGE<sub>2</sub> et TNF- $\alpha$ . L'ajout du DNCB n'a aucun effet significatif sur la production d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-8 induite par PMA/LPS, tandis que de façon inattendue, il diminue significativement la production de PGE<sub>2</sub>.

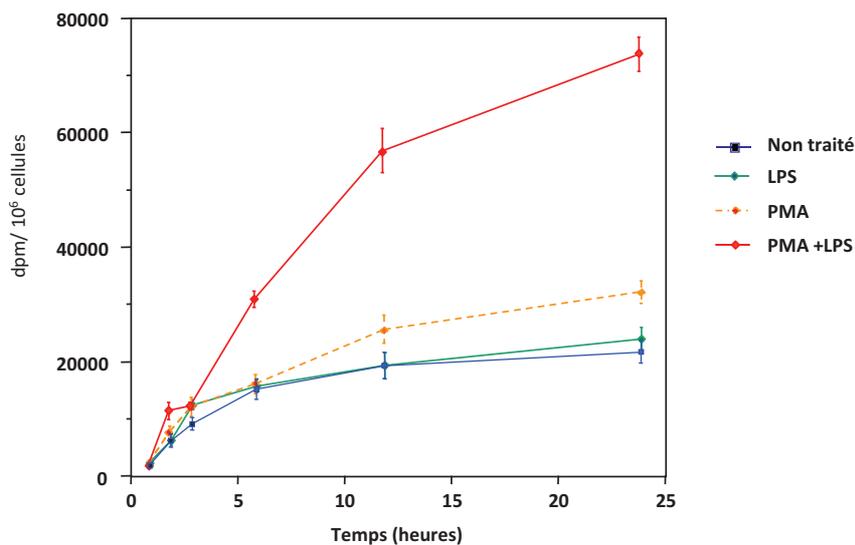
Au regard de ces résultats confirmés sur d'autres sensibilisants de contact, avant de disséquer les mécanismes d'action des sensibilisants conduisant à cette inhibition, nous avons souhaité, dans cette première partie, caractériser le système des cellules U937 traitées avec PMA/LPS (U937 PMA/LPS), afin de préciser les effets propres de chacun de ces activateurs sur les cellules U937 et de les distinguer par la suite des effets des sensibilisants sur ce système.

L'analyse des effets de chacun des activateurs PMA et LPS sur les cellules U937 a été menée au niveau de l'étude du phénotype des cellules, du métabolisme de l'acide arachidonique, de la production de cytokines/chimiokines inflammatoires ainsi que de la voie de signalisation dépendante du facteur de transcription Nrf2.

**Tableau 5 : Phénotype des cellules U937 traitées ou non avec PMA et/ou LPS.**

Les cellules U937 ont été traitées pendant 48h avec PMA (60 ng/mL), LPS (10 µg/mL) ou PMA/LPS. L'expression des marqueurs de surface CD14 et CD1a et du marqueur intracellulaire CD68 a été mesurée par immunomarquage avec les anticorps anti-CD14-PE, anti-CD1a-FITC et anti-CD68-FITC, analysée par cytométrie en flux en utilisant le logiciel CellQuest™ Pro. Le tableau renseigne les intervalles des pourcentages de cellules positives et des intensités moyennes de fluorescence (MFI) obtenus pour chaque condition et chaque marqueur (n = 4-8 expériences indépendantes).

Marqueur	Non traité		LPS		PMA		PMA + LPS	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI
CD14	0,7 – 1,5	8 – 10	1 – 2	10-11	1 – 2	12 – 20	30-40	25-40
CD1a	1 – 2,5	10-30	0,9 – 1,5	14 – 15	2 - 6	10 – 20	15 – 20	10 – 40
CD68	40 - 50	40 - 50	30-40	40-50	50 - 60	80 - 90	80 - 90	80 - 90



**Figure 19 : Cinétique de libération d'acide arachidonique dans le surnageant de culture des U937 traitées ou non avec PMA et/ou LPS.**

Les cellules U937 ont été marquées pendant 18h avec [<sup>3</sup>H]AA. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 24h avec PMA (60 ng/mL), LPS (10 µg/mL) ou PMA/LPS. Au cours du temps (30min, 1h, 6h, 12h, 24h) la quantité de radioactivité dans le surnageant de culture a été mesurée. La courbe représente pour chaque condition de traitement les quantités de radioactivité dans les milieux de culture (exprimées en dpm/10<sup>6</sup> cellules) ± erreur standard de la moyenne (SEM) de 3 expériences indépendantes.

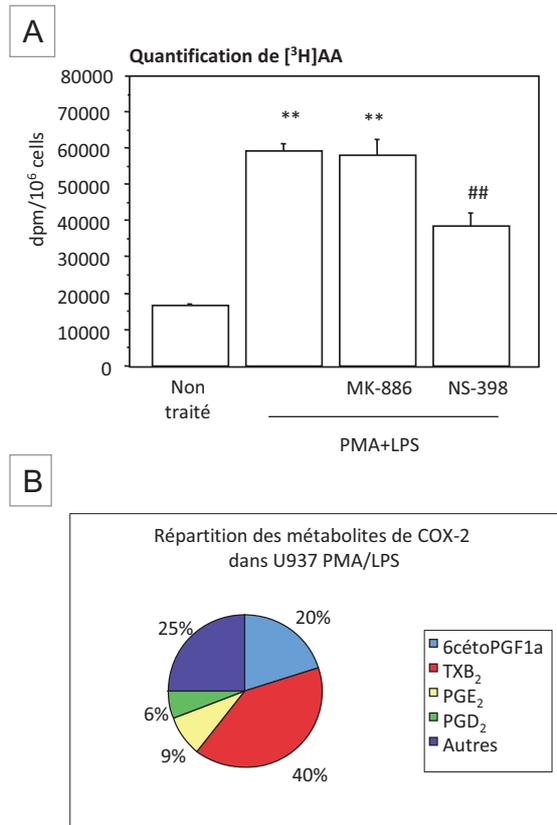
## I. Phénotype et morphologie des cellules

Le phénotype des cellules U937 a été analysé en mesurant par cytométrie en flux l'expression des marqueurs de lignage monocytaire, CD14, dendritique, CD1a, et de macrophages, CD68, suite aux différents traitements. Le tableau 5 indique les pourcentages de cellules positives et intensités moyennes de fluorescence (MFI) pour CD14, CD1a et CD68. En l'absence de tout traitement, les cellules indifférenciées sont à environ 50% CD68<sup>+</sup>, en revanche, elles sont négatives pour les marqueurs CD14 et CD1a. L'ajout de LPS ne modifie pas ce phénotype de manière significative. Le PMA induit en revanche une légère augmentation du nombre de cellules CD14<sup>+</sup> et du nombre de cellules CD1a<sup>+</sup>; de même on peut observer une augmentation du marqueur CD68, plus marquée au niveau de l'intensité d'expression que du pourcentage de cellules positives. En associant PMA et LPS le marqueur CD14 est très nettement augmenté, les cellules se différencient clairement et on obtient majoritairement une population de type macrophages (80% CD68<sup>+</sup>). Au-delà du phénotype, nous avons pu observer que le traitement PMA/LPS augmente la taille des cellules U937 et allonge leur temps de doublement; de plus, les cellules deviennent adhérentes et s'agrègent entre elles pour former des amas.

En conclusion, parmi les conditions testées, seule la condition PMA/LPS induit une différenciation des U937 avec une population majoritaire de cellules de type macrophages.

## II. Métabolisme de l'acide arachidonique dans le modèle cellulaire U937 PMA/LPS

Comme décrit précédemment (fig.18) le traitement PMA/LPS induit la production de PGE<sub>2</sub> par les cellules U937. Afin de déterminer la contribution respective du PMA et du LPS dans la synthèse de prostaglandines par les U937 ainsi que la cinétique de production des métabolites de l'AA, nous avons traité les cellules U937 avec de l'AA radiomarqué ([<sup>3</sup>H]AA) et suivi au cours du temps la libération de l'AA radiomarqué dans le surnageant de culture après différents traitements (PMA, LPS et PMA/LPS) en mesurant la radioactivité présente dans le surnageant (fig. 19). Alors que le LPS seul n'induit aucune libération d'AA, le PMA entraîne une augmentation rapide (dès 10h) de la quantité extracellulaire d'AA et de ses métabolites. Cette libération est fortement accentuée par l'ajout du LPS, que ce soit en terme de cinétique de réponse (induction plus rapide, observée dès 1h) ou d'intensité (induction plus de deux fois supérieure à l'effet du PMA seul).



**Figure 20: Principales voies métaboliques de l'AA dans les cellules U937 traitées avec PMA/LPS.**

Le métabolisme de l'acide arachidonique a été évalué sur les cellules U937 pré-marquées avec de l' [<sup>3</sup>H]AA, stimulées ou non avec PMA/LPS en présence ou absence des inhibiteurs pharmacologiques, NS398 (10 mM) ou MK-398 (5 mM). L'étude des métabolites totaux de l' [<sup>3</sup>H]AA a été réalisée par chromatographie sur couche mince comme décrit dans « Matériel et Méthodes ».

(A) Les histogrammes représentent les quantités moyennes des métabolites totaux de l' [<sup>3</sup>H]AA exprimées en dpm/10<sup>6</sup> cellules ± erreur standard de la moyenne (SEM) pour trois expériences indépendantes. \*\* p < 0,01 est considéré comme significatif par rapport au groupe contrôle non stimulé par PMA/LPS ; ## p < 0,01 est considéré comme significatif par rapport au groupe contrôle stimulé par PMA/LPS sans inhibiteur.

(B) Le diagramme circulaire représente la répartition en pourcentage des différents métabolites de COX-2 produits par les cellules U937 stimulées par PMA/LPS.

Nous avons ensuite cherché à caractériser quels métabolites de l'AA sont produits. Pour ce faire, les cellules radiomarquées à [<sup>3</sup>H]AA ont été traitées avec PMA/LPS en présence ou absence d'inhibiteurs spécifiques des principales enzymes du métabolisme de l'AA [MK-886, inhibiteur spécifique de la FLAP (« five lipoxygenase activating protein ») et NS-398 inhibiteur spécifique de la COX-2] puis la quantité de radioactivité a été dosée par scintillation liquide. Les résultats présentés dans la figure 20A montrent que contrairement au MK-886, le NS-398 diminue significativement la quantité de métabolites totaux produits par U937 PMA/LPS, indiquant une forte contribution de COX-2 dans la métabolisation de l'AA. L'absence d'effet de l'inhibiteur MK-886 sur la quantité d'AA métabolisé suggère que les cellules U937 traitées par le PMA/LPS ne produisent pas de métabolites de la 5-LOX. En effet, des dosages EIA dans les surnageants de culture n'ont mis en évidence aucun leucotriène (B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> et E<sub>4</sub>) ni dérivé d'acides eicosatétraénoïques (HETE) (non montré). Nous pouvons donc déduire de ces analyses que la voie de métabolisme de l'AA prépondérante dans les U937 PMA/LPS est la voie COX, dont la répartition des métabolites, quantifiés par rapport aux pics de chromatographie, est représentée par le diagramme circulaire (fig. 20B). Il apparaît que TxB<sub>2</sub> est le métabolite majoritaire produit par les cellules U937 stimulées par PMA/LPS, PGE<sub>2</sub> ne représentant que 9% des métabolites de COX.

L'étude utilisant l' [<sup>3</sup>H]AA a été complétée par une analyse en EIA afin de préciser la cinétique de production de ces deux métabolites d'intérêt (PGE<sub>2</sub> et TxB<sub>2</sub>) et de disséquer les contributions relatives du PMA et du LPS sur cette synthèse. La figure 21 montre respectivement les quantités de TxB<sub>2</sub> (A) et PGE<sub>2</sub> (B) produites à 2h, 6h, 8h, 24h et 48h par les cellules U937 traitées avec PMA, LPS et PMA/LPS. Seule la condition PMA/LPS permet une production de prostanoïdes par les U937. Les productions de TxB<sub>2</sub> et PGE<sub>2</sub> sont relativement parallèles : elles démarrent dès 6h avec une augmentation au cours du temps extrêmement rapide entre 10h et 24h, pour ensuite atteindre un plateau après 24h de stimulation. On confirme bien les proportions de TxB<sub>2</sub> et de PGE<sub>2</sub>, observées dans la figure 20, puisque le taux de TxB<sub>2</sub> est 5 x supérieur à celui de PGE<sub>2</sub>.

Concernant la production des prostanoïdes, nous avons vu qu'un plateau était souvent atteint à 24h, ce qui peut correspondre à un ralentissement de la synthèse ou un ratio synthèse/dégradation neutre. Afin de comprendre si la quantité de PGE<sub>2</sub> dosée à 48h provient d'une néosynthèse entre 24h et 48h, nous avons ajouté à 24h du NS-398 au système U937 PMA/LPS et comparé la production consécutive de PGE<sub>2</sub> à celle de cellules U937 PMA/LPS. Les résultats montrés dans la figure 21C indiquent que la quantité de PGE<sub>2</sub> produite par U937 PMA/LPS entre 24h et 48h est significativement inhibée par le NS-398 ; ainsi la production de PGE<sub>2</sub> est encore active après 24h, même si le *turnover* du métabolite doit être tel que la quantité totale de PGE<sub>2</sub> n'augmente plus significativement.

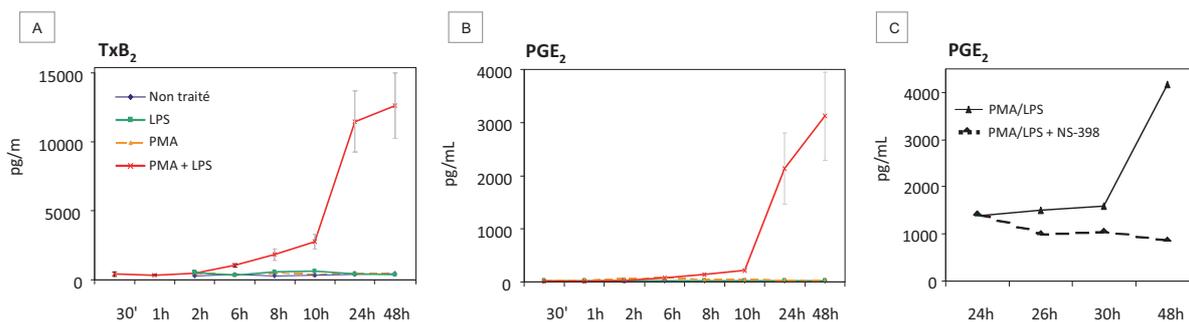


Figure 21 : Quantités de TxB<sub>2</sub> et PGE<sub>2</sub> produites dans le surnageant de culture des cellules U937 traitées ou non avec PMA et/ou LPS.

Les cellules U937 ont été traitées pendant 48h avec PMA (60 ng/mL), LPS (10 µg/mL) ou PMA/LPS. Au cours du temps (30min, 1h, 2h, 6h, 8h, 10h, 24h et 48h), les quantités de TxB<sub>2</sub> (A) et PGE<sub>2</sub> (B-C) ont été déterminées par EIA. Les courbes représentent pour chaque condition de traitement les quantités moyennes de prostanoides (en pg/mL) ± erreur standard de la moyenne (SEM) de 3-20 expériences indépendantes. (C) Quantité de PGE<sub>2</sub> analysée au cours du temps entre 24h et 48h pour U937 PMA/LPS ± NS-398 (10 µM). Le NS-398 a été ajouté après 24h de traitement des cellules U937 avec PMA/LPS (expérience représentative de 2 expériences indépendantes).

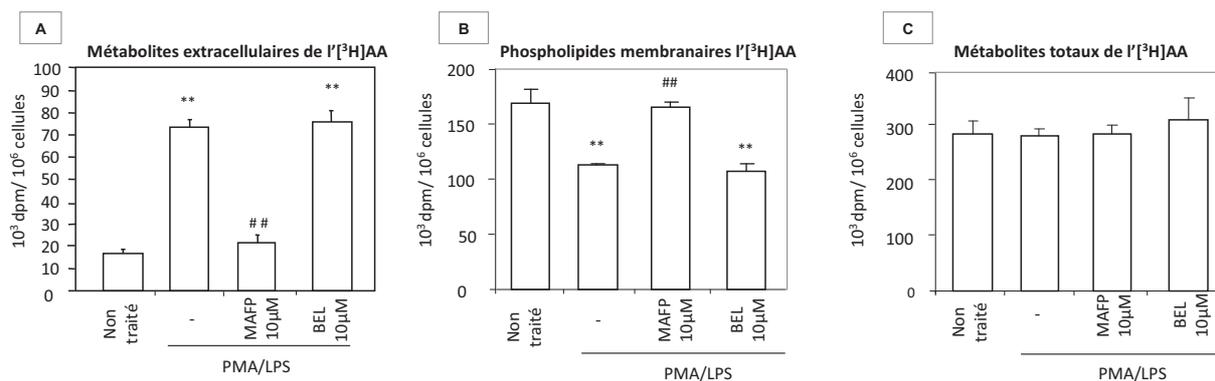


Figure 22 : Quantité d'acide arachidonique radiomarqué ([<sup>3</sup>H]AA) dans les cellules U937 traitées ou non avec PMA/LPS en présence ou absence des inhibiteurs BEL et MAFP.

Les cellules U937 marquées avec [<sup>3</sup>H]AA ont été traitées pendant 24h avec PMA/LPS en présence ou absence des inhibiteurs BEL (10 µM) ou MAFP (10 µM). La quantité de radioactivité a été mesurée dans les fractions des métabolites extracellulaires (A), des phospholipides membranaires (B) et des métabolites totaux (C). Les histogrammes représentent pour chaque condition de traitement les quantités de radioactivité exprimées en dpm/10<sup>6</sup> cellules ± erreur standard de la moyenne (SEM) pour 3 expériences indépendantes.

Le traitement PMA/LPS induisant la production d'un large spectre de prostanoïdes, dans la suite de l'étude nous nous sommes donc intéressés à caractériser l'effet propre des activateurs PMA et LPS sur les différentes étapes de la cascade de l'acide arachidonique via la cyclooxygénase.

La première étape limitante dans la cascade métabolique de l'AA est la mobilisation de l'AA à partir des phospholipides membranaires sous l'action de phospholipases  $A_2$ . Afin de déterminer quelles phospholipases sont responsables de cette mobilisation induite par les activateurs PMA/LPS dans la lignée U937 nous avons traité les cellules marquées à l' $[^3\text{H}]$ AA avec différents inhibiteurs des  $\text{PLA}_2$  (MAFP et BEL) puis mesuré la radioactivité au niveau des métabolites extracellulaires et des phospholipides membranaires. Contrairement au BEL, inhibiteur spécifique de la  $i\text{PLA}_2$ , qui n'a aucun effet, le MAFP (inhibiteur de la  $i\text{PLA}_2$  et  $c\text{PLA}_2$ ) diminue significativement la quantité des métabolites extracellulaires produits par U937 PMA/LPS (fig. 22A). D'autre part, la diminution de la quantité d' $[^3\text{H}]$ AA dans la fraction des phospholipides membranaires induite par PMA/LPS est annulée par le MAFP (aucun effet avec le BEL) (fig. 22B), tandis que la quantité totale de radioactivité ne varie pas quelle que soit la condition (fig. 22C). L'ensemble de ces résultats suggère que l'hydrolyse de l'AA à partir des phospholipides membranaires sous l'effet du PMA/LPS est dépendante de la  $c\text{PLA}_2$ .

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression des cyclooxygénases dans les U937 suivant les conditions de stimulation. Pour cela, dans un premier temps, l'expression des gènes des deux isoformes de l'enzyme *ptgs-1* (codant pour COX-1) et *ptgs-2* (codant pour COX-2) a été mesurée en dosant les ARNm par RT-PCR. Comme représenté sur la figure 23, le gène *ptgs-1*, exprimé constitutivement dans les cellules U937, voit son expression significativement augmentée par le PMA seul ou en association avec le LPS dès 2h (fig. 23A). Concernant l'isoforme *ptgs-2*, qui n'est pas exprimée dans les U937 au niveau basal, l'expression du gène est fortement induite par PMA/LPS, dès 2h avec une augmentation encore plus marquée entre 10h et 24h pour atteindre des taux d'induction extrêmement élevés (x2000) (fig. 23B<sub>2</sub>). Le PMA et le LPS seuls ont également un effet sur l'induction de l'expression du gène *ptgs-2* mais à un niveau beaucoup plus faible qu'en association (fig. 23B<sub>1</sub>).

Nous avons ensuite vérifié l'induction de COX-1 et 2 au niveau de l'expression de la protéine, par un double marquage intracellulaire COX-1/COX-2 des cellules U937, analysé par cytométrie en flux. Comme représenté dans la figure 24A, suite au traitement PMA/LPS le pourcentage de cellules  $\text{COX-2}^+$  augmente au cours du temps à partir de 6h, pour atteindre un optimum à 24h de stimulation, tandis que l'expression de la protéine COX-1 est inchangée.

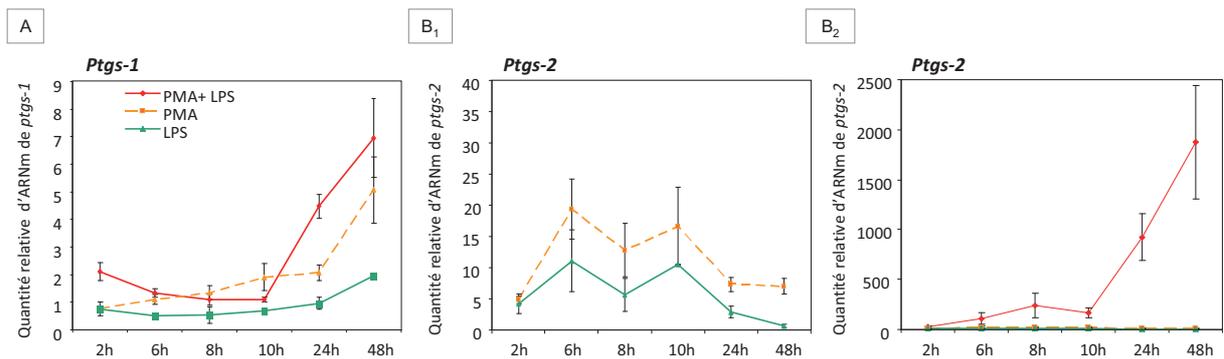


Figure 23 : Expression des gènes *ptgs-1* (codant pour COX-1) et *ptgs-2* (codant pour COX-2) dans les cellules U937 traitées ou non avec PMA et/ou LPS.

Les cellules U937 ont été traitées jusqu'à 48h avec PMA (60 ng/mL), LPS (10 µg/mL) ou PMA/LPS. L'expression du gène *ptgs-1* (A) et du gène *ptgs-2* (B1 et B2) a été étudiée par la quantification relative des ARNm, mesurés par RT-PCR après 2, 6, 8, 10, 24 et 48h de traitement. Les résultats sont exprimés en quantité relative d'ARNm normalisée par rapport à l'expression du "gène de ménage" *rp13* et rapportée au témoin non traité. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n ≥ 3 expériences indépendantes).

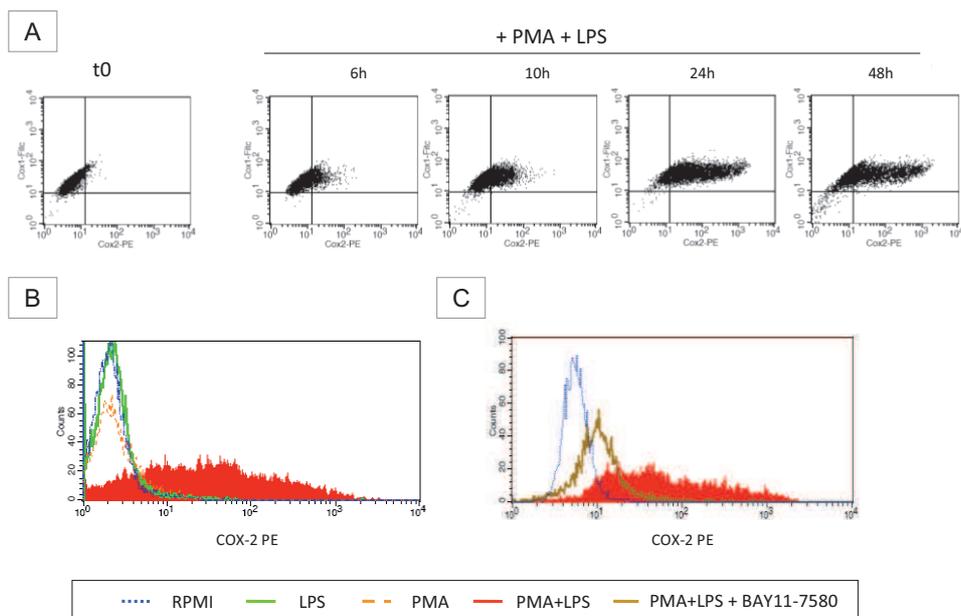


Figure 24 : Expression des protéines COX-1 et COX-2 dans les cellules U937.

Les cellules U937 ont été traitées jusqu'à 48h avec PMA (60 ng/ml) et/ou LPS (10 µg/ml) en présence ou absence de l'inhibiteur BAY11-7085 (2 µM). Après perméabilisation, les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-COX-1 couplés FITC et anti-COX-2 couplés PE. L'analyse a été réalisée par cytométrie en flux utilisant le logiciel CellQuest™ Pro.

(A) Analyse en cinétique (6, 10, 24 et 48h) de l'expression des protéines COX-1 et COX-2 dans les cellules U937 PMA/LPS. Cette expression, montrée en nuage de points et exprimée en MFI (COX-1 et ordonnée et COX-2 en abscisse) est représentée en comparaison de l'expression basale à  $t_0$ . Les nuages de points montrent une expérience représentative parmi 4-6 expériences indépendantes.

(B) Analyse de l'expression de COX-2 à 24h par les U937 traitées avec PMA et/ou LPS.

(C) Analyse de l'effet du BAY11-7085 sur l'expression COX-2 à 24h par les U937 PMA/LPS. Les histogrammes présentent le nombre d'événements en ordonnée et la MFI en abscisse obtenus pour une expérience représentative parmi 3-4 expériences indépendantes.

On peut penser que pour COX-1 les inductions observées au niveau des ARNm n'ont pas de significativité biologique. De même, concernant COX-2, alors qu'en ARNm une induction avait également été observée avec le PMA seul, seule la condition PMA/LPS induit son expression au niveau de la protéine (fig. 24B). L'expression de COX-2 après traitement PMA/LPS est complètement annulée par l'ajout de BAY11-7085, un inhibiteur de NF- $\kappa$ B, ce qui suggère que dans notre modèle, l'expression de COX-2 induite par PMA/LPS est bien sous le contrôle du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Enfin, nous avons vérifié que la production de PGE<sub>2</sub> induite par PMA/LPS est bien entièrement dépendante de l'activité de COX-2, puisque l'ajout du NS-398 à 10 $\mu$ M, concentration à laquelle l'inhibition est spécifique de COX-2, supprime la quantité de PGE<sub>2</sub> induite par PMA/LPS pour atteindre le niveau basal des cellules non traitées (fig. 25).

En conclusion sur le métabolisme de l'AA dans les U937, l'association des deux activateurs PMA et LPS est indispensable à la synthèse de prostanoïdes observée à partir de 10h de stimulation. Les effets cumulés des deux activateurs permettent de 1) mobiliser rapidement (avant 6h) l'AA à partir des phospholipides membranaires sous l'action de la cPLA<sub>2</sub>, 2) induire à partir de 6-8h l'expression de l'enzyme COX-2 (via l'activation de NF- $\kappa$ B) responsable de la cyclo-oxydation/péroxydation de l'AA en PGH<sub>2</sub>. Enfin, bien que cette étape n'ait pas été évaluée directement, le traitement PMA/LPS doit très probablement avoir une action sur l'expression et/ou l'activation des synthases terminales (*i.e.* thromboxane, PGE-et PGD-synthases) responsables de la métabolisation du PGH<sub>2</sub> en différents prostanoïdes TxB<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> et PGD<sub>2</sub>.

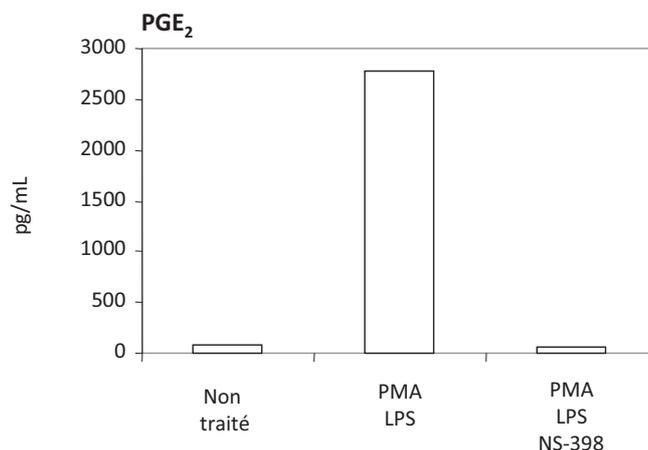


Figure 25 : Quantité de PGE<sub>2</sub> dans les surnageants de culture des cellules U937 traitées avec PMA/LPS en présence ou absence de l'inhibiteur NS-398.

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h avec PMA (60 ng/mL)/LPS (10  $\mu$ g/mL) en présence ou absence de l'inhibiteur NS-398 (10  $\mu$ M). Les quantités extracellulaires de PGE<sub>2</sub> ont été déterminées par EIA. Les histogrammes représentent les concentrations moyennes de PGE<sub>2</sub>, exprimées en pg/mL, d'une expérience représentative de 3 expériences indépendantes.

Tableau 6 : Quantités d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$ , d'IL-8, d'IL-6 et d'IL-10 dosées à 24h dans le milieu de culture des cellules U937 traitées avec PMA ou LPS.

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h en présence ou absence de PMA (60 ng/mL) ou de LPS (10  $\mu$ g/mL). Les dosages des cytokines ont été réalisés par la technologie Luminex. Les concentrations moyennes sont exprimées en pg/mL  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes.

pg/mL	Non traité	LPS	PMA	PMA/LPS
IL-1 $\beta$	157 $\pm$ 40	150 $\pm$ 40	150 $\pm$ 40	740 $\pm$ 150
TNF- $\alpha$	< 3,2	10 $\pm$ 1	500 $\pm$ 22	14379 $\pm$ 2545
IL-8	< 3,2	23 318 $\pm$ 492	(435 $\pm$ 151) $\times$ 10 <sup>3</sup>	(10 $\pm$ 5) $\times$ 10 <sup>6</sup>
IL-6	< 3,2	10 $\pm$ 1	0	1800 $\pm$ 1500
IL-10	10	10	30	120 $\pm$ 20

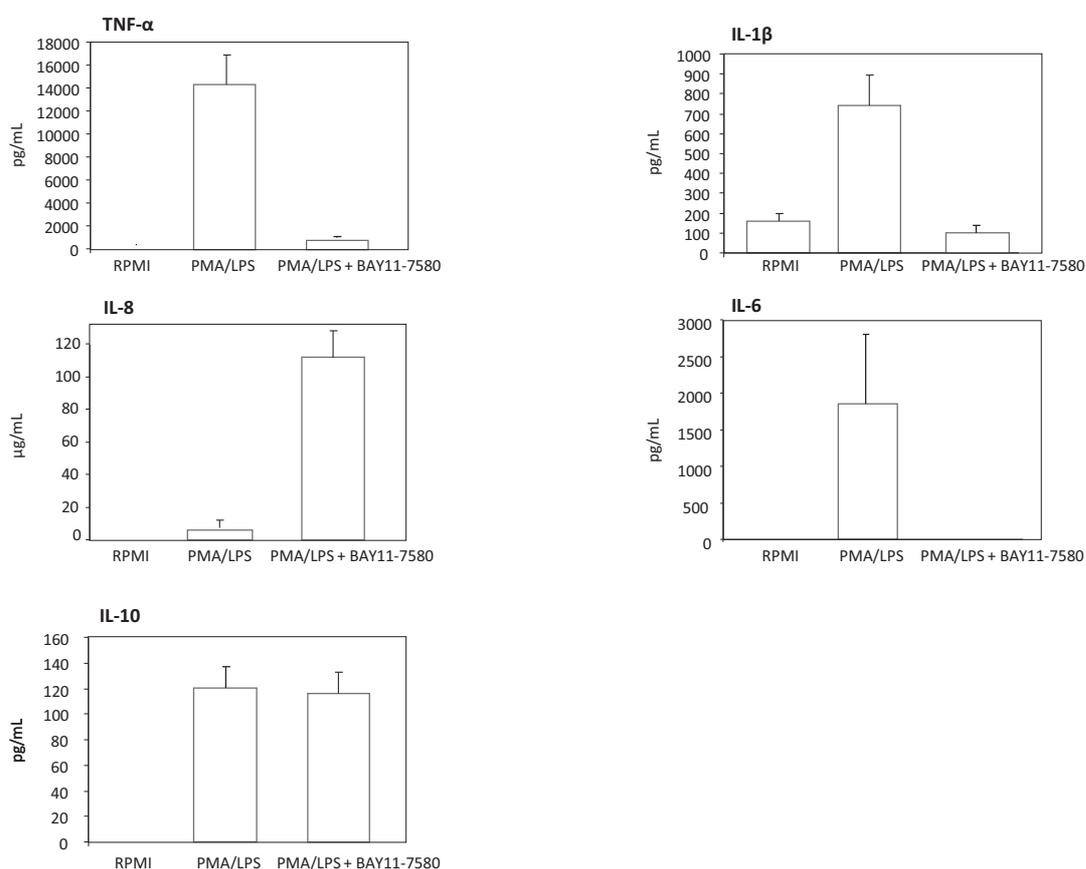


Figure 26 : Quantités de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6 et IL-10 produites par les cellules U937 traitées avec PMA/LPS en présence ou absence de l'inhibiteur BAY11-7085.

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h avec PMA (60 ng/mL)/LPS (10  $\mu$ g/mL) en présence ou absence de l'inhibiteur BAY11-7085 (2  $\mu$ M). Les dosages des cytokines ont été réalisés par la technologie Luminex. Les histogrammes donnent les quantités moyennes exprimées en pg/mL ou  $\mu$ g/mL (pour IL-8)  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes.

### III. Cytokines et chimiokines produites par le modèle U937 PMA/LPS

Au-delà de la synthèse de prostanoïdes, nous nous sommes intéressés à cartographier les cytokines produites par le système cellulaire U937 PMA/LPS. Ainsi, nous avons dosé dans le surnageant de culture différentes cytokines/chimiokines produites par les cellules en fonction des stimulations (tableau 6). Comme déjà décrit dans l'étude préliminaire, au niveau basal, les U937 ne produisent pas de médiateurs ou à de très faibles taux pour l'IL-1 $\beta$  (150 pg/mL). Comme pour les métabolites de l'AA, le LPS seul n'a pas d'effet significatif sur la production des cytokines analysées sauf sur IL-8 tandis que le PMA seul induit la production de TNF- $\alpha$  (500 pg/mL) et d'IL-8 (435 ng/mL) mais est sans effet sur l'IL-1 $\beta$ , l'IL-10 et l'IL-6 (tableau 6). L'association PMA/LPS induit la production de nombreux médiateurs en quantité variable : après 24h de stimulation les niveaux de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-8 sont respectivement autour de 15000, 800, 1800, 120 pg/mL et 10 mg/mL (tableau 6); quelle que soit la condition testée, nous n'avons jamais mis en évidence d'IL-12p70. D'autre part, l'ajout de BAY11-7085 supprime quasi totalement la production de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 confirmant que la synthèse de ces médiateurs est bien sous le contrôle du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, en revanche, BAY11-7085 n'a pas d'effet sur IL-10 et potentialise la production d'IL-8 qui atteint 100 mg/mL. L'ensemble de ces dosages indique que parmi les conditions testées l'association PMA/LPS induit la production du plus grand nombre de cytokines aux plus fortes concentrations.

### IV. Activation du facteur de transcription Nrf2 dans le modèle U937 PMA/LPS

Etant donné le rôle de Nrf2 dans la réponse cellulaire au stress, nous avons souhaité évaluer les effets de chacun des activateur PMA et LPS sur ce facteur de transcription. L'étude du facteur de transcription Nrf2 a été entreprise dans notre système cellulaire en mesurant l'expression de certains gènes cibles de Nrf2 (*nqo1*, *ho-1*, *akr1c2*). La figure 27 présente les quantités relatives d'ARNm pour les gènes *nqo1*, *ho-1* et *akr1c2* exprimées au cours du temps par les cellules U937 après traitement au LPS, PMA et PMA/LPS. Parmi les différentes conditions, le LPS seul n'induit pas l'expression des gènes cibles de Nrf2 analysés. En revanche, le PMA seul et en combinaison avec le LPS induit significativement l'expression de *nqo1*, *ho-1* et *akr1c2*. Malgré une importante variabilité de l'intensité de la réponse, la condition PMA/LPS induit une augmentation de l'expression des gènes cibles de Nrf2 plus importante que les autres conditions.

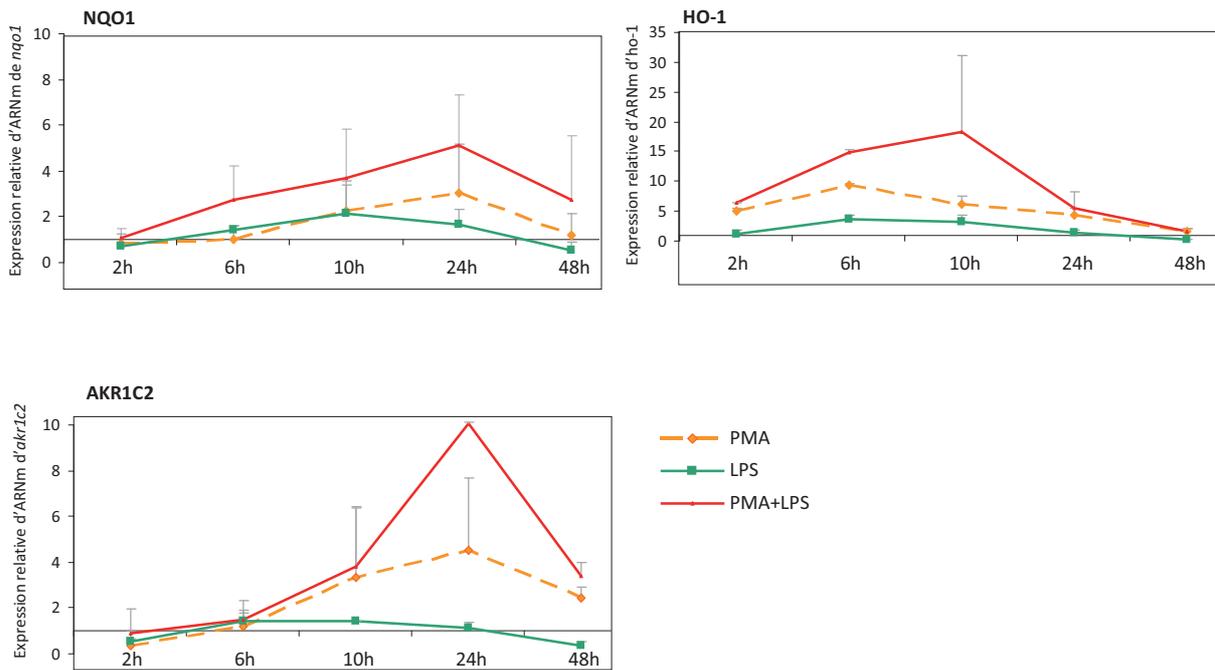


Figure 27 : Expression en cinétique de gènes cibles de Nrf2 (*nqo1*, *ho-1* et *akr1c2*) dans les cellules U937 traitées ou non avec PMA et/ou LPS.

Les cellules U937 ont été traitées ou non pendant 48h avec PMA (60 ng/mL) et/ou LPS (10 µg/mL). L'expression des gènes *nqo1*, *ho-1*, et *akr1c2* a été étudiée par la quantification des ARNm, mesurés par RT-PCR après 2, 6, 10, 24 et 48h de traitement. Les résultats sont exprimés en quantité relative comparativement aux cellules U937 non traitées et les valeurs ont été normalisées par rapport à l'expression du "gène de ménage" *rpl13*. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n≥ 3 expériences indépendantes).

En fonction des gènes, les cinétiques et intensité de réponse varient : les maxima d'induction pour *nqo1* (x4), *ho-1* (x20) et *akr1c2* (x10) sont atteints respectivement à 24h, 10h et 24h. Ainsi l'ensemble de ces résultats indique que seul ou en association avec le LPS, le PMA active le facteur de transcription Nrf2 et l'expression consécutive de ses gènes cibles.

En conclusion de cette première partie, nous avons pu montrer que sous l'action conjointe du PMA/LPS, les cellules U937 se différencient en cellules de type macrophages capables de produire de nombreux médiateurs inflammatoires (cytokines, chimiokines et prostanoïdes) suite à l'activation de voies de signalisation et des facteurs de transcription tels que Nrf2 et NF-κB. Concernant la cascade de l'AA, bien que le PMA seul soit capable d'induire une légère mobilisation d'AA et la transcription de COX-2, son effet est insuffisant à la production de prostanoïdes et la présence du LPS est en effet indispensable pour une mobilisation significative de l'AA et l'expression de COX-2 au niveau protéique.

La caractérisation du modèle et des effets propres de PMA et LPS achevée, nous nous sommes ensuite intéressés à caractériser les effets inhibiteurs des sensibilisants sur la production de PGE<sub>2</sub> afin de déterminer les mécanismes d'action mis en jeu.

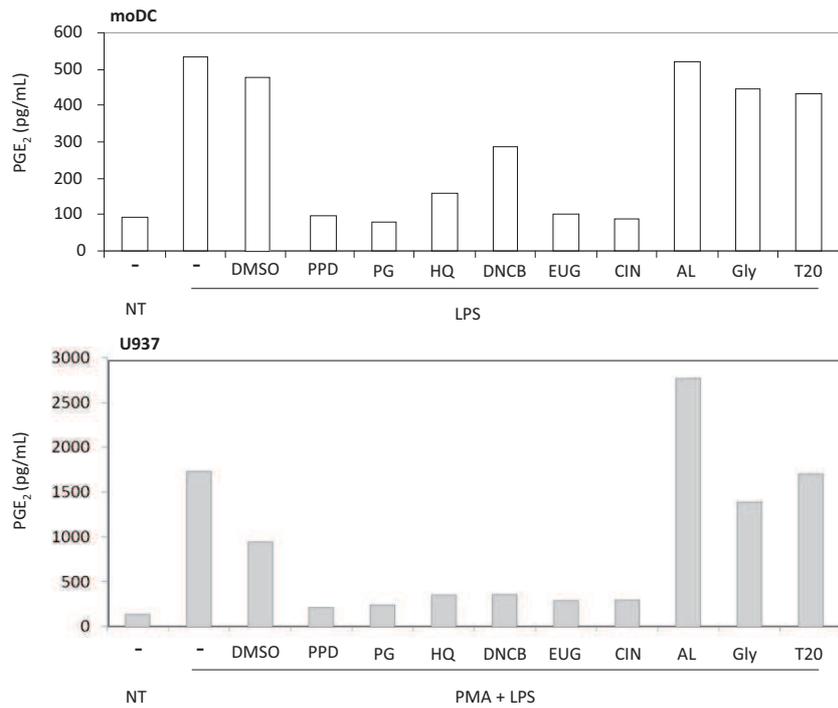


Figure 28 : Effet des sensibilisants sur la production de PGE<sub>2</sub> par les DC différenciées à partir de monocytes (moDC) et par les cellules U937.

Les moDC (J5 de différenciation) et les U937 ont été stimulées ou non pendant 24h avec respectivement LPS ± molécules ou PMA/LPS ± molécules. Les doses des molécules testées sont les suivantes : CIN: 50 µM; EUG: 1000 µM; PPD: 100 µM; DNCB: 5 µM; PG: 200 µM ; HQ: 10 µM ; T20 : 1400 µM ; Gly : 1000 µM et AL:1300 µM. Les quantités de PGE<sub>2</sub> ont été dosées dans le surnageant par EIA. Les histogrammes représentent les concentrations d'une expérience représentative de n=3-5 expériences indépendantes pour les U937. Dans le cas des moDC, l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois.

## **PARTIE II: Etude des mécanismes d'action des sensibilisants sur le métabolisme de l'acide arachidonique des cellules U937 PMA/LPS**

Nous avons précédemment montré que le DNCB inhibe la production de PGE<sub>2</sub> induite par PMA/LPS dans les cellules U937. Ce résultat a été confirmé sur d'autres sensibilisants de contact. Ainsi, dans cette partie nous présentons l'étude des mécanismes d'action de 6 sensibilisants de référence : le 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB), le 1,4-dihydroquinone (HQ), la 1,4-para-phenylenediamine (PPD) et le n-propyl gallate (PG), en tant que sensibilisants extrêmes/fort, le cinnamaldehyde (CIN) en tant que modéré et l'eugenol (EUG) en tant que sensibilisant faible. Dans un premier temps, l'article « Contact sensitizers modulate the arachidonic acid metabolism of PMA-differentiated U-937 monocytic cells activated by LPS », publié en juillet 2011 dans le journal *Toxicology and Applied Pharmacology*, s'intéresse à déterminer à quel(s) niveau(x) de la cascade métabolique de l'AA les interactions des sensibilisants ont lieu. Dans un deuxième temps, nous préciserons les voies de signalisation amont (Nrf2/NF-κB) impliquées dans les mécanismes d'action des sensibilisants.

Avant de nous attacher à mieux comprendre par quels mécanismes ces effets inhibiteurs ont lieu, nous avons d'abord voulu nous assurer que ces effets n'étaient pas restreints au modèle particulier U937 PMA/LPS mais qu'ils pouvaient également se retrouver dans d'autres modèles cellulaires, notamment dans un modèle de cellules dendritiques.

### **I. Effet des sensibilisants sur la production de PGE<sub>2</sub> par les moDC**

Afin d'identifier si les effets des sensibilisants, observés dans le modèle U937 PMA/LPS, se retrouvent sur des cellules primaires, nous avons utilisé des cellules dendritiques générées à partir de monocytes humains (moDC). Après 5 jours de différenciation avec GM-CSF et IL-4, les moDC ont été traitées ou non avec du LPS, en présence ou en absence des molécules (6 sensibilisants et 3 non sensibilisants). A titre de comparaison, des U937 ont été traitées avec PMA/LPS en présence ou absence des mêmes molécules; pour chacune des molécules, la dose maximale non cytotoxique a été évaluée. Après 24h de traitement, la quantité de PGE<sub>2</sub> a été dosée par EIA dans les surnageants de culture. Les résultats montrent que la quantité de PGE<sub>2</sub> induite par le LPS sur les moDC est inférieure à celle produite par les U937 PMA/LPS puisque les moDC produisent 550 pg/mL alors que les U937 1500 pg/mL (fig. 28), toutefois les effets relatifs des molécules testées sont similaires : dans les deux modèles, les 3 non sensibilisants [acide lactique (AL), glycérol (Gly) et tween 20



(T20)] ne modifient pas la quantité de PGE<sub>2</sub> produite, tandis que les sensibilisants (PPD, PG, HQ, DNCB, EUG et CIN) diminuent la production en PGE<sub>2</sub> avec la même dynamique de réponse : parmi les sensibilisants testés le PG, l'EUG, le CIN et la PPD présentent les effets inhibiteurs les plus marqués dans les deux modèles (diminution de 80%) tandis que l'HQ et le DNCB ont des effets moins prononcés (diminution de 50%). En conclusion, l'inhibition de la production de PGE<sub>2</sub> spécifique des sensibilisants et mise en évidence dans le modèle U937 PMA/LPS a été retrouvée dans des moDC et ne semble pas liée à la quantité de PGE<sub>2</sub> produite par les cellules stimulées.

Dans une perspective de développement de test alternatif à l'animal permettant d'identifier le potentiel sensibilisant de molécules, les lignées cellulaires sont plus adaptées (quantité de cellules, durée de la culture, reproductibilité des réponses). Ainsi, pour le développement d'un test autour du marqueur PGE<sub>2</sub>, le modèle des cellules U937 différenciées avec PMA et stimulées avec le LPS a été poursuivi et notamment pour l'étude des mécanismes d'action des sensibilisants qui suit.

## **II. Inhibition de la synthèse de prostanoïdes produits par les U937 PMA/LPS par les sensibilisants de contact : une caractéristique commune pour des mécanismes d'action variés.**

### A) Article "Contact sensitizers modulate the arachidonic acid metabolism of PMA-differentiated U937 monocytic cells activated by LPS"

#### *Présentation de l'article :*

L'induction effective de cellules T spécifiques d'un haptène en réponse à une molécule sensibilisante nécessite, au-delà de la modification de protéines de la peau (formation du complexe antigénique), un deuxième signal, dit « de danger », conduisant à l'activation des DC, est déterminant dans la mise en place d'une réponse spécifique de sensibilisation.

L'objectif de cette étude était de mieux comprendre comment les sensibilisants modulent une réponse inflammatoire au niveau de la production de cytokines et du métabolisme des médiateurs lipidiques dérivés de l'acide arachidonique.

Ce travail a été mené en utilisant la lignée myéloïde pro-monocytaire U937, qui, lorsqu'elle est différenciée avec du PMA et stimulée avec du LPS produit un large panel de médiateurs inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, prostanoïdes...). Dans cette étude nous avons évalué l'effet de six sensibilisants de référence (DNCB, PPD, HQ, EUG et CIN) et 3 non sensibilisants (AL, Gly et T20) sur la production de ces médiateurs. Nos résultats montrent

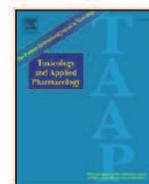


que parmi les molécules testées, tous les sensibilisants diminuent significativement et de façon spécifique la production des métabolites des prostanoïdes ( $PGE_2$ ,  $PGD_2$ ,  $TxB_2$ ...). Au-delà, deux sensibilisants, l'EUG et le CIN diminuent également les quantités d'IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  produites par les cellules U937 PMA/LPS. Dans un deuxième temps nous nous sommes attachés à préciser à quel niveau dans la cascade enzymatique du métabolisme de l'acide arachidonique les sensibilisants agissent. Nous avons ainsi montré qu'aucun des sensibilisants testés n'empêche la mobilisation de l'AA à partir des phospholipides membranaires sous l'action de la cPLA $_2$ . En revanche, la plupart des effets semblent se situer au niveau de l'enzyme COX-2. De façon plus précise, nous avons pu montrer par RT-PCR et cytométrie en flux que l'EUG et le CIN inhibent l'expression de l'enzyme aussi bien au niveau de l'ARNm que de la protéine. D'autre part, nous avons montré dans un test enzymatique biochimique utilisant une enzyme COX-2 recombinante que l'HQ, le PG et l'EUG ont la capacité d'inhiber l'activité de l'enzyme à des doses relativement élevées. Parmi les molécules testées, seul le DNCB ne montre aucun effet que ce soit sur cPLA $_2$  ou sur COX-2, ce qui nous laisse penser que son interaction doit plutôt se situer en aval de COX-2, au niveau des différentes synthèses.



# Article





## Contact sensitizers modulate the arachidonic acid metabolism of PMA-differentiated U-937 monocytic cells activated by LPS

Aurélia Del Bufalo<sup>a,\*</sup>, José Bernad<sup>b</sup>, Christophe Dardenne<sup>b</sup>, Denis Verda<sup>a</sup>, Jean Roch Meunier<sup>a</sup>, Françoise Rousset<sup>a</sup>, Silvia Martinozzi-Teissier<sup>a</sup>, Bernard Pipy<sup>b</sup>

<sup>a</sup> L'Oréal R&I, 93600 Aulnay-sous-Bois, France

<sup>b</sup> UMD3, INSERM-IFR150, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, 31062 Toulouse, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 April 2011

Revised 18 June 2011

Accepted 23 June 2011

Available online 30 July 2011

#### Keywords:

Contact sensitizers

Arachidonic acid metabolism

Inflammation

U-937 myeloid cell line

### ABSTRACT

For the effective induction of a hapten-specific T cell immune response toward contact sensitizers, in addition to covalent-modification of skin proteins, the redox and inflammatory statuses of activated dendritic cells are crucial. The aim of this study was to better understand how sensitizers modulate an inflammatory response through cytokines production and COX metabolism cascade. To address this purpose, we used the human monocytic-like U-937 cell line differentiated by phorbol myristate acetate (PMA) and investigated the effect of 6 contact sensitizers (DNFB, PPD, hydroquinone, propyl gallate, cinnamaldehyde and eugenol) and 3 non sensitizers (lactic acid, glycerol and tween 20) on the production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) and on the arachidonic acid metabolic profile after bacterial lipopolysaccharide (LPS) stimulation. Our results showed that among the tested molecules, all sensitizers specifically prevent the production of PMA/LPS-induced COX-2 metabolites (PGE<sub>2</sub>, TxB<sub>2</sub> and PGD<sub>2</sub>), eugenol and cinnamaldehyde inhibiting also the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . We further demonstrated that there is no unique PGE<sub>2</sub> inhibition mechanism: while the release of arachidonic acid (AA) from membrane phospholipids does not appear to be a target of modulation, COX-2 expression and/or COX-2 enzymatic activity are the major steps of prostaglandin synthesis that are inhibited by sensitizers. Altogether these results add a new insight into the multiple biochemical effects described for sensitizers.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Allergic contact dermatitis (ACD) is a common cutaneous inflammatory disease induced by chemicals and metal ions (Grabbe and Schwarz, 1998). Contact sensitizers are low molecular weight electrophilic reactive molecules, lipophilic enough to penetrate the epidermis, that bind (most often covalently) to skin proteins. The modified self proteins (haptenated proteins) are then processed by dendritic cells (DC), which migrate from the skin to the draining lymph nodes where they present the hapten-modified peptide to naïve T cells in a MHC restricted context, leading to a hapten-specific immune response (Krasteva et al., 1999). In addition, for the effective generation of hapten-specific effector T lymphocytes, danger signals are crucial by triggering oxidative stress and the related inflammatory response that allows DC activation i.e. upregulation of co-stimulatory molecules (CD86, CD80, CD83, CD40) and MHC class II molecules (Aiba et al., 1997). Among the different inflammatory mediators leading to DC maturation, cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , etc.) as well as eicosanoids and precisely prostaglandins, play a major role (Enk and Katz, 1992; Harizi and Gualde, 2005). These cytokines, but also

chemokines such as IL-8 and CCL-20 are produced by keratinocytes in response to topical application of contact sensitizers onto the skin (Enk et al., 1992). However, concerning prostaglandins, very little is known about their regulation by contact sensitizers.

Clinical studies have produced evidence that irritation (arising from the release of pro-inflammatory cytokines in the skin) promotes the development of ACD (McLelland et al., 1991) and, on the contrary, an absence of danger signals drives to tolerance (Smith et al., 2002). Similarly, Magnusson and Kligman's work (1969) has concluded that an adequate level of skin irritation is crucial to the optimal development of skin sensitization. Despite all, the sensitization phase of ACD is often a silent process, without obvious clinical manifestations of inflammation/irritation. In this regard it is interesting that anti-inflammatory properties of some molecules (eugenol, isoeugenol, cinnamaldehyde, etc.) do not prevent their inducing skin sensitization (Lee et al., 2007; Lin et al., 2003).

It has also been demonstrated that contact sensitizers, as small electrophilic molecules, can activate the transcriptional regulator Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2), inducing the expression of genes with an antioxidant response element (ARE) in their promoter sequence [i.e. heme oxygenase 1 (HO-1), NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1)] (Ade et al., 2009; Natsch and Emter, 2008). The detoxification functions of the induced enzymes and the anti-

\* Corresponding author at: L'Oréal R&I, 1, av. Eugène Schueller, BP22, 93601 Aulnay sous Bois, France.

E-mail address: [adelbufalo@rd.joreal.com](mailto:adelbufalo@rd.joreal.com) (A. Del Bufalo).



inflammatory program (inhibition of COX-2 and iNOS expression) initiated by the Nrf2 pathway (Lin et al., 2008; Liu et al., 2008) allow cells to overcome the oxidative stress caused by electrophilic injuries. In other words, the intrinsic reactivity of contact sensitizers, on the one hand generates an inflammatory response needed for DC maturation, but on the other hand ends up in a protective anti-oxidant and anti-inflammatory program.

Considering the major impact of this balance on the shaping of the immune response to contact allergen (Toebak et al., 2006), the aim of this study was to better understand how sensitizers modulate the inflammatory response including the COX mediated production of prostaglandins (PGs).

Prostaglandins are a family of biologically active compounds derived from C20 polyunsaturated fatty acids such as arachidonic acid (AA), which is primarily released under the action of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) from phospholipid membrane components and then metabolized into eicosanoids through different oxidation cascades [cyclooxygenase (COX), lipoxygenase (LOX)]. COX enzymes (constitutive COX-1 and inducible COX-2), also called PGH<sub>2</sub> synthases, have bifunctional catalytic properties, which oxygenate, cyclize and reduce AA into PGH<sub>2</sub> via their cyclooxygenase/peroxidase function. PGH<sub>2</sub> is subsequently metabolized by a series of downstream synthases into a variety of eicosanoids that include PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub>, and thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) (Smith et al., 1991).

Since the monocyte-like cell line U-937 is widely known to discriminate sensitizers from non sensitizers and, when differentiated by phorbol myristate acetate (PMA) and activated by lipopolysaccharide (LPS), it becomes a model often used to analyze the modulatory effect of substances on the inflammation, we chose the PMA/LPS treated U-937 model in order to evaluate how sensitizers could affect the induction of an inflammatory response. We show here that among the tested molecules sensitizers unlike non sensitizers selectively inhibit PGE<sub>2</sub> production induced by PMA/LPS and describe their mechanisms of action.

## Material and methods

**Chemicals.** Dimethyl sulfoxide (DMSO), lipopolysaccharide (LPS), phorbol myristate acetate (PMA) and contact sensitizers were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France and St Louis, USA) at the highest possible purity (often >98%). The following chemical sensitizers were used: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNFB, CAS 97-00-7), 1,4-dihydroquinone (HQ, CAS 123-31-9), 1,4-phenylenediamine (pPD, CAS 106-50-3), n-propyl gallate (PG; CAS 121-79-9), cinnamaldehyde (CIN, CAS 104-55-2); eugenol (EUG, CAS 97-53-0), lactic acid (LA, CAS 50-21-5), Glycerol (Gly, CAS 56-81-5) and Tween 20 (T20, CAS 9005-64-5). The pharmacological inhibitors were: N-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]-methanesulfonamide (NS-398, CAS 123653-11-2), bromoenol lactone (BEL, CAS 478288-90-3) from Cayman Chemical (Ann Arbor, USA), (E)-3-[(4-t-Butylphenyl)sulfonyl]-2-propenenitrile (BAY 11-7085, CAS 196309-76-9) from Calbiochem Merck Chemicals (Nottingham, UK) and methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP, CAS 149301-79-1) from Enzo Lifesciences (Villeurbanne, France). [<sup>3</sup>H]AA was obtained from PerkinElmer (Courtaboeuf, France).

**Cell culture and chemical treatment.** U-937 cells (CRL-1593.2, ATCC, Manassas, USA) were cultured and maintained at a cell density between 2 × 10<sup>5</sup> and 1 × 10<sup>6</sup> cells/ml in RPMI 1640 (Gibco – Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest, Nuaille, France), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin using classical cell culture protocols and facilities. For cell stimulation U-937 were plated in 24-well plates (0.5 × 10<sup>5</sup> cells/ml) and treated with 60 ng/ml PMA in association with 10 µg/ml LPS. Chemical sensitizers (or pharmacological inhibitors) dissolved in DMSO and PPD, HQ, PG, LA, Gly and T20 solubilized in RPMI were added simultaneously to PMA/LPS. The

final DMSO concentration was below 0.4% (v/v). Supernatants and cells were harvested at different time-points depending on the experiments.

After 24 h of incubation with different chemicals, the viability was assessed using UptiBlue Viable cell (Counting Reagent, Interchim, France) and/or Dead/Live Fixable Far Red (Molecular Probes, Cergy Pontoise, France), according to the manufacturers' instructions.

**Arachidonic acid metabolism study.** To evaluate the effect of sensitizers on the AA metabolism, U-937 cells were pre-labeled with [<sup>3</sup>H] arachidonic acid ([<sup>3</sup>H]AA). Briefly, after cells had been cultured for 18 h at a cell density of 1 × 10<sup>6</sup> cells/ml with 1 µCi [<sup>3</sup>H]AA/ml, the culture medium was discarded after centrifugation (1000 g for 10 min) and the cells were washed three times to remove unincorporated [<sup>3</sup>H]AA. Once labeled, the cells were stimulated as described above. At the end of the stimulation course (24 h), the culture medium was separated from the cells by centrifugation and both fractions were collected.

The cellular lipids were extracted twice with hexane/isopropanol (3:2, v/v) evaporated to dryness under nitrogen and the residues were dissolved in hexane/isopropanol and analyzed by thin layer chromatography as described (Pollaud et al., 1995). Briefly, the lipid extracts were quantitatively applied on a thin-layer silica-gel plate (LK-6-DF Whatman) previously heated for 1 h at 100 °C, with a Camag ATS4 automatic TLC sampler. The plates were run up to 10 cm with chloroform/methanol/water/triethylamine (30:34:8:35, v/v) to separate the phospholipids and were then dried. They were then run again in the same direction for a further 6 cm with petroleum ether/diethyl ether/acetic acid (50:50:1, v/v) to separate the cholesteryl esters, neutral lipids and free fatty acid. Radioactive metabolites were identified using a beta-Radioactivity Intelligent Thin Layer Analyzer (Raytest) and were quantified by beta scintillation count using a 1217 Rackbeta counter (LKB).

To extract the intracellular eicosanoids, after removal of culture supernatants, 1 ml of water/methanol (85:15, v/v) was added to each well and two 10 min-freeze-thaw cycles (−80 °C) were carried out. The cell lysates were then transferred to 2 ml Eppendorf tubes before being sonicated for 3 min and centrifuged for 10 min at 13,000 g. Cell extracts (supernatants) were stored at −80 °C for further analysis.

To purify and analyze the intracellular (cell extracts) and extracellular (culture supernatants) [<sup>3</sup>H]AA metabolites, the samples were acidified to pH 5.4 with 1 M HCl and then chromatographically extracted and concentrated by solid phase extraction (SPE) using Varian Bond Elut C18 columns and an AutoTrace SPE Workstation (Caliper Life Science). Free [<sup>3</sup>H]AA and [<sup>3</sup>H]-metabolites were eluted by methanol (extraction efficiency was almost constant and above 85%). The methanol samples were evaporated to dryness under nitrogen. The residues were dissolved in 80 µl methanol and quantitatively applied on a thin-layer silica-gel plate (LK-6-DF Whatman) previously heated for 1 h at 100 °C. The solvent used to separate the [<sup>3</sup>H]AA metabolites was the organic phase of ethyl acetate/water/isooctane/acetic acid (110:100:50:20, v/v). The free [<sup>3</sup>H]AA and [<sup>3</sup>H]AA COX metabolites were identified using a beta-Radioactivity Intelligent Thin Layer Analyzer using retention times and co-migration with authentic standards.

**COX-2 gene expression analysis by Real-Time PCR.** After removal of cell supernatants, the adherent cell layer was lysed with 500 µl RLT lysis buffer (Qiagen, Courtaboeuf, France) before total RNA isolation using "RNeasy RNA isolation" kits according to the manufacturer's specifications (Qiagen). The RNA concentration was determined using the Ribogreen RNA quantitation kit (Molecular Probes- Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and quality was assessed with Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Massy France). The RNA was stored in RNase-free water at −80 °C.

One microgram of total RNA was reverse transcribed in 20 µl volume using the QuantiTect® Rev Transcription Kit (Qiagen). After reverse transcription, 180 µl H<sub>2</sub>O were added and the cDNA was stored at −20 °C until needed for PCR.



Real-time PCR analysis was performed on a Lightcycler 480 apparatus (Roche Diagnostics, Meylan, France) using QuantiTect® SYBR green (Qiagen) according to the manufacturer's instructions as follows: each real-time PCR reaction for *ptgs-1* (QuantiTect® QT00210280) and *ptgs-2* (QuantiTect® QT00040586) was set up using 2 µl of cDNA in a total volume of 10 µl (SYBR mix). Samples were denatured at 95 °C for 15 min. Subsequently, 40 cycles were run for 15 s at 94 °C for denaturation, 30 s at 55 °C for annealing and 30 s at 72 °C for elongation. For each experiment, a standard curve was included with serial dilutions of a dedicated cDNA, in order to verify the PCR efficiency. The relative gene expression levels were given as % of fold-change ratios and were calculated according to the classical  $\Delta\Delta Ct$  rule, using the vehicle sample (RPMI or DMSO) and the *rpl-13* (QuantiTect® QT01671628) gene expression for normalization.

**COX-2 protein expression analysis.** Intracellular COX protein expression analysis was performed by flow cytometry according to a previously described method (Moller et al., 2008) using the Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) according to the manufacturer's specifications. In fact, cells were harvested with trypsin EDTA 0.25%, washed twice with PBS, resuspended in 250 µl of Cytotix/Cytoperm-Solution (BD Biosciences) and incubated 20 min at 4 °C. Afterwards, cells were washed twice with 100 µl Perm/Wash buffer (centrifugation 5 min/300 × g), resuspended in 100 µl Perm/Wash buffer and stained with 10 µl of directly fluorochrome-conjugated mouse monoclonal anti-COX-1 FITC/anti-COX-2 PE antibodies (or the IgG1 isotypic control) (Ref #334090; #349526; BD Biosciences) for 30 min at 4 °C. Finally,  $1 \times 10^4$  cells were analyzed in a FACSCalibur flow cytometer. Data analysis was performed with the CellQuestTMPro software.

Results were expressed using IR = (Induction Ratio) calculated with the following formula:  $IR = [(MFI_{spe} - MFI_{iso})_{treated}] / [(MFI_{spe} - MFI_{iso})_{vehicle}]$ , where MFI is the mean fluorescence intensity of samples (treated or vehicle) labeled with isotype control antibody (iso) or antigen-specific antibody (spe).

**COX-2 activity assay.** The assay was performed using the recombinant COX-2 enzyme (from ovine placenta), from Cayman Chemical (Ann Arbor, USA). Briefly, the enzyme and its heme were pre-incubated with reference inhibitor (Dup-697) or sensitizers at room temperature for 5 min in 100 mM Tris (pH 8.0). Each sensitizer was dissolved in DMSO 0.4% and assessed at 6 concentrations (500, 100, 10, 5, 1, 0.1 µM). A colorimetric substrate, the N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-Phenylenediamine (TMPD), a co-substrate of the peroxidase activity of COX-2, was added to the assay mix. The reaction was initiated by the addition of 50 µM of arachidonic acid. After 10 min of incubation at room temperature, the reaction was stopped by adding 1 M HCl and the fluorescence of the oxidized TMPD was read at 590 nm.

**Enzyme Immune Assay (EIA) analysis.** PGE<sub>2</sub> and TxB<sub>2</sub> concentrations were measured in cell culture supernatants and/or SPE-(C18) purified cell lysates (prepared as previously described), using respectively the "High sensitivity PGE<sub>2</sub> Enzyme Immunoassay kit" (Assay Designs, Ann Arbor, US) or TxB<sub>2</sub> EIA kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, US).

IL-1β and TNF-α concentrations were analyzed in cell culture supernatants using the IL-1β, TNF-α EIA kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, US) as described by the manufacturer.

**Data analysis.** Results are shown as mean ± standard error of the mean (SEM) for at least three independent experiments. Statistical differences between two groups (treated and control) were evaluated using analysis of variance of the Bonferroni–Dunn test. For data expressed as a ratio, the treatment effect was considered significant when the confidence interval of the data did not include the reference value 100 using the Hodge–Lemman estimator.

Differences were considered statistically significant when  $p < 0.01$  and indicated by two asterisks (\*\*).

## Results

### Contact sensitizers specifically suppress the PMA/LPS-induced PGE<sub>2</sub> release in U-937

As previously established (Garrelts et al., 1999), U-937 stimulated with a PMA/LPS cocktail massively produce pro-inflammatory mediators such as the cytokines TNF-α and IL-1β as well as the prostanoid PGE<sub>2</sub>, as shown 24 h after stimulation in Fig. 1A–C. With the aim of evaluating the effect of sensitizers on these three inflammatory mediators in comparison to non sensitizers, we quantified TNF-α, IL-1β and PGE<sub>2</sub> released by U-937 stimulated by PMA/LPS in the presence of different chemicals. We chose six reference contact sensitizers with various potentials and chemical reactivities: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB), 1,4-dihydroquinone (HQ), 1,4-para-phenylenediamine (PPD) and *n*-propyl gallate (PG), as extreme/strong sensitizers, cinnamaldehyde (CIN) as moderate and eugenol (EUG) as a weak sensitizer, as well as 3 non sensitizers lactic acid (LA), glycerol (Gly) and tween 20 (T20) (Table 1). Each molecule was evaluated at two non toxic doses (maximal non toxic dose and a ½ dilution). As shown in Fig. 1D–E, while non sensitizers have no inhibitory effect, all tested sensitizers strongly reduce the production of PGE<sub>2</sub> induced by PMA/LPS (between 50% and 90% decrease) whereas only CIN and EUG at the highest tested doses also inhibit IL-1β and TNF-α production.

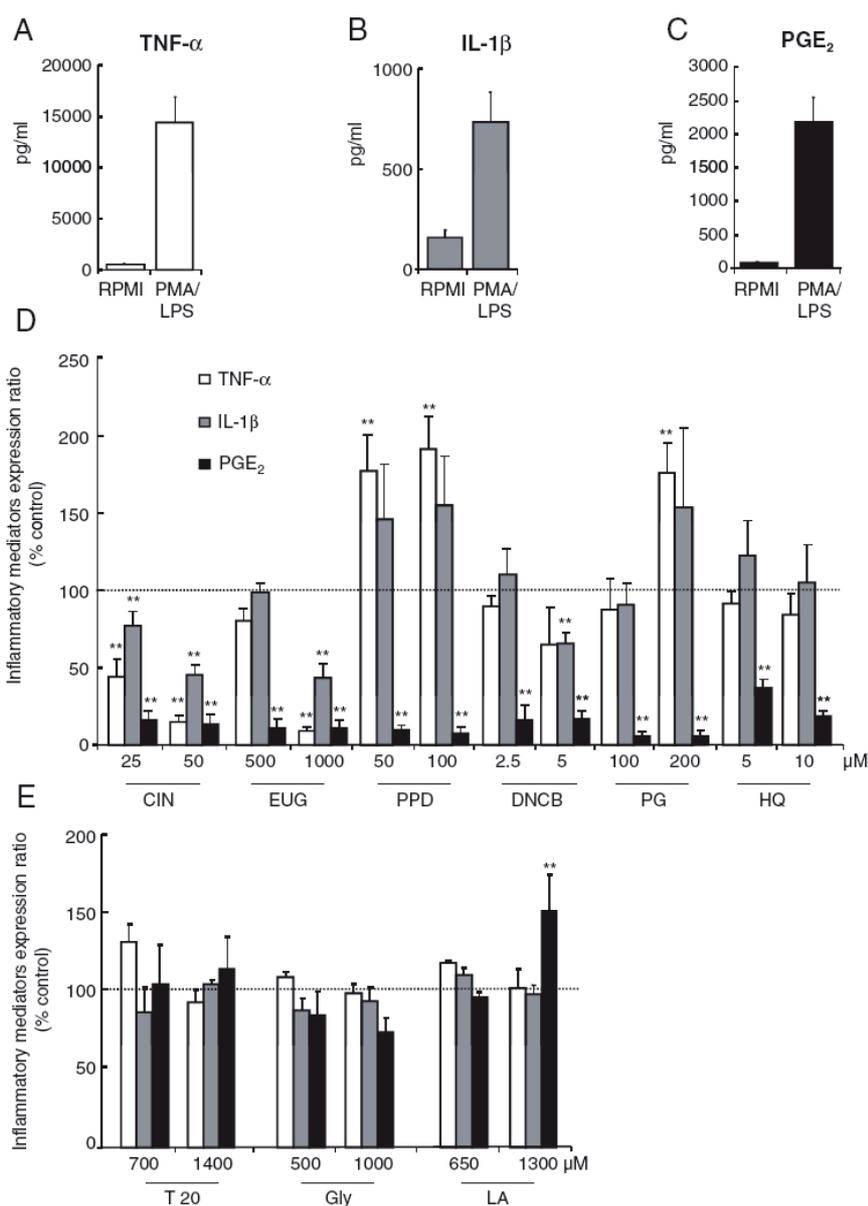
To confirm that this extracellular PGE<sub>2</sub> decrease is indeed the consequence of an inhibition of PGE<sub>2</sub> synthesis and does not depend on intracellular accumulation, we analyzed the total quantity of PGE<sub>2</sub> produced by the cells. To do so, we added the intracellular amount of PGE<sub>2</sub>, quantified in purified cell lysates to the PGE<sub>2</sub> measured in the extracellular fraction. Fig. 2 illustrates the total PGE<sub>2</sub> amount produced by PMA/LPS-stimulated U-937 treated with sensitizers and expressed relatively to the amount in the PMA-LPS vehicle control. All tested sensitizers significantly decrease the total PGE<sub>2</sub> quantity with at least a 50% decrease, strongly suggesting that sensitizers downregulate PGE<sub>2</sub> synthesis.

### Contact sensitizers suppress the production of all COX metabolites produced by PMA/LPS-stimulated U-937

In order to analyze whether sensitizers affect the production of other prostanoids, [<sup>3</sup>H]AA prelabeled U-937 cells were treated with PMA/LPS with or without sensitizers and radioactivity was quantified in the COX metabolites' fraction of culture supernatants and cell lysates. A specific COX-2 enzymatic inhibitor, NS-398 was used as a control. As shown in Fig. 3A, the quantity of radioactivity in the fraction corresponding to COX metabolites increases in U-937 after PMA/LPS stimulation. This increase was strongly downregulated by all tested sensitizers the same way as the COX-2 inhibitor, NS-398.

The analysis of AA metabolites produced by U-937 cells stimulated by PMA/LPS showed that TxB<sub>2</sub>, a stable metabolite of TXA<sub>2</sub>, was the predominant product of the COX pathway (40%), while PGE<sub>2</sub> fraction represents only 10% of the radioactivity (Fig. 3B). We confirmed this result by EIA since we found that U-937 cells stimulated by PMA/LPS produce 5 times more TxB<sub>2</sub> (10 ng/ml) (Fig. 4B) than PGE<sub>2</sub> (2 ng/ml) (Fig. 1C). To confirm the results obtained with [<sup>3</sup>H]AA prelabeled U-937 cells we determined, using EIA, the effect of sensitizers on the production of TXB<sub>2</sub>. As shown in Fig. 4A, sensitizers inhibit TxB<sub>2</sub> production increased by PMA/LPS, as does NS-398. Interestingly, despite the differences between TxB<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> production levels, sensitizers suppress both eicosanoids with the same magnitude: HQ at 5 µM decreases both PGE<sub>2</sub> and TxB<sub>2</sub> by 60% and HQ at 10 µM displays an 80% decrease for both, whereas EUG, CIN, PPD and PG almost totally suppress





**Fig. 1.** TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and PGE<sub>2</sub> amount in U-937 cell culture supernatants after stimulation with PMA/LPS in the absence (A–C) or presence (D) of chemicals. (A–C) U-937 cells were treated with 60 ng/ml PMA and 10  $\mu$ g/ml LPS for 24 h. Culture supernatants were analyzed by EIA. Data represent TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B) and PGE<sub>2</sub> (C) in pg/mL as mean  $\pm$  SEM of 3–7 independent experiments. (D–E) Simultaneously with their 24 h stimulation (PMA/LPS), U-937 cells were exposed to sensitizers (CIN; EUG; DNCB; PPD; HQ; PG) or non-sensitizers (LA; Gly; T20). For each molecule, 2 non toxic doses were tested. Culture supernatants were analyzed by EIA. Data (white bars: TNF- $\alpha$ ; gray bars: IL-1 $\beta$ ; black bars: PGE<sub>2</sub>) are expressed as relative quantity (%) of inflammatory mediators production in treated samples compared to the vehicle control (PMA/LPS U-937 treated with RPMI or DMSO 0.4%). Dotted line indicates the 100% threshold. Results represent the mean  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments ( $n = 3-7$ ). The effect of chemical treatments was considered significant (\*\* $p < 0.01$ ), when the confidence interval of the data did not include the reference value 100.

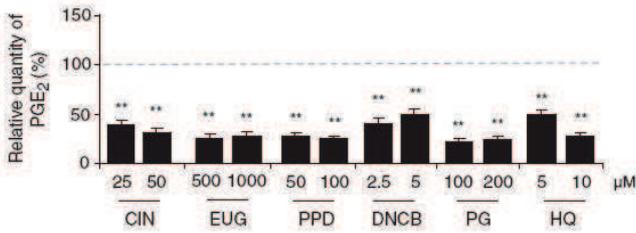
**Table 1**

List of the tested chemicals (sensitizers and non sensitizers).

Chemical name	Abbreviation	CAS	Chemical family	Use	Known effect	References
1-chloro-2,4-dinitrobenzene	DNCB	97-00-7	Aromatic halides	Reference	S (extreme/strong)	Basketter et al., 1999
1,4-dihydroquinone	HQ	123-31-9	Quinone/Phenolic compound	Whitener	S (extreme/strong)	Basketter et al., 1999
1,4-phenylenediamine	pPD	106-50-3	Aromatic amine	Hair dyes, textiles	S (strong)	Basketter et al., 1999
n-propyl gallate	PG	121-79-9	Phenolic compound	Antioxidant	S (strong)	Basketter et al., 1999
Cinnamaldehyde	CIN	104-55-2	Aldehyde	Fragrance	S (moderate)	Basketter et al., 1999
Eugenol	EUG	97-53-0	Phenyl propen	Fragrance	S (weak)	Basketter et al., 1999
Lactic acid	LA	50-21-5	Carboxylic acid	Food additive, peeling agent	NS (irritant)	Basketter et al., 1999
Glycerol	Gly	56-81-5	Poly-alcohol	Moisturizing agent	NS	Basketter et al., 1999
Tween 20	T20	9005-64-5	Polymer	Surfactant	NS (slight irritant)	Lanigan and Yamarik, 2002

S: sensitizer; NS: non sensitizer.





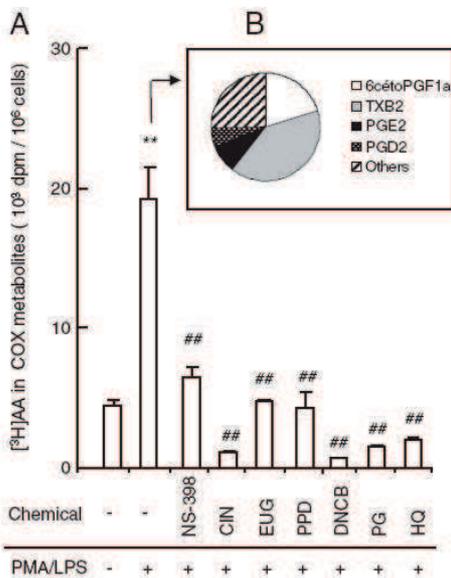
**Fig. 2.** Sensitizers' effect on total PGE<sub>2</sub> quantity produced by PMA/LPS-U-937 cells. After sensitizers' treatment, culture supernatants and SPE(C-18) purified cell lysates of PMA/LPS-U-937 were analyzed by EIA for PGE<sub>2</sub> quantification. Total amounts were calculated as a sum of extracellular and intracellular amounts. Data are expressed as relative total quantity (%) of PGE<sub>2</sub> compared to the vehicle control (PMA/LPS U-937 treated with RPMI or DMSO 0.4%). Results represent the mean ± SEM of at least 3 independent experiments. (n=3-7). Dotted line indicates the 100% threshold. The effect of treatments with sensitizers was considered significant (\*\*p<0.01), when the confidence interval of the data did not include the reference value 100.

(90% decrease) eicosanoid production. As for TxB<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub>, EIA quantification of PGD<sub>2</sub> shows that this prostaglandin (which represents 10% of the radioactivity) is also inhibited by all tested sensitizers, as by NS-398 (data not shown).

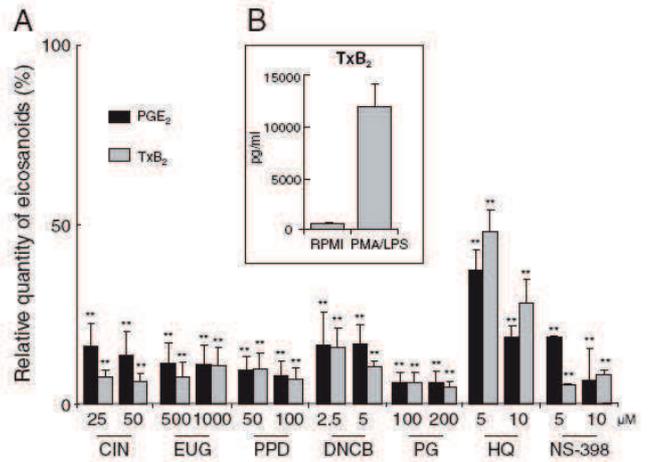
Since sensitizers suppress the majority of COX metabolites (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> and TxB<sub>2</sub>), we investigated the sensitizer's effect, starting upstream the syntheses level, i.e. upstream of PGH<sub>2</sub>.

**Contact sensitizers do not inhibit arachidonic acid mobilization from membrane phospholipids**

As AA mobilization from membrane phospholipids, catalyzed by PLA<sub>2</sub> activation, is the rate-limiting step in PG biosynthesis, we studied the mobilization of this fatty acid in [<sup>3</sup>H]AA labeled U-937 cells. After



**Fig. 3.** Effect of sensitizers on COX metabolites production induced by PMA/LPS in U-937. AA metabolism in U-937 cells under the effect of PMA (60 ng/ml) and LPS (10 μg/ml) was evaluated with [<sup>3</sup>H]AA labeled U-937 cells. Prelabeled cells were cultured for 24 h with PMA/LPS with or without NS-398 at 10 μM (a COX-2 inhibitor) or sensitizers (CIN: 50 μM; EUG: 1000 μM; PPD: 100 μM; DNCB: 5 μM; PG: 200 μM; HQ: 10 μM). The study of the [<sup>3</sup>H] AA metabolism was processed as described in Material and methods. (A) Histogram represents the mean of [<sup>3</sup>H]AA metabolites produced in culture medium (expressed in dpm/10<sup>6</sup> cells) ± standard error (SEM) of the three independent experiments. \*\* (p<0.01) indicates a significant difference as compared to unstimulated U-937; ## (p<0.01) indicates a significant difference as compared to the U-937 cells treated with PMA/LPS. (B) Pie chart gives the relative ratio of the [<sup>3</sup>H]-labeled main COX metabolites: TxB<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> and 6cetoPG1α.



**Fig. 4.** Amount of TxB<sub>2</sub> produced in U-937 cell culture supernatants after stimulation with PMA/LPS in presence or absence of sensitizers. (A) Simultaneously with their 24 h stimulation (PMA/LPS), U-937 cells were exposed to sensitizers (CIN; EUG; DNCB; PPD; HQ; PG; NISO<sub>4</sub>). Culture supernatants were analyzed for PGE<sub>2</sub> and TxB<sub>2</sub> by EIA. Data are expressed as relative quantity (%) of TxB<sub>2</sub> (gray bars) and PGE<sub>2</sub> (black bars) in the treated samples compared to vehicle control (PMA/LPS U-937 treated with RPMI or DMSO 0.4%). Results represent the mean ± SEM of at least 3 independent experiments (n=3-7). The effect of treatments with sensitizers was considered significant (\*\*p<0.01), when the confidence interval of the data did not include the reference value 100. (B) U-937 cells were treated with 60 ng/ml PMA and 10 μg/ml LPS for 24 h. Culture supernatants were analyzed by EIA. Data represent TxB<sub>2</sub> in pg/ml as mean ± SEM of 3-7 independent experiments.

24 h of PMA/LPS treatment, the quantity of labeled [<sup>3</sup>H]AA in the membrane phospholipids decreases significantly (Fig. 5A-upper panel), while in parallel the total [<sup>3</sup>H]AA quantity in the model (culture medium + cells) remains stable (Fig. 5A-lower panel). Among the different types of PLA<sub>2</sub> found in macrophages, we focused on two important cytosolic types: cPLA<sub>2</sub> (calcium dependent PLA<sub>2</sub>) and iPLA<sub>2</sub> (calcium independent PLA<sub>2</sub>). To understand which one is involved in the observed AA mobilization, we used two inhibitors: MAFP (iPLA<sub>2</sub> and cPLA<sub>2</sub> inhibitor) and BEL, a specific iPLA<sub>2</sub> inhibitor. As shown in Fig. 5A, while BEL has no effect, MAFP almost totally abolished the PMA/LPS effect on [<sup>3</sup>H]AA mobilization from membrane phospholipids. These results indicate that cPLA<sub>2</sub> is the phospholipase involved in the AA mobilization triggered by PMA/LPS in U-937 cells. In contrast, sensitizers do not modify the [<sup>3</sup>H]AA quantity in membrane phospholipids compared to the PMA/LPS condition (Fig. 5B), indicating that sensitizers do not inhibit phospholipid hydrolysis.

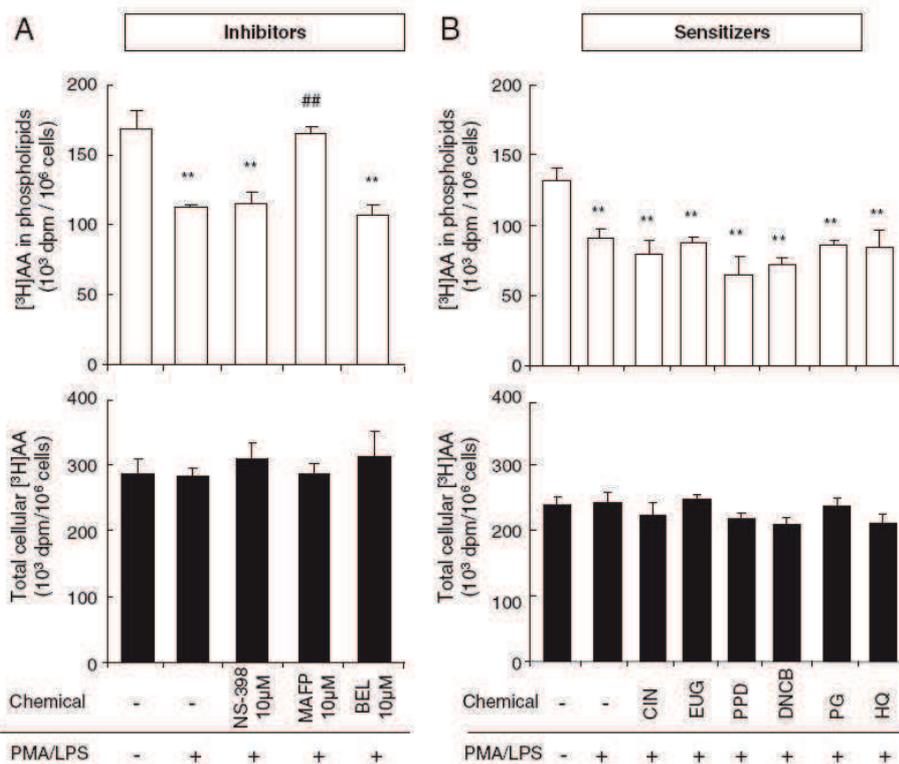
Since sensitizers do not affect AA mobilization but do inhibit prostanoid production by PMA/LPS-stimulated U-937, we hypothesized that their interference is very likely to take place at the COX level (expression and/or activity).

**Only cinnamaldehyde and eugenol inhibit PMA/LPS-induced COX-2 expression**

It is well known that COX exists in two major isoforms (Smith et al., 2000): COX-1, which is constitutively expressed and thus responsible for basal prostaglandin synthesis, and COX-2, which is inducible under inflammatory conditions. Among the different transcription factors regulating COX-2 expression, NF-κB is known to play a critical role in LPS-stimulated pro-inflammatory response.

We first analyzed *ptgs* (*cox*) gene expression, measuring *ptgs-1* and *ptgs-2* mRNA by RT-PCR. As expected, whereas *ptgs-1* expression remains unchanged at basal level (data not shown), *ptgs-2* expression is massively induced by PMA/LPS in U-937 cells (Fig. 6A). Moreover, the inhibitory effect of the specific COX-2 inhibitor NS-398 (Fig. 3A) strengthened the predominant role of COX-2 in prostanoids synthesis induced by PMA/LPS in the U-937 cells.





**Fig. 5.** AA mobilization from U-937 membrane phospholipids. AA mobilization in U-937 cells was evaluated on [<sup>3</sup>H]AA labeled cells. Pre-labeled cells were cultured for 24 h with PMA/LPS with or without pharmacological inhibitors [NS398 (a COX-2 inhibitor), or MAFP (a cPLA2 and iPLA2 inhibitor) or BEL (a iPLA2 inhibitor)] (A) or contact sensitizers (CIN; 50 μM; EUG; 1000 μM; PPD; 100 μM; DNCB; 5 μM; PG; 200 μM; HQ; 10 μM) (B). The study of the [<sup>3</sup>H]AA mobilization was processed as described in Material and methods. (Upper panels) Histograms represent the mean of [<sup>3</sup>H]AA in membrane phospholipids (expressed in dpm/10<sup>6</sup> cells) ± SEM of the three independent experiments. \*\* (p < 0.01) indicates a significant difference as compared to unstimulated U-937; ## (p < 0.01) indicates a significant difference as compared to the U-937 cells treated with PMA/LPS. (Lower panels) Histograms represent the mean of the total of [<sup>3</sup>H]AA incorporated in U-937 cells and mobilized in culture medium after 24 h of treatments (expressed in dpm/10<sup>6</sup> cells) ± standard error (SEM) of three independent experiments.

Induction of COX-2 expression starts very early, since *ptgs-2* mRNA is detected from 2 h after stimulation (fold induction × 24) and continues to increase over time (until 48 h), reaching remarkably high fold changes (×3000 at 48 h). We then confirmed these observations at protein level by COX-1/COX-2 intracellular double staining, followed by FACS analysis. As shown in Fig. 6B–C, the percentage of COX-2<sup>+</sup> cells increases over time after PMA/LPS stimulation, with an optimum after 24 h of stimulation. COX-2 expression is indeed under the control of the transcription factor NF-κB, since both COX-2 mRNA and protein are almost completely inhibited by the NF-κB inhibitor, BAY11-7085 (Fig. 6D). As expected, all cells are COX-1 positive with a constant expression level over time. We thus analyzed the effect of sensitizers on COX-2 expression (mRNA and protein) at 24 h. As shown in Fig. 6D, only CIN and EUG, at the highest concentration, clearly inhibit COX-2 expression at both mRNA and protein level, however not as strongly as the NF-κB inhibitor BAY11-7085. In contrast, none of the other 4 sensitizers significantly modify COX-2 expression. Concerning HQ, only a slight inhibition is observed at the protein level, but, even if this inhibition is statistically significant, its biological relevance remains unclear.

Altogether these results on COX-2 expression suggest that the sensitizers' inhibition of COX-2, if any, should concern the activities of this enzyme.

#### Propyl gallate, hydroquinone and eugenol inhibit COX-2 enzymatic activity

The sensitizers' inhibition of COX-2 activity was assessed in a biochemical test, using an ovine recombinant COX-2 enzyme. In this assay we analyzed the enzymatic peroxidase activity of COX-2 by measuring the emergence of a colored compound resulting from the

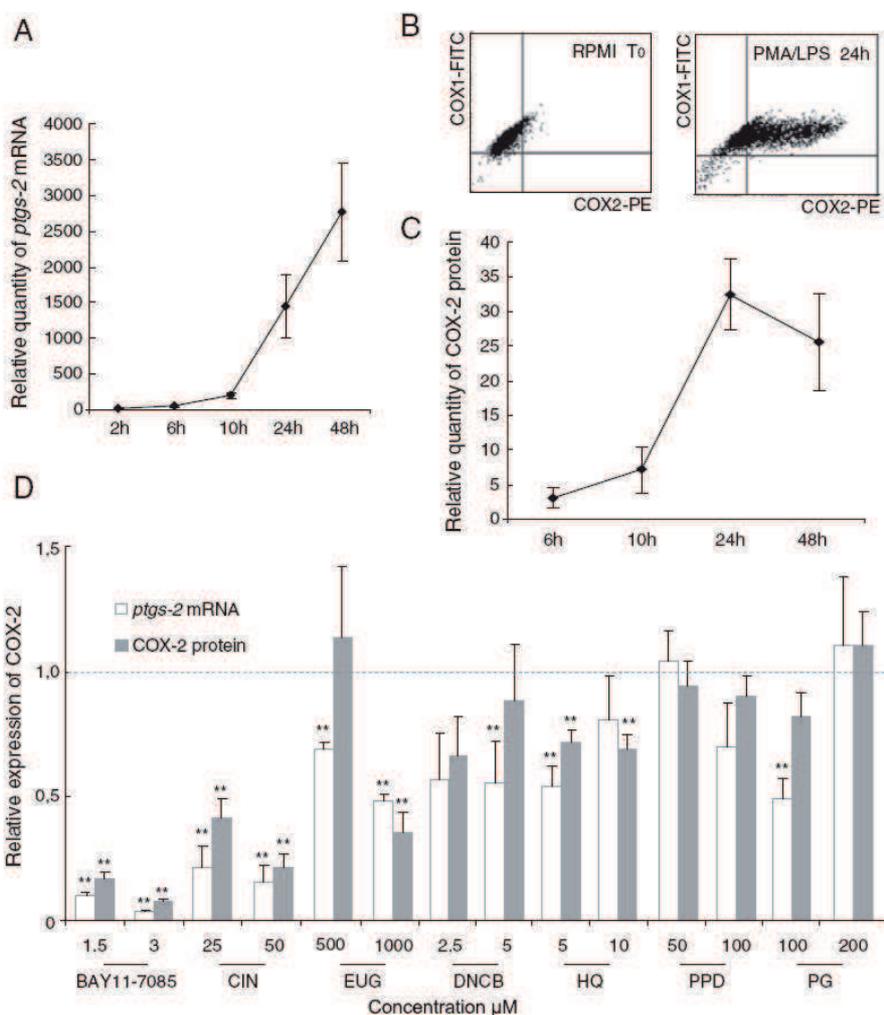
oxidation by the enzyme of a co-substrate, TMPD. Therefore, in this assay, a reduction in color was indicative of an inhibition of enzymatic activity. DuP-697 is used as a reference COX-2 inhibitor.

As shown in Fig. 7, among the tested sensitizers, PG, HQ and EUG inhibit enzymatic activity, with a respective IC(50) of 27.9, 95.2 and 628 μM. Those inhibitory capacities are however low compared to DuP-697, a reference COX-2 inhibitor, which has an IC(50) of 57.5 nM. DNCB and CIN show no capacity to inhibit COX-2 activity in these test conditions. For PPD, the assay was inconclusive since PPD alone has the capacity to oxidize TMPD.

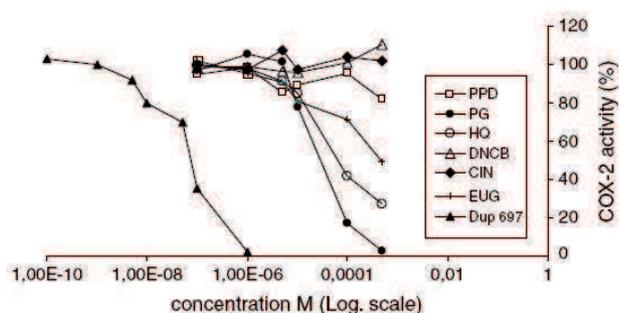
#### Discussion

It is commonly accepted that chemical sensitizers, as electrophilic molecules, can react with nucleophilic residues leading to protein-haptenation and immunogenicity of the protein-hapten complex. These electrophilic properties have also been described to constitute a danger signal, which causes oxidative stress and redox imbalance in DC, inducing their maturation through redox-sensitive pathways such as those leading to p38 MAPK and NF-κB activation (Ade et al., 2007; Mizuashi et al., 2005; Trompezinski et al., 2008). More recently, it has been shown that sensitizers' electrophilic properties allow them to activate the signaling pathway involving the repressor protein Keap 1 and the transcription factor Nrf2 which binds to the antioxidant electrophile response element (ARE) in the promoter of many phase II detoxification genes (Ade et al., 2009; Natsch and Emter, 2008). Moreover, it has been demonstrated that well known Nrf2 inducers such as sulforaphane, also have the capacity to inhibit macrophage-mediated release of pro-inflammatory cytokines and enzymes (TNF-α, IL-1β, COX-2, iNOS). This inhibition was not observed in





**Fig. 6.** Expression of COX-2 in U-937 stimulated by PMA/LPS in the absence (A–C) or presence (D) of contact sensitizers. (A) U-937 cells were treated with 60 ng/ml PMA and 10  $\mu$ g/ml LPS. Relative expression of *ptgs-2* gene was studied by mRNA relative quantification, measured by real-time PCR after 2, 6, 10, 24 and 48 h of PMA/LPS stimulation. Results are expressed as fold change compared to untreated U-937 and corrected by the expression of the house-keeping gene *rpl13* as described in Material and methods. Results represent the mean  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments. (B) COX-1 and COX-2 protein expression in U-937 (RPMI T0) and U-937 treated with 60 ng/ml PMA and 10  $\mu$ g/ml LPS for 24 h. Cells were intracellularly stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-COX-1 (Cox-1-Fitc) and phycoerythrin-conjugated anti-COX-2 (Cox-2-PE). Analysis was performed by flow cytometer and CellQuest™ Pro software. Dot plot shows one representative experiment of 4–6 independent experiments. (C) Expression of COX-2 protein in U-937 cells treated with 60 ng/ml PMA and 10  $\mu$ g/ml LPS for 6, 10, 24 and 48 h. Results in the graph are expressed as relative quantity (IR) as described in Material and methods. (D) Simultaneously with their 24 h stimulation (PMA/LPS), U-937 cells were exposed 24 h to sensitizers (CIN; EUG; DNCB; PPD; HQ; PG; NiSO<sub>4</sub>). Data (white bars: COX-2 mRNA; gray bars: COX-2 protein) are expressed as relative quantities in treated samples compared to the vehicle control (U-937 cells stimulated with PMA/LPS treated with RPMI or DMSO 0.4%). Results represent the mean  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments. (n = 3–8). The effect of treatments with sensitizers was considered significant (\*\*p < 0.01), when the confidence interval of the data did not include the reference value 100.



**Fig. 7.** Sensitizers inhibition of COX-2 enzymatic activity. Sensitizers and Dup-697 (a COX-2 inhibitor) were incubated with a recombinant COX-2 enzyme, from ovine placenta (as described in Material and methods). COX-2 activity was calculated from the fluorescence of the oxidized COX-2 co-substrate TMPD. Data are expressed as relative activity in the treated samples compared to the vehicle control (DMSO 0.4%).

Nrf2<sup>-/-</sup> macrophages, suggesting that the induction of Nrf2 participates to the inhibition of pro-inflammatory mediators (Heiss et al., 2001; Lin et al., 2008).

In the present study, among six sensitizers, all known to be Nrf2 activators, we identified two different profiles of *in vitro* inflammatory modulation. Interestingly, all sensitizers (DNCB, PPD, PG, HQ, CIN and EUG) strongly inhibited the production of COX metabolites such as PGE<sub>2</sub> and TxB<sub>2</sub> induced by PMA/LPS in U-937 cells, while the production of other inflammatory mediators such as IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$  was inhibited only by CIN and EUG. It is noteworthy that none of these effects were observed with the 3 tested non sensitizers (LA, Gly, T20). To better understand how sensitizers specifically modulate this inflammatory response induced by PMA/LPS, we focused on the impact of such molecules on the AA metabolism cascade.

Prostaglandins are known to be secreted via active transportation mediated by the multidrug resistance proteins (MRP), member of the ATP-binding cassette transporter (ABCC) family (Reid et al., 2003).



Our data on total PGE<sub>2</sub> synthesis showed however that a modulation of PGE<sub>2</sub> secretion is insufficient to explain the extracellular inhibition of PGE<sub>2</sub>.

In the synthesis of prostanoids, the rate limiting step is the availability of AA, the substrate of COX enzymes. Sensitizers do not affect this step, as shown by the experiments on AA mobilization in [<sup>3</sup>H]AA prelabeled U-937 cells. In the PMA/LPS-stimulated U-937 model, where COX-2 is the major enzyme producing prostanoids, we found moreover that several sensitizers affect this enzyme at different levels of inhibition: for instance, using an enzymatic acellular assay, the phenolic compounds (EUG, PG, HQ) were found to inhibit COX-2 activity. Indeed, phenols as well as aromatic amines and antioxidants, at high concentrations, are known to inhibit COX activity due to their ability to quench radical intermediates (Hsuanyu and Dunford, 1992; Kulmacz and Lands, 1983). Moreover, Thompson and Eling (1989) showed that EUG also competed with the AA substrate for the active site of the enzyme. The acellular COX-2 enzymatic assay we used made it possible to determine the following IC(50) for PG, HQ and EUG at 27.9, 95.2 and 628 μM respectively. Recently, Huss and co-authors (2002) have determined an IC(50) value for EUG at 129 μM and detected an inhibitory activity for CIN [IC(50) = 245 μM]. In our enzymatic system, CIN was not detected as a COX-2 inhibitor (tested to 5 mM), which underlines a sensitivity difference between the detection techniques. Despite all, it is noteworthy that the IC(50) values, determined in the acellular enzymatic assay, are for some molecules significantly higher than the ones found for the PGE<sub>2</sub> inhibition in the U-937 cellular system: 10 μM (HQ), 5 μM (EUG). While it remains to be confirmed that in our PMA/LPS-induced U937 model these sensitizers inhibit PGE-2 synthesis through inhibition of COX-2 enzymatic activity, the discrepancy between the IC(50) of COX-2 and IC(50) of PGE-2 suggests that sensitizers could affect other parameters than COX-2 activity. Interestingly, only CIN and EUG, at the highest tested doses, were found to significantly inhibit COX-2 expression at both mRNA and protein levels. These results on EUG are consistent with the literature on similar in vitro models (Lee et al., 2007; Li et al., 2006). In contrast, in other models (CD34-derived-DC, HaCat keratinocyte cell line), sensitizers were shown to induce COX-2 expression instead of inhibiting it (Lambrechts et al., 2010; Moller et al., 2008). These opposite results may be explained by the different inflammatory statuses of the models used.

The link between Nrf2 activation and COX-2 mRNA inhibition described by Lin et al. (2008) is not relevant in our study since the induction of Nrf2 by the PMA/LPS cocktail (data not shown) does not prevent NF-κB-dependent COX-2 expression. Moreover, although all tested sensitizers are known to be Nrf2 inducers, only CIN and EUG were found to inhibit COX-2 expression.

Concerning PPD and DNCB, we were unable to identify any mechanisms of inhibition upstream PGH<sub>2</sub>, since they affect neither AA mobilization by PLA<sub>2</sub>, nor the expression of COX-2. Moreover, in the enzymatic assay, no inhibition of COX-2 activity could be observed, even though for PPD this property could not be excluded due to its interference with the readout system. Furthermore, PPD and DNCB do not deviate AA oxidation through COX-alternative pathways (LOX...) since we did not measure any difference in AA metabolites other than in COX metabolites (data not shown). We also observed that in the PMA/LPS U-937 model, the 5-lipoxygenase (5-LOX) pathway leading to leukotrienes B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> and E<sub>4</sub> is not present (data not shown), as reported in the literature (Kargman et al., 1993).

Beyond the mechanisms operating upstream or in parallel to the PGH<sub>2</sub> level in the AA metabolic cascade, sensitizer inhibition might also occur downstream, at the level of the different synthases/isomerases responsible for the formation of each prostanoid (PGEs, TxAs...). Since some of these synthases (microsomal PGES-1, PGD synthase) require glutathione as an essential cofactor for their activity (Jowsey et al., 2001; Thoren et al., 2003), it is likely that sensitizers and in particular DNCB, which are known to deplete GSH (Mizuashi et

al., 2005), inhibit the activity of the isomerases. Moreover, mPGES-1, which possesses cysteine residues important for its activity in its active site (Thoren et al., 2003), may be inhibited by sensitizers known to react with thiols (Gerberick et al., 2004). Nevertheless, the possible inhibitory effect of sensitizers on prostanoid isomerase activity remains to be confirmed.

Despite the diversity of mechanisms by which sensitizers affect AA metabolism, this study demonstrates that all have the capacity to inhibit the formation of COX metabolites, and in particular PGE<sub>2</sub> produced by PMA/LPS U-937. While these results add new insight into the multiple biochemical effects described so far for sensitizers, the underlying biological relevance remains unclear.

The environment, in which DC take up antigens and undergo maturation, shapes the outcome of the induced adaptive immune response. In that context, it is now clearly established that eicosanoids and precisely PGE<sub>2</sub> exert a great impact on DC maturation. In fact, PGE<sub>2</sub> contributes to the cytokine expression profile of DCs that skews the T cell differentiation towards a T helper 2 (Th2) (IL-4, IL-5) by modulating the IL-10/IL-12 balance (Kapsenberg et al., 1996). Consequently, PGE<sub>2</sub> inhibition by sensitizers would indeed favor a Th1/cytotoxic T cell reaction, which is perfectly concordant with the effector T cells involved in ACD (Vocanson et al., 2009). More recently, prostaglandins synthesized by COX-2 have also been associated with cellular immune tolerance. In fact, PGE<sub>2</sub> has been shown to induce Foxp3+ regulatory T cells (Treg) and to increase their suppressive regulatory capability (Baratelli et al., 2005). Since it has been shown that Treg cells can inhibit contact hypersensitivity (Cavani, 2008), the inhibition of COX-2 metabolites by sensitizers seems here to favor an allergic immune reaction.

Among the tested molecules, two sensitizers, EUG and CIN, depicted a larger inhibition profile since they not only inhibit COX-2 metabolites by inhibiting the expression of the enzyme, but also decrease the production of IL-1β and TNF-α by U-937 induced by PMA/LPS. On the basis of these results, it would thus appear likely that

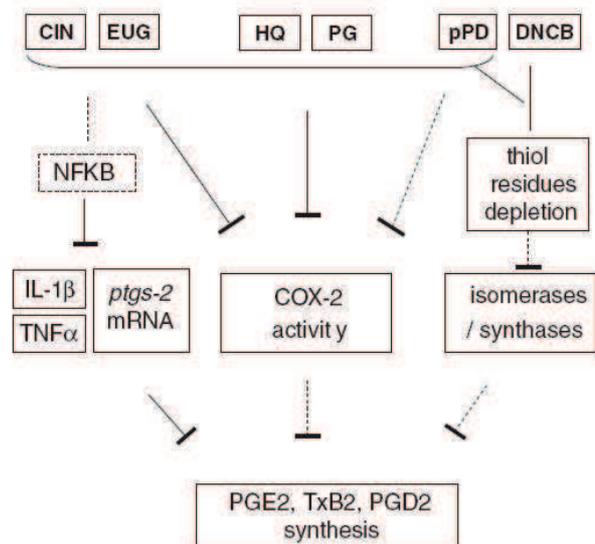


Fig. 8. Diagram representation of the mechanisms of action of tested sensitizers (DNCB, PPD, HQ, PG, EUG and CIN) leading to the inhibition of PGE<sub>2</sub> in U-937 treated with PMA/LPS. Dotted lines are supposed/hypothetical mechanisms and plain lines are demonstrated mechanisms. Three main pathways of inhibition are drawn: CIN and EUG inhibit the transcription of COX-2 (as well as the production of TNF-α and IL-1β), through the supposed inhibition of NF-κB activation; EUG, HQ, PG (not excluded for PPD) inhibit the enzymatic activity of COX-2 (demonstrated in an acellular enzymatic model – to be confirmed in the U-937); DNCB, PPD and possibly all sensitizers inhibit the activity of all isomerases through their capacity to deplete GSH and to interact with free thiol groups (f.i. cysteine).



they inhibit the transcription factor NF- $\kappa$ B. Interestingly, the molecules which present the broadest anti-inflammatory properties are those which have the lowest sensitizer potential. These results bring to mind those of Lass and colleagues (2008), who found Arnica tincture and sesquiterpene lactone to be weak contact sensitizers due to their low potency at inducing inflammation in contrast to their potent anti-inflammatory effects at preventing the activation of NF- $\kappa$ B.

In conclusion, the present study strongly suggests that sensitizers specifically modulate the PMA/LPS induced inflammatory response. We demonstrate that despite the diversity of their mechanisms of action (Fig. 8), all tested sensitizers have the common property to inhibit the production of COX metabolites, and in particular PGE<sub>2</sub>, produced by PMA/LPS stimulated U-937. Future studies on an enlarged set of chemicals will clarify whether this characteristic is a general hallmark of sensitizers, how it is linked to sensitization potency and therefore how this parameter could be implemented into an alternative integrated strategy for the evaluation of skin sensitization.

### Conflict of interest

All authors state no competing interest.

### References

- Ade, N., Antonios, D., Kerdine-Romer, S., Boislevé, F., Rousset, F., Pallardy, M., 2007. NF- $\kappa$ B plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NISO(4) but not by DNCB. *Toxicol. Sci.* 99, 488–501.
- Ade, N., Leon, F., Pallardy, M., Peiffer, J.L., Kerdine-Romer, S., Tissier, M.H., Bonnet, P.A., Fabre, I., Ourlin, J.C., 2009. HMOX1 and NQO1 genes are upregulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: role of the Keap1/Nrf2 pathway. *Toxicol. Sci.* 107, 451–460.
- Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., Tagami, H., 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.* 27, 3031–3038.
- Baratelli, F., Lin, Y., Zhu, L., Yang, S.C., Heuze-Vourc'h, N., Zeng, G., Reckamp, K., Dohadwala, M., Sharma, S., Dubinett, S.M., 2005. Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *J. Immunol.* 175, 1483–1490.
- Basketter, D.A., Lea, L.J., Cooper, K., Stocks, J., Dickens, A., Pate, I., Dearman, R.J., Kimber, I., 1999. Threshold for classification as a skin sensitizer in the local lymph node assay: a statistical evaluation. *Food Chem. Toxicol.* 37, 1167–1174.
- Cavani, A., 2008. T regulatory cells in contact hypersensitivity. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 8, 294–298.
- Enk, A.H., Katz, S.L., 1992. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1398–1402.
- Garrelds, I.M., van Hal, P.T., Haakmat, R.C., Hoogsteden, H.C., Saxena, P.R., Zijlstra, F.J., 1999. Time dependent production of cytokines and eicosanoids by human monocytic leukaemia U937 cells; effects of glucocorticosteroids. *Mediators Inflamm.* 8, 229–235.
- Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Bailey, R.E., Chaney, J.G., Morrall, S.W., Lepoittevin, J.P., 2004. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol. Sci.* 81, 332–343.
- Grabbe, S., Schwarz, T., 1998. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol. Today* 19, 37–44.
- Harizi, H., Gualde, N., 2005. The impact of eicosanoids on the crosstalk between innate and adaptive immunity: the key roles of dendritic cells. *Tissue Antigens* 65, 507–514.
- Heiss, E., Herhaus, C., Klimo, K., Bartsch, H., Gerhauser, C., 2001. Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* 276, 32008–32015.
- Hsuanyu, Y.C., Dunford, H.B., 1992. Reduction of prostaglandin H synthase compound II by phenol and hydroquinone, and the effect of indomethacin. *Arch. Biochem. Biophys.* 292, 213–220.
- Huss, U., Ringbom, T., Perera, P., Bohlén, L., Vasange, M., 2002. Screening of ubiquitous plant constituents for COX-2 inhibition with a scintillation proximity based assay. *J. Nat. Prod.* 65, 1517–1521.
- Jowsey, I.R., Thomson, A.M., Flanagan, J.U., Murdock, P.R., Moore, G.B., Meyer, D.J., Murphy, G.J., Smith, S.A., Hayes, J.D., 2001. Mammalian class Sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D2 synthases. *Biochem. J.* 359, 507–516.
- Kapsenberg, M.L., Hilken, C.M., van der Pouw Kraan, T.C., Wierenga, E.A., Snijders, A., 1996. The role of accessory cell products in the regulation of T cell cytokine production. *Adv. Exp. Med. Biol.* 409, 305–308.
- Kargman, S., Rousseau, P., Reid, G.K., Rouzer, C.A., Mancini, J.A., Rands, E., Dixon, R.A., Diehl, R.E., Leveille, C., Nathaniel, D., 1993. Leukotriene synthesis in U937 cells expressing recombinant 5-lipoxygenase. *J. Lipid Mediat.* 7, 31–45.
- Krasteva, M., Kehren, J., Ducluzeau, M.T., Sayag, M., Cacclapuoti, M., Akiba, H., Descotes, J., Nicolas, J.F., 1999. Contact dermatitis I. Pathophysiology of contact sensitivity. *Eur. J. Dermatol.* 9, 65–77.
- Kulmacz, R.J., Lands, W.E., 1983. Requirements for hydroperoxide by the cyclooxygenase and peroxidase activities of prostaglandin H synthase. *Prostaglandins* 25, 531–540.
- Lambrechts, N., Vanheel, H., Hooyberghs, J., De, B.P., Witters, H., Van Den, H.R., Van, T.V., Nelissen, I., Schoeters, G., 2010. Gene markers in dendritic cells unravel pieces of the skin sensitization puzzle. *Toxicol. Lett.* 196, 95–103.
- Lanigan, R.S., Yamarik, T.A., 2002. Final report on the safety assessment of sorbitan caprylate, sorbitan cocoate, sorbitan diisostearate, sorbitan dioleate, sorbitan distearate, sorbitan isostearate, sorbitan olivate, sorbitan sesquiossearate, sorbitan sesquisteate, and sorbitan triisostearate. *Int. J. Toxicol.* 21 (Suppl. 1), 93–112.
- Lass, C., Vocanson, M., Wagner, S., Schempp, C.M., Nicolas, J.F., Merfort, I., Martin, S.F., 2008. Anti-inflammatory and immune-regulatory mechanisms prevent contact hypersensitivity to *Arnica montana* L. *Exp. Dermatol.* 17, 849–857.
- Lee, Y.Y., Yang, S.F., Ho, W.H., Lee, Y.H., Hung, S.L., 2007. Eugenol modulates cyclooxygenase-2 expression through the activation of nuclear factor kappa B in human osteoblasts. *J. Endod.* 33, 1177–1182.
- Li, W., Tsubouchi, R., Qiao, S., Haneda, M., Murakami, K., Yoshino, M., 2006. Inhibitory action of eugenol compounds on the production of nitric oxide in RAW264.7 macrophages. *Biomed. Res.* 27, 69–74.
- Lin, C.C., Wu, S.J., Chang, C.H., Ng, L.T., 2003. Antioxidant activity of *Cinnamomum cassia*. *Phytother. Res.* 17, 726–730.
- Lin, W., Wu, R.T., Wu, T., Khor, T.O., Wang, H., Kong, A.N., 2008. Sulforaphane suppressed LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages through Nrf2 dependent pathway. *Biochem. Pharmacol.* 76, 967–973.
- Liu, H., Dinkova-Kostova, A.T., Talalay, P., 2008. Coordinate regulation of enzyme markers for inflammation and for protection against oxidants and electrophiles. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15926–15931.
- Magnusson, B., Kligman, A.M., 1969. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol.* 52, 268–276.
- McLelland, J., Shuster, S., Matthews, J.N., 1991. Irritants increase the response to an allergen in allergic contact dermatitis. *Arch. Dermatol.* 127, 1016–1019.
- Mizushima, M., Ohtani, T., Nakagawa, S., Aiba, S., 2005. Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 124, 579–586.
- Moller, I., Michel, K., Frech, N., Burger, M., Pfeifer, D., Frommolt, P., Veelken, H., Thomas-Kassel, A.K., 2008. Dendritic cell maturation with poly(I:C)-based versus PGE2-based cytokine combinations results in differential functional characteristics relevant to clinical application. *J. Immunother.* 31, 506–519.
- Natsch, A., Enter, R., 2008. Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the in vitro testing of the sensitization potential of chemicals. *Toxicol. Sci.* 102, 110–119.
- Pollaud, C., Krause, S., Lepert, J.C., Orfila, C., Seguelas, M., Festal, D., Decerprit, J., Pipy, B., 1995. Acetylated low density lipoprotein inhibits the incorporation of arachidonic acid in phospholipids with a concomitant increase of cholesterol arachidonate in rat peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1259, 211–219.
- Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., van, d.H.L., Kuil, A., de Haas, M., Wijnholds, J., Borst, P., 2003. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 9244–9249.
- Smith, W.L., Marnett, L.J., DeWitt, D.L., 1991. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol. Ther.* 49, 153–179.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., Garavito, R.M., 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 145–182.
- Smith, H.R., Basketter, D.A., McFadden, J.P., 2002. Irritant dermatitis, irritancy and its role in allergic contact dermatitis. *Clin. Exp. Dermatol.* 27, 138–146.
- Thompson, D., Eling, T., 1989. Mechanism of inhibition of prostaglandin H synthase by eugenol and other phenolic peroxidase substrates. *Mol. Pharmacol.* 36, 809–817.
- Thoren, S., Weinander, R., Saha, S., Jegerschild, C., Pettersson, P.L., Samuelsson, B., Hebert, H., Hamberg, M., Morgenstern, R., Jakobsson, P.J., 2003. Human microsomal prostaglandin E synthase-1: purification, functional characterization, and projection structure determination. *J. Biol. Chem.* 278, 22199–22209.
- Toebak, M.J., Moed, H., von Blomberg, M.B., Bruynzeel, D.P., Gibbs, S., Scheper, R.J., Rustemeyer, T., 2006. Intrinsic characteristics of contact and respiratory allergens influence production of polarizing cytokines by dendritic cells. *Contact Dermatitis* 55, 238–245.
- Trompezinski, S., Migdal, C., Tailhardat, M., Le, V.B., Courtellemont, P., Haftek, M., Serres, M., 2008. Characterization of early events involved in human dendritic cell maturation induced by sensitizers: cross talk between MAPK signalling pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 230, 397–406.
- Vocanson, M., Henni no, A., Rozieres, A., Poyet, G., Nicolas, J.F., 2009. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy* 64, 1699–1714.

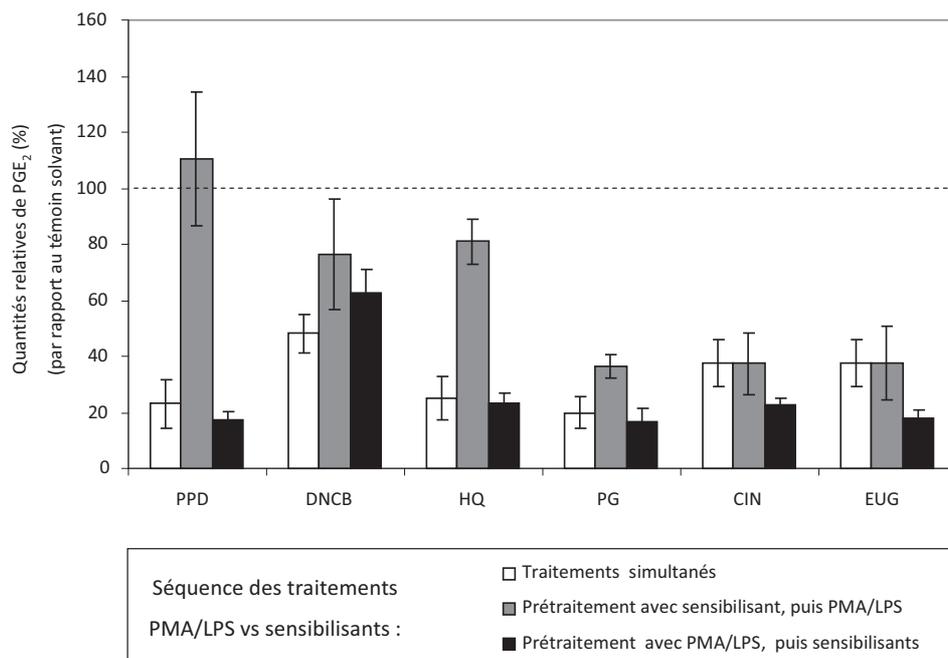


Figure 29 : Effet de la séquence des traitements sur l'inhibition de la production de PGE<sub>2</sub> par les sensibilisants.

Les cellules U937 ont été prétraitées pendant 8h (avec PMA/LPS ou avec les sensibilisants ou avec PMA/LPS et les sensibilisants) avant d'être stimulées pendant 16h (avec respectivement des sensibilisants ou PMA/LPS). Les quantités de PGE<sub>2</sub> ont été dosées dans le surnageant par EIA. Les histogrammes représentent les quantités relatives moyennes de PGE<sub>2</sub> (% par rapport au témoin véhicule) ± SEM de n=3-5 expériences indépendantes. La ligne en pointillés représente le témoin solvant.

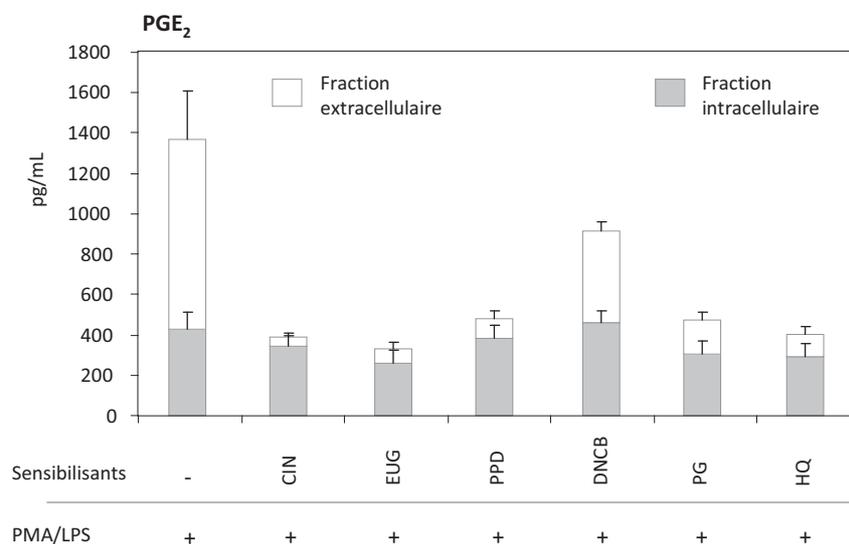


Figure 30 : Effet des sensibilisants sur la répartition de la quantité de PGE<sub>2</sub> dans les fractions intra et extracellulaires des cellules U937 traitées avec PMA/LPS.

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h avec PMA (60 ng/mL) et LPS (10 µg/mL) en présence ou absence d'un sensibilisant (CIN: 50 µM; EUG: 1000 µM; PPD: 100 µM; DNCB: 5 µM; PG: 200 µM; HQ: 10 µM). Les histogrammes présentent les quantités moyennes de PGE<sub>2</sub> intra et extracellulaires ± SEM calculées sur 3 expériences indépendantes.

## A) Résultats supplémentaires de l'article

### **1) Influence de la cinétique de traitement sur l'effet des sensibilisants**

Les effets démontrés des sensibilisants sur le système cellulaire U937 PMA/LPS ont été obtenus dans des conditions où l'ensemble des traitements (activateurs PMA/LPS et sensibilisants) sont administrés de façon simultanée. Nous avons également décomposé les traitements afin d'évaluer si les sensibilisants ont la capacité d'arrêter la production de PGE<sub>2</sub> induite par PMA/LPS (sensibilisants administrés après PMA/LPS) et/ou d'empêcher l'action du PMA/LPS sur la mise en place de la voie métabolique COX-2 (sensibilisants administrés avant PMA/LPS). La figure 29 présente les effets de ces traitements séquentiels sur la production de PGE<sub>2</sub> : tandis que le PG, le CIN et l'EUG inhibent la production de PGE<sub>2</sub> induite par PMA/LPS quel que soit l'ordre des traitements, la PPD, le DNCB et l'HQ inhibent la production de PGE<sub>2</sub> lorsque le sensibilisant est appliqué simultanément ou après PMA/LPS tandis qu'un effet nettement inférieur voire inexistant (PPD) est observé lorsque le sensibilisant est administré avant PMA/LPS. Ainsi l'ensemble des sensibilisants étudiés inhibent la production de PGE<sub>2</sub> en cours d'induction par PMA/LPS mais tous ne sont pas capables d'empêcher la réponse des cellules U937 au PMA/LPS.

### **2) Les sensibilisants n'engendrent pas de rétention intracellulaire des prostanoides**

Les résultats présentés dans la figure 2 de l'article montrent que la quantité totale de PGE<sub>2</sub> produite par les cellules U937 stimulées par PMA/LPS est diminuée de façon significative par les sensibilisants. Afin d'exclure que la diminution observée est due à une rétention extracellulaire de la prostaglandine, nous avons détaillé à la répartition des prostaglandines présentes dans les fractions intra et extracellulaires (fig. 30). Ces résultats montrent que la quantité intracellulaire de PGE<sub>2</sub> est relativement constante, autour de 350 pg/mL, et ce quelle que soit la condition, y compris pour les U937 non traitées (non montré). Il apparaît donc qu'une quantité basale de PGE<sub>2</sub> constante soit maintenue en intracellulaire et que lorsque la production de PGE<sub>2</sub> augmente, cette quantité est sécrétée à l'extérieur de la cellule. De ce fait, on peut conclure que dans les cellules U937 traitées avec PMA/LPS, les sensibilisants inhibent bien la synthèse de PGE<sub>2</sub> et n'induisent pas de rétention intracellulaire.

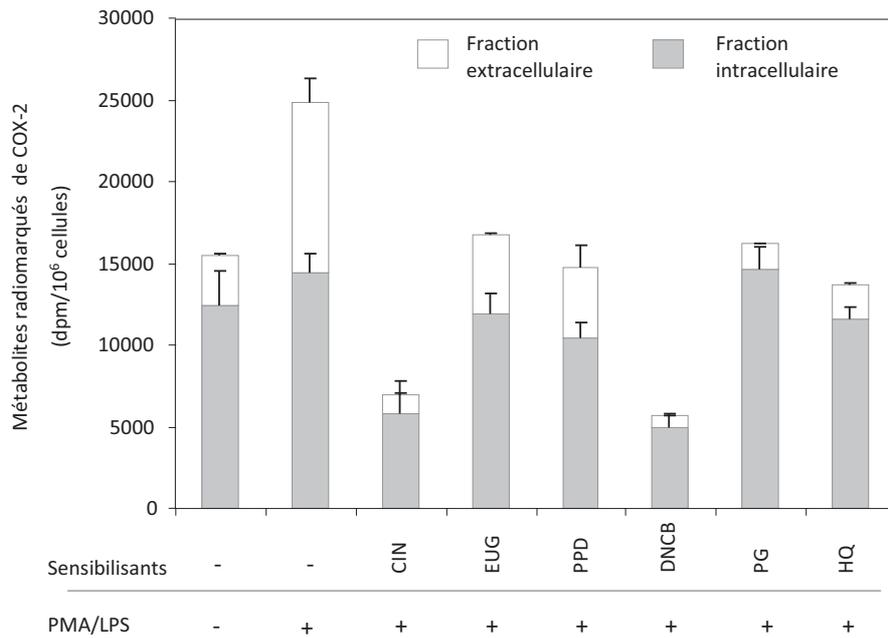


Figure 31 : Effet des sensibilisants sur la répartition des métabolites de COX-2 dans les fractions intra et extracellulaires des cellules U937 traitées avec PMA/LPS.

Les cellules U937, préalablement marquées avec de l' [<sup>3</sup>H]AA, ont été traitées pendant 24h avec PMA (60 ng/mL) et LPS (10 µg/mL) en présence ou absence d'un sensibilisant (CIN: 50 µM; EUG: 1000 µM; PPD: 100 µM; DNCB: 5 µM; PG: 200 µM; HQ: 10 µM). Les histogrammes représentent la moyenne exprimée en dpm/10<sup>6</sup> cellules ± erreur standard de la moyenne (SEM) de la radioactivité mesurée dans les fractions intra et extracellulaires des métabolites de COX-2 pour trois expériences indépendantes.

Afin de s'assurer que ce constat est généralisable à l'ensemble des métabolites de COX-2 et en particulier à TxB<sub>2</sub>, métabolite majoritaire dans notre système, nous avons analysé la répartition intra/extracellulaire de l'ensemble des métabolites de COX-2 de cellules U937 marquées avec [<sup>3</sup>H]AA, traitées avec PMA/LPS en présence ou absence d'un sensibilisant. Les résultats de la figure 31 confirment que la quantité d' [<sup>3</sup>H]AA dans la fraction intracellulaire des métabolites de COX-2 des U937 n'est pas augmentée et au contraire dans le cas du CIN et du DNCB, la diminution de la synthèse est si importante que même le pool intracellulaire est affecté. Ainsi on peut conclure que l'inhibition observée de la quantité extracellulaire de PGE<sub>2</sub> n'est pas le fait d'une rétention intracellulaire des prostanoides.

En conclusion nous avons pu démontrer que les sensibilisants testés diminuent la synthèse de prostanoides des U937 induite par PMA/LPS de façon spécifique par rapport aux molécules non sensibilisantes et différents niveaux d'interaction au sein de la cascade enzymatique conduisant à la formation des prostanoides ont pu être mis en évidence. Tandis qu'aucun des sensibilisants testés ne semble moduler la mobilisation de l'AA par la cPLA<sub>2</sub>, nous avons montré que les sensibilisants agissent surtout sur l'expression de COX-2 (EUG et CIN) et/ou sur l'activité enzymatique (HQ, PG, EUG). Concernant deux sensibilisants (PPD et DNCB) nous n'avons pu mettre en évidence d'action directe sur le métabolisme de l'AA mais certains éléments laissent penser que l'action du DNCB sur la cascade métabolique serait due à sa capacité à dépléter le GSH. Dans la partie suivante, nous allons poursuivre la caractérisation des mécanismes d'action des sensibilisants sur le métabolisme de l'AA des U937 PMA/LPS en nous attachant tout particulièrement aux effets des sensibilisants sur les voies de réponse de la cellule au stress oxydant.

## **II. Etude des voies de signalisation induites par les sensibilisants dans le système U937 PMA/LPS**

### **A) Effets thiol-dépendants du DNCB et du CIN sur la diminution de la production de PGE<sub>2</sub>**

L'étude des effets des sensibilisants de contact sur le métabolisme de l'AA n'a pas permis de déterminer par quel mécanisme d'action le DNCB et la PPD inhibent la production de PGE<sub>2</sub>. Alors que pour la PPD la piste d'un effet inhibiteur de l'activité enzymatique de COX-2 ne peut être exclue, le DNCB a clairement montré une absence d'inhibition de COX-2 aussi bien au niveau de l'expression que de son activité enzymatique.

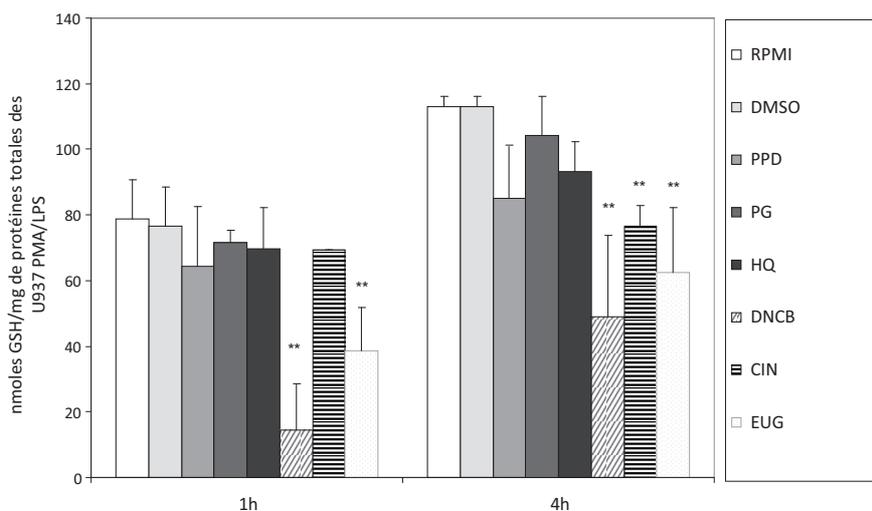


Figure 32 : Effet des sensibilisants sur la quantité de GSH intracellulaire des cellules U937 traitées avec PMA/LPS.

Les cellules U937 ont été traitées avec PMA (60 ng/mL) et LPS (10 µg/mL) en présence ou absence d'un sensibilisant (CIN: 50 µM; EUG: 1000 µM; PPD: 100 µM; DNCB: 5 µM; PG: 200 µM; HQ: 10 µM) pendant 1h et 4h. Les cellules ont été lysées et le GSH a été dosé par UHPLC, comme décrit dans la partie « Matériel et Méthodes ». Les histogrammes présentent pour chaque temps de cinétique les quantités moyennes ± écart type de GSH pour chaque condition, normalisées par rapport à la quantité de protéines extraites, de n=2-3 expériences indépendantes. \*\* indique un effet significatif (p<0,05) des sensibilisants par rapport au témoin solvant.

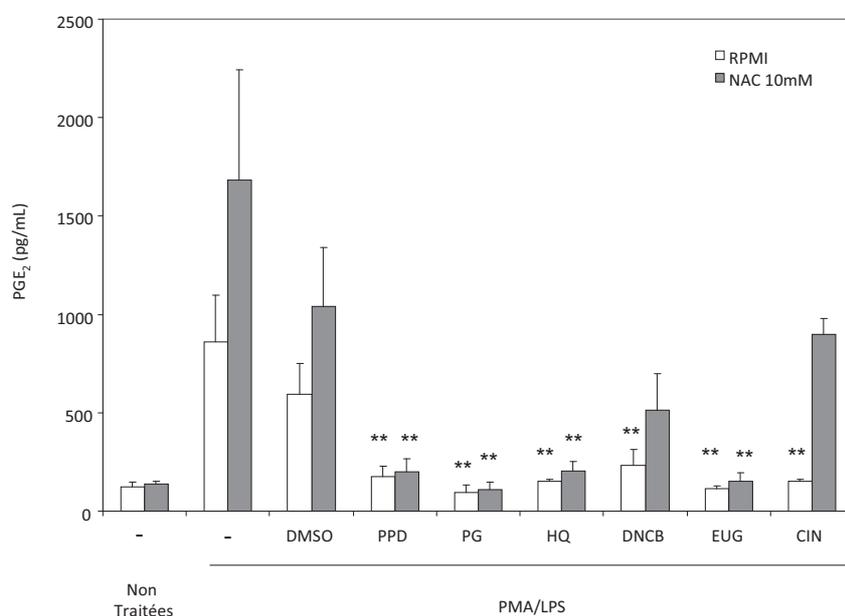


Figure 33 : Effet de la N-Acetyl-Cystéine (NAC) sur l'inhibition de la production de PGE<sub>2</sub> par les sensibilisants.

Les cellules U937, après avoir été prétraitées pendant 1h avec 10 mM de NAC, ont été stimulées pendant 24h avec PMA (60 ng/mL) et LPS (10 µg/mL) en présence ou absence d'un sensibilisant (CIN: 50 µM; EUG: 1000 µM; PPD: 100 µM; DNCB: 5 µM; PG: 200 µM; HQ: 10 µM). Les quantités de PGE<sub>2</sub> ont été dosées dans le surnageant par EIA. Les histogrammes représentent les concentrations moyennes ± SEM de n=3-5 expériences indépendantes. \*\* indique un effet significatif (p<0,05) des sensibilisants par rapport au témoin solvant.

Nous avons donc émis l'hypothèse que le DNCB pourrait agir au niveau des différentes synthèses en aval de COX-2 et en particulier au niveau de la mPGES-1, responsable de la formation de la PGE<sub>2</sub> à partir de la PGH<sub>2</sub>. Cette hypothèse est basée sur le fait que la mPGES-1 fonctionne avec le GSH comme co-facteur et que le DNCB, de par sa réactivité vis-à-vis des groupements thiols est bien connu pour dépléter le GSH intracellulaire (Mizuashi *et al.*, 2005; Hirota *et al.*, 2009; Megherbi *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2009; Kagatani *et al.*, 2010; Migdal *et al.*, 2010). En l'absence de tests enzymatiques disponibles pour cette enzyme nous avons voulu vérifier si dans le système U937 PMA/LPS, l'effet inhibiteur des sensibilisants sur le métabolisme de l'acide l'AA pourrait être lié à une déplétion du GSH par les sensibilisants. Nous avons ainsi dosé par spectrométrie de masse le GSH intracellulaire des cellules traitées avec PMA/LPS en présence ou absence de sensibilisants à 1h et 4h. La figure 32 indique pour l'ensemble des conditions testées les quantités intracellulaires de GSH rapportées à la quantité de protéines totales. La quantité basale de GSH pour des cellules U937 varie entre 80-100 nmoles/mg de protéines, soit 5-10 nmoles/10<sup>6</sup> cellules. Parmi les sensibilisants testés seuls le DNCB, l'EUG et le CIN diminuent significativement la quantité de GSH des cellules U937 PMA/LPS, avec les premiers effets observés dès 1h pour le DNCB et l'EUG. Dans aucune des conditions la présence de GSSG n'a pu être mise en évidence (non montré). D'autre part, afin d'évaluer si les effets des sensibilisants sur la diminution de la production de PGE<sub>2</sub> sont thiol-dépendants, nous avons pré-traité les cellules U937 pendant 1h avec un anti-oxydant donneur de thiol, la NAC (N-acétyl-cystéine), avant de les stimuler avec PMA/LPS pendant 24h en présence ou absence de sensibilisant (fig. 33). Bien que dans ces conditions, la quantité de PGE<sub>2</sub> produite par les cellules U937 PMA/LPS est plus importante qu'en absence de NAC, la pPD, le PG, l'HQ et l'EUG continuent d'inhiber complètement la synthèse de PGE<sub>2</sub>. En revanche, il apparaît que l'effet inhibiteur du DNCB et du CIN sur PGE<sub>2</sub> est diminué, ce qui suggère que les effets inhibiteurs de ces deux molécules sur la production de PGE<sub>2</sub> sont du moins en partie thiol-dépendants.

### B) Effet des sensibilisants sur l'activation du facteur de transcription NF-κB

L'étude des mécanismes d'action des sensibilisants de contact sur le métabolisme de l'acide arachidonique a permis de mettre en évidence que certains sensibilisants comme l'EUG et le CIN diminuent la production de prostanoïdes des U937 PMA/LPS via une inhibition de l'expression de COX-2 et diminuent également la production de TNF-α et IL-1β. Ces éléments suggèrent que l'EUG et le CIN pourraient inhiber le facteur de transcription NF-κB. Ainsi nous avons entrepris d'étudier l'activation de NF-κB en mesurant par Western Blot la dégradation de l'inhibiteur de NFκB, IκB-α, dans les cellules U937 traitées avec PMA/LPS.

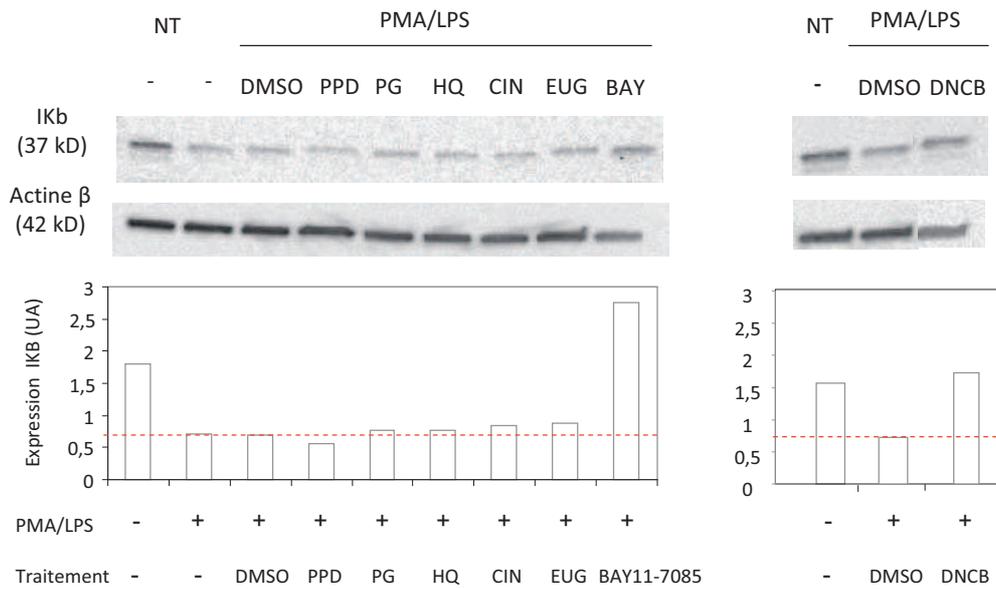


Figure 34 : Effet des sensibilisants sur la quantité de protéine IκB-α dans les cellules U937 traitées avec PMA/LPS ± sensibilisants.

Les cellules U937 ont été traitées pendant 1h avec PMA (60 ng/mL) et LPS (10 µg/mL) en présence ou absence d'un sensibilisant (CIN: 50 µM; EUG: 1000 µM; PPD: 100 µM; PG: 200 µM; HQ: 10 µM) ou en présence ou absence de l'inhibiteur BAY11-7085 à 2 µM. 40 mg de protéines totales ont été analysés par Westernblot pour la présence d'IκB-α en comparaison de l'actine β. Une quantification d'intensité de marquage (densimétrie) a été réalisée par le logiciel QuantityOne (Bio-Rad). Les histogrammes présentent pour chaque condition une quantification en unités arbitraires de l'expression de la protéine IκB normalisée par rapport à la quantité de la protéine actine β. La ligne rouge en pointillés représente le niveau de la condition U937 traitées avec PMA/LPS. Le gel montre une expérience représentative de n=2-4 expériences indépendantes.

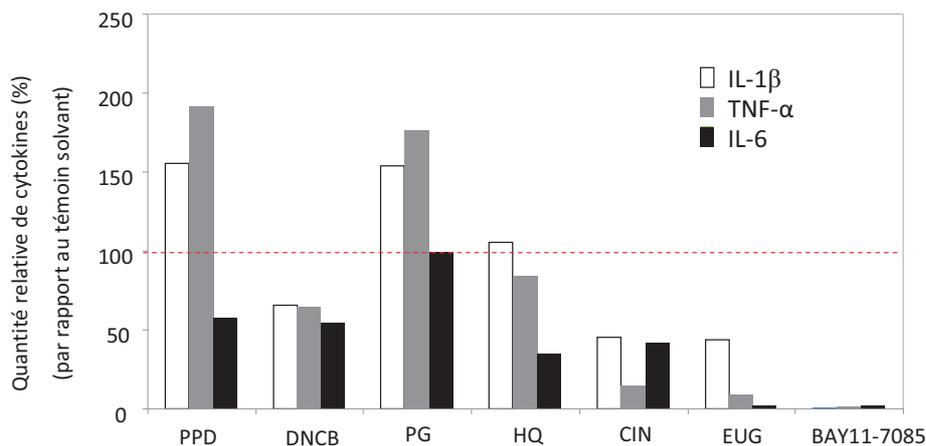


Figure 35 : Effet des sensibilisants sur la quantité des cytokines IL-1β, TNF-α et IL-6 produites par les cellules U937 traitées avec PMA/LPS.

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h avec PMA (60 ng/mL) et LPS (10 µg/mL) en présence ou absence d'un sensibilisant (CIN: 50 µM; EUG: 1000 µM; PPD: 100 µM; DNCB: 5 µM; PG: 200 µM; HQ: 10 µM) ou en présence ou absence de l'inhibiteur BAY11-7085 à 2µM. Les surnageants de culture ont été dosés par Luminex. Les histogrammes présentent les quantités relatives (%) par rapport aux cellules U937 PMA/LPS traitées avec le témoin solvant (représenté par la ligne en pointillés) d'IL-1β, TNF-α et IL-6 d'une expérience représentative de n=2 expériences indépendantes.

Les résultats présentés en figure 34 montrent que le PMA/LPS induit une diminution d'intensité de la bande protéique correspondant à I $\kappa$ B- $\alpha$ , suggérant qu'I $\kappa$ B- $\alpha$  est dégradé et par conséquent le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est activé. En présence de l'inhibiteur pharmacologique de NF- $\kappa$ B, le BAY-117085, la dégradation d'I $\kappa$ B- $\alpha$  est annulée. Parmi les sensibilisants testés, seul le DNCB annule la diminution d'I $\kappa$ B- $\alpha$  induite par PMA/LPS.

Comme largement décrit et confirmé précédemment dans notre modèle U937 PMA/LPS, NF- $\kappa$ B régule l'expression d'un certain nombre de cytokines puisque l'inhibiteur BAY-117085 annule la production d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 (fig. 26). Nous nous sommes donc intéressés à l'effet de sensibilisants sur la production de l'ensemble de ces médiateurs. La figure 35 présente les quantités relatives d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 produites par les cellules U937 PMA/LPS traitées avec différents sensibilisants. Parmi les sensibilisants testés, le DNCB, l'EUG et le CIN diminuent l'ensemble des médiateurs (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IL-6) avec une diminution marquée comparable à celle du BAY-7085 pour l'EUG. L'IL-6 apparaît diminué par l'ensemble des sensibilisants sauf par le PG. Tandis que l'HQ n'induit pas d'effets significatifs sur les autres médiateurs, la PPD et le PG augmentent significativement les quantités d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$ .

L'ensemble de ces résultats montre que parmi les sensibilisants testés, seuls le CIN, l'EUG et le DNCB semblent diminuer l'activation de NF- $\kappa$ B induite par PMA/LPS avec cependant des mécanismes d'action différents puisque seul le DNCB empêche la dégradation d'I $\kappa$ B- $\alpha$  induite par PMA/LPS.

### C) Modulation des gènes cibles du facteur de transcription Nrf2 par les sensibilisants de contact dans le système U937 PMA/LPS

Dans une étude récente, Lin et collaborateurs (2008) comparent les effets anti-inflammatoires du sulforaphane sur des macrophages péritonéaux issus de souris Nrf2 ( $^{+/+}$ ) et ( $^{-/-}$ ) en montrant que dans les cellules Nrf2 ( $^{+/+}$ ) le sulforaphane inhibe l'induction de la production de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et COX-2 par le LPS tandis que ces effets inhibiteurs sont atténués dans les cellules provenant des souris Nrf2 ( $^{-/-}$ ) (Lin *et al.*, 2008a). Dans la même perspective, Woo et Kwon (2007) montrent que dans la lignée de macrophages murins RAW264.7, le sulforaphane a la capacité d'inhiber l'expression de COX-2 induite par le LPS (Woo and Kwon, 2007). Les auteurs montrent en effet que le sulforaphane, activateur de Nrf2, induit l'expression de NQO1 et HO-1, qui empêcheraient la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau et ainsi la transcription de COX-2. Afin de valider dans notre modèle U937 PMA/LPS si ces liens entre induction de Nrf2 et inhibition de NF- $\kappa$ B se retrouvent, nous avons étudié l'effet d'un activateur de Nrf2, le sulforaphane sur la production de PGE $_2$  et l'expression des gènes *ptgs-2*, *ho-1* et *nqo1*.

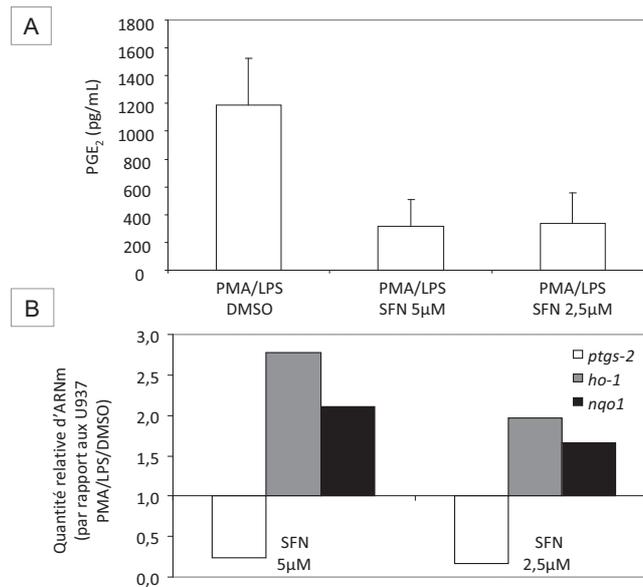


Figure 36 : Effet du sulforaphane (SFN) sur la production de PGE<sub>2</sub> et l'expression des gènes *ptgs-2*, *nqo1* et *ho-1* par les cellules U937 traitées avec PMA/LPS.

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h avec avec PMA (60 ng/mL) et LPS (10 µg/mL) en présence ou absence de SFN.

(A) Les quantités de PGE<sub>2</sub> ont été dosées dans le surnageant par EIA. Les histogrammes représentent les concentrations moyennes de PGE<sub>2</sub> ± SEM de n=3 expériences indépendantes.

(B) La quantification des ARNm a été réalisée par RT-PCR quantitative. Les histogrammes présentent les quantités relatives des ARNm des gènes codant pour COX-2, NQO1 et HO-1 dans les U937 traitées avec PMA/LPS en présence de SFN, comparativement au témoin solvant U937 PMA/LPS. Les valeurs quantitatives des transcrits des gènes d'intérêt ont préalablement été normalisées par rapport à l'expression du "gène de ménage" *rp13*. Expérience représentative de n=3 expériences indépendantes.

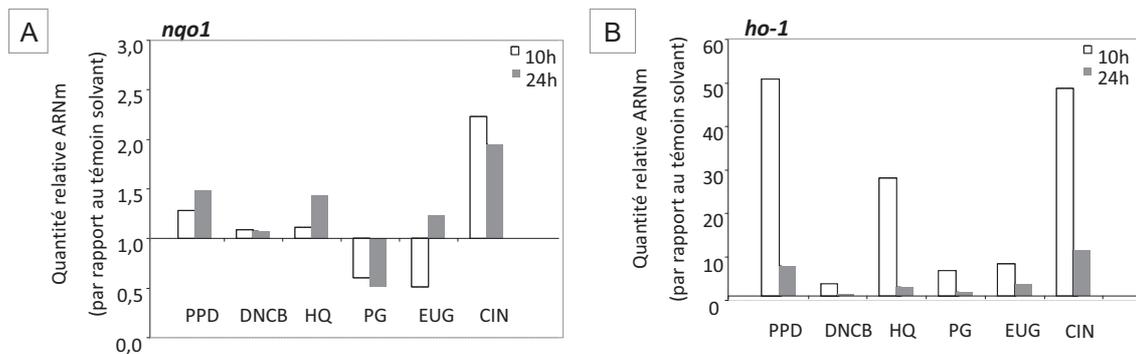


Figure 37 : Effet des sensibilisants sur l'expression relative des gènes *nqo1* et *ho-1* dans les cellules U937 traitées avec PMA/LPS.

Les cellules U937 ont été traitées avec PMA (60 ng/mL) et LPS (10 µg/mL) en présence ou absence d'un sensibilisant (CIN: 50 µM; EUG: 1000 µM; PPD: 100 µM; DNCB: 5 µM; PG: 200 µM; HQ: 10 µM). L'expression des gènes *nqo1* et *ho-1* a été étudiée après 10 et 24h de traitement par RT-PCR quantitative. Les résultats sont exprimés en quantités relatives d'ARNm du gène d'intérêt comparativement aux cellules U937 PMA/LPS (témoin solvant). Les valeurs quantitatives des transcrits des gènes d'intérêt ont préalablement été normalisées par rapport à l'expression du "gène de ménage" *rp13*. Les histogrammes présentent une expérience représentative de n=3 expériences indépendantes.

Dans notre modèle, le sulforaphane inhibe la production de PGE<sub>2</sub> induite par PMA/LPS (fig. 36A). De plus, l'expression de l'ARNm codant pour COX-2 est également inhibée, puisque la quantité d'ARNm de *ptgs-2* est diminuée de plus de deux fois (x 0,3). De façon concomitante, on peut noter une induction dose-dépendante de la quantité d'ARNm de *nqo1* et *ho-1*, significative pour le sulforaphane à 5 µM (fig. 36B).

Ces résultats suggèrent que les effets du sulforaphane décrits dans la littérature ont pu être confirmés dans notre modèle et que la surexpression des gènes cibles de Nrf2 pourrait contribuer à l'inhibition de l'expression de COX-2 et donc de la production de PGE<sub>2</sub> induite par PMA/LPS dans les cellules U937. Nous avons donc souhaité évaluer si, dans notre système, l'inhibition de l'expression de COX-2 démontrée pour le CIN et l'EUG pouvait être expliquée par une surexpression des gènes *nqo1* et *ho-1*. La figure 37 présente l'expression relative des gènes *nqo1* (A) et *ho-1* (B) à 10h et 24h après traitement des cellules U937 PMA/LPS avec les différents sensibilisants par rapport aux cellules traitées seulement par le PMA/LPS. Parmi les sensibilisants testés, seul le CIN à 10h augmente de façon significative l'expression de *nqo1*. Cette induction reste toutefois relativement faible (x2) et transitoire puisqu'elle ne se poursuit pas à 24h. Concernant *ho-1*, à l'exception du DNCB qui ne modifie pas significativement l'expression du gène induit par PMA/LPS, tous les sensibilisants testés augmentent significativement la quantité d'ARNm du gène à 10h. Les inductions les plus importantes sont observées pour la PPD, l'HQ et le CIN avec des inductions respectives de x50, x30 et x50.

Si l'on s'intéresse à la chimiokine IL-8, connue pour être en partie régulée par Nrf2, on remarque que parmi les sensibilisants testés seul le DNCB et l'EUG augmentent la quantité d'IL-8 induite par PMA/LPS avec toutefois des différences au niveau de l'intensité d'induction (fig. 38) : tandis que le DNCB augmente légèrement la quantité d'IL-8 (x2), l'EUG augmente très fortement la chimiokine, de manière comparable au BAY-117085.

Ainsi, une surexpression de certains gènes cibles de Nrf2 est observée pour tous les sensibilisants (sauf le DNCB) et pas uniquement pour ceux qui inhibent NF-κB (EUG, CIN et DNCB).

En conclusion nous avons montré que les sensibilisants diminuent de façon spécifique la production des prostanoides et notamment de PGE<sub>2</sub> et du TxB<sub>2</sub> par les cellules U937 PMA/LPS et que cet effet n'est pas restreint à la lignée U937 puisque cette signature est retrouvée dans des moDC. En fonction des sensibilisants, divers mécanismes d'action ont pu être décrits : tandis qu'aucun sensibilisant ne semble modifier la mobilisation de l'AA sous l'action de la cPLA<sub>2</sub> induite par PMA/LPS, le CIN et l'EUG inhibent l'expression de COX-2 au niveau de la protéine et l'HQ, le PG et l'EUG inhibent l'activité de COX-2. Le DNCB n'a pour

sa part aucune action sur COX-2. Nous avons pu cependant montrer que la molécule a la capacité de dépléter très fortement la quantité intracellulaire de GSH et que ses effets sur l'inhibition de la production de PGE<sub>2</sub> sont principalement thiols-dépendants, ce qui laisse penser que le DNCB pourrait agir sur les isomérases, en aval de COX-2, dont l'activité est dépendante du GSH. Au-delà de la cascade de l'AA, nous avons pu montrer que le DNCB, le CIN et l'EUG inhibent l'activation du facteur de transcription NF-κB avec toutefois des mécanismes différents puisque seul le DNCB agit au niveau d'IκB-α.

Dans la perspective de pouvoir utiliser le marqueur PGE<sub>2</sub> dans un test de prédiction du caractère sensibilisant des molécules et d'identifier comment ce test se positionnerait dans la batterie de tests existants, en parallèle de cette approche mécanistique, nous avons dans la suite de l'étude réalisé une analyse statistique du test sur un set élargi de molécules.

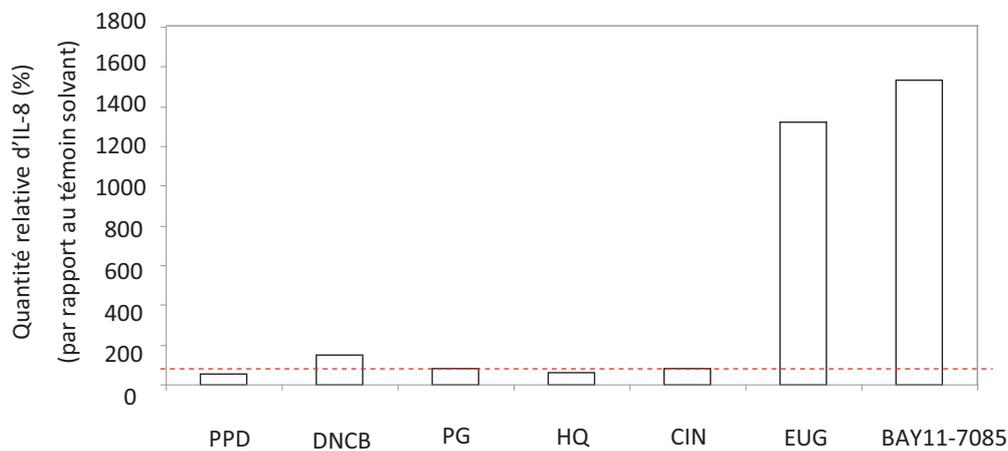


Figure 38 : Effet des sensibilisants sur la quantité de chimiokine IL-8 produite par les cellules U937 traitées avec PMA/LPS.

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h avec PMA (60 ng/mL) et LPS (10 µg/mL) en présence ou absence d'un sensibilisant (CIN: 50 µM; EUG: 1000 µM; PPD: 100 µM; DNCB: 5 µM; PG: 200 µM; HQ: 10 µM) ou en présence ou absence de l'inhibiteur BAY11-7085 à 2 µM. Les surnageants de culture ont été dosés par Luminex. Les histogrammes présentent les quantités relatives (%) par rapport aux cellules U937 PMA/LPS traitées avec le témoin solvant (représenté par la ligne en pointillés) d'IL-8 d'une expérience représentative de n=2 expériences indépendantes.

## **PARTIE III : Prédiction de l'allergie retardée de contact, mise en place du « Test PGE<sub>2</sub> »**

### **I. Le test PGE<sub>2</sub>, un test performant pour la prédiction du caractère sensibilisant des molécules chimiques**

Dans les parties précédentes nous avons pu démontrer que les sensibilisants ont la capacité d'inhiber la production de PGE<sub>2</sub> induite dans la lignée U937 par le cocktail PMA/LPS. Sur un set de 6 molécules sensibilisantes de potentiels variés et 3 molécules non sensibilisantes nous avons par ailleurs identifié que ces effets sont spécifiques des sensibilisants testés. D'autre part, nous nous sommes assurés que ces effets ne sont pas dépendants du modèle *in vitro* utilisé puisque dans d'autres types cellulaires [DC issues de monocytes et lignée MUTZ-3 différenciée en DC (non montré)] la spécificité de la réponse a été confirmée.

Dans la perspective d'utiliser le paramètre « inhibition de PGE<sub>2</sub> » comme marqueur permettant de prédire le caractère sensibilisant des molécules, nous avons évalué dans le système cellulaire U937 PMA/LPS un set de 176 molécules, pour lesquelles les données du test LLNA sont disponibles. Ce set, constitué pour moitié de molécules de référence et pour moitié d'ingrédients cosmétiques, représente une répartition relativement équilibrée de molécules sensibilisantes et non sensibilisantes puisqu'il se compose de 59% de sensibilisants et 41% de non sensibilisants.

Pour chaque molécule trois expériences indépendantes sont menées dans les conditions suivantes : chaque molécule est testée sur une gamme de six concentrations, déterminée sur la base de la viabilité des molécules sur les cellules U937. Pour des molécules non toxiques, les molécules sont testées sur une gamme de 200 à 6,25 µg/mL. Pour des molécules toxiques la dose maximum évaluée correspond à la dose subtoxique pour les U937 (*i.e.* dose pour laquelle 70% des cellules U937 sont viables). Chaque molécule est administrée aux cellules U937 simultanément au cocktail PMA/LPS et incubée pendant 24h et 48h. Pour chaque temps de cinétique, la viabilité des cellules U937 PMA/LPS est vérifiée par AlamarBlue et les quantités de PGE<sub>2</sub> sont dosées par EIA. Une expérience est considérée comme valide si 1) la quantité basale de PGE<sub>2</sub> produite par les U937 est inférieure ou égale à 100 pg/mL ; 2) la quantité de PGE<sub>2</sub> induite par le cocktail PMA/LPS est supérieure ou égale à 1000 pg/mL, 3) la PPD, choisie comme référence positive, diminue la quantité de PGE<sub>2</sub> à plus de 60% (IR≤40%).

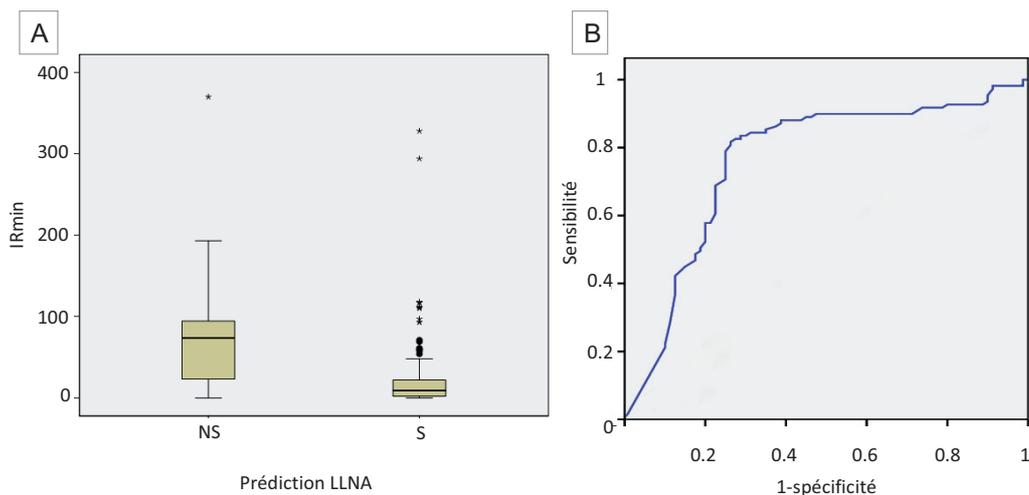


Figure 39 : Analyse statistique des données du test PGE<sub>2</sub>.

(A) Distribution des valeurs sous le format de boîtes à moustache, (voir « Matériel et Méthodes ») des IR<sub>min</sub> déterminés pour les 176 molécules évaluées dans le test PGE<sub>2</sub> en fonction de leur caractère sensibilisant prédit par le LLNA (NS : non sensibilisant ; S : sensibilisant).

° correspond aux valeurs dites « outlier » (atypiques) qui sont supérieures à 1.5 fois « l'interquartile range »

\* correspond aux valeurs dites « extreme » (aberrantes) qui sont supérieures à 3 fois « l'interquartile range »

(B) Courbe ROC tracée à partir des calculs de performance (voir Annexe 2 : sensibilité/ spécificité) réalisés sur les différents seuils de positivité (S vs NS) déterminés pour l'IR<sub>min</sub> issu du test PGE<sub>2</sub>.

Tableau 7 : Performances prédictives du test PGE<sub>2</sub> : statistiques de Cooper.

(A) Tableau de corrélation entre les prédictions du test LLNA et celles du test PGE<sub>2</sub>

(B) Calcul des performances (statistiques de Cooper) pour les 176 molécules.

Les rectangles de couleur indiquent les effectifs considérés pour le calcul de sensibilité, spécificité et concordance.

A

		Prédiction PGE <sub>2</sub>		Total
		NS	S	
LLNA	NS	52	20	72
	S	20	84	104
Total		72	104	176

B

Sensibilité	81%
Spécificité	72%
Concordance	77%

Pour chaque condition, les quantités relatives (IR) de PGE<sub>2</sub> comparativement au témoin solvant ont été calculées en pourcentage (par ex., si la quantité est identique au témoin solvant, IR=100%). Ainsi pour chaque molécule, la quantité relative minimale de PGE<sub>2</sub> (IR<sub>min</sub>) identifiée sur l'ensemble des doses et des expériences a été reportée (Annexe 1) et une étude statistique permettant de définir le modèle prédictif (seuil de positivité et calcul des performances de prédiction en comparaison du LLNA) a été menée sur ce paramètre IR<sub>min</sub> pour chaque temps de cinétique 24h et 48h.

La représentation en « boîtes à moustache » de la figure 39A indique pour le temps 24h la répartition des molécules suivant leur IR<sub>min</sub>, en fonction de la prédiction du LLNA. Malgré la large distribution des molécules aussi bien sensibilisantes que non sensibilisantes, il apparaît que la majorité des sensibilisants a un IR<sub>min</sub><40% (*i.e.* inhibition ≥ 60%). La courbe ROC « Receiver Operating Characteristic » du paramètre IR<sub>min</sub> a été calculée (fig. 39B). Cette courbe permet d'étudier les variations de la spécificité et de la sensibilité d'un test pour différentes valeurs du seuil de discrimination. Pour rappel, la sensibilité du test est donnée par la proportion de molécules qui sont sensibilisantes en LLNA et qui sont prédites sensibilisantes dans le test PGE<sub>2</sub> (vrais positifs) et la spécificité est donnée par la proportion de molécules non sensibilisantes en LLNA qui sont prédites non sensibilisantes dans le test PGE<sub>2</sub> (vrais négatifs). L'outil de la courbe ROC permet de déterminer un seuil de façon empirique pour chaque paramètre, s'approchant le plus d'un compromis entre sensibilité et spécificité de prédiction. Un seuil est idéal s'il permet de séparer totalement tous les positifs des négatifs, sans faux positifs, ni faux négatifs. Il est donc défini par une sensibilité et une spécificité égales à 1. Pour chaque paramètre, les seuils s'approchant le plus de ce compromis sont surlignés en rouge dans le tableau (Annexe 2). Il apparaît que le seuil de 40% pour le paramètre IR<sub>min</sub> identifié à partir des boîtes à moustache est confirmé par la courbe ROC.

Le seuil de positivité ayant été établi (molécules prédites S si IR<sub>min</sub> < 40% et molécules prédites NS si IR<sub>min</sub> > 40%), les performances du test ont pu être calculées (tableau 7). Il apparaît que la concordance générale du test est de 77%, avec une meilleure sensibilité (81%) que spécificité (72%). Le même travail conduit sur les données à 48h aboutit à la détermination d'un seuil pour IR<sub>min</sub> à 57 (résultats non montrés). Les performances globales sont cependant moins bonnes (sensibilité 75 %, spécificité 63% et concordance générale 70%). Au vu de ces résultats, la cinétique de 24h et le seuil de positivité de « IR<sub>min</sub> < 40% » ont été retenus.

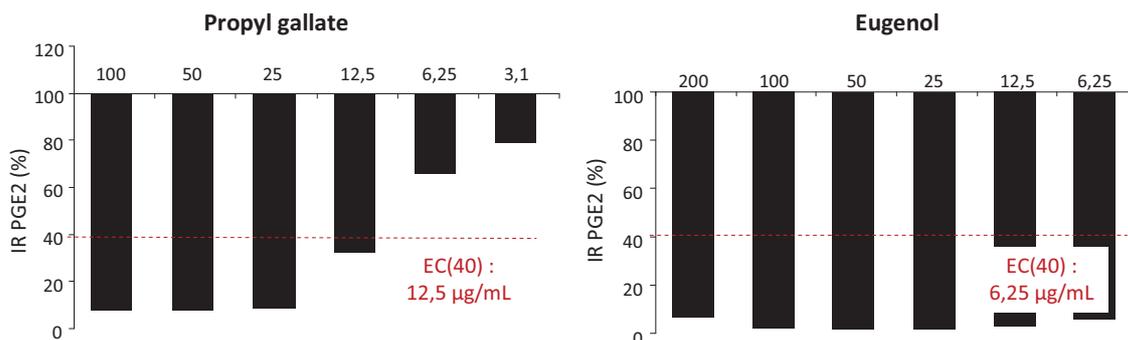
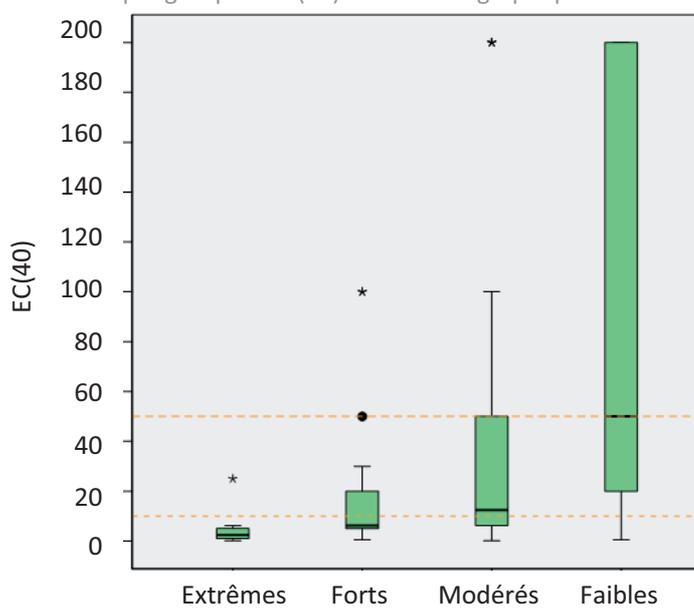


Figure 40 : Effet dose du PG et de l'EUG sur la production PGE<sub>2</sub> par les cellules U937 traitées avec PMA/LPS.

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h avec PMA/LPS en présence ou absence du PG ou de l'EUG. Les quantités de PGE<sub>2</sub> ont été dosées dans le surnageant par EIA. Les histogrammes présentent les index de réactivité (IR) en %, c'est-à-dire les quantités relatives de PGE<sub>2</sub> (calculées comparativement aux cellules U937 traitées avec le témoin solvant). La ligne en pointillés rouge indique le seuil d'une quantité relative de 40% (soit une inhibition de la production 60%), permettant de déterminer l'EC(40). Expériences représentatives de n ≥ 3 expériences indépendantes.

Tableau 8 : Distribution des valeurs d'EC(40) en fonction des potentiels sensibilisants des molécules, détermination de seuils.

Distribution des valeurs sous le format de boîtes à moustache, (voir « Matériel et Méthodes ») des EC(40) déterminés pour les 89 molécules évaluées dans le test PGE<sub>2</sub> en fonction de leur potentiel sensibilisant prédit par le LLNA. Détermination graphique de seuils [EC(40) = 10 et EC(40) = 50] délimitant trois classes d'EC(40). Le tableau renseigne les effectifs par groupe d'EC(40) déterminés graphiquement.



Classe d'EC(40)	Classe de LLNA			
	Extrêmes	Forts	Modérés	Faibles
< 10	9	16	18	4
10 < x < 50	1	7	15	6
> 50	0	2	4	7
Total	10	25	37	17

## II. Pertinence du test PGE<sub>2</sub> pour la prédiction du potentiel sensibilisant des molécules chimiques

### A) Absence de corrélation entre le potentiel sensibilisant des molécules et le potentiel d'inhibition de la production de PGE<sub>2</sub>

Une fois le seuil de positivité établi ( $IR_{\min} = 40\%$ ), nous avons entrepris de préciser si l'on pouvait distinguer au sein des sensibilisants les différentes classes de potentiel déterminées par l'EC(3) du LLNA. Pour cela, de manière similaire à l'EC(3) du LLNA, une concentration seuil pour induire un  $IR \leq 40$ , « EC(40) », a été déterminée pour chaque molécule. Parmi les molécules « inhibant » la production de PGE<sub>2</sub>, dont l' $IR_{\min}$  est inférieur à 40%, on peut distinguer deux profils d'inhibition (fig. 40): les molécules qui présentent un effet dose-réponse [comme le PG mais aussi comme le TNBS, le DNCB, le PAP, l'oxazolone, l'HQ ou encore le NiSO<sub>4</sub> (résultats non montrés)] et les molécules pour lesquelles toutes les doses testées diminuent significativement la quantité de PGE<sub>2</sub> et pour lesquelles il ne nous a pas été possible d'identifier une dose avec un  $IR < 40\%$ . Ce cas de figure qui comprend l'eugénol, l'isoeugénol, le résorcinol, ou encore le cinnamaldéhyde qui représente une minorité des molécules qui inhibent la production de PGE<sub>2</sub>, comporte en majorité des sensibilisants modérés mais on trouve également des sensibilisants forts et extrêmes (comme le bromure de benzyl et la 2-nitro-p-phenylenediamine) (résultats non montrés). Les « EC(40) » ont donc été calculées comme suit : pour les molécules présentant une inhibition en dose-réponse, l'EC(40) est la plus faible dose testée pour laquelle l' $IR_{\min} < 40$ ; pour les molécules inhibant à toutes les doses testées, la valeur d'EC(40) a été arbitrairement ramenée à la plus faible dose testée. Nous avons donc cherché à identifier si le paramètre EC(40) pouvait permettre de prédire le potentiel sensibilisant des molécules. Le tableau 8 présente la distribution des EC(40) des molécules classées sensibilisantes par le LLNA et prédites S par le test PGE<sub>2</sub> en fonction de leur potentiel sensibilisant (extrême, fort, modéré, faible). On peut remarquer que les sensibilisants extrêmes ont des valeurs d'EC(40) plutôt faibles (<10µg/mL) comparativement aux autres groupes. Même si une tendance semble se dégager autour du seuil de 10 pour distinguer 2 groupes, extrêmes et forts d'une part et sensibilisants modérés et faibles d'autre part, le nombre de faux positifs reste trop élevé pour établir une règle, puisque 40% (22/54) des molécules sensibilisantes faibles et modérés ont un EC(40) inférieur à 10 (tableau 8).

En conclusion, le paramètre EC(40) ne permet pas de prédire le potentiel sensibilisant des molécules.

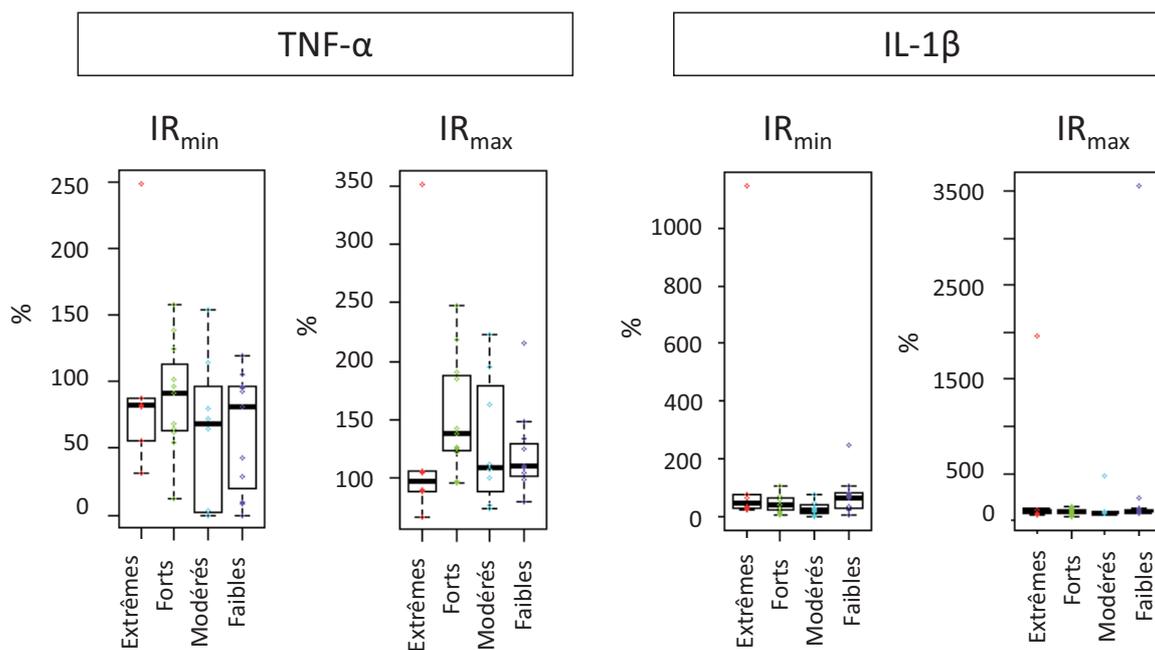


Figure 41 : Distribution des valeurs d' $IR_{min}$  et  $IR_{max}$  pour les cytokines TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  en fonction des potentiels sensibilisants des molécules.

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h avec PMA (60 ng/mL) et LPS (10  $\mu$ g/mL) en présence ou absence d'une molécule à tester. Les surnageants de culture ont été dosés par EIA pour TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  et PGE<sub>2</sub>. Pour chaque molécule (50) un  $IR_{min}$  et un  $IR_{max}$  ont été définis pour chacun des marqueurs PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ . Pour les molécules inhibant PGE<sub>2</sub> (i.e.  $IR_{min} < 40$ ), les  $IR_{min}$  et  $IR_{max}$  pour TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  ont été représentés sous forme de boîtes à moustache en fonction de leur potentiel sensibilisant défini par le LLNA.

Tableau 9 : Performances individuelles (statistiques de Cooper) des tests MUSST, DPRA, Nrf2-HTS et PGE<sub>2</sub>

Les principes, protocoles et modèles prédictifs des différents tests sont détaillés dans la partie « Matériel et Méthodes ». Sur la base des résultats de ces tests sur 160 molécules (66 NS et 94 S), le pourcentage de molécules prédites et les performances ont pu être calculées comme décrit dans « Matériel et Méthodes ».

	Nombre de réponses %	Concordance %	Sensibilité %	Spécificité %
MUSST	62	78	85	67
DPRA	86	80	86	69
Nrf2-HTS	88	74	76	72
PGE <sub>2</sub>	100	78	83	71

### B) Intérêt des paramètres complémentaires « modulation des cytokines TNF- $\alpha$ et IL-1 $\beta$ » pour la prédiction du potentiel sensibilisant

Lors de l'étude mécanistique des effets des sensibilisants sur l'inhibition de la production de PGE<sub>2</sub> (parties II), nous avons pu identifier que parmi les sensibilisants testés, l'EUG et le CIN, dont les potentiels sensibilisants sont les plus faibles, présentent la signature anti-inflammatoire la plus importante, puisque les deux molécules, au-delà de PGE<sub>2</sub> diminuent également de manière significative les quantités de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  produites par les cellules U937 PMA/LPS, quand testées à forte concentration. A l'inverse, la PPD, l'HQ et le PG, sensibilisants forts à extrêmes, montrent une augmentation des quantités de TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  produites par les cellules U937. Ainsi nous avons évalué si ces observations pouvaient se généraliser à un set plus important de molécules et si la modulation d'autres médiateurs inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  pouvait être corrélée au potentiel sensibilisant des molécules.

Pour cela, sur un set de 50 molécules de référence « inhibant PGE<sub>2</sub> » (testés dans les conditions du test PGE<sub>2</sub> sur U937 PMA/LPS: 6 doses par molécule, 24h de traitement), en parallèle de PGE<sub>2</sub>, les concentrations de TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  ont été quantifiées par EIA et pour chaque cytokine, un IR<sub>min</sub> et un IR<sub>max</sub> ont été déterminés (Annexe 3). A l'image de l'IR<sub>min</sub>, l'IR<sub>max</sub> représente l'index de réactivité maximal atteint parmi les différentes doses et expériences testées. La distribution des 4 paramètres selon les potentiels sensibilisants des molécules est représentée dans la figure 41. Sur les 28 molécules qui inhibent PGE<sub>2</sub> la moitié ou moins inhibe également à plus de 50% IL-1 $\beta$  (15/28), et/ou TNF- $\alpha$  (11/28) (Annexe 3). Seulement 9 molécules inhibent l'ensemble des marqueurs, uniquement des non sensibilisants ou sensibilisants faibles/modérés (isoeugénol, eugénol, cinnamaldéhyde, chlorhexidine, butyl glycidyl ether, propyl paraben, diethyl maleate, 6-methylcoumarine et SDS). Toutefois, aucune règle générale sur les paramètres individuels ou en combinaison ne semble pouvoir se dégager.

Même si l'ajout des paramètres TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  ne permet pas de prédire le potentiel sensibilisant des molécules, il apparait de façon intéressante que parmi les molécules qui inhibent les trois médiateurs on ne retrouve que des sensibilisants faibles/modérés ou des non sensibilisants.

Tableau 10 : Matrice de corrélation des prédictions du caractère sensibilisant (S vs NS) des tests DPRA, MUSST et Nrf2-HTS par rapport au test PGE<sub>2</sub>.

Les pourcentages des molécules prédites de façon identique au test PGE<sub>2</sub> sont calculés de la façon suivante :

$$\%MP = \frac{\text{(Nombre molécules avec test PGE}_2 \text{ et le test DPRA, MUSST ou Nrf2-HTS donnent même conclusion)}}{\text{(Nombre molécules prédites par le test DPRA, MUSST ou Nrf2-HTS)}}$$

Ces pourcentages sont calculés pour l'ensemble des 160 molécules (A), pour les 125 molécules bien classées en PGE<sub>2</sub> comparativement au LLNA (B) et pour les 35 molécules mal classées par le test PGE<sub>2</sub> comparativement au LLNA (C).

Ensemble des 160 molécules				
A	% de molécules prédites de façon identique	DPRA	MUSST	Nrf2-HTS
	PGE <sub>2</sub>	90	89	94
Molécules « bien classées » en PGE <sub>2</sub> (comp. LLNA)				
B	% de molécules prédites de façon identique	DPRA	MUSST	Nrf2-HTS
	PGE <sub>2</sub>	81	76	83
Molécules « mal classées » en PGE <sub>2</sub> (comp. LLNA)				
C	% de molécules prédites de façon identique	DPRA	MUSST	Nrf2-HTS
	PGE <sub>2</sub>	48	43	32

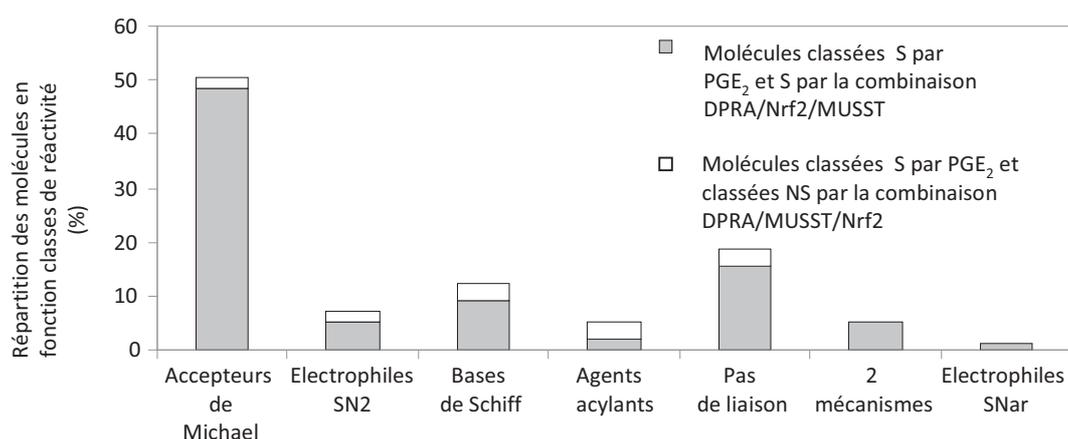


Figure 42 : Représentativité des classes de réactivité de molécules classées S par le test PGE<sub>2</sub> et classées de la même façon ou différemment par la combinaison des 3 autres tests (DPRA, MUSST et Nrf2-HTS).

Les classes de réactivité sont données par le logiciel ToxTree

([http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/computational\\_toxicology/qsar\\_tools/toxtree](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/computational_toxicology/qsar_tools/toxtree)).

Les pourcentages sont calculés par rapport au nombre total de molécules classées S par le test PGE<sub>2</sub>, soit 97. Les effectifs respectifs des molécules classées S par le test PGE<sub>2</sub> et classées S par la combinaison des trois autres tests et des molécules classées S par le test PGE<sub>2</sub> et classées NS par la combinaison des trois autres tests sont respectivement de 84 et 13.

En conclusion, le test PGE<sub>2</sub>, qui prédit le caractère sensibilisant d'une molécule en fonction de sa capacité à diminuer à plus de 60% la quantité de PGE<sub>2</sub> produite dans le système U937 PMA/LPS, présente de bonnes performances. Toutefois, nous n'avons pu identifier de règle afin de corrélérer avec le potentiel sensibilisant des molécules que ce soit au niveau de l'intensité d'inhibition maximale ou de la première dose à laquelle une molécule franchit le seuil des 60% d'inhibition.

Comme déjà évoqué dans l'introduction de cette thèse, d'autres tests modélisant également les événements pré-immuns de l'allergie de contact sont développés (tests DPRA, MUSST, Nrf2-HTS...). Dans la dernière partie de ce travail nous nous sommes donc intéressés à positionner le test PGE<sub>2</sub> par rapport aux autres tests actuellement utilisés en interne chez L'Oréal.

### **III. Positionnement du test PGE<sub>2</sub> dans la batterie de tests prédictifs disponibles**

Comme admis par l'ensemble de la communauté (Jowsey *et al.*, 2006; Maxwell and Mackay, 2008; Natsch *et al.*, 2009), il est peu probable qu'un seul test permette de prédire le potentiel sensibilisant avec de bonnes performances et, dans cette perspective, tout le défi réside dans l'intégration des différents tests dans une batterie prédictive. Chez L'Oréal, nous travaillons un certain nombre de tests *in silico* (DEREK, TIMES, TOOLBOX) et *in vitro* (DPRA, MUSST, Nrf2-HTS) et l'exercice d'intégration des tests est actuellement en cours. Ainsi, sur un set commun de 160 molécules, des données ont été générées pour l'ensemble de ces tests. Dans la perspective de mieux comprendre le positionnement du marqueur PGE<sub>2</sub> par rapport aux autres marqueurs de réactivité chimique, d'induction de Nrf2 et de maturation des DC, nous avons analysé les résultats du test PGE<sub>2</sub> au regard de ceux des tests DPRA, Nrf2-HTS et MUSST ainsi que des catégories de réactivité chimique données par l'outil *in silico* Toxtree. Pour rappel, les protocoles de ces tests ainsi que les règles de prédiction des molécules sont détaillés dans la partie « Matériel et Méthodes ».

En Annexe 4 sont présentés pour les 160 molécules (89 ingrédients cosmétiques et 71 molécules de référence) les prédictions de chacun des tests. De façon générale, sur ce set de molécules, tous les tests présentent de bonnes performances avec une concordance générale supérieure ou égale à 74% et une sensibilité meilleure que la spécificité (Tableau 9). Toutefois, contrairement au test PGE<sub>2</sub> qui donne une prédiction pour toutes les molécules testées, dans certains tests de nombreuses molécules ne sont pas classées.

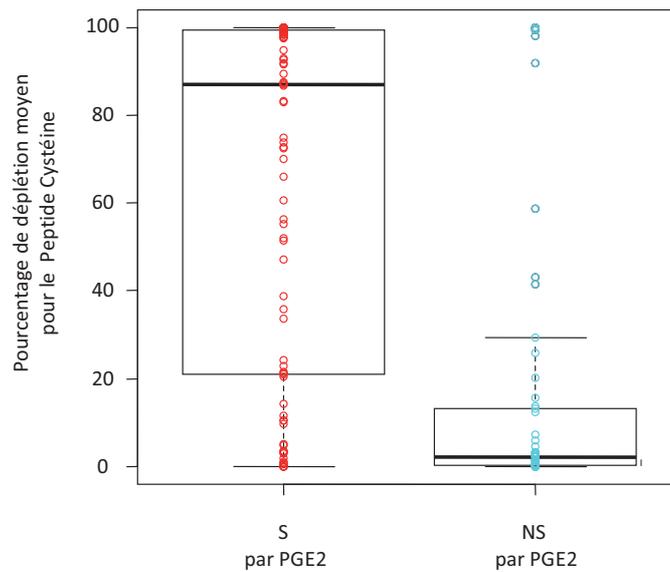


Figure 43 : Distribution (« boîtes à moustache ») des pourcentages de déplétion du peptide Cys du test DPRA en fonction de la classe (S vs NS) prédite par le test PGE<sub>2</sub>

La comparaison des médianes des deux groupes par le test de Wilcoxon donne une p-value < 0.0001, ce qui signifie que les deux groupes sont statistiquement différents.

Si l'on s'intéresse au positionnement relatif du test PGE<sub>2</sub> par rapport aux autres tests, en comparant deux à deux les prédictions du test PGE<sub>2</sub> avec celles des autres tests, on remarque que respectivement 89, 90 et 94% des prédictions du PGE<sub>2</sub> sont identiques aux conclusions données par les tests DPRA, MUSST et Nrf2-HTS, lorsque ces derniers donnent une prédiction (S/NS) (Tableau 10). Parmi les molécules bien classées par le PGE<sub>2</sub> par rapport au LLNA (125 molécules), respectivement 81, 76 et 83% sont également bien classées par le test DPRA, MUSST et Nrf2-HTS. En revanche, au niveau des molécules mal prédites par le PGE<sub>2</sub> comparativement au LLNA (35 molécules), seulement 50% sont prédites de la même façon par le DPRA et le MUSST, voire moins dans le cas du test Nrf2, ce qui signifie que le test PGE<sub>2</sub> ne semble pas « se tromper » dans ses prédictions de la même façon que les autres tests.

Si l'on analyse les 97 molécules classées S par le test PGE<sub>2</sub> (Annexe 4) comparativement à la prédiction donnée par la combinaison des 3 autres tests (DPRA, MUSST, Nrf2-HTS) et au regard des catégories de réactivité de la classification d'Aptula et Roberts (2005), on remarque que dans les cas où les 2 prédictions diffèrent (PGE<sub>2</sub> vs combinaison DPRA/MUSST/Nrf2-HTS), la proportion des catégories de réactivité comme les bases de Schiff, les agents acylants et les réactions SN<sub>2</sub> est augmentée (fig. 42). A l'inverse, les accepteurs de Michael, constituant 50% des molécules classées S par le test PGE<sub>2</sub> ne représentent que 15% des cas de désaccord de prédiction. Suite à cette observation, nous avons entrepris une analyse comparative du test PGE<sub>2</sub> avec la réactivité des molécules sur le peptide Cys du test DPRA. Les résultats présentés dans la figure 43 montrent que plus de 50% des molécules classées S en PGE<sub>2</sub> déplètent le peptide Cys à plus de 80% et que plus de 50% des molécules classées NS par le test PGE<sub>2</sub> déplètent à moins de 2% le peptide Cys. Ainsi il se dégage une corrélation entre la capacité des sensibilisants à réagir sur les Cys et leur capacité à inhiber PGE<sub>2</sub>.

En conclusion, l'étude statistique a permis de mettre en évidence que le paramètre « inhibition PGE<sub>2</sub> » est un bon marqueur pour un test de prédiction du caractère sensibilisant des molécules mais que les paramètres étudiés ne sont pas suffisants pour prédire le potentiel des molécules en tant que tels. L'analyse comparative du test par rapport aux autres tests DPRA, MUSST et Nrf2-HTS semble indiquer une certaine complémentarité des mécanismes analysés dans chacun des tests et notamment pour les molécules autres que des accepteurs de Michael.



## Discussion



De par leurs propriétés physico-chimiques, les sensibilisants sont des molécules électrophiles qui modifient les protéines endogènes pour former un complexe haptène-protéine immunogène. Cette première étape, appelée « signal 1 » n'est cependant pas suffisante pour induire l'activation et la prolifération de cellules T, spécifiques de l'haptène. En effet, un deuxième signal dit de danger, activant l'immunité innée et déclenchant un environnement d'alerte, est déterminant dans la mise en place d'une réponse spécifique de sensibilisation.

Un certain nombre d'observations viennent pourtant nuancer ce constat : tout d'abord, la phase de sensibilisation de l'HSRC est un processus silencieux sur le plan clinique, sans manifestation inflammatoire mesurable. Ensuite, les propriétés anti-inflammatoires de certaines molécules (eugénol, cinnamaldéhyde, isoeugénol...) n'empêchent pas leur capacité à induire une sensibilisation de contact (Lin *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007). Enfin, les sensibilisants sont décrits pour être des activateurs du facteur de transcription Nrf2 (Natsch and Emter, 2008; Ade *et al.*, 2009) dont on sait que certains gènes cibles (ex. HO-1, NQO1...) possèdent des fonctions de détoxification et mettent en place un programme anti-inflammatoire conduisant à l'inhibition de l'expression de COX-2 (Lin *et al.*, 2008a; Liu *et al.*, 2008b). La mise en place de ces programmes permet ainsi aux cellules de surmonter le stress oxydant induit par l'attaque électrophile. En d'autres termes, la réactivité intrinsèque des sensibilisants permet donc de générer un signal de danger indispensable à la maturation des DC mais dans le même temps cette réponse aboutit à la mise en place d'un programme antioxydant et anti-inflammatoire.

Etant donné la complexité et l'importance du rôle du signal de danger dans le développement de la réponse immunitaire et plus spécialement ici dans le développement de l'HSRC, nous nous sommes intéressés à étudier comment les sensibilisants modulent la réponse inflammatoire de la cellule. Tandis que la plupart des études *in vitro* évalue comment les sensibilisants induisent cette réponse, nous avons adressé cette question avec un angle différent, en évaluant l'impact des sensibilisants sur la mise en place d'une réponse inflammatoire, ici induite par l'association PMA/LPS.

## **I. Caractéristique du modèle expérimental U937 PMA/LPS**

Pour l'objet de notre étude nous avons travaillé avec la lignée U937, bien décrite pour sa capacité à répondre aux sensibilisants (Rousset *et al.*, 2000; Python *et al.*, 2007; Aeby *et al.*, 2010). Cette lignée promonocytaire issue d'une leucémie monoblastique, qui a la capacité d'être différenciée en macrophages, est également utilisée pour l'étude d'effets anti-inflammatoires de molécules. Dans la plupart des études les cellules U937 sont



préalablement différenciées en macrophages avec le PMA pendant plusieurs jours avant d'être stimulées avec le LPS (Schenkein, 1986; Arias-Negrete *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008; Minafra *et al.*, 2011). Dans nos conditions, les traitements PMA et LPS sont réalisés de manière simultanée. Durant le processus de différenciation les cellules subissent des modifications phénotypiques, morphologiques et fonctionnelles (Dodd *et al.*, 1983; Harris and Ralph, 1985). Malgré la différence de protocole dans la séquence des traitements, nous avons pu retrouver un certain nombre des modifications décrites, notamment l'augmentation de la taille des cellules, l'allongement de leur temps de doublement, le fait que les cellules deviennent adhérentes et s'agrègent entre elles, ainsi que l'augmentation du marqueur de monocytes CD14 et du marqueur de macrophages CD68.

Au cours de leur différenciation, les cellules acquièrent également la capacité de sécréter un certain nombre de molécules biologiquement actives (prostanoïdes, cytokines...). En revanche si cette étape de différenciation n'est pas engagée, elles ne sont pas capables de répondre complètement à la stimulation bactérienne LPS et en ce sens elles diffèrent des monocytes issus de sang périphérique, des macrophages et des moDC (Kurland *et al.*, 1979; Cobb *et al.*, 1983). Nous avons pu confirmer que les cellules U937 indifférenciées expriment le TLR4 (non montré) mais comme décrit plus haut, elles sont négatives pour CD14. Comme le LPS agit sur la cellule en se liant à la triade CD14/TLR4/MD2 (« Myeloid Differentiation 2 ») induisant l'activation de facteurs de transcription dont NF- $\kappa$ B (Guha and Mackman, 2001), on peut penser que l'absence de réponse des U937 au LPS est due à l'absence d'expression constitutive de CD14. Ainsi, seule l'association PMA/LPS permet la production d'un grand nombre de médiateurs (cytokines, chimiokines, prostanoïdes).

Si l'on compare nos résultats à ceux des études rapportées dans la littérature on remarque qu'un prétraitement des cellules U937 pendant plusieurs jours avec du PMA n'induit pas de réponse des cellules au LPS plus rapide, que ce soit au niveau de l'expression de COX-2 ou des prostaglandines; de même, les quantités de prostaglandines produites ne sont pas supérieures dans le cas d'un pré-traitement avec le PMA (Schenkein, 1986; Arias-Negrete *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2003).

Concernant la production de prostanoïdes, chacun des activateurs PMA et LPS intervient à plusieurs niveaux dans la cascade métabolique de l'AA, notamment sur les enzymes clés cPLA<sub>2</sub> et COX-2: le PMA, en tant que puissant activateur de la protéine kinase C (PKC), induit sa translocation du cytosol vers la membrane (Lee *et al.*, 2003) et consécutivement active la translocation de l'enzyme cPLA<sub>2</sub> vers la membrane cellulaire (Rehfeldt *et al.*, 1991). En parallèle, le PMA induit l'expression de COX-2 au niveau de l'ARNm via l'activation des MAPK et de NF- $\kappa$ B (Dean *et al.*, 1999). De la même façon, le LPS a de multiples effets, notamment sur la cPLA<sub>2</sub>. Le LPS, via le récepteur CD14, active la phospholipase C (PLC)



qui libère à partir des phospholipides membranaires (PL) du diacylglycerol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP3). L'IP3 active la calmoduline impliquée dans l'augmentation intracellulaire du calcium (Ryu *et al.*, 1987), ce qui favorise l'activité enzymatique de la cPLA<sub>2</sub>. D'autre part, le DAG et l'IP3 activent l'activité de la cPLA<sub>2</sub> via l'induction de la PKC et des MAPK p38 qui phosphorylent la cPLA<sub>2</sub> sur ses sites Ser<sup>505</sup> et Ser<sup>727</sup> (Kramer and Sharp, 1997). De plus, l'activation du complexe CD14/TLR4/MD2 par le LPS active le facteur de transcription NF-κB (Lin *et al.*, 2001) et probablement également la voie MAPK p38 (Jiang *et al.*, 2003; Dean *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999) conduisant à l'expression de COX-2. L'ensemble de ces différentes voies a été synthétisé dans la figure 44.

Ces éléments bibliographiques sont cohérents avec le fait que dans notre modèle seule la condition PMA/LPS permette la production des différents prostanoides (TxB<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>) par les U937 en induisant 1) une mobilisation de l'AA sous l'action de la cPLA<sub>2</sub>, 2) l'expression de l'enzyme COX-2 et probablement 3) l'expression et la synthèse des différentes synthases en aval de COX-2. En effet, en absence du PMA, le LPS ne peut agir sur la cellule, faute de CD14 et en absence de LPS, l'augmentation du calcium intracellulaire, nécessaire à l'activation de l'enzyme cPLA<sub>2</sub> fait défaut. D'autre part, le PMA seul n'est pas capable d'induire l'expression de COX-2 au niveau de la protéine alors qu'il l'induit au niveau du transcrite (instabilité des ARNm ?) (fig. 24).

Pour aboutir à la production de cytokines/chimiokines par les U937, deux signaux sont nécessaires : d'une part la transcription est induite par l'activation de facteurs de transcription, tels NF-κB et d'autre part, dans le cas de l'IL-1β, l'activation de l'inflammasome est également indispensable pour cliver la forme inactive pro-IL-1β et libérer la forme active IL-1β. Ainsi, de même que pour les prostanoides, l'association PMA/LPS est nécessaire à la production de l'ensemble des cytokines par les U937. En effet, en absence de PMA, le LPS n'a pas d'effet sur la cellule qui n'expriment pas CD14. En l'absence de LPS, le PMA est capable d'activer NF-κB, probablement via l'activation de la PKCα, qui phosphoryle la sous unité p65 de NF-κB (Mut *et al.*, 2010), ce qui aboutit à la production de TNF-α. En revanche, le PMA ne semble pas activer l'inflammasome, puisqu'en l'absence de LPS, l'IL-1β n'est pas produite, même si de par ses capacités à induire NF-κB, on peut penser que la forme pro-IL-1β est présente.

Dans notre modèle, l'expression des gènes *ho-1*, *nqo1* et *akr1c2*, de même que la production d'IL-8 sont induites par le PMA, indiquant que le facteur de transcription Nrf2 est activé par le PMA. Ces résultats confirment ceux de Huang et collaborateurs (2000) qui ont pu mettre en évidence *in vivo* et *in vitro* une activation de la voie Nrf2 par le PMA via l'activation des PKC (Huang *et al.*, 2000).

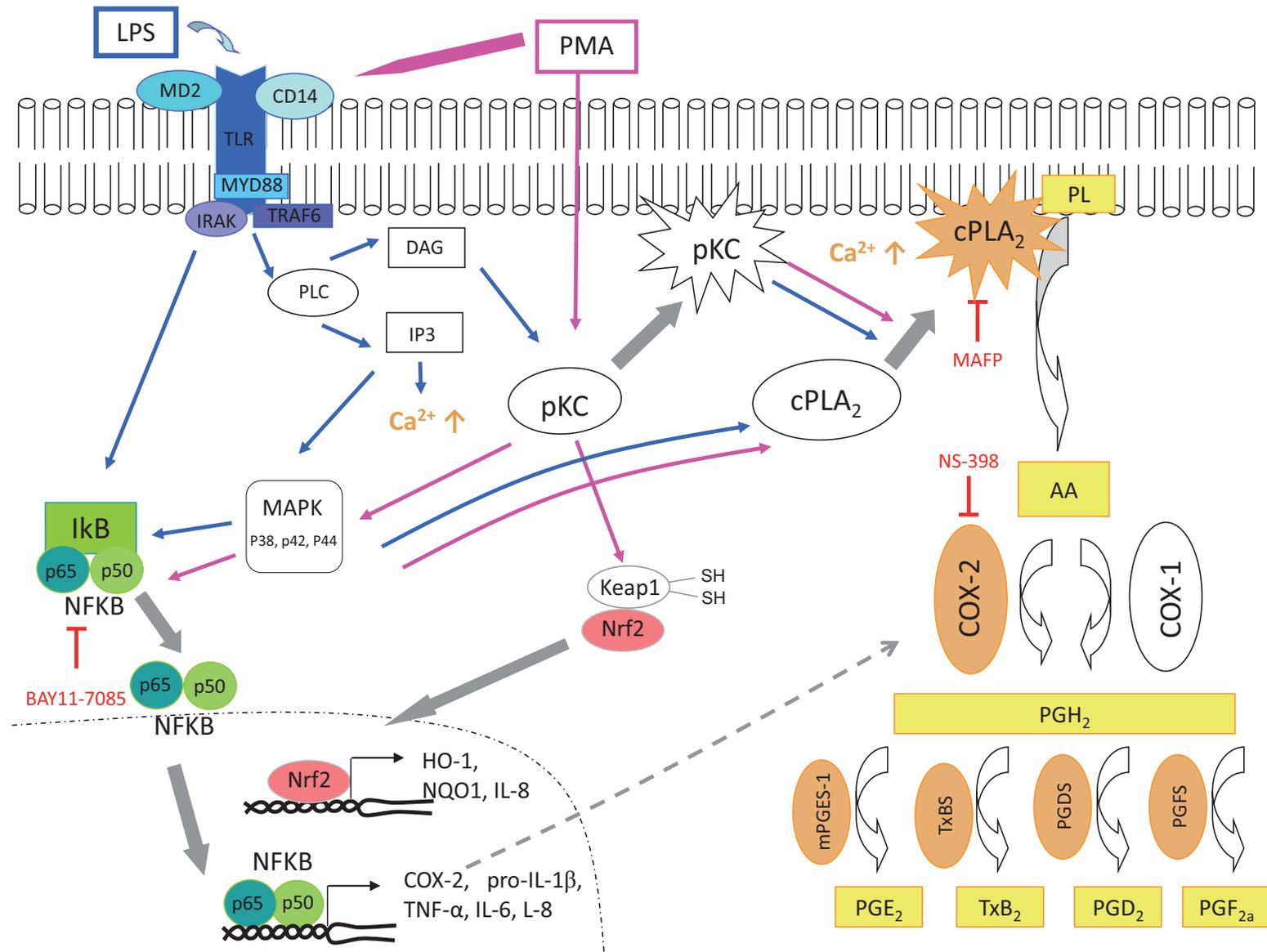
Figure 44 : Schéma de synthèse des effets du PMA et du LPS sur l'activation des facteurs de transcription NF-κB et Nrf2 ainsi que sur la synthèse de médiateurs inflammatoires (prostaglandines, cytokines, chimiokines) par les U937.

Le PMA (flèches roses) via l'activation de la PKC induit 1) la translocation de la cPLA<sub>2</sub> à la membrane, 2) l'activation de Nrf2 et 3) participe à l'activation de NF-κB via l'induction des MAPK. Au-delà, il induit l'expression de CD14 nécessaire à la réponse du LPS.

Le LPS (flèches bleues) induit via TLR4/CD14/MD2, le facteur de transcription NF-κB et la transcription des gènes associés (COX-2, pro-IL-1β, TNF-α...). De plus, le LPS active la phospholipase C (PLC) qui en induisant l'inositol 3 phosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG) conduit respectivement à l'augmentation du calcium intracellulaire (Ca<sup>2+</sup>) et l'activation de la PKC, aboutissant à l'activation de la cPLA<sub>2</sub>. Ainsi, en réponse au PMA et LPS, la cascade métabolique de l'AA se met en place : les phospholipides membranaires (PL) sont hydrolysés en AA sous l'action de la cPLA<sub>2</sub>. L'AA est ensuite métabolisé par la COX-2 en PGH<sub>2</sub> qui est ensuite pris en charge par les différentes synthases (mPGES-1, TxBS, PGDS...) pour donner les prostanoïdes correspondants PGE<sub>2</sub>, TxB<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>...

En rouge sont représentés les principaux inhibiteurs utilisés.

➡ : translocation





En effet, parmi les différentes voies possibles d'activation de Nrf2, les PKC ont été décrites comme ayant un rôle crucial, aussi bien via la phosphorylation de Nrf2 lui-même, entraînant un changement de conformation du complexe Keap1/Nrf2 et la libération consécutive de Nrf2, que via la phosphorylation de ses partenaires (Keap1 et/ou Maf), favorisant ainsi la réponse des cellules au stress oxydant (Huang *et al.*, 2000).

Ainsi, le modèle d'étude U937 PMA/LPS est un modèle dans lequel l'ensemble des voies de signalisation conduisant à la production de médiateurs inflammatoires sont induites. Cette caractérisation nous a permis d'aborder la question de l'effet des sensibilisants sur ces médiateurs.

## **II. Inhibition par les sensibilisants de contact de la production des prostanoïdes par U937 PMA/LPS : une même signature biologique pour des mécanismes d'action variés**

Notre étude portant sur six sensibilisants de référence de potentiel et de mécanismes d'action variés (haptènes vrais, pro et pre-haptènes) a mis en évidence que les sensibilisants, contrairement aux molécules non sensibilisantes testées (acide lactique, glycérol et tween 20) ont la capacité de diminuer significativement la quantité de prostanoïdes produits par les cellules U937 PMA/LPS.

Les prostanoïdes sont décrits pour être sécrétés hors de la cellule par un transport actif médié par les transporteurs MRP (Reid *et al.*, 2003). Nos données montrent qu'une modulation de la sécrétion de PGE<sub>2</sub> par les sensibilisants de contact, si elle a lieu, est insuffisante pour expliquer la diminution de la quantité extracellulaire de PGE<sub>2</sub> et que tous les sensibilisants étudiés inhibent bien la synthèse des prostanoïdes. Cependant, une sécrétion réduite n'est toutefois pas à exclure puisque de nombreux éléments laissent penser que les sensibilisants pourraient être pris en charge directement ou via leur conjugaison au GSH par des transporteurs MRP et pourraient ainsi empêcher par compétition la sécrétion des métabolites de l'AA hors de la cellule. Pour aller dans ce sens, il a récemment été montré *in vitro* à la fois sur kératinocytes normaux humains (NHEK) que sur moDC que les sensibilisants eugénol et isoeugénol sont transportés hors de la cellule par des transporteurs MRP et en particulier le MRP-1 (Skazik *et al.*, 2008; Skazik *et al.*, 2011). De même, il a été décrit que le DNCB en se couplant au GSH est transporté *in vitro* hors de la cellule via MRP-4 (Bai *et al.*, 2004).

D'autre part, nous nous sommes assurés que l'effet inhibiteur des sensibilisants sur la production des prostanoïdes n'est pas dû à l'induction des autres voies métaboliques alternatives de l'AA, notamment la voie 5-LOX et donc à une déviation des métabolites de



l'AA en leucotriènes. En effet, la 5-LOX est absente des U937, même après traitement au PMA/LPS (Kargman *et al.*, 1993) et nous n'avons pas dosé de leucotriène et de 15-HETE après traitement avec des sensibilisants (non montré). Ces résultats n'excluent pas un rôle de la 12-LOX ainsi que des mono-oxygénases sous le contrôle des CYP450 mais nous n'avons pas choisi de nous focaliser sur ces voies.

En conclusion des démonstrations précédentes, nous pouvons affirmer que l'effet inhibiteur des sensibilisants se situe avant tout sur la voie de synthèse COX, même si nous ne pouvons exclure un effet sur la sécrétion des prostanoïdes. Ainsi nous nous sommes focalisés sur l'effet des sensibilisants sur les enzymes clés de ce métabolisme.

La cPLA<sub>2</sub>, enzyme responsable de la mobilisation de l'AA, est composée de neuf résidus cystéine dont certains sont décrits comme essentiels pour l'activité de l'enzyme (Li *et al.*, 1996). Or, les sensibilisants testés et notamment le DNCB ont la capacité de réagir avec les résidus thiols, laissant supposer que les sensibilisants pourraient ainsi interférer avec la libération de l'AA. Toutefois nous n'avons pas réussi à mettre en évidence un effet des sensibilisants sur l'hydrolyse des phospholipides membranaires sous l'action de la cPLA<sub>2</sub> induite dans les U937 par PMA/LPS (fig. 22).

Concernant COX-2, nous avons pu mettre en évidence que l'action de la plupart des sensibilisants se situe au niveau de cette enzyme. Un premier groupe de molécules constitué de l'EUG et du CIN inhibent l'expression de COX-2, à la fois au niveau transcriptionnel et au niveau de la protéine. Ces résultats pour l'EUG sont comparables à ceux rapportés dans la littérature dans des modèles similaires (Li *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007). Toutefois, d'autres études réalisées sur les modèles cellulaires CD34-DC et HaCat rapportent pour le CIN, l'EUG, la PPD et le DNCB une augmentation de l'expression de COX-2 (Moeller *et al.*, 2008; Lambrechts *et al.*, 2010). Ainsi, il apparaît qu'en fonction de l'état inflammatoire des modèles les effets des sensibilisants semblent différents.

Pour tous les composés phénoliques du set de sensibilisants étudiés (PG, HQ, EUG) nous avons montré, en utilisant un test enzymatique biochimique, qu'ils inhibent l'activité de COX-2. En effet, les molécules phénoliques sont connues pour inhiber l'activité de COX-2 en « quenchant » les radicaux intermédiaires nécessaires à l'enzyme (Kulmacz and Lands, 1983; Hsuanyu and Dunford, 1992b). De plus, Thompson et Eling (1989) ont montré que l'EUG exerce une compétition avec l'AA pour l'accès au site actif cyclooxygénase de l'enzyme (Thompson and Eling, 1989). Même si ces résultats restent à confirmer dans le modèle cellulaire U937 PMA/LPS on peut penser que pour ces molécules l'inhibition de la production de la PGE<sub>2</sub> passe par une inhibition de l'activité de COX-2. Dans notre système enzymatique le CIN n'a pas été détecté comme un inhibiteur de COX, pourtant il a été décrit comme tel dans un autre modèle expérimental, probablement plus sensible (Huss *et al.*, 2002).



Concernant le DNCB, nous avons montré que la molécule ne modifie ni la cPLA<sub>2</sub> ni la COX-2. Ainsi, l'action du DNCB sur la diminution de la production de PGE<sub>2</sub> doit très probablement se situer en aval de COX-2, au niveau des différentes synthèses, puisqu'au-delà de PGE<sub>2</sub> nous avons pu montrer que les productions de l'ensemble des métabolites de COX-2 (Article fig. 3) sont également significativement diminuées par le DNCB ainsi que par les autres sensibilisants testés. Il a été rapporté que la PGD synthase et la mPGES-1 utilisent le glutathion comme co-facteur indispensable à leurs activités (Jowsey *et al.*, 2001; Thoren *et al.*, 2003) et que la mPGES-1 possède dans son site actif des résidus Cys importants pour son activité (Thoren *et al.*, 2003). Ainsi, à défaut d'avoir pu étudier l'inhibition des synthèses par le DNCB, nous avons cherché à mieux caractériser la réactivité du DNCB vis-à-vis du GSH et des thiols et nous avons ainsi montré que 1) le DNCB déplete rapidement la quantité de GSH intracellulaire des cellules U937 PMA/LPS (fig. 32) et 2) l'effet inhibiteur du DNCB est thiol-dépendant (fig. 33). D'autre part, dans le test DPRA, le DNCB réagit fortement sur le peptide Cys (quasiment 100% de déplétion). Ainsi, de façon indirecte nous avons des éléments renforçant l'hypothèse d'une inhibition des synthèses par le DNCB. Cette inhibition reste cependant à être démontrée de façon formelle.

Dans le cas de la PPD, une interférence de la molécule avec le système de détection du test biochimique d'activité de la COX-2 (*i.e.* oxydation directe du substrat par la PPD) ne nous a pas permis de conclure sur un éventuel effet inhibiteur de la molécule au niveau de l'activité de COX-2. Cependant, les amines aromatiques sont connues pour inhiber l'activité de cette enzyme (Hsuanyu and Dunford, 1992a), et par ailleurs d'autres éléments expérimentaux nous font pencher vers cette hypothèse d'action pour la PPD : 1) les effets différentiels de la PPD sur la production de PGE<sub>2</sub> selon que le sensibilisant est administré avant ou après le PMA/LPS (effets similaires à ceux de l'HQ : pas de diminution de la PGE<sub>2</sub> quand les cellules sont prétraitées avec le sensibilisant et diminution de la PGE<sub>2</sub> lorsque le sensibilisant est administré en même temps ou après le PMA/LPS) suggèrent que l'inhibition de la PPD se situe une fois que le métabolisme COX-2 est établi, très probablement au niveau des activités enzymatiques ; 2) comme la PPD ne diminue pas la quantité de GSH dans les cellules U937 PMA/LPS ou seulement tardivement, on peut penser que la PPD inhibe plus probablement l'activité de COX-2.

Malgré nos premières hypothèses, un effet commun à tous les sensibilisants testés au niveau des synthèses dû à leurs capacités à modifier la balance GSH/GSSG n'a pas été vérifié dans le modèle U937 PMA/LPS. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'effet des sensibilisants sur la balance redox en décrivant la diminution du GSH, puisque quelle que soit la condition testée nous n'avons pas mis en évidence de GSSG. Ce résultat



peut s'expliquer par le fait que le GSSG formé peut être soit réduit par une glutathion réductase (GSR) en GSH soit éliminé de la cellule par des transporteurs.

Ainsi, parmi les six sensibilisants étudiés seuls le DNCB, le CIN et l'EUG déplètent la quantité intracellulaire de GSH dans les U937 PMA/LPS (fig. 32). Le DNCB et le CIN, en tant qu'haptènes vrais n'ont pas besoin de transformations chimiques pour être réactifs, ce qui explique leur action rapide sur le glutathion (entre 1h et 4h). L'EUG, bien que pro-haptène, réagit sur le GSH probablement en raison de la forte dose à laquelle il est étudié (1 mM). Dans le cas des pré-haptènes qui doivent être oxydés pour être réactifs, à savoir la PPD, l'HQ et le PG, aucune diminution significative de la quantité de GSH n'est observée, même après 24h de traitement (non montré). Cette absence d'effet pourrait s'expliquer par le fait que les enzymes de détoxification de ces molécules (NAT-1, SULT, GST et UGT...), exprimées et fonctionnelles dans les U937 (Kelly and Sim, 1991; Minafra *et al.*, 2011), prennent en charge les molécules avant qu'elles ne puissent réagir.

En conclusion de l'étude des mécanismes d'action des sensibilisants, l'inhibition de la production des prostanoïdes par les sensibilisants de contact semble être la résultante d'un ensemble d'effets différents pour chaque sensibilisant et pas forcément spécifiques (fig. 45). Toutefois, puisque tous les sensibilisants étudiés inhibent la production de PGE<sub>2</sub> induite par PMA/LPS mais n'empêchent pas nécessairement les effets du PMA/LPS sur la mise en place de la voie métabolique COX-2, on peut conclure que les effets les plus déterminants et les plus récurrents semblent se situer au niveau des activités enzymatiques de COX-2 et/ou des synthèses.



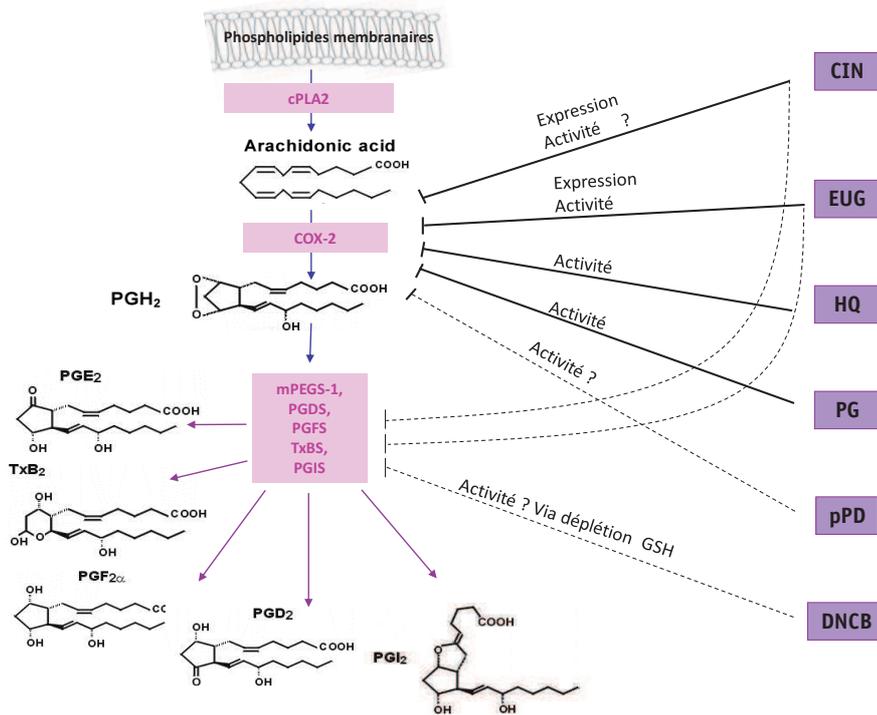


Figure 45 : Schéma de synthèse des effets des sensibilisants (CIN, EUG, HQ, PG, PPD et DNCB) sur le métabolisme COX-2 de l'acide arachidonique conduisant à l'inhibition de la PGE<sub>2</sub> produite par les cellules U937 PMA/LPS

Les lignes en pointillé représentent les mécanismes supposés/hypothétiques et les lignes continues les mécanismes démontrés. On distingue trois profils d'inhibition (non exclusifs):

- Inhibition de l'expression de COX-2 (EUG, CIN)
- Inhibition de l'activité enzymatique de COX-2 (démontrée dans un système enzymatique acellulaire, à confirmer dans U937 PMA/LPS) (EUG, HQ, PG et probablement PPD)
- Inhibition de l'activité des isomérases via la capacité à dépléter le GSH et d'interagir avec les résidus thiols (DNCB et probablement EUG et CIN)



### **III. Effet des sensibilisants sur l'équilibre des voies de signalisation sous le contrôle des facteurs de transcription Nrf2 et NF- $\kappa$ B dans le modèle U937 PMA/LPS**

Parmi les sensibilisants testés, nous avons pu mettre en évidence que le CIN, l'EUG et le DNCB semblent inhiber NF- $\kappa$ B. Tandis que le DNCB empêche la dégradation d'I $\kappa$ B- $\alpha$  induite par PMA/LPS, le CIN et l'EUG inhibent de façon comparable au BAY11-7085 et au DNCB un certain nombre de protéines sous le contrôle de NF- $\kappa$ B (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ...) mais n'ont pas montré d'effet inhibiteur sur la dégradation d'I $\kappa$ B- $\alpha$ . Ainsi, dans le cas du CIN et de l'EUG, on peut penser que soit ces deux molécules inhibent la dégradation d'I $\kappa$ B- $\alpha$  mais dans une cinétique différente de celle du BAY11-7085 et du DNCB, soit leurs effets inhibiteurs se situent plutôt au niveau des sous-unités p50 et/ou p65 de NF- $\kappa$ B. Enfin nous pouvons également émettre l'hypothèse que ces deux molécules activent la voie p105 de NF- $\kappa$ B conduisant à la régulation négative de la transcription des gènes cibles (Beinke and Ley, 2004). Quels que soient les modes d'action de ces deux sensibilisants, des essais mesurant l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B (par ex. étude de retard sur gel ou EMSA) permettraient de statuer sur leurs effets sur NF- $\kappa$ B.

Le profil inhibiteur sur NF- $\kappa$ B du CIN va dans le sens des résultats de Youn et collaborateurs (2008) qui ont montré, dans la lignée murine de macrophages RAW264.7, que le CIN supprime l'activation de NF- $\kappa$ B par le LPS et par conséquent l'expression des gènes cibles tels COX-2, en réagissant avec les groupements thiols du récepteur TLR4 et en empêchant son oligomérisation (Youn *et al.*, 2008). De même, dans d'autres systèmes, les effets de l'EUG sur des cibles NF- $\kappa$ B et du DNCB sur l'inhibition NF- $\kappa$ B via I $\kappa$ B ont déjà été décrits (Kim *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Ade *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007).

Des interrelations complexes semblent exister entre les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et Nrf2 et leurs voies de signalisation respectives. Récemment, il a été rapporté que la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B réprime Nrf2 au niveau de son activité transcriptionnelle. En effet, les deux facteurs de transcription sont en compétition pour un même co-activateur la « transcription co-activator CREB binding protein » (CBP) et que NF- $\kappa$ B est capable de recruter l'histone déacétylase 3 (HDAC3) entraînant une hypoacétylation locale qui empêche l'expression des gènes cibles de Nrf2 (Liu *et al.*, 2008a). A l'inverse, de nombreuses études ont également décrit les effets inhibiteurs de Nrf2 sur NF- $\kappa$ B, montrant une forte corrélation entre la capacité de certaines molécules (triterpénoïdes, sulforaphane, curcumin...) à induire Nrf2 et leurs propriétés anti-inflammatoires (inhibition de l'expression de COX-2 et iNOS



induites par le LPS dans des macrophages). L'absence de ces effets anti-inflammatoires dans des cellules Nrf2<sup>-/-</sup> suggère que l'induction de Nrf2 entraîne une inhibition de NF-κB (Dinkova-Kostova *et al.*, 2005; Woo and Kwon, 2007; Lin *et al.*, 2008a; Liu *et al.*, 2008b; Rushworth *et al.*, 2008). Les mécanismes de cette inhibition sont encore mal connus mais il semblerait que la protéine HO-1 induite par Nrf2 ait un effet inhibiteur sur l'activation et la translocation de NF-κB au noyau, empêchant ainsi la transcription des gènes cibles (Xu *et al.*, 2005).

Comme nous avons pu le démontrer, dans notre système, les facteurs de transcription Nrf2 et NF-κB sont induits par PMA/LPS. Ainsi les deux voies de signalisation co-existent dans une sorte d'équilibre, voire de contrôle inhibiteur réciproque puisqu'on note une augmentation marquée (x 16) de la production d'IL-8, en partie sous le contrôle de Nrf2 (Zhang *et al.*, 2005; Gruber *et al.*, 2010), lorsque l'inhibiteur de NF-κB, BAY11-7085, est ajouté au système U937 PMA/LPS (fig. 38). D'autre part, nous avons pu montrer que dans notre modèle, le sulforaphane, activateur de Nrf2, diminue la quantité de PGE<sub>2</sub> produite par les U937 PMA/LPS via une inhibition de l'expression de COX-2. Ainsi, nous avons souhaité évaluer si de façon comparable au SFN, l'inhibition de l'expression de COX-2 par le CIN et l'EUG pouvait s'expliquer par une augmentation de l'activité transcriptionnelle de Nrf2.

L'étude de l'activité de Nrf2 a été menée au travers de l'expression au niveau ARNm de deux gènes cibles, *nqo1* et *ho-1* ainsi qu'au travers du dosage de la protéine IL-8. Nous avons observé que tous les sensibilisants, mis à part le DNCB, induisent l'expression d'*ho-1* dans les cellules U937 PMA/LPS, mais que seulement le CIN induit *nqo1* de manière significative (fig. 37). Toutefois, comme Nrf2 n'est pas le seul facteur de transcription contrôlant HO-1, et qu'AP-1, HSF ou encore NF-κB ont été décrits pour réguler l'expression du gène (Alam and Cook, 2003), il est difficile de conclure sur la base de ce seul gène à une suractivation de la voie de signalisation dépendante de Nrf2 par les sensibilisants de contact dans les cellules U937 déjà activées par cette voie par PMA/LPS. Concernant la production d'IL-8, parmi les sensibilisants testés, seuls le DNCB et l'EUG augmentent la quantité d'IL-8 produite par les U937 PMA/LPS : tandis que le DNCB présente une induction modérée (x 2), l'EUG induit très fortement (x 13) l'expression d'IL-8, de façon comparable au BAY11-7085. La figure 46 synthétise les effets des différentes molécules testées sur les voies dépendantes de Nrf2 et NF-κB.



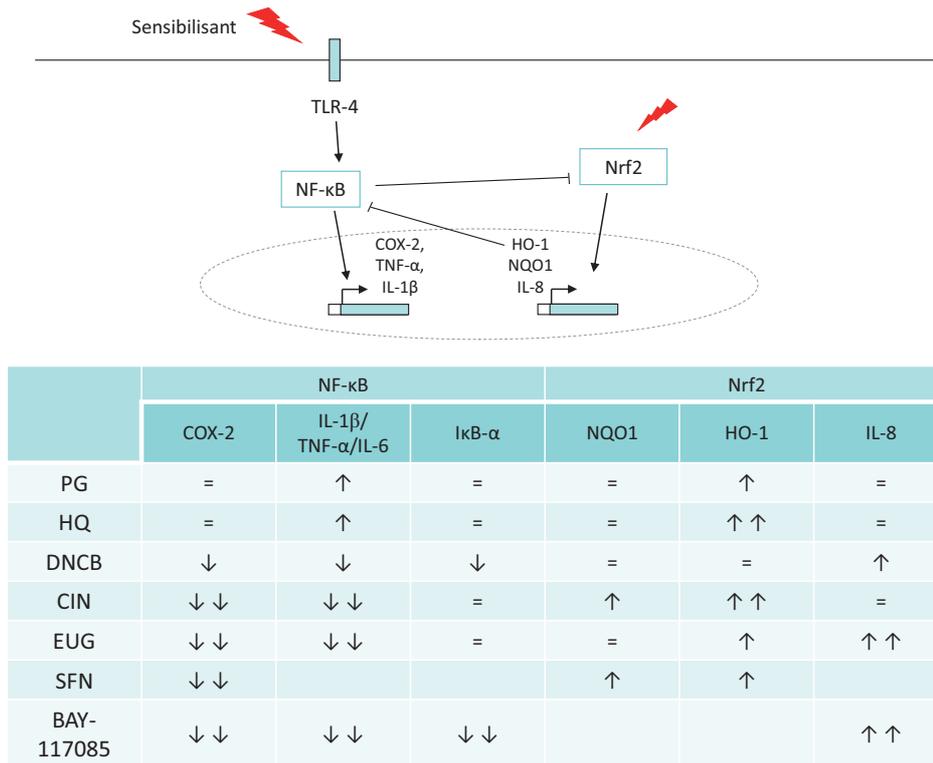


Figure 46 : Schéma de synthèse des interrelation entre Nrf2 et NF-κB et tableau récapitulatif des effets des molécules testées sur chacune des deux voies de signalisation.

Les effets des molécules sont données en variations comparativement à la condition U937 PMA/LPS.

↑ : induction

↓ : diminution

= pas de variation significative



Ainsi, contrairement à ce que nous avons pu observer avec le sulforaphane, l'inhibition de l'expression de COX-2 par le CIN et l'EUG via l'inhibition de NF- $\kappa$ B ne peut donc pas être uniquement expliquée par une suractivation de la voie Nrf2 (fig. 46). En outre, puisque dans notre système, les effets de Nrf2 sur NF- $\kappa$ B ne sont pas si simples à appréhender et un travail en cours, utilisant des cellules *silencées* pour Nrf2, devrait permettre de mieux caractériser l'implication de l'activation de Nrf2 sur la voie NF- $\kappa$ B.

#### **IV. Le test PGE<sub>2</sub>, performance et positionnement**

Sur la base de la preuve de concept menée sur six sensibilisants et trois irritants montrant que tous les sensibilisants diminuent significativement et spécifiquement la quantité de PGE<sub>2</sub> produite par les cellules U937 PMA/LPS nous avons souhaité évaluer si le paramètre « inhibition de la production de PGE<sub>2</sub> » pouvait constituer un test robuste de prédiction de l'HSRC. Comme détaillé en introduction, l'industrie cosmétique doit en effet garantir l'innocuité de ses ingrédients et se trouve dans l'obligation de développer des tests alternatifs aux tests sur animaux, au moins tout aussi prédictifs. D'autres tests sont déjà disponibles, relativement avancés dans leur validation et dans ce contexte, au-delà des performances propres du test PGE<sub>2</sub>, il convient d'évaluer le positionnement du test PGE<sub>2</sub> par rapport à ces autres tests (DPRA, MUSST, Nrf2-HTS) pour identifier une éventuelle valeur ajoutée du test PGE<sub>2</sub> pour l'évaluation de la sécurité des matières premières cosmétiques.

Dans le cadre de ce travail nous avons mis au point et déterminé le protocole standardisé du test PGE<sub>2</sub>, dont le principe est de mesurer après 24h d'incubation l'effet d'une molécule donnée sur la production de PGE<sub>2</sub> par les cellules U937 PMA/LPS. Dans ce test, une molécule est classée sensibilisante si elle diminue la quantité de PGE<sub>2</sub> produite de plus de 60% ( $IR_{\min} \leq 40\%$ ) de façon dose dépendante ou bien à toutes les doses testées. Ainsi, sur cette base, nous avons pu montrer que le test PGE<sub>2</sub> présente de bonnes performances prédictives générales et notamment dans sa capacité à détecter des sensibilisants (sensibilité de 81%). Si l'on décompose les performances du test en fonction du set de molécules (molécules de référence *versus* molécules cosmétiques) on remarque que les prédictions du test PGE<sub>2</sub> sont meilleures pour les molécules cosmétiques que pour les molécules de référence (81% de concordance générale pour le set de molécules cosmétique contre 73% pour les molécules de référence) (analyses non montrées mais données en annexe 1). Cette différence semble s'expliquer par l'importante proportion au sein de ce set de colorants d'oxydation (58 molécules) qui sont très bien prédits par le test PGE<sub>2</sub>. A l'inverse, on observe que les conservateurs (18 molécules) sont relativement mal prédits par



le test PGE<sub>2</sub> avec notamment des faux négatifs (glyoxal, glutaraldéhyde, formaldéhyde, MCI, p-méthylaminophénol sulfate).

Au sein des faux positifs, parmi les 9 autres molécules de référence classées non sensibilisantes par le LLNA et qui inhibent PGE<sub>2</sub> (acide salicylique, hexane, éthylvaniline, SDS, furil, hydrocortisone, coumarin et 6-méthylcoumarin, propylparabène), il apparaît que l'hydrocortisone, le propylparabène et le coumarin seraient en fait bien classées par le test PGE<sub>2</sub> par rapport à l'homme puisque des cas cliniques ont été rapportés sur ces molécules (Schlede *et al.*, 2003; Schnuch *et al.*, 2007). Le test PGE<sub>2</sub> reste toutefois moins spécifique que sensible puisque l'on sait que toutes les molécules anti-inflammatoires connues pour inhiber l'activité de l'enzyme COX-2 (inhibiteurs pharmacologiques : NS-398, indométacine et/ou AINS : paracétamol, aspirine, ibuprofène) ou les corticoïdes, sont prédites sensibilisantes par le test PGE<sub>2</sub> alors que tel n'est pas nécessairement le cas. Dans le cas de certaines de ces molécules, nous avons pu identifier que l'évaluation des marqueurs TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  en complément de PGE<sub>2</sub> pourrait permettre de nuancer l'alerte sensibilisante donnée par l'inhibition de la production de PGE<sub>2</sub>. Cette hypothèse doit cependant être validée sur un set plus important de molécules.

Ainsi, l'analyse statistique nous a permis de montrer que le paramètre « inhibition de la production de PGE<sub>2</sub> » corrèle bien avec le caractère sensibilisant de molécules. En revanche ce paramètre n'a pu être corrélé au potentiel sensibilisant des molécules que ce soit au niveau de l'intensité d'inhibition ou de l'EC(40).

Dans une dernière étape notre objectif était de positionner le « test PGE<sub>2</sub> » (*i.e.* inhibition de PGE<sub>2</sub>) au sein de la batterie de tests utilisés chez L'Oréal pour prédire le potentiel sensibilisant de molécules (*i.e.* DPRA, Nrf-2-HTS et MUSST). Pour ce faire nous disposons de deux types d'éléments : des éléments mécanistiques visant à étudier au sein des systèmes biologiques les liens entre les différents marqueurs mis en jeu dans les tests et d'autre part, des éléments statistiques permettant de corrélérer les marqueurs entre eux sur la base de données générées sur un grand nombre de molécules (160).

### A) PGE<sub>2</sub> et CD86

Dans une récente étude menée sur des CD34-DC, Lambrechts et collaborateurs (2010) ont identifié que les sensibilisants induisent l'expression de l'enzyme COX-2 et ont pu montrer que l'expression de la molécule de co-stimulation CD86 induite par le DNFB est diminuée par l'inhibition de l'activité COX-2 (Lambrechts *et al.*, 2010; Lambrechts *et al.*, 2011). Contrairement aux résultats de cette équipe, lorsque les cellules U937 sont traitées avec des sensibilisants, nous n'avons pas mis en évidence d'induction de COX-2, alors que



l'expression du CD86 est augmenté (non montré). De même, l'induction du CD86 dans les U937 suite à un traitement par des sensibilisants (PPD, TNBS) ou par le cocktail PMA/LPS n'est pas diminuée par le NS-398, l'inhibiteur de COX-2 (non montré). Ainsi, dans notre système, la voie COX-2/PGE<sub>2</sub> ne semble pas impliquée dans l'induction du CD86 et l'on peut donc penser que les deux marqueurs ne sont pas redondants. Au travers de l'étude statistique nous avons pu confirmer que les deux paramètres « augmentation du CD86 » et « inhibition de PGE<sub>2</sub> » n'ont pas de lien puisque dans plus de 50% des cas où PGE<sub>2</sub> classe mal une molécule (comparativement au LLNA), le test MUSST la prédit bien. En d'autres termes, les deux tests ne se trompent pas de la même façon et en ce sens, on peut penser qu'ils sont complémentaires.

Les deux tests PGE<sub>2</sub> et MUSST qui sont effectués sur la même lignée peuvent aisément être menés en parallèle. Ainsi la combinaison de ces deux tests permettrait dans les cas où le test MUSST ne prédit pas, d'augmenter le nombre de molécules prédites et dans les cas où les deux tests prédisent de la même façon d'apporter un indice de confiance supplémentaire à la prédiction. Sur la base des 160 molécules évaluées, il apparaît que pour les 30 molécules où les deux tests MUSST et PGE<sub>2</sub> divergent, dans 60% des cas (18/30) le test MUSST prédit correctement le LLNA. Ainsi, en adoptant les règles suivantes :

- lorsque les deux tests prédisent une molécule S (respectivement NS), la molécule est classée S (respectivement NS)
- lorsque les deux tests divergent, la molécule est classée selon la prédiction du test MUSST
- lorsque le test MUSST ne prédit pas, la molécule est classée selon la prédiction du test PGE<sub>2</sub>

il apparaît qu'une combinaison des deux tests donne de bonnes performances sur les 160 molécules (100% des MP), avec des prédictions pour l'ensemble du set, une concordance générale de 80%, une sensibilité de 87,5% et une spécificité de 70%.

### B) PGE<sub>2</sub> et Nrf2

Comme déjà rapporté, de nombreuses études établissent un lien entre l'activation du facteur de transcription Nrf2 et l'inhibition de l'expression de COX-2 (Dinkova-Kostova *et al.*, 2005; Woo and Kwon, 2007; Lin *et al.*, 2008a; Liu *et al.*, 2008b; Rushworth *et al.*, 2008). Dans notre modèle les liens entre les deux marqueurs ont difficilement pu être interprétés (voir chapitre précédent). Ainsi il ne nous a pas été possible d'étudier les liens précis entre ces deux marqueurs mais comme déjà évoqué un travail sur des U937 *silencées* pour Nrf2 devrait nous permettre de préciser si l'inhibition de la production de PGE<sub>2</sub> par les sensibilisants de contact est dépendante de l'activation de Nrf2. Lorsque l'on compare les



prédictions données par chacun des tests (DPRA, Nrf-2-HTS, MUSST) à celles données par le test PGE<sub>2</sub>, il apparaît que le test Nrf2-HTS est celui qui montre le plus de divergences. De ce fait on peut conclure que les deux marqueurs mis en jeu dans les deux tests semblent relativement indépendants.

### C) PGE<sub>2</sub> et DPRA

Une analyse comparative des résultats du test PGE<sub>2</sub> avec ceux de la réactivité des molécules sur le peptide Cys du test DPRA montre que 50% des molécules classées S en PGE<sub>2</sub> déplètent le peptide Cys à plus de 80% et que 50% des molécules classées NS par le test PGE<sub>2</sub> déplètent à moins de 2% le peptide Cys (fig. 43). Au-delà nous avons pu remarquer que lorsque la molécule à tester est un accepteur de Michael l'ensemble des tests et en particulier le DPRA et PGE<sub>2</sub> donnent la plupart du temps des prédictions comparables. Ces résultats renforcent l'idée que la capacité des molécules à inhiber la production de PGE<sub>2</sub> est indirectement liée à la réactivité des molécules sur les résidus Cys des protéines de la cellule et ces résultats vont dans le sens de ce que nous avons pu mettre en évidence dans notre étude mécanistique sur la cascade de l'AA, puisque de nombreuses enzymes cruciales dans le métabolisme ont une activité dépendante de la cystéine. Pour autant, certains sensibilisants ayant une réactivité préférentielle vis-à-vis de la Lys comme le résorcinol [Taux de Déplétion du peptide Cys (TDcys) : 0.9% ; Taux de Déplétion du peptide Lys (TDLys : 22%)] et le 2-méthyl-3-phenyl-2-propanal (TDcys : 10 % ; TDlys : 28%) peuvent être bien prédites par le test PGE<sub>2</sub>.

Si l'on détaille les cas de figure où les résultats du test PGE<sub>2</sub> divergent avec la prédiction donnée par combinaison des autres tests *in vitro* (tableau 11), on note dans la plupart des cas qu'il s'agit de faux positifs en PGE<sub>2</sub> par rapport au LLNA, et notamment pour des molécules comme l'éthylvaniline ou le 6-méthylcoumarine ou encore l'acide salicylique qui possèdent une structure avec des groupements phénols et une forte probabilité d'être inhibitrice de l'activité de COX-2. D'autre part, l'hydrocortisone, un corticoïde bien décrit, qui inhibe PGE<sub>2</sub> du fait de son activité anti-inflammatoire via l'inhibition de NF-κB, est de ce fait classée S par le test PGE<sub>2</sub> tandis que les autres tests la classent NS, y compris le test LLNA. Contrairement aux molécules citées précédemment, il s'agirait dans ce cas d'un faux négatif des autres tests car de nombreux cas cliniques ont été rapportés et confirment le potentiel sensibilisant de l'hydrocortisone. Dans le cas de la diéthylentriamine, du trimellitic anhydride et du benzyl benzoate, le test PGE<sub>2</sub>, qui, contrairement aux autres tests, classe ces trois molécules S, donne une prédiction comparable au LLNA.



En conclusion, la comparaison du test PGE<sub>2</sub> avec chacun des autres tests suggère une certaine complémentarité avec le test MUSST et le test Nrf2-HTS mais il apparaît toutefois une redondance avec le test DPRA et notamment la déplétion du peptide Cys. Au-delà des aspects statistiques, il est également important de considérer dans la construction d'une batterie le critère du domaine d'application de chacun des tests ainsi que des critères de faisabilité. En ce sens, le test PGE<sub>2</sub> peut représenter un intérêt puisqu'il s'agit d'un test relativement facile à mettre en œuvre qui conclut sur toutes les molécules testées, contrairement aux autres tests qui présentent des cas « non concluants ». L'ensemble de ces éléments met donc en évidence qu'une combinaison des tests permettrait d'améliorer les performances de prédictions (sensibilité, spécificité...), de disposer de meilleurs indices de confiance dans les prédictions et probablement de couvrir une plus large gamme de matières premières. Le travail en cours au sein du groupe L'Oréal permettra de déterminer la batterie optimale de tests afin d'assurer les meilleures prédictions.

**Tableau 11 : Tableau comparatif des prédictions des tests PGE<sub>2</sub>, MUSST, DPRA, Nrf2 et LLNA**

Représentation de 9 cas de molécules de référence classées sensibilisantes par le test PGE<sub>2</sub> et classées différemment par la combinaison des 3 autres tests in vitro (MUSST, DPRA et Nrf2). Pour chaque molécule la catégorie de réactivité donnée par l'outil in silico « Troxtree » est indiquée.

Abréviations :

S : sensibilisant

NS : non sensibilisant

INC : pas de conclusion

Test molécule	Classe de Réactivité (Toxtree)	PGE2	MUSST	DPRA	NRF2	LLNA
Acide salicylique	No binding	S	NS	INC	NS	NS
Hydrocortisone	Schiff base formation	S	NS	S	NS	NS
Etylvaniline	Schiff base formation	S	INC	NS	S	NS
Coumarin	Michael Acceptor	S	NS	NS	S	NS
6-methylcoumarine	Michael Acceptor	S	INC	NS	S	NS
Hexane	No binding	S	NS	NS	NS	NS
Diethylenetriamine	Schiff base formation	S	NS	NS	NS	S
Trimellitic anhydride	Acyl Transfer agent	S	NS	NS	NS	S
Benzyl benzoate	Acyl Transfer agent	S	INC	NS	NS	S



## V. Interprétation biologique de l'inhibition de la production de PGE<sub>2</sub> par les sensibilisants de contact

Malgré les diversités de mécanismes par lesquels les sensibilisants interagissent sur le métabolisme de l'acide arachidonique, nous avons montré que la plupart des sensibilisants ont la capacité d'inhiber la formation des métabolites de COX produits par U937 PMA/LPS. Cette propriété des sensibilisants, mise en évidence de façon empirique dans le système U937 PMA/LPS, n'avait jusqu'alors pas été décrite et semble être une conséquence de la capacité des molécules à réagir avec des résidus thiols (cystéines, GSH) inhibant ainsi l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique (cPLA<sub>2</sub>, COX-2 et les synthases) dépendantes du statut redox de la cellule pour leur fonctionnement (Rouzer *et al.*, 1982; Li *et al.*, 2003). Toutefois, le modèle biologique utilisé est relativement artificiel, puisque les cellules U937 sont traitées simultanément avec le sensibilisant et un cocktail induisant l'activation de voies de signalisations normalement non induites dans un état homéostatique. Il n'en demeure pas moins que l'inhibition de la production de PGE<sub>2</sub> par les sensibilisants de contact est un bon test de prédiction du caractère sensibilisant de molécules. Au-delà des performances, nous nous sommes intéressés à comprendre la significativité biologique d'une telle signature et en particulier de préciser comment ce marqueur peut être interprété par rapport aux événements biologiques de l'HSRC. Dans ce chapitre nous discuterons dans un premier temps les liens éventuels entre la signature d'une molécule donnée sur les différents médiateurs PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  dans le système U937 PMA/LPS et son potentiel sensibilisant pour ensuite aborder le rôle des PGE<sub>2</sub> dans la régulation de la réponse spécifique à un sensibilisant.

L'étude mécanistique sur un nombre restreint de sensibilisants a pu mettre en évidence que les sensibilisants les plus faibles du set, le CIN et l'EUG sensibilisants respectivement modéré et faible, sont ceux qui au-delà du marqueur PGE<sub>2</sub>, inhibent également la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ . A l'inverse, la PPD et l'HQ, deux sensibilisants forts, augmentent la quantité de TNF- $\alpha$  produite. Cette corrélation apparente entre le potentiel sensibilisant des molécules et leur capacité à augmenter ou diminuer la production de médiateurs inflammatoires ne semble pas avoir été confirmée dans l'étude statistique sur un nombre plus large de sensibilisants, à contrario, nous avons pu observer de façon intéressante que parmi les molécules qui diminuent significativement les trois marqueurs PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  on ne trouve que des molécules non sensibilisantes ou sensibilisantes faibles/modérées. Ainsi, l'évaluation des paramètres TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  en complément du test PGE<sub>2</sub> permettrait de nuancer l'alerte sensibilisant sur une molécule



donnée. Lass et collaborateurs (2008) avaient également émis cette hypothèse dans une récente étude sur l'Arnica et les sesquiterpènes lactones, montrant que leurs effets anti-inflammatoires sont en lien direct avec leur faible potentiel sensibilisant (Lass *et al.*, 2008).

Comme rappelé en introduction, peu d'éléments sont rapportés dans la littérature permettant d'établir un lien entre la voie de signalisation de PGE<sub>2</sub> et la sensibilisation de contact. De plus, même si nous avons montré que la signature des sensibilisants n'est pas restreinte au modèle U937 et se retrouve dans des modèles de cellules primaires plus physiologiques, il est important de rappeler que notre modèle reste un système artificiel, mimant des macrophages activés et en ce sens il est difficile d'extrapoler les résultats obtenus sur le métabolisme de l'acide arachidonique à d'éventuels mécanismes de l'allergie de contact. En revanche, notre modèle permet de mettre en évidence des propriétés biochimiques des sensibilisants qui sont plutôt à considérer dans un contexte restreint, celui d'une situation inflammatoire locale.

PGE<sub>2</sub> est décrit pour avoir un rôle important au cours des différentes étapes de l'HSRC. Tout d'abord, PGE<sub>2</sub> contribue à la maturation des DC dans les phases initiales de maturation en augmentant l'expression de molécules de co-stimulation (CD83, CD80, CD86, OX40L, CD70...) (Kabashima *et al.*, 2003; Krause *et al.*, 2007; Krause *et al.*, 2009) et d'autre part il favorise leur migration (Kabashima *et al.*, 2003; Scandella *et al.*, 2004). En effet, Kabashima et collaborateurs (2003) ont pu montrer que des souris déficientes pour les récepteurs EP4 à la prostaglandine E<sub>2</sub> présentent une réaction d'HSRC au DNFB diminuée par rapport à des souris sauvages ou à des souris traitées pendant la phase de sensibilisation avec un agoniste d'EP4. Nos résultats obtenus sur U937 PMA/LPS ne peuvent toutefois pas s'interpréter au regard de ces propriétés de PGE<sub>2</sub> puisqu'il s'agit ici de la réponse de la peau en état homéostatique à un stimulus de danger.

D'autre part, PGE<sub>2</sub> intervient sur l'orientation du profil de cytokines produites par les DC, déterminant ainsi l'orientation de la réponse immunitaire. De façon plus précise on sait que PGE<sub>2</sub> est décrit pour orienter les cytokines produites par les DC vers un profil de type Th2 (IL-4, IL-5) en modulant la balance IL-10/IL-12 (Kapsenberg *et al.*, 1996). Ainsi une inhibition de la production de PGE<sub>2</sub> par les sensibilisants de contact comme nous avons pu le montrer, pourrait moduler la balance IL10/IL12 en faveur de l'IL-12 induisant ainsi une réponse Th1/Tc1, ce qui est cohérent avec le type de cellules effectrices décrites dans l'HSRC (Vocanson *et al.*, 2009). De même, les prostaglandines synthétisées par COX-2 sont associées à une réponse cellulaire plutôt tolérogène. En effet, PGE<sub>2</sub> a été décrite pour favoriser les Treg et pour augmenter leurs propriétés régulatrices (Baratelli *et al.*, 2005b). Comme l'on sait que les Treg ont un effet inhibiteur dans l'allergie de contact (Cavani, 2008), nos résultats démontrant l'inhibition de la voie COX-2 par les sensibilisants de contact irait également dans le sens de l'allergie de contact.



Ainsi PGE<sub>2</sub> semble impliqué tout au long des différents mécanismes de l'allergie de contact tant dans la phase de sensibilisation que dans la phase effectrice, avec des rôles qui diffèrent en fonction du type de sources (type cellulaire), de l'environnement et du type de cellules réceptrices (DC/T). Compte tenu de la complexité de ces mécanismes, il apparaît que le test PGE<sub>2</sub>, permettant de mettre en évidence des propriétés avant tout biochimiques des sensibilisants ne nous permet pas de répondre à la question du rôle de PGE<sub>2</sub> dans l'allergie de contact et de ce fait ne nous permet pas de corréler à nos résultats la dimension de potentiel sensibilisant.



## Conclusion générale

En conclusion, même si l'inhibition de la production de PGE<sub>2</sub> par les sensibilisants de contact demeure d'interprétation complexe au regard des mécanismes biologiques mis en jeu dans l'HSRC, notre étude a néanmoins permis de mettre en évidence un phénomène lié aux propriétés physico-chimiques des sensibilisants et à leur réactivité intrinsèque caractéristique. L'étude fine des mécanismes d'action des sensibilisants a pu montrer de nombreux profils distincts parfois non exclusifs (inhibition de l'expression de COX-2 et/ou inhibition de l'activité de COX-2 et/ou inhibition de l'activité des synthases) conduisant tous à la diminution de PGE<sub>2</sub> et des prostanoïdes en général produits par les cellules U937 PMA/LPS. Cette propriété des sensibilisants confirmée sur un large set de molécules a pu mettre en évidence qu'un test basé sur l'inhibition de la production PGE<sub>2</sub> permet de prédire avec de bonnes performances le caractère sensibilisant des molécules.

Une étude approfondie sur une batterie de tests (DPRA, MUSST, Nrf2 et PGE<sub>2</sub>) a permis de mettre en évidence l'apport d'informations complémentaires par le test PGE<sub>2</sub>. Comme nous avons pu le montrer, le marqueur « inhibition de la PGE<sub>2</sub> » est à la convergence d'un ensemble de signaux, ce qui rend le test robuste puisque quelque soit le mécanisme mis en jeu par le sensibilisant, en évaluant le paramètre « inhibition de la PGE<sub>2</sub> », on a de bonnes chances d'identifier la molécule comme telle ; à l'inverse, comme ce test résume beaucoup de choses, il est moins spécifique et ne présente pas une informativité très forte. Nous avons par ailleurs pu mettre en évidence que le test PGE<sub>2</sub> est relativement proche du test DPRA et notamment les prédictions apportées par le peptide Cys, mais que le test PGE<sub>2</sub> présente des performances inférieures. Toutefois, le test PGE<sub>2</sub> possède un domaine d'application plus large que le DPRA puisqu'il prédit toutes les molécules testées et contrairement au DPRA, il intègre une composante métabolique puisqu'il s'agit d'un test cellulaire. Ainsi sur la base des ces différents critères, il conviendra d'évaluer la valeur ajoutée du test PGE<sub>2</sub> dans une batterie prédictive contenant le test DPRA. Au-delà nous avons pu remarquer que l'évaluation des paramètres TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  en complément du marqueur PGE<sub>2</sub> pouvait présenter un intérêt potentiel permettant de nuancer l'alerte sensibilisante donnée par l'inhibition de PGE<sub>2</sub>. Ces observations, à confirmer sur un set de molécules plus large, pourraient représenter un avantage dans l'évaluation du risque de nouvelles matières premières que l'Oréal voudra développer.



## Bibliographie

1. **Ade,N., Antonios,D., Kerdine-Romer,S., Boisleve,F., Rousset,F. and Pallardy,M.** (2007) *NF-kappaB plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO(4) but not by DNCB.* Toxicol. Sci., 99, 488-501.
2. **Ade,N., Leon,F., Pallardy,M., Peiffer,J.L., Kerdine-Romer,S., Tissier,M.H., Bonnet,P.A., Fabre,I. and Ourlin,J.C.** (2009) *HMOX1 and NQO1 genes are upregulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: role of the Keap1/Nrf2 pathway.* Toxicol. Sci., 107, 451-460.
3. **Ade,N., Martinozzi-Teissier,S., Pallardy,M. and Rousset,F.** (2006) *Activation of U937 cells by contact sensitizers: CD86 expression is independent of apoptosis.* J. Immunotoxicol., 3, 189-197.
4. **Aeby,P., Ashikaga,T., Bessou-Touya,S., Schepky,A., Gerberick,F., Kern,P., Marrec-Fairley,M., Maxwell,G., Ovigne,J.M., Sakaguchi,H., Reisinger,K., Tailhardat,M., Martinozzi-Teissier,S. and Winkler,P.** (2010) *Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa's research and method development program.* Toxicol. In Vitro, 24, 1465-1473.
5. **Aeby,P., Wyss,C., Beck,H., Griem,P., Scheffler,H. and Goebel,C.** (2004) *Characterization of the sensitizing potential of chemicals by in vitro analysis of dendritic cell activation and skin penetration.* J. Invest Dermatol., 122, 1154-1164.
6. **Ahmadi,M., Emery,D.C. and Morgan,D.J.** (2008) *Prevention of both direct and cross-priming of antitumor CD8+ T-cell responses following overproduction of prostaglandin E2 by tumor cells in vivo.* Cancer Res., 68, 7520-7529.
7. **Aiba,S.** (2007) *Dendritic cells: importance in allergy.* Allergol. Int., 56, 201-208.
8. **Aiba,S., Manome,H., Nakagawa,S., Mollah,Z.U., Mizuashi,M., Ohtani,T., Yoshino,Y. and Tagami,H.** (2003) *p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and 2,4-dinitrochlorobenzene.* J. Invest Dermatol., 120, 390-399.
9. **Aiba,S., Manome,H., Yoshino,Y. and Tagami,H.** (2000) *In vitro treatment of human transforming growth factor-beta1-treated monocyte-derived dendritic cells with haptens can induce the phenotypic and functional changes similar to epidermal Langerhans cells in the initiation phase of allergic contact sensitivity reaction.* Immunology, 101, 68-75.
10. **Aiba,S., Terunuma,A., Manome,H. and Tagami,H.** (1997) *Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules.* Eur. J. Immunol., 27, 3031-3038.
11. **Akiba,H., Kehren,J., Ducluzeau,M.T., Krasteva,M., Horand,F., Kaiserlian,D., Kaneko,F. and Nicolas,J.F.** (2002) *Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early*



*recruitment of CD8+ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis.* J. Immunol., 168, 3079-3087.

12. **Alam,J. and Cook,J.L.** (2003) *Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway.* Curr. Pharm. Des, 9, 2499-2511.
13. **Albanesi,C., Cavani,A. and Girolomoni,G.** (1999) *IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha.* J. Immunol., 162, 494-502.
14. **Albanesi,C., Scarponi,C., Cavani,A., Federici,M., Nasorri,F. and Girolomoni,G.** (2000) *Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes.* J. Invest Dermatol., 115, 81-87.
15. **Aleksic,M., Pease,C.K., Basketter,D.A., Panico,M., Morris,H.R. and Dell,A.** (2008) *Mass spectrometric identification of covalent adducts of the skin allergen 2,4-dinitro-1-chlorobenzene and model skin proteins.* Toxicol. In Vitro, 22, 1169-1176.
16. **Anderson,K.V.** (2000) *Toll signaling pathways in the innate immune response.* Curr. Opin. Immunol., 12, 13-19.
17. **Antonios,D., Ade,N., Kerdine-Romer,S., ssaf-Vandecasteele,H., Larange,A., Azouri,H. and Pallardy,M.** (2009) *Metallic haptens induce differential phenotype of human dendritic cells through activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways.* Toxicol. In Vitro., 23, 227-234.
18. **Aptula,A.O., Patlewicz,G. and Roberts,D.W.** (2005) *Skin sensitization: reaction mechanistic applicability domains for structure-activity relationships.* Chem. Res. Toxicol., 18, 1420-1426.
19. **Aptula,A.O. and Roberts,D.W.** (2006) *Mechanistic applicability domains for nonanimal-based prediction of toxicological end points: general principles and application to reactive toxicity.* Chem. Res. Toxicol., 19, 1097-1105.
20. **Arias-Negrete,S., Keller,K. and Chadee,K.** (1995) *Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophages.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 208, 582-589.
21. **Aronica,M.A., Mora,A.L., Mitchell,D.B., Finn,P.W., Johnson,J.E., Sheller,J.R. and Boothby,M.R.** (1999) *Preferential role for NF-kappa B/Rel signaling in the type 1 but not type 2 T cell-dependent immune response in vivo.* J. Immunol., 163, 5116-5124.
22. **Arrighi,J.F., Rebsamen,M., Rousset,F., Kindler,V. and Hauser,C.** (2001) *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., 166, 3837-3845.
23. **Atarashi,K., Mori,T., Yoshiki,R., Kabashima,K., Kuma,H. and Tokura,Y.** (2009) *Skin application of ketoprofen systemically suppresses contact hypersensitivity by inducing CD4(+) CD25(+) regulatory T cells.* J. Dermatol. Sci., 53, 216-221.
24. **Babelova,A., Moreth,K., Tsalastra-Greul,W., Zeng-Brouwers,J., Eickelberg,O., Young,M.F., Bruckner,P., Pfeilschifter,J., Schaefer,R.M., Grone,H.J. and Schaefer,L.** (2009) *Biglycan, a*



*danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors.* J. Biol. Chem., 284, 24035-24048.

25. **Bai,J., Lai,L., Yeo,H.C., Goh,B.C. and Tan,T.M.** (2004) *Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) mediates efflux of bimane-glutathione.* Int. J. Biochem. Cell Biol., 36, 247-257.
26. **Bal,W., Lukszo,J., Jezowska-Bojczuk,M. and Kasprzak,K.S.** (1995) *Interactions of nickel(II) with histones. Stability and solution structure of complexes with CH<sub>3</sub>CO-Cys-Ala-Ile-His-NH<sub>2</sub>, a putative metal binding sequence of histone H3.* Chem. Res. Toxicol., 8, 683-692.
27. **Ball,N., Cagen,S., Carrillo,J.C., Certa,H., Eigler,D., Emter,R., Faulhammer,F., Garcia,C., Graham,C., Haux,C., Kolle,S.N., Kreiling,R., Natsch,A. and Mehling,A.** (2011) *Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and in vitro methods in a weight-of-evidence approach.* Regul. Toxicol. Pharmacol., 60, 389-400.
28. **Balsinde,J. and Dennis,E.A.** (1997) *Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>.* J. Biol. Chem., 272, 16069-16072.
29. **Banchereau,J. and Steinman,R.M.** (1998) *Dendritic cells and the control of immunity.* Nature., 392, 245-252.
30. **Baratelli,F., Krysan,K., Heuze-Vourc'h,N., Zhu,L., Escudero,B., Sharma,S., Reckamp,K., Dohadwala,M. and Dubinett,S.M.** (2005a) *PGE<sub>2</sub> confers survivin-dependent apoptosis resistance in human monocyte-derived dendritic cells.* J. Leukoc. Biol., 78, 555-564.
31. **Baratelli,F., Lin,Y., Zhu,L., Yang,S.C., Heuze-Vourc'h,N., Zeng,G., Reckamp,K., Dohadwala,M., Sharma,S. and Dubinett,S.M.** (2005b) *Prostaglandin E<sub>2</sub> induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4<sup>+</sup> T cells.* J. Immunol., 175, 1483-1490.
32. **Barratt,M.D., Castell,J.V., Miranda,M.A. and Langowski,J.J.** (2000) *Development of an expert system rulebase for the prospective identification of photoallergens.* J. Photochem. Photobiol. B., 58, 54-61.
33. **Basketter,D.A., Evans,P., Fielder,R.J., Gerberick,G.F., Dearman,R.J. and Kimber,I.** (2002) *Local lymph node assay - validation, conduct and use in practice.* Food Chem. Toxicol., 40, 593-598.
34. **Basketter,D.A. and Kimber,I.** (2011) *Skin irritation, false positives and the local lymph node assay: a guideline issue?* Regul. Toxicol. Pharmacol., 61, 137-140.
35. **Basketter,D.A., Lea,L.J., Cooper,K., Stocks,J., Dickens,A., Pate,I., Dearman,R.J. and Kimber,I.** (1999a) *Threshold for classification as a skin sensitizer in the local lymph node assay: a statistical evaluation.* Food Chem. Toxicol., 37, 1167-1174.
36. **Basketter,D.A., Lea,L.J., Dickens,A., Briggs,D., Pate,I., Dearman,R.J. and Kimber,I.** (1999b) *A comparison of statistical approaches to the derivation of EC<sub>3</sub> values from local lymph node assay dose responses.* J. Appl. Toxicol., 19, 261-266.
37. **Becker,D., Mohamadzadeh,M., Reske,K. and Knop,J.** (1992) *Increased level of intracellular MHC class II molecules in murine Langerhans cells following in vivo and in vitro administration of contact allergens.* J. Invest Dermatol., 99, 545-549.



38. **Beinke,S. and Ley,S.C.** (2004) *Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology.* Biochem. J., 382, 393-409.
39. **Betz,M. and Fox,B.S.** (1991) *Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines.* J. Immunol., 146, 108-113.
40. **Beyaert,R., Cuenda,A., Vanden,B.W., Plaisance,S., Lee,J.C., Haegeman,G., Cohen,P. and Fiers,W.** (1996) *The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor.* EMBO J., 15, 1914-1923.
41. **Bohme,A., Thaens,D., Paschke,A. and Schuurmann,G.** (2009) *Kinetic glutathione chemoassay to quantify thiol reactivity of organic electrophiles--application to alpha,beta-unsaturated ketones, acrylates, and propiolates.* Chem. Res. Toxicol., 22, 742-750.
42. **Boisleve,F., Kerdine-Romer,S. and Pallardy,M.** (2005) *Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha.* Toxicology, 206, 233-244.
43. **Boisleve,F., Kerdine-Romer,S., Rougier-Larzat,N. and Pallardy,M.** (2004) *Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF-alpha and MAPK.* J. Invest Dermatol., 123, 494-502.
44. **Boniface,K., Bak-Jensen,K.S., Li,Y., Blumenschein,W.M., McGeachy,M.J., McClanahan,T.K., McKenzie,B.S., Kastelein,R.A., Cua,D.J. and de Waal,M.R.** (2009) *Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling.* J. Exp. Med., 206, 535-548.
45. **Bonneville,M., Chavagnac,C., Vocanson,M., Rozieres,A., Benetiere,J., Pernet,I., Denis,A., Nicolas,J.F. and Hennino,A.** (2007) *Skin contact irritation conditions the development and severity of allergic contact dermatitis.* J. Invest Dermatol., 127, 1430-1435.
46. **Bonventre,J.V., Huang,Z., Taheri,M.R., O'Leary,E., Li,E., Moskowitz,M.A. and Sapirstein,A.** (1997) *Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2.* Nature, 390, 622-625.
47. **Bouloc,A., Cavani,A. and Katz,S.I.** (1998) *Contact hypersensitivity in MHC class II-deficient mice depends on CD8 T lymphocytes primed by immunostimulating Langerhans cells.* J. Invest Dermatol., 111, 44-49.
48. **BUEHLER,E.V.** (1965) *DELAYED CONTACT HYPERSENSITIVITY IN THE GUINEA PIG.* Arch. Dermatol., 91:171-7., 171-177.
49. **Burke,J.E. and Dennis,E.A.** (2009) *Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling.* J. Lipid Res., 50 Suppl, S237-S242.
50. **Campos,R.A., Szczepanik,M., Lisbonne,M., Itakura,A., Leite-de-Moraes,M. and Askenase,P.W.** (2006) *Invariant NKT cells rapidly activated via immunization with diverse contact antigens collaborate in vitro with B-1 cells to initiate contact sensitivity.* J. Immunol., 177, 3686-3694.
51. **Cao,Y., Zhou,H., Tao,J., Zheng,Z., Li,N., Shen,B., Shih,T.S., Hong,J., Zhang,J. and Chou,K.Y.** (2003) *Keratinocytes induce local tolerance to skin graft by activating interleukin-10-secreting T cells in the context of costimulation molecule B7-H1.* Transplantation., 75, 1390-1396.



52. **Cao,Z., Xiong,J., Takeuchi,M., Kurama,T. and Goeddel,D.V.** (1996) *TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1*. *Nature.*, 383, 443-446.
53. **Casati,S., Aeby,P., Basketter,D.A., Cavani,A., Gennari,A., Gerberick,G.F., Griem,P., Hartung,T., Kimber,I., Lepoittevin,J.P., Meade,B.J., Pallardy,M., Rougier,N., Rousset,F., Rubinstenn,G., Sallusto,F., Verheyen,G.R. and Zuang,V.** (2005) *Dendritic cells as a tool for the predictive identification of skin sensitisation hazard*. *Altern. Lab Anim*, 33, 47-62.
54. **Cavani,A.** (2008) *T regulatory cells in contact hypersensitivity*. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 8, 294-298.
55. **Cavani,A., De,P.O. and Girolomoni,G.** (2007) *New aspects of the molecular basis of contact allergy*. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 7, 404-408.
56. **Cavani,A., Ottaviani,C., Nasorri,F., Sebastiani,S. and Girolomoni,G.** (2003) *Immunoregulation of hapten and drug induced immune reactions*. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 3, 243-247.
57. **Chan,B.S., Endo,S., Kanai,N. and Schuster,V.L.** (2002) *Identification of lactate as a driving force for prostanoid transport by prostaglandin transporter PGT*. *Am. J. Physiol Renal Physiol*, 282, F1097-F1102.
58. **Chandrasekharan,N.V. and Simmons,D.L.** (2004) *The cyclooxygenases*. *Genome Biol.*, 5, 241.
59. **Chang,H., Shyu,K.G., Lin,S., Tsai,S.C., Wang,B.W., Liu,Y.C., Sung,Y.L. and Lee,C.C.** (2003) *The plasminogen activator inhibitor-1 gene is induced by cell adhesion through the MEK/ERK pathway*. *J. Biomed. Sci.*, 10, 738-745.
60. **Chen,H., Qin,J., Wei,P., Zhang,J., Li,Q., Fu,L., Li,S., Ma,C. and Cong,B.** (2009) *Effects of leukotriene B4 and prostaglandin E2 on the differentiation of murine Foxp3+ T regulatory cells and Th17 cells*. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.*, 80, 195-200.
61. **Chene,G., Dubourdeau,M., Balard,P., Escoubet-Lozach,L., Orfila,C., Berry,A., Bernad,J., Aries,M.F., Charveron,M. and Pipy,B.** (2007) *n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids induce the expression of COX-2 via PPARgamma activation in human keratinocyte HaCaT cells*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1771, 576-589.
62. **Chiang,N., Bermudez,E.A., Ridker,P.M., Hurwitz,S. and Serhan,C.N.** (2004) *Aspirin triggers antiinflammatory 15-epi-lipoxin A4 and inhibits thromboxane in a randomized human trial*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, 15178-15183.
63. **Chizzolini,C., Chicheportiche,R., Alvarez,M., de,R.C., Roux-Lombard,P., Ferrari-Lacraz,S. and Dayer,J.M.** (2008) *Prostaglandin E2 synergistically with interleukin-23 favors human Th17 expansion*. *Blood.*, 112, 3696-3703.
64. **Clark,A.R., Dean,J.L. and Saklatvala,J.** (2003) *Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38*. *FEBS Lett.*, 546, 37-44.
65. **Clark,J.D., Schievella,A.R., Nalefski,E.A. and Lin,L.L.** (1995) *Cytosolic phospholipase A2*. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.*, 12, 83-117.
66. **Cluzel-Tailhardat,M., Bonnet-Duquennoy,M., de Qeral,D.P., Vocanson,M., Kurfurst,R., Courtellemont,P., Le,V.B. and Nicolas,J.F.** (2007) *Chemicals with weak skin sensitizing*



- properties can be identified using low-density microarrays on immature dendritic cells.* Toxicol. Lett., 174, 98-109.
67. **Cobb,M.A., Hsueh,W., Pachman,L.M. and Barnes,W.T.** (1983) *Prostaglandin biosynthesis by a human macrophage-like cell line, U937.* J. Reticuloendothel. Soc., 33, 197-206.
68. **Copple,I.M., Goldring,C.E., Kitteringham,N.R. and Park,B.K.** (2010) *The keap1-nrf2 cellular defense pathway: mechanisms of regulation and role in protection against drug-induced toxicity.* Handb. Exp. Pharmacol., 233-266.
69. **Coutant,K.D., Ulrich,P., Thomas,H., Cordier,A. and Brugerolle,d.F.** (1999) *Early changes in murine epidermal cell phenotype by contact sensitizers.* Toxicol. Sci., 48, 74-81.
70. **Creagh,E.M. and O'Neill,L.A.** (2006) *TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity.* Trends Immunol., 27, 352-357.
71. **Cumberbatch,M., Dearman,R.J., Griffiths,C.E. and Kimber,I.** (2003) *Epidermal Langerhans cell migration and sensitisation to chemical allergens.* APMIS., 111, 797-804.
72. **Cumberbatch,M., Dearman,R.J. and Kimber,I.** (1997) *Interleukin 1 beta and the stimulation of Langerhans cell migration: comparisons with tumour necrosis factor alpha.* Arch. Dermatol. Res., 289, 277-284.
73. **Cumberbatch,M. and Kimber,I.** (1992) *Dermal tumour necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration.* Immunology., 75, 257-263.
74. **de Jong,W.H., Van Och,F.M., Den Hartog Jager,C.F., Spiekstra,S.W., Slob,W., Vandebriel,R.J. and van,L.H.** (2002) *Ranking of allergenic potency of rubber chemicals in a modified local lymph node assay.* Toxicol. Sci., 66, 226-232.
75. **De Smedt,A.C., Van Den Heuvel,R.L., Van,T., V, Berneman,Z.N., Schoeters,G.E., Weber,E. and Tuschi,H.** (2002) *Phenotypic alterations and IL-1beta production in CD34(+) progenitor- and monocyte-derived dendritic cells after exposure to allergens: a comparative analysis.* Arch. Dermatol. Res., 294, 109-116.
76. **Dean,J.L., Brook,M., Clark,A.R. and Saklatvala,J.** (1999) *p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes.* J. Biol. Chem., 274, 264-269.
77. **Dearman,R.J., Hilton,J., Basketter,D.A. and Kimber,I.** (1999) *Cytokine endpoints for the local lymph node assay: consideration of interferon-gamma and interleukin 12.* J. Appl. Toxicol., 19, 149-155.
78. **Deeley,R.G., Westlake,C. and Cole,S.P.** (2006) *Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins.* Physiol Rev., 86, 849-899.
79. **Diepgen,T.L. and Coenraads,P.J.** (1999) *The epidemiology of occupational contact dermatitis.* Int. Arch. Occup. Environ. Health., 72, 496-506.



80. **Diepgen,T.L., Fartasch,M., Ring,J., Scheewe,S., Staab,D., Szcepanski,R., Werfel,T., Wahn,U. and Gieler,U.** (2003) *[Education programs on atopic eczema. Design and first results of the German Randomized Intervention Multicenter Study]*. *Hautarzt.*, 54, 946-951.
81. **Dieu,M.C., Vanbervliet,B., Vicari,A., Bridon,J.M., Oldham,E., it-Yahia,S., Briere,F., Zlotnik,A., Lebecque,S. and Caux,C.** (1998) *Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites.* *J. Exp. Med.*, 188, 373-386.
82. **Dimitrov,S., Dimitrova,G., Pavlov,T., Dimitrova,N., Patlewicz,G., Niemela,J. and Mekenyan,O.** (2005) *A stepwise approach for defining the applicability domain of SAR and QSAR models.* *J. Chem. Inf. Model.*, 45, 839-849.
83. **Dinkova-Kostova,A.T., Liby,K.T., Stephenson,K.K., Holtzclaw,W.D., Gao,X., Suh,N., Williams,C., Risingsong,R., Honda,T., Gribble,G.W., Sporn,M.B. and Talalay,P.** (2005) *Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102, 4584-4589.
84. **Divkovic,M., Pease,C.K., Gerberick,G.F. and Basketter,D.A.** (2005) *Hapten-protein binding: from theory to practical application in the in vitro prediction of skin sensitization.* *Contact Dermatitis.*, 53, 189-200.
85. **Dodd,R.C., Cohen,M.S., Newman,S.L. and Gray,T.K.** (1983) *Vitamin D metabolites change the phenotype of monoblastic U937 cells.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 80, 7538-7541.
86. **dos Santos,G.G., Reinders,J., Ouwehand,K., Rustemeyer,T., Scheper,R.J. and Gibbs,S.** (2009) *Progress on the development of human in vitro dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound.* *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 236, 372-382.
87. **Dubois,B., Chapat,L., Goubier,A. and Kaiserlian,D.** (2003) *CD4+CD25+ T cells as key regulators of immune responses.* *Eur. J. Dermatol.*, 13, 111-116.
88. **Dustin,M.L., Singer,K.H., Tuck,D.T. and Springer,T.A.** (1988) *Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon gamma and is mediated by intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1).* *J. Exp. Med.*, 167, 1323-1340.
89. **Engeman,T.M., Gorbachev,A.V., Gladue,R.P., Heeger,P.S. and Fairchild,R.L.** (2000) *Inhibition of functional T cell priming and contact hypersensitivity responses by treatment with anti-secondary lymphoid chemokine antibody during hapten sensitization.* *J. Immunol.*, 164, 5207-5214.
90. **Enk,A.H. and Katz,S.I.** (1992) *Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89, 1398-1402.
91. **Enomoto,A., Takeda,M., Shimoda,M., Narikawa,S., Kobayashi,Y., Kobayashi,Y., Yamamoto,T., Sekine,T., Cha,S.H., Niwa,T. and Endou,H.** (2002) *Interaction of human organic anion transporters 2 and 4 with organic anion transport inhibitors.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 301, 797-802.
92. **Escoubet,L., Rey,A., Wong,A., Bernad,J., Lepert,J.C., Orfila,C. and Pipy,B.** (2000) *Increased cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase activating protein expression in peritoneal macrophages during ovalbumin immunization of mice and cytosolic phospholipase A(2) activation after antigen challenge.* *Biochim. Biophys. Acta*, 1487, 92-105.



93. **Forster,R., Schubel,A., Breitfeld,D., Kremmer,E., Renner-Muller,I., Wolf,E. and Lipp,M.** (1999) *CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs.* Cell., 99, 23-33.
94. **Freudenberg,M.A., Esser,P.R., Jakob,T., Galanos,C. and Martin,S.F.** (2009) *Innate and adaptive immune responses in contact dermatitis: analogy with infections.* G. Ital. Dermatol. Venereol., 144, 173-185.
95. **Funk,C.D.** (2001) *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology.* Science., 294, 1871-1875.
96. **Gallucci,S. and Matzinger,P.** (2001) *Danger signals: SOS to the immune system.* Curr. Opin. Immunol., 13, 114-119.
97. **Garrett,W.S., Chen,L.M., Kroschewski,R., Ebersold,M., Turley,S., Trombetta,S., Galan,J.E. and Mellman,I.** (2000) *Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42.* Cell., 102, 325-334.
98. **Geijtenbeek,T.B., Torensma,R., van Vliet,S.J., van Duijnhoven,G.C., Adema,G.J., van,K.Y. and Figdor,C.G.** (2000) *Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses.* Cell., 100, 575-585.
99. **Geissmann,F., eu-Nosjean,M.C., Dezutter,C., Valladeau,J., Kayal,S., Leborgne,M., Brousse,N., Saeland,S. and Davoust,J.** (2002) *Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin.* J. Exp. Med., 196, 417-430.
100. **Gerberick,F., Aleksic,M., Basketter,D., Casati,S., Karlberg,A.T., Kern,P., Kimber,I., Lepoittevin,J.P., Natsch,A., Ovigne,J.M., Rovida,C., Sakaguchi,H. and Schultz,T.** (2008) *Chemical reactivity measurement and the predicitive identification of skin sensitizers. The report and recommendations of ECVAM Workshop 64.* Altern. Lab Anim, 36, 215-242.
101. **Gerberick,G.F., Ryan,C.A., Kimber,I., Dearman,R.J., Lea,L.J. and Basketter,D.A.** (2000) *Local lymph node assay: validation assessment for regulatory purposes.* Am. J. Contact Dermat., 11, 3-18.
102. **Gerberick,G.F., Troutman,J.A., Foertsch,L.M., Vassallo,J.D., Quijano,M., Dobson,R.L., Goebel,C. and Lepoittevin,J.P.** (2009) *Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system.* Toxicol. Sci., 112, 164-174.
103. **Gerberick,G.F., Vassallo,J.D., Bailey,R.E., Chaney,J.G., Morrall,S.W. and Lepoittevin,J.P.** (2004) *Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens.* Toxicol. Sci., 81, 332-343.
104. **Gerberick,G.F., Vassallo,J.D., Foertsch,L.M., Price,B.B., Chaney,J.G. and Lepoittevin,J.P.** (2007) *Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach.* Toxicol. Sci., 97, 417-427.
105. **Gildea,L.A., Ryan,C.A., Foertsch,L.M., Kennedy,J.M., Dearman,R.J., Kimber,I. and Gerberick,G.F.** (2006) *Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing.* J. Invest Dermatol., 126, 1813-1822.



106. **Girolomoni,G., Cruz,P.D., Jr. and Bergstresser,P.R.** (1990) *Internalization and acidification of surface HLA-DR molecules by epidermal Langerhans cells: a paradigm for antigen processing.* J. Invest Dermatol., 94, 753-760.
107. **Goetzl,E.J., An,S. and Smith,W.L.** (1995) *Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases.* FASEB J., 9, 1051-1058.
108. **Goodwin,J.S. and Ceuppens,J.** (1983) *Regulation of the immune response by prostaglandins.* J. Clin. Immunol., 3, 295-315.
109. **Grabbe,S. and Schwarz,T.** (1998) *Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity.* Immunol. Today, 19, 37-44.
110. **Greaves,M.W. and Donald-Gibson,W.** (1972) *Prostaglandin biosynthesis by human skin and its inhibition by corticosteroids.* Br. J. Pharmacol., 46, 172-175.
111. **Greenwald,R.J., Freeman,G.J. and Sharpe,A.H.** (2005) *The B7 family revisited.* Annu. Rev. Immunol., 23:515-48., 515-548.
112. **Gruber,F., Mayer,H., Lengauer,B., Mlitz,V., Sanders,J.M., Kadl,A., Bilban,M., de,M.R., Wagner,O., Kensler,T.W., Yamamoto,M., Leitinger,N. and Tschachler,E.** (2010) *NF-E2-related factor 2 regulates the stress response to UVA-1-oxidized phospholipids in skin cells.* FASEB J., 24, 39-48.
113. **Guha,M. and Mackman,N.** (2001) *LPS induction of gene expression in human monocytes.* Cell Signal., 13, 85-94.
114. **Gunn,M.D., Tangemann,K., Tam,C., Cyster,J.G., Rosen,S.D. and Williams,L.T.** (1998) *A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 95, 258-263.
115. **Hagenbuch,B. and Meier,P.J.** (2003) *The superfamily of organic anion transporting polypeptides.* Biochim. Biophys. Acta., 1609, 1-18.
116. **Harizi,H. and Gualde,N.** (2004) *Eicosanoids: an emerging role in dendritic cell biology.* Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz. ), 52, 1-5.
117. **Harizi,H. and Gualde,N.** (2005) *The impact of eicosanoids on the crosstalk between innate and adaptive immunity: the key roles of dendritic cells.* Tissue Antigens, 65, 507-514.
118. **Harizi,H. and Gualde,N.** (2006) *Pivotal role of PGE2 and IL-10 in the cross-regulation of dendritic cell-derived inflammatory mediators.* Cell Mol. Immunol., 3, 271-277.
119. **Harizi,H., Juzan,M., Grosset,C., Rashedi,M. and Gualde,N.** (2001) *Dendritic cells issued in vitro from bone marrow produce PGE(2) that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells.* Cell Immunol., 209, 19-28.
120. **Harris,P. and Ralph,P.** (1985) *Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines.* J. Leukoc. Biol., 37, 407-422.
121. **Harris,S.G., Padilla,J., Koumas,L., Ray,D. and Phipps,R.P.** (2002) *Prostaglandins as modulators of immunity.* Trends Immunol., 23, 144-150.



122. **He,D., Wu,L., Kim,H.K., Li,H., Elmets,C.A. and Xu,H.** (2006) *CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses.* J. Immunol., 177, 6852-6858.
123. **Henri,S., Guilliams,M., Poulin,L.F., Tamoutounour,S., Ardouin,L., Dalod,M. and Malissen,B.** (2010) *Disentangling the complexity of the skin dendritic cell network.* Immunol. Cell Biol., 88, 366-375.
124. **Hirai,H., Tanaka,K., Yoshie,O., Ogawa,K., Kenmotsu,K., Takamori,Y., Ichimasa,M., Sugamura,K., Nakamura,M., Takano,S. and Nagata,K.** (2001) *Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2.* J. Exp. Med., 193, 255-261.
125. **Hirota,M., Suzuki,M., Hagino,S., Kagatani,S., Sasaki,Y., Aiba,S. and Itagaki,H.** (2009) *Modification of cell-surface thiols elicits activation of human monocytic cell line THP-1: possible involvement in effect of haptens 2,4-dinitrochlorobenzene and nickel sulfate.* J. Toxicol. Sci., 34, 139-150.
126. **Hoffmann,R., Wenzel,E., Huth,A., van der,S.P., Schaufele,M., Henninger,H.P. and Happle,R.** (1994) *Cytokine mRNA levels in Alopecia areata before and after treatment with the contact allergen diphenylcyclopropenone.* J. Invest Dermatol., 103, 530-533.
127. **Holtzman,M.J.** (1991) *Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung function and disease.* Am. Rev. Respir. Dis., 143, 188-203.
128. **Hooyberghs,J., Schoeters,E., Lambrechts,N., Nelissen,I., Witters,H., Schoeters,G. and Van Den,H.R.** (2008) *A cell-based in vitro alternative to identify skin sensitizers by gene expression.* Toxicol. Appl. Pharmacol., 231, 103-111.
129. **Hsuanyu,Y. and Dunford,H.B.** (1992a) *Prostaglandin H synthase kinetics. The effect of substituted phenols on cyclooxygenase activity and the substituent effect on phenolic peroxidatic activity.* J. Biol. Chem., 267, 17649-17657.
130. **Hsuanyu,Y.C. and Dunford,H.B.** (1992b) *Reduction of prostaglandin H synthase compound II by phenol and hydroquinone, and the effect of indomethacin.* Arch. Biochem. Biophys., 292, 213-220.
131. **Huang,H.C., Nguyen,T. and Pickett,C.B.** (2000) *Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 97, 12475-12480.
132. **Huss,U., Ringbom,T., Perera,P., Bohlin,L. and Vasange,M.** (2002) *Screening of ubiquitous plant constituents for COX-2 inhibition with a scintillation proximity based assay.* J. Nat. Prod., 65, 1517-1521.
133. **Ikarashi,Y., Tsuchiya,T. and Nakamura,A.** (1993) *A sensitive mouse lymph node assay with two application phases for detection of contact allergens.* Arch. Toxicol., 67, 629-636.
134. **Ingber,A., Cohen,Y., Krinsky,M. and Yedgar,S.** (2007) *A novel treatment of contact dermatitis by topical application of phospholipase A2 inhibitor: a double-blind placebo-controlled pilot study.* Int. J. Immunopathol. Pharmacol., 20, 191-195.



135. Jiang,W., Swiggard,W.J., Heufler,C., Peng,M., Mirza,A., Steinman,R.M. and Nussenzweig,M.C. (1995) *The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing.* Nature., 375, 151-155.
136. Jiang,Y.J., Lu,B., Choy,P.C. and Hatch,G.M. (2003) *Regulation of cytosolic phospholipase A2, cyclooxygenase-1 and -2 expression by PMA, TNFalpha, LPS and M-CSF in human monocytes and macrophages.* Mol. Cell Biochem., 246, 31-38.
137. Johansson,H., Lindstedt,M., Albrekt,A.S. and Borrebaeck,C.A. (2011) *A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests.* BMC. Genomics, 12, 399.
138. Jowsey,I.R., Basketter,D.A., Westmoreland,C. and Kimber,I. (2006) *A future approach to measuring relative skin sensitising potency: a proposal.* J. Appl. Toxicol., 26, 341-350.
139. Jowsey,I.R., Thomson,A.M., Flanagan,J.U., Murdock,P.R., Moore,G.B., Meyer,D.J., Murphy,G.J., Smith,S.A. and Hayes,J.D. (2001) *Mammalian class Sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D2 synthases.* Biochem. J., 359, 507-516.
140. Kabashima,K., Sakata,D., Nagamachi,M., Miyachi,Y., Inaba,K. and Narumiya,S. (2003) *Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells.* Nat. Med., 9, 744-749.
141. Kagatani,S., Sasaki,Y., Hirota,M., Mizuashi,M., Suzuki,M., Ohtani,T., Itagaki,H. and Aiba,S. (2010) *Oxidation of cell surface thiol groups by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells.* J. Invest Dermatol., 130, 175-183.
142. Kalinski,P., Hilkens,C.M., Snijders,A., Snijdewint,F.G. and Kapsenberg,M.L. (1997) *IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells.* J. Immunol., 159, 28-35.
143. Kamath,A.T., Henri,S., Battye,F., Tough,D.F. and Shortman,K. (2002) *Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs.* Blood., 100, 1734-1741.
144. Kamei,D., Yamakawa,K., Takegoshi,Y., Mikami-Nakanishi,M., Nakatani,Y., Oh-Ishi,S., Yasui,H., Azuma,Y., Hirasawa,N., Ohuchi,K., Kawaguchi,H., Ishikawa,Y., Ishii,T., Uematsu,S., Akira,S., Murakami,M. and Kudo,I. (2004) *Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin synthase-1.* J. Biol. Chem., 279, 33684-33695.
145. Kanai,N., Lu,R., Satriano,J.A., Bao,Y., Wolkoff,A.W. and Schuster,V.L. (1995) *Identification and characterization of a prostaglandin transporter.* Science., 268, 866-869.
146. Kapsenberg,M.L. (2003) *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization.* Nat. Rev. Immunol., 3, 984-993.
147. Kapsenberg,M.L., Hilkens,C.M., van der Pouw Kraan TC, Wierenga,E.A. and Snijders,A. (1996) *The role of accessory cell products in the regulation of T cell cytokine production.* Adv. Exp. Med. Biol., 409, 305-308.
148. Kargman,S., Rousseau,P., Reid,G.K., Rouzer,C.A., Mancini,J.A., Rands,E., Dixon,R.A., Diehl,R.E., Leveille,C., Nathaniel,D. and . (1993) *Leukotriene synthesis in U937 cells expressing recombinant 5-lipoxygenase.* J. Lipid Mediat., 7, 31-45.



149. **Karlberg,A.T., Bergstrom,M.A., Borje,A., Luthman,K. and Nilsson,J.L.** (2008) *Allergic contact dermatitis--formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers*. Chem. Res. Toxicol., 21, 53-69.
150. **Karlberg,A.T., Shao,L.P., Nilsson,U., Gafvert,E. and Nilsson,J.L.** (1994) *Hydroperoxides in oxidized d-limonene identified as potent contact allergens*. Arch. Dermatol. Res., 286, 97-103.
151. **Kawai,T., Adachi,O., Ogawa,T., Takeda,K. and Akira,S.** (1999) *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity., 11, 115-122.
152. **Kawamori,T., Rao,C.V., Seibert,K. and Reddy,B.S.** (1998) *Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis*. Cancer Res., 58, 409-412.
153. **Kehren,J., Desvignes,C., Krasteva,M., Ducluzeau,M.T., Assossou,O., Horand,F., Hahne,M., Kagi,D., Kaiserlian,D. and Nicolas,J.F.** (1999) *Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity*. J. Exp. Med., 189, 779-786.
154. **Keir,M.E., Butte,M.J., Freeman,G.J. and Sharpe,A.H.** (2008) *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu. Rev. Immunol., 26:677-704., 677-704.
155. **Kelly,S.L. and Sim,E.** (1991) *Expression of N-acetyl transferase in a human monocytic cell-line, U937*. Hum. Exp. Toxicol., 10, 33-38.
156. **Kensler,T.W., Wakabayashi,N. and Biswal,S.** (2007) *Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 47:89-116., 89-116.
157. **Kerfoot,S.M., Szczepanik,M., Tung,J.W. and Askenase,P.W.** (2008) *Identification of initiator B cells, a novel subset of activation-induced deaminase-dependent B-1-like cells that mediate initiation of contact sensitivity*. J. Immunol., 181, 1717-1727.
158. **Kim,E.H. and Surh,Y.J.** (2006) *15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors*. Biochem. Pharmacol., 72, 1516-1528.
159. **Kim,H.J., Barajas,B., Wang,M. and Nel,A.E.** (2008) *Nrf2 activation by sulforaphane restores the age-related decrease of T(H)1 immunity: role of dendritic cells*. J. Allergy Clin. Immunol., 121, 1255-1261.
160. **Kim,H.K., Guan,H., Zu,G., Li,H., Wu,L., Feng,X., Elmets,C., Fu,Y. and Xu,H.** (2006) *High-level expression of B7-H1 molecules by dendritic cells suppresses the function of activated T cells and desensitizes allergen-primed animals*. J. Leukoc. Biol., 79, 686-695.
161. **Kim,S.S., Oh,O.J., Min,H.Y., Park,E.J., Kim,Y., Park,H.J., Nam,H.Y. and Lee,S.K.** (2003) *Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells*. Life Sci., 73, 337-348.
162. **Kimber,I., Hilton,J., Dearman,R.J., Gerberick,G.F., Ryan,C.A., Basketter,D.A., Scholes,E.W., Ladics,G.S., Loveless,S.E., House,R.V. and .** (1995) *An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures*. Toxicology., 103, 63-73.



163. **Kimura,H., Takeda,M., Narikawa,S., Enomoto,A., Ichida,K. and Endou,H.** (2002) *Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins.* J. Pharmacol. Exp. Ther., 301, 293-298.
164. **Kish,D.D., Gorbachev,A.V. and Fairchild,R.L.** (2005) *CD8+ T cells produce IL-2, which is required for CD(4+)CD25+ T cell regulation of effector CD8+ T cell development for contact hypersensitivity responses.* J. Leukoc. Biol., 78, 725-735.
165. **Kissenpfennig,A., Henri,S., Dubois,B., Laplace-Builhe,C., Perrin,P., Romani,N., Tripp,C.H., Douillard,P., Leserman,L., Kaiserlian,D., Saeland,S., Davoust,J. and Malissen,B.** (2005) *Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells.* Immunity., 22, 643-654.
166. **Klekotka,P.A., Yang,L. and Yokoyama,W.M.** (2010) *Contrasting roles of the IL-1 and IL-18 receptors in MyD88-dependent contact hypersensitivity.* J. Invest Dermatol., 130, 184-191.
167. **Kobayashi,Y., Matsumoto,M., Kotani,M. and Makino,T.** (1999) *Possible involvement of matrix metalloproteinase-9 in Langerhans cell migration and maturation.* J. Immunol., 163, 5989-5993.
168. **Kohler,J., Hartmann,U., Grimm,R., Pflugfelder,U. and Weltzien,H.U.** (1997) *Carrier-independent hapten recognition and promiscuous MHC restriction by CD4 T cells induced by trinitrophenylated peptides.* J. Immunol., 158, 591-597.
169. **Komura,J., Oguchi,M., Aoshima,T. and Ofuji,S.** (1980) *Ultrastructural studies of allergic contact dermatitis in man. Infiltrating cells at the earliest phase of spongiotic bulla formation.* Arch. Dermatol. Res., 267, 283-290.
170. **Kondo,S., Kooshesh,F., Wang,B., Fujisawa,H. and Sauder,D.N.** (1996) *Contribution of the CD28 molecule to allergic and irritant-induced skin reactions in CD28 -/- mice.* J. Immunol., 157, 4822-4829.
171. **Kondo,S., Pastore,S., Shivji,G.M., McKenzie,R.C. and Sauder,D.N.** (1994) *Characterization of epidermal cytokine profiles in sensitization and elicitation phases of allergic contact dermatitis as well as irritant contact dermatitis in mouse skin.* Lymphokine Cytokine Res., 13, 367-375.
172. **Kramer,R.M., Roberts,E.F., Um,S.L., Borsch-Haubold,A.G., Watson,S.P., Fisher,M.J. and Jakubowski,J.A.** (1996) *p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2.* J. Biol. Chem., 271, 27723-27729.
173. **Kramer,R.M. and Sharp,J.D.** (1997) *Structure, function and regulation of Ca<sup>2+</sup>-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2).* FEBS Lett., 410, 49-53.
174. **Krasteva,M., Kehren,J., Ducluzeau,M.T., Sayag,M., Cacciapuoti,M., Akiba,H., Descotes,J. and Nicolas,J.F.** (1999) *Contact dermatitis I. Pathophysiology of contact sensitivity.* Eur. J. Dermatol., 9, 65-77.
175. **Krause,P., Bruckner,M., Uermosi,C., Singer,E., Groettrup,M. and Legler,D.F.** (2009) *Prostaglandin E(2) enhances T-cell proliferation by inducing the costimulatory molecules OX40L, CD70, and 4-1BBL on dendritic cells.* Blood, 113, 2451-2460.



176. **Krause,P., Singer,E., Darley,P.I., Klebensberger,J., Groettrup,M. and Legler,D.F.** (2007) *Prostaglandin E2 is a key factor for monocyte-derived dendritic cell maturation: enhanced T cell stimulatory capacity despite IDO.* J. Leukoc. Biol., 82, 1106-1114.
177. **Kripke,M.L., Munn,C.G., Jeevan,A., Tang,J.M. and Bucana,C.** (1990) *Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization.* J. Immunol., 145, 2833-2838.
178. **Kulmacz,R.J. and Lands,W.E.** (1983) *Requirements for hydroperoxide by the cyclooxygenase and peroxidase activities of prostaglandin H synthase.* Prostaglandins, 25, 531-540.
179. **Kurland,J.I., Pelus,L.M., Ralph,P., Bockman,R.S. and Moore,M.A.** (1979) *Induction of prostaglandin E synthesis in normal and neoplastic macrophages: role for colony-stimulating factor(s) distinct from effects on myeloid progenitor cell proliferation.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 76, 2326-2330.
180. **Lachapelle,J.M., Ale,S.I., Freeman,S., Frosch,P.J., Goh,C.L., Hannuksela,M., Hayakawa,R., Maibach,H.I. and Wahlberg,J.E.** (1997) *Proposal for a revised international standard series of patch tests.* Contact Dermatitis., 36, 121-123.
181. **Lambeau,G. and Gelb,M.H.** (2008) *Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2.* Annu. Rev. Biochem., 77, 495-520.
182. **Lambrechts,N., Nelissen,I., Van,T., V, Witters,H., Van Den,H.R., Hooyberghs,J. and Schoeters,G.** (2011) *Functionality and specificity of gene markers for skin sensitization in dendritic cells.* Toxicol. Lett., 203, 106-110.
183. **Lambrechts,N., Vanheel,H., Hooyberghs,J., De,B.P., Witters,H., Van Den,H.R., Van,T., V, Nelissen,I. and Schoeters,G.** (2010) *Gene markers in dendritic cells unravel pieces of the skin sensitization puzzle.* Toxicol. Lett., 196, 95-103.
184. **Lambrechts,N., Verstraelen,S., Lodewyckx,H., Felicio,A., Hooyberghs,J., Witters,H., Van,T., V, Van,C.P., Nelissen,I., Van Den,H.R. and Schoeters,G.** (2009) *THP-1 monocytes but not macrophages as a potential alternative for CD34+ dendritic cells to identify chemical skin sensitizers.* Toxicol. Appl. Pharmacol., 236, 221-230.
185. **Landsteiner,K. and Jacobs,J.** (1935) *STUDIES ON THE SENSITIZATION OF ANIMALS WITH SIMPLE CHEMICAL COMPOUNDS.* J. Exp. Med., 61, 643-656.
186. **Lasa,M., Mahtani,K.R., Finch,A., Brewer,G., Saklatvala,J. and Clark,A.R.** (2000) *Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade.* Mol. Cell Biol., 20, 4265-4274.
187. **Lass,C., Vocanson,M., Wagner,S., Schempp,C.M., Nicolas,J.F., Merfort,I. and Martin,S.F.** (2008) *Anti-inflammatory and immune-regulatory mechanisms prevent contact hypersensitivity to Arnica montana L.* Exp. Dermatol., 17, 849-857.
188. **Lee,S.C., Han,J.S., Seo,J.K. and Cha,Y.N.** (2003) *Modulation of cyclooxygenase-2 expression by phosphatidylcholine specific phospholipase C and D in macrophages stimulated with lipopolysaccharide.* Mol. Cells, 15, 320-326.



189. **Lee,Y.Y., Yang,S.F., Ho,W.H., Lee,Y.H. and Hung,S.L.** (2007) *Eugenol modulates cyclooxygenase-2 expression through the activation of nuclear factor kappa B in human osteoblasts.* J. Endod., 33, 1177-1182.
190. **Lepoittevin,J.P.** (2006) *Metabolism versus chemical transformation or pro- versus prehaps? Contact Dermatitis,* 54, 73-74.
191. **Leslie,C.C.** (1997) *Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2.* J. Biol. Chem., 272, 16709-16712.
192. **Leulier,F. and Lemaitre,B.** (2008) *Toll-like receptors--taking an evolutionary approach.* Nat. Rev. Genet., 9, 165-178.
193. **Li,B., Xia,L., Krantz,A. and Yuan,Z.** (1996) *Site-directed mutagenesis of Cys324 and Cys331 in human cytosolic phospholipase A2: locus of action of thiol modification reagents leading to inactivation of cPLA2.* Biochemistry., 35, 3156-3161.
194. **Li,L., Steinauer,K.K., Dirks,A.J., Husbeck,B., Gibbs,I. and Knox,S.J.** (2003) *Radiation-induced cyclooxygenase 2 up-regulation is dependent on redox status in prostate cancer cells.* Radiat. Res., 160, 617-621.
195. **Li,Q. and Verma,I.M.** (2002) *NF-kappaB regulation in the immune system.* Nat. Rev. Immunol., 2, 725-734.
196. **Li,W., Tsubouchi,R., Qiao,S., Haneda,M., Murakami,K. and Yoshino,M.** (2006) *Inhibitory action of eugenol compounds on the production of nitric oxide in RAW264.7 macrophages.* Biomed. Res., 27, 69-74.
197. **Lin,C.C., Wu,S.J., Chang,C.H. and Ng,L.T.** (2003) *Antioxidant activity of Cinnamomum cassia.* Phytother. Res., 17, 726-730.
198. **Lin,C.H., Kuan,I.H., Lee,H.M., Lee,W.S., Sheu,J.R., Ho,Y.S., Wang,C.H. and Kuo,H.P.** (2001) *Induction of cyclooxygenase-2 protein by lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus in human pulmonary epithelial cells: involvement of a nuclear factor-kappa B-dependent pathway.* Br. J. Pharmacol., 134, 543-552.
199. **Lin,W., Wu,R.T., Wu,T., Khor,T.O., Wang,H. and Kong,A.N.** (2008a) *Sulforaphane suppressed LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages through Nrf2 dependent pathway.* Biochem. Pharmacol., 76, 967-973.
200. **Lin,Z.P., Zhu,Y.L., Johnson,D.R., Rice,K.P., Nottoli,T., Hains,B.C., McGrath,J., Waxman,S.G. and Sartorelli,A.C.** (2008b) *Disruption of cAMP and prostaglandin E2 transport by multidrug resistance protein 4 deficiency alters cAMP-mediated signaling and nociceptive response.* Mol. Pharmacol., 73, 243-251.
201. **Liu,G.H., Qu,J. and Shen,X.** (2008a) *NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK.* Biochim. Biophys. Acta, 1783, 713-727.
202. **Liu,H., Dinkova-Kostova,A.T. and Talalay,P.** (2008b) *Coordinate regulation of enzyme markers for inflammation and for protection against oxidants and electrophiles.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 105, 15926-15931.



203. **Loveless,S.E., Ladics,G.S., Gerberick,G.F., Ryan,C.A., Basketter,D.A., Scholes,E.W., House,R.V., Hilton,J., Dearman,R.J. and Kimber,I.** (1996) *Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial.* Toxicology., 108, 141-152.
204. **Lowe,N.J., Virgadamo,F. and Stoughton,R.B.** (1977) *Anti-inflammatory properties of a prostaglandin antagonist, a corticosteroid and indomethacin in experimental contact dermatitis.* Br. J. Dermatol., 96, 433-438.
205. **Macatonia,S.E., Edwards,A.J. and Knight,S.C.** (1986) *Dendritic cells and the initiation of contact sensitivity to fluorescein isothiocyanate.* Immunology., 59, 509-514.
206. **Macatonia,S.E., Knight,S.C., Edwards,A.J., Griffiths,S. and Fryer,P.** (1987) *Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies.* J. Exp. Med., 166, 1654-1667.
207. **Machet,L., Couhe,C., Perrinaud,A., Hoarau,C., Lorette,G. and Vaillant,L.** (2004) *A high prevalence of sensitization still persists in leg ulcer patients: a retrospective series of 106 patients tested between 2001 and 2002 and a meta-analysis of 1975-2003 data.* Br. J. Dermatol., 150, 929-935.
208. **Magnusson,B. and Kligman,A.M.** (1969) *The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test.* J. Invest Dermatol., 52, 268-276.
209. **Mariathasan,S. and Monack,D.M.** (2007) *Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation.* Nat. Rev. Immunol., 7, 31-40.
210. **Martin,S., Ortmann,B., Pflugfelder,U., Birsner,U. and Weltzien,H.U.** (1992) *Role of hapten-anchoring peptides in defining hapten-epitopes for MHC-restricted cytotoxic T cells. Cross-reactive TNP-determinants on different peptides.* J. Immunol., 149, 2569-2575.
211. **Martin,S.F., Dudda,J.C., Bachtanian,E., Lembo,A., Liller,S., Durr,C., Heimesaat,M.M., Bereswill,S., Fejer,G., Vassileva,R., Jakob,T., Freudenberg,N., Termeer,C.C., Johner,C., Galanos,C. and Freudenberg,M.A.** (2008) *Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity.* J. Exp. Med., 205, 2151-2162.
212. **Martin,S.F., Esser,P.R., Weber,F.C., Jakob,T., Freudenberg,M.A., Schmidt,M. and Goebeler,M.** (2011) *Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis.* Allergy., 66, 1152-1163.
213. **Martinon,F.** (2008) *Detection of immune danger signals by NALP3.* J. Leukoc. Biol., 83, 507-511.
214. **Martinon,F., Mayor,A. and Tschopp,J.** (2009) *The inflammasomes: guardians of the body.* Annu. Rev. Immunol., 27:229-65., 229-265.
215. **Matzinger,P.** (1994) *Tolerance, danger, and the extended family.* Annu. Rev. Immunol., 12:991-1045., 991-1045.
216. **Maxwell,G. and Mackay,C.** (2008) *Application of a systems biology approach to skin allergy risk assessment.* Altern. Lab Anim, 36, 521-556.



217. **McKim,J.M., Keller,D.J., III and Gorski,J.R.** (2010) *A new in vitro method for identifying chemical sensitizers combining peptide binding with ARE/EpRE-mediated gene expression in human skin cells.* *Cutan. Ocul. Toxicol.*, 29, 171-192.
218. **McMichael,A.J. and Henderson,R.L.** (2004) *Topical sensitizers in alopecia areata.* *Dermatol. Nurs.*, 16, 333-336.
219. **Megherbi,R., Kiorpelidou,E., Foster,B., Rowe,C., Naisbitt,D.J., Goldring,C.E. and Park,B.K.** (2009) *Role of protein haptention in triggering maturation events in the dendritic cell surrogate cell line THP-1.* *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 238, 120-132.
220. **Migdal,C., Foggia,L., Tailhardat,M., Courtellemont,P., Haftek,M. and Serres,M.** (2010) *Sensitization effect of thimerosal is mediated in vitro via reactive oxygen species and calcium signaling.* *Toxicology.*, 274, 1-9.
221. **Minafra,L., Di,C.G., Albanese,N.N. and Cancemi,P.** (2011) *Proteomic differentiation pattern in the U937 cell line.* *Leuk. Res.*, 35, 226-236.
222. **Mizuashi,M., Ohtani,T., Nakagawa,S. and Aiba,S.** (2005) *Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells.* *J. Invest Dermatol.*, 124, 579-586.
223. **Moeller,R., Lichter,J. and Blomeke,B.** (2008) *Impact of para-phenylenediamine on cyclooxygenases expression and prostaglandin formation in human immortalized keratinocytes (HaCaT).* *Toxicology*, 249, 167-175.
224. **Mohamadzadeh,M., Muller,M., Hultsch,T., Enk,A., Saloga,J. and Knop,J.** (1994) *Enhanced expression of IL-8 in normal human keratinocytes and human keratinocyte cell line HaCaT in vitro after stimulation with contact sensitizers, tolerogens and irritants.* *Exp. Dermatol.*, 3, 298-303.
225. **Monneret,G., Gravel,S., Diamond,M., Rokach,J. and Powell,W.S.** (2001) *Prostaglandin D2 is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor.* *Blood.*, 98, 1942-1948.
226. **Moulon,C., Peguet-Navarro,J., Courtellemont,P., Redziniak,G. and Schmitt,D.** (1993) *In vitro primary sensitization and restimulation of hapten-specific T cells by fresh and cultured human epidermal Langerhans' cells.* *Immunology*, 80, 373-379.
227. **Murakami,M., Naraba,H., Tanioka,T., Semmyo,N., Nakatani,Y., Kojima,F., Ikeda,T., Fueki,M., Ueno,A., Oh,S. and Kudo,I.** (2000) *Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2.* *J. Biol. Chem.*, 275, 32783-32792.
228. **Mut,M., Amos,S. and Hussaini,I.M.** (2010) *PKC alpha phosphorylates cytosolic NF-kappaB/p65 and PKC delta delays nuclear translocation of NF-kappaB/p65 in U1242 glioblastoma cells.* *Turk. Neurosurg.*, 20, 277-285.
229. **Naik,E. and Dixit,V.M.** (2011) *Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production.* *J. Exp. Med.*, 208, 417-420.
230. **Nakae,S., Komiyama,Y., Nambu,A., Sudo,K., Iwase,M., Homma,I., Sekikawa,K., Asano,M. and Iwakura,Y.** (2002) *Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses.* *Immunity.*, 17, 375-387.



231. **Namazi,M.R.** (2006) *Two novel molecular mechanisms to account for the therapeutic efficacy of contact dermatitis against alopecia areata.* Int. Immunopharmacol., 6, 862.
232. **Narumiya,S., Sugimoto,Y. and Ushikubi,F.** (1999) *Prostanoid receptors: structures, properties, and functions.* Physiol Rev., 79, 1193-1226.
233. **Nataraj,C., Thomas,D.W., Tilley,S.L., Nguyen,M.T., Mannon,R., Koller,B.H. and Coffman,T.M.** (2001) *Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse.* J. Clin. Invest., 108, 1229-1235.
234. **Natsch,A., Caroline,B., Leslie,F., Frank,G., Kimberly,N., Allison,H., Heather,I., Robert,L., Stefan,O., Hendrik,R., Andreas,S. and Roger,E.** (2011) *The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: results of a ring-study in five laboratories.* Toxicol. In Vitro, 25, 733-744.
235. **Natsch,A. and Emter,R.** (2008) *Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the in vitro testing of the sensitization potential of chemicals.* Toxicol. Sci., 102, 110-119.
236. **Natsch,A., Emter,R. and Ellis,G.** (2009) *Filling the concept with data: integrating data from different in vitro and in silico assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing.* Toxicol. Sci., 107, 106-121.
237. **Natsch,A. and Gfeller,H.** (2008) *LC-MS-based characterization of the peptide reactivity of chemicals to improve the in vitro prediction of the skin sensitization potential.* Toxicol. Sci., 106, 464-478.
238. **Nemeth,J.F., Hochgesang,G.P., Jr., Marnett,L.J. and Caprioli,R.M.** (2001) *Characterization of the glycosylation sites in cyclooxygenase-2 using mass spectrometry.* Biochemistry., 40, 3109-3116.
239. **Nestle,F.O., Di,M.P., Qin,J.Z. and Nickoloff,B.J.** (2009) *Skin immune sentinels in health and disease.* Nat. Rev. Immunol., 9, 679-691.
240. **Neves,B.M., Cruz,M.T., Francisco,V., Garcia-Rodriguez,C., Silvestre,R., Cordeiro-da-Silva,A., Dinis,A.M., Batista,M.T., Duarte,C.B. and Lopes,M.C.** (2009) *Differential roles of PI3-Kinase, MAPKs and NF-kappaB on the manipulation of dendritic cell T(h)1/T(h)2 cytokine/chemokine polarizing profile.* Mol. Immunol., 46, 2481-2492.
241. **Nomura,T., Lu,R., Pucci,M.L. and Schuster,V.L.** (2004) *The two-step model of prostaglandin signal termination: in vitro reconstitution with the prostaglandin transporter and prostaglandin 15 dehydrogenase.* Mol. Pharmacol., 65, 973-978.
242. **O'Garra,A., Vieira,P.L., Vieira,P. and Goldfeld,A.E.** (2004) *IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage.* J. Clin. Invest., 114, 1372-1378.
243. **O'Sullivan,B.J., MacDonald,K.P., Pettit,A.R. and Thomas,R.** (2000) *RelB nuclear translocation regulates B cell MHC molecule, CD40 expression, and antigen-presenting cell function.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 97, 11421-11426.
244. **Oeckinghaus,A., Hayden,M.S. and Ghosh,S.** (2011) *Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways.* Nat. Immunol., 12, 695-708.



245. **Otto, J.C. and Smith, W.L.** (1994) *The orientation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 in the endoplasmic reticulum.* J. Biol. Chem., 269, 19868-19875.
246. **Ouaaz, F., Arron, J., Zheng, Y., Choi, Y. and Beg, A.A.** (2002) *Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits.* Immunity., 16, 257-270.
247. **Park, G.Y. and Christman, J.W.** (2006) *Involvement of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in the molecular pathogenesis of inflammatory lung diseases.* Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol., 290, L797-L805.
248. **Patlewicz, G., Aptula, A.O., Uriarte, E., Roberts, D.W., Kern, P.S., Gerberick, G.F., Kimber, I., Dearman, R.J., Ryan, C.A. and Basketter, D.A.** (2007a) *An evaluation of selected global (Q)SARs/expert systems for the prediction of skin sensitisation potential.* SAR QSAR. Environ. Res., 18, 515-541.
249. **Patlewicz, G., Dimitrov, S.D., Low, L.K., Kern, P.S., Dimitrova, G.D., Comber, M.I., Aptula, A.O., Phillips, R.D., Niemela, J., Madsen, C., Wedebye, E.B., Roberts, D.W., Bailey, P.T. and Mekenyan, O.G.** (2007b) *TIMES-SS--a promising tool for the assessment of skin sensitization hazard. A characterization with respect to the OECD validation principles for (Q)SARs and an external evaluation for predictivity.* Regul. Toxicol. Pharmacol., 48, 225-239.
250. **Patlewicz, G., Jeliaskova, N., Safford, R.J., Worth, A.P. and Aleksiev, B.** (2008) *An evaluation of the implementation of the Cramer classification scheme in the Toxtree software.* SAR QSAR. Environ. Res., 19, 495-524.
251. **Peiser, M., Tralau, T., Heidler, J., Api, A.M., Arts, J.H., Basketter, D.A., English, J., Diepgen, T.L., Fuhlbrigge, R.C., Gaspari, A.A., Johansen, J.D., Karlberg, A.T., Kimber, I., Lepoittevin, J.P., Liebsch, M., Maibach, H.I., Martin, S.F., Merk, H.F., Platzek, T., Rustemeyer, T., Schnuch, A., Vandebriel, R.J., White, I.R. and Luch, A.** (2011) *Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects : Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany.* Cell Mol. Life Sci..
252. **Pichler, W.J.** (2002) *Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept.* Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 2, 301-305.
253. **Pichowski, J.S., Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Basketter, D.A. and Kimber, I.** (2000) *Investigation of induced changes in interleukin 1beta mRNA expression by cultured human dendritic cells as an in vitro approach to skin sensitization testing.* Toxicol. In Vitro., 14, 351-360.
254. **Pichowski, J.S., Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Basketter, D.A. and Kimber, I.** (2001) *Allergen-induced changes in interleukin 1 beta (IL-1 beta) mRNA expression by human blood-derived dendritic cells: inter-individual differences and relevance for sensitization testing.* J. Appl. Toxicol., 21, 115-121.
255. **Pickard, C., Smith, A.M., Cooper, H., Strickland, I., Jackson, J., Healy, E. and Friedmann, P.S.** (2007) *Investigation of mechanisms underlying the T-cell response to the hapten 2,4-dinitrochlorobenzene.* J. Invest Dermatol., 127, 630-637.
256. **Picot, D. and Garavito, R.M.** (1994) *Prostaglandin H synthase: implications for membrane structure.* FEBS Lett., 346, 21-25.



257. **Python,F., Goebel,C. and Aeby,P.** (2007) *Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens.* Toxicol. Appl. Pharmacol., 220, 113-124.
258. **Python,F., Goebel,C. and Aeby,P.** (2009) *Comparative DNA microarray analysis of human monocyte derived dendritic cells and MUTZ-3 cells exposed to the moderate skin sensitizer cinnamaldehyde.* Toxicol. Appl. Pharmacol., 239, 273-283.
259. **Randolph,G.J.** (2001) *Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators.* Semin. Immunol., 13, 267-274.
260. **Rasaiyaah,J., Yong,K., Katz,D.R., Kellam,P. and Chain,B.M.** (2007) *Dendritic cells and myeloid leukaemias: plasticity and commitment in cell differentiation.* Br. J. Haematol., 138, 281-290.
261. **Ratzinger,G., Stoitzner,P., Ebner,S., Lutz,M.B., Layton,G.T., Rainer,C., Senior,R.M., Shipley,J.M., Fritsch,P., Schuler,G. and Romani,N.** (2002) *Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin.* J. Immunol., 168, 4361-4371.
262. **Rehfeldt,W., Hass,R. and Goppelt-Struebe,M.** (1991) *Characterization of phospholipase A2 in monocytic cell lines. Functional and biochemical aspects of membrane association.* Biochem. J., 276 ( Pt 3), 631-636.
263. **Reid,G., Wielinga,P., Zelcer,N., van,d.H., I, Kuil,A., de Haas,M., Wijnholds,J. and Borst,P.** (2003) *The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 100, 9244-9249.
264. **Reiser,H. and Schneeberger,E.E.** (1996) *Expression and function of B7-1 and B7-2 in hapten-induced contact sensitivity.* Eur. J. Immunol., 26, 880-885.
265. **Ring,S., Schafer,S.C., Mahnke,K., Lehr,H.A. and Enk,A.H.** (2006) *CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue.* Eur. J. Immunol., 36, 2981-2992.
266. **Roberts,D.W., Aptula,A.O., Patlewicz,G. and Pease,C.** (2008) *Chemical reactivity indices and mechanism-based read-across for non-animal based assessment of skin sensitisation potential.* J. Appl. Toxicol., 28, 443-454.
267. **Roberts,D.W. and Natsch,A.** (2009) *High throughput kinetic profiling approach for covalent binding to peptides: application to skin sensitization potency of Michael acceptor electrophiles.* Chem. Res. Toxicol., 22, 592-603.
268. **Roberts,D.W., Patlewicz,G., Kern,P.S., Gerberick,F., Kimber,I., Dearman,R.J., Ryan,C.A., Basketter,D.A. and Aptula,A.O.** (2007) *Mechanistic applicability domain classification of a local lymph node assay dataset for skin sensitization.* Chem. Res. Toxicol., 20, 1019-1030.
269. **Romagnoli,P., Labhardt,A.M. and Sinigaglia,F.** (1991) *Selective interaction of Ni with an MHC-bound peptide.* EMBO J., 10, 1303-1306.
270. **Rousset,F., Verda,D., Garrigue J.L., Mariani,M. and Leclaire,J.** (2002) *In vitro prediction of contact sensitivity with human cell lines, Contact Dermatitis Meeting, Roma.*



271. **Rousset,F., Vigouroux,V., Desolle,P., Verda,D., Mariani,M. and Leclaire,J.** (2000) *Promonocytic human cell lines as predictive tools for contact sensitivity, American Contact Dermatitis Meeting, Dallas.*
272. **Rouzer,C.A., Scott,W.A., Griffith,O.W., Hamill,A.L. and Cohn,Z.A.** (1982) *Arachidonic acid metabolism in glutathione-deficient macrophages.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 79, 1621-1625.
273. **Rushworth,S.A., MacEwan,D.J. and O'Connell,M.A.** (2008) *Lipopolysaccharide-induced expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and heme oxygenase-1 protects against excessive inflammatory responses in human monocytes.* J. Immunol., 181, 6730-6737.
274. **Russel,F.G., Koenderink,J.B. and Masereeuw,R.** (2008) *Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules.* Trends Pharmacol. Sci., 29, 200-207.
275. **Ruzicka,T. and Printz,M.P.** (1982) *Arachidonic acid metabolism in skin: experimental contact dermatitis in guinea pigs.* Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 69, 347-352.
276. **Ryan,C.A., Gildea,L.A., Hulette,B.C., Dearman,R.J., Kimber,I. and Gerberick,G.F.** (2004) *Gene expression changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen.* Toxicol. Lett., 150, 301-316.
277. **Ryu,S.H., Cho,K.S., Lee,K.Y., Suh,P.G. and Rhee,S.G.** (1987) *Purification and characterization of two immunologically distinct phosphoinositide-specific phospholipases C from bovine brain.* J. Biol. Chem., 262, 12511-12518.
278. **Saccani,S., Pantano,S. and Natoli,G.** (2002) *p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment.* Nat. Immunol., 3, 69-75.
279. **Saint-Mezard,P., Krasteva,M., Chavagnac,C., Bosset,S., Akiba,H., Kehren,J., Kanitakis,J., Kaiserlian,D., Nicolas,J.F. and Berard,F.** (2003) *Afferent and efferent phases of allergic contact dermatitis (ACD) can be induced after a single skin contact with haptens: evidence using a mouse model of primary ACD.* J. Invest Dermatol., 120, 641-647.
280. **Saint-Mezard,P., Rosieres,A., Krasteva,M., Berard,F., Dubois,B., Kaiserlian,D. and Nicolas,J.F.** (2004) *Allergic contact dermatitis.* Eur. J. Dermatol., 14, 284-295.
281. **Sallusto,F. and Mackay,C.R.** (2004) *Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation.* Curr. Opin. Immunol., 16, 724-731.
282. **Samuelsson,B., Morgenstern,R. and Jakobsson,P.J.** (2007) *Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target.* Pharmacol. Rev., 59, 207-224.
283. **Sanderson,D.M. and Earnshaw,C.G.** (1991) *Computer prediction of possible toxic action from chemical structure; the DEREK system.* Hum. Exp. Toxicol., 10, 261-273.
284. **Scandella,E., Men,Y., Gillessen,S., Forster,R. and Groettrup,M.** (2002) *Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells.* Blood, 100, 1354-1361.



285. Scandella,E., Men,Y., Legler,D.F., Gillessen,S., Prikler,L., Ludewig,B. and Groettrup,M. (2004) *CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2*. Blood, 103, 1595-1601.
286. Schaefer,L., Babelova,A., Kiss,E., Hausser,H.J., Baliova,M., Krzyzankova,M., Marsche,G., Young,M.F., Mihalik,D., Gotte,M., Malle,E., Schaefer,R.M. and Grone,H.J. (2005) *The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages*. J. Clin. Invest., 115, 2223-2233.
287. Schenkein,H.A. (1986) *LPS-stimulated release of prostaglandin E and thromboxane B2 from the U937 cell line*. Cell Immunol., 102, 307-314.
288. Scher,J.U. and Pillinger,M.H. (2009) *The anti-inflammatory effects of prostaglandins*. J. Investig. Med., 57, 703-708.
289. Scherer,D.C., Brockman,J.A., Chen,Z., Maniatis,T. and Ballard,D.W. (1995) *Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92, 11259-11263.
290. Schlede,E., Aberer,W., Fuchs,T., Gerner,I., Lessmann,H., Maurer,T., Rossbacher,R., Stropp,G., Wagner,E. and Kayser,D. (2003) *Chemical substances and contact allergy--244 substances ranked according to allergenic potency*. Toxicology., 193, 219-259.
291. Schmidt,M., Raghavan,B., Muller,V., Vogl,T., Fejer,G., Tchaptchet,S., Keck,S., Kalis,C., Nielsen,P.J., Galanos,C., Roth,J., Skerra,A., Martin,S.F., Freudenberg,M.A. and Goebeler,M. (2010) *Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel*. Nat. Immunol., 11, 814-819.
292. Schmidt,R.J. and Chung,L.Y. (1992) *Biochemical responses of skin to allergenic and non-allergenic nitrohalobenzenes. Evidence that an NADPH-dependent reductase in skin may act as a prohapten-activating enzyme*. Arch. Dermatol. Res., 284, 400-408.
293. Schnuch,A., Uter,W., Geier,J., Lessmann,H. and Frosch,P.J. (2007) *Sensitization to 26 fragrances to be labelled according to current European regulation. Results of the IVDK and review of the literature*. Contact Dermatitis., 57, 1-10.
294. Schoeters,E., Verheyen,G.R., Nelissen,I., Van Rompay,A.R., Hooyberghs,J., Van Den Heuvel,R.L., Witters,H., Schoeters,G.E., Van,T., V and Berneman,Z.N. (2007) *Microarray analyses in dendritic cells reveal potential biomarkers for chemical-induced skin sensitization*. Mol. Immunol., 44, 3222-3233.
295. Schuster,V.L. (2002) *Prostaglandin transport*. Prostaglandins Other Lipid Mediat., 68-69:633-47., 633-647.
296. Schwarzenberger,K. and Udey,M.C. (1996) *Contact allergens and epidermal proinflammatory cytokines modulate Langerhans cell E-cadherin expression in situ*. J. Invest Dermatol., 106, 553-558.
297. Sellmayer,A., Goessl,C., Obermeier,H., Volk,R., Reder,E., Weber,C. and Weber,P.C. (1994) *Differential induction of eicosanoid synthesis in monocytic cells treated with retinoic acid and 1,25-dihydroxy-vitamin D3*. Prostaglandins, 47, 203-220.



298. **Senaldi,G., Pointaire,P., Piguët,P.F. and Grau,G.E.** (1994) *Protective effect of N-acetylcysteine in hapten-induced irritant and contact hypersensitivity reactions.* J. Invest Dermatol., 102, 934-937.
299. **Severa,M., D'Ambrosio,A., Giordani,L., Quintieri,F. and Coccia,E.** (2005) *Inhibition of interleukin-12 expression in diltiazem-treated dendritic cells through the reduction of nuclear factor-kappa B transcriptional activity.* Biochem. Pharmacol., 69, 425-432.
300. **Sexton,E., Van Themsche,C., LeBlanc,K., Parent,S., Lemoine,P. and Asselin,E.** (2006) *Resveratrol interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells.* Mol. Cancer, 5, 45.
301. **Simmons,D.L., Botting,R.M. and Hla,T.** (2004) *Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition.* Pharmacol. Rev., 56, 387-437.
302. **Sirois,J. and Richards,J.S.** (1993) *Transcriptional regulation of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. Evidence for the role of a cis-acting C/EBP beta promoter element.* J. Biol. Chem., 268, 21931-21938.
303. **Skazik,C., Heise,R., Bostanci,O., Paul,N., Denecke,B., Jousen,S., Kiehl,K., Merk,H.F., Zwadlo-Klarwasser,G. and Baron,J.M.** (2008) *Differential expression of influx and efflux transport proteins in human antigen presenting cells.*
304. **Skazik,C., Heise,R., Ott,H., Czaja,K., Marquardt,Y., Merk,H.F. and Baron,J.M.** (2011) *Active transport of contact allergens in human monocyte-derived dendritic cells is mediated by multidrug resistance related proteins.* Arch. Biochem. Biophys., 508, 212-216.
305. **Sligh,J.E., Ballantyne,C.M., Rich,S.S., Hawkins,H.K., Smith,C.W., Bradley,A. and Beaudet,A.L.** (1993) *Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90, 8529-8533.
306. **Smith,W.L.** (1992) *Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action.* Am. J. Physiol., 263, F181-F191.
307. **Smith,W.L., DeWitt,D.L. and Garavito,R.M.** (2000) *Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology.* Annu. Rev. Biochem., 69, 145-182.
308. **Soltes,L., Mendichi,R., Kogan,G., Schiller,J., Stankovska,M. and Arnhold,J.** (2006) *Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan.* Biomacromolecules., 7, 659-668.
309. **Spector,A.A.** (2009) *Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway.* J. Lipid Res., 50 Suppl:S52-6. Epub@2008 Oct 23., S52-S56.
310. **Spencer,A.G., Woods,J.W., Arakawa,T., Singer,I.I. and Smith,W.L.** (1998) *Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy.* J. Biol. Chem., 273, 9886-9893.
311. **Stichtenoth,D.O., Thoren,S., Bian,H., Peters-Golden,M., Jakobsson,P.J. and Crofford,L.J.** (2001) *Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells.* J. Immunol., 167, 469-474.



312. **Stoitzner,P., Holzmann,S., McLellan,A.D., Ivarsson,L., Stossel,H., Kapp,M., Kammerer,U., Douillard,P., Kampgen,E., Koch,F., Saeland,S. and Romani,N.** (2003) *Visualization and characterization of migratory Langerhans cells in murine skin and lymph nodes by antibodies against Langerin/CD207.* J. Invest Dermatol., 120, 266-274.
313. **Stossel,H., Koch,F., Kampgen,E., Stoger,P., Lenz,A., Heufler,C., Romani,N. and Schuler,G.** (1990) *Disappearance of certain acidic organelles (endosomes and Langerhans cell granules) accompanies loss of antigen processing capacity upon culture of epidermal Langerhans cells.* J. Exp. Med., 172, 1471-1482.
314. **Sugimoto,Y. and Narumiya,S.** (2007) *Prostaglandin E receptors.* J. Biol. Chem., 282, 11613-11617.
315. **Surh,Y.J. and Chun,K.S.** (2007) *Cancer chemopreventive effects of curcumin.* Adv. Exp. Med. Biol., 595, 149-172.
316. **Suzuki,M., Hirota,M., Hagino,S., Itagaki,H. and Aiba,S.** (2009) *Evaluation of changes of cell-surface thiols as a new biomarker for in vitro sensitization test.* Toxicol. In Vitro, 23, 687-696.
317. **Szameit,S., Vierlinger,K., Farmer,L., Tuschl,H. and Noehammer,C.** (2008) *Microarray-based in vitro test system for the discrimination of contact allergens and irritants: identification of potential marker genes.* Clin. Chem., 54, 525-533.
318. **Takanami-Ohnishi,Y., Amano,S., Kimura,S., Asada,S., Utani,A., Maruyama,M., Osada,H., Tsunoda,H., Irukayama-Tomobe,Y., Goto,K., Karin,M., Sudo,T. and Kasuya,Y.** (2002) *Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in contact hypersensitivity.* J. Biol. Chem., 277, 37896-37903.
319. **Tas,S.W., de Jong,E.C., Hajji,N., May,M.J., Ghosh,S., Vervoordeldonk,M.J. and Tak,P.P.** (2005) *Selective inhibition of NF-kappaB in dendritic cells by the NEMO-binding domain peptide blocks maturation and prevents T cell proliferation and polarization.* Eur. J. Immunol., 35, 1164-1174.
320. **Tay,A., Maxwell,P., Li,Z.G., Goldberg,H. and Skorecki,K.** (1994) *Cytosolic phospholipase A2 gene expression in rat mesangial cells is regulated post-transcriptionally.* Biochem. J., 304, 417-422.
321. **Thierse,H.J., Gamerding,K., Junkes,C., Guerreiro,N. and Weltzien,H.U.** (2005) *T cell receptor (TCR) interaction with haptens: metal ions as non-classical haptens.* Toxicology., 209, 101-107.
322. **Thompson,D. and Eling,T.** (1989) *Mechanism of inhibition of prostaglandin H synthase by eugenol and other phenolic peroxidase substrates.* Mol. Pharmacol., 36, 809-817.
323. **Thoren,S., Weinander,R., Saha,S., Jegerschold,C., Pettersson,P.L., Samuelsson,B., Hebert,H., Hamberg,M., Morgenstern,R. and Jakobsson,P.J.** (2003) *Human microsomal prostaglandin E synthase-1: purification, functional characterization, and projection structure determination.* J. Biol. Chem., 278, 22199-22209.
324. **Tive,L.** (2000) *Celecoxib clinical profile.* Rheumatology. (Oxford), 39 Suppl 2, 21-28.



325. **Toebak,M.J., de,R.J., Moed,H., Stoof,T.J., von Blomberg,B.M., Bruynzeel,D.P., Scheper,R.J., Gibbs,S. and Rustemeyer,T.** (2008) *Differential suppression of dendritic cell cytokine production by anti-inflammatory drugs.* Br. J. Dermatol., 158, 225-233.
326. **Toebak,M.J., Moed,H., von Blomberg,M.B., Bruynzeel,D.P., Gibbs,S., Scheper,R.J. and Rustemeyer,T.** (2006) *Intrinsic characteristics of contact and respiratory allergens influence production of polarizing cytokines by dendritic cells.* Contact Dermatitis, 55, 238-245.
327. **Tracey,B.M. and Shuker,D.E.** (1997) *Characterization of azo coupling adducts of benzenediazonium ions with aromatic amino acids in peptides and proteins.* Chem. Res. Toxicol., 10, 1378-1386.
328. **Treisman,R.** (1996) *Regulation of transcription by MAP kinase cascades.* Curr. Opin. Cell Biol., 8, 205-215.
329. **Trompezinski,S., Migdal,C., Tailhardat,M., Le,V.B., Courtellemont,P., Haftek,M. and Serres,M.** (2008) *Characterization of early events involved in human dendritic cell maturation induced by sensitizers: cross talk between MAPK signalling pathways.* Toxicol. Appl. Pharmacol., 230, 397-406.
330. **Turville,S.G., Cameron,P.U., Handley,A., Lin,G., Pohlmann,S., Doms,R.W. and Cunningham,A.L.** (2002) *Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets.* Nat. Immunol., 3, 975-983.
331. **Tuschl,H., Kovac,R. and Weber,E.** (2000) *The expression of surface markers on dendritic cells as indicators for the sensitizing potential of chemicals.* Toxicol. In Vitro, 14, 541-549.
332. **Uematsu,S., Matsumoto,M., Takeda,K. and Akira,S.** (2002) *Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway.* J. Immunol., 168, 5811-5816.
333. **Valladeau,J., Ravel,O., zutter-Dambuyant,C., Moore,K., Kleijmeer,M., Liu,Y., Duvert-Frances,V., Vincent,C., Schmitt,D., Davoust,J., Caux,C., Lebecque,S. and Saeland,S.** (2000) *Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules.* Immunity., 12, 71-81.
334. **van de Ven,R., Scheffer,G.L., Reurs,A.W., Lindenberg,J.J., Oerlemans,R., Jansen,G., Gillet,J.P., Glasgow,J.N., Pereboev,A., Curiel,D.T., Scheper,R.J. and de Gruijl,T.D.** (2008) *A role for multidrug resistance protein 4 (MRP4; ABCC4) in human dendritic cell migration.* Blood, 112, 2353-2359.
335. **van den Oord,J.J. and de Wolf-Peters,C.** (1994) *Epithelium-lining macrophages in psoriasis.* Br. J. Dermatol., 130, 589-594.
336. **van der Pouw Kraan,T.C., Boeije,L.C., Smeenk,R.J., Wijdenes,J. and Aarden,L.A.** (1995) *Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production.* J. Exp. Med., 181, 775-779.
337. **Van Och,F.M., Slob,W., de Jong,W.H., Vandebriel,R.J. and van,L.H.** (2000) *A quantitative method for assessing the sensitizing potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of the uncertainty margins.* Toxicology., 146, 49-59.



338. **Vocanson,M., Hennino,A., Rozieres,A., Poyet,G. and Nicolas,J.F.** (2009) *Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis*. *Allergy*, 64, 1699-1714.
339. **Wakabayashi,T., Hu,D.L., Tagawa,Y., Sekikawa,K., Iwakura,Y., Hanada,K. and Nakane,A.** (2005) *IFN-gamma and TNF-alpha are involved in urushiol-induced contact hypersensitivity in mice*. *Immunol. Cell Biol.*, 83, 18-24.
340. **Wang,X., Xue,H., Xu,Q., Zhang,K., Hao,X., Wang,L. and Yan,G.** (2008) *p38 kinase/cytosolic phospholipase A2/cyclooxygenase-2 pathway: a new signaling cascade for lipopolysaccharide-induced interleukin-1beta and interleukin-6 release in differentiated U937 cells*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 86, 61-67.
341. **Warbrick,E.V., Dearman,R.J., Basketter,D.A. and Kimber,I.** (1999) *Analysis of interleukin 12 protein production and mRNA expression in mice exposed topically to chemical allergens*. *Toxicology.*, 132, 57-66.
342. **Watanabe,H., Gaide,O., Petrilli,V., Martinon,F., Contassot,E., Roques,S., Kummer,J.A., Tschopp,J. and French,L.E.** (2007) *Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity*. *J. Invest Dermatol.*, 127, 1956-1963.
343. **Watanabe,H., Gehrke,S., Contassot,E., Roques,S., Tschopp,J., Friedmann,P.S., French,L.E. and Gaide,O.** (2008) *Danger signaling through the inflammasome acts as a master switch between tolerance and sensitization*. *J. Immunol.*, 180, 5826-5832.
344. **Weber,F.C., Esser,P.R., Muller,T., Ganesan,J., Pellegatti,P., Simon,M.M., Zeiser,R., Idzko,M., Jakob,T. and Martin,S.F.** (2010) *Lack of the purinergic receptor P2X(7) results in resistance to contact hypersensitivity*. *J. Exp. Med.*, 207, 2609-2619.
345. **Weltzien,H.U., Moulon,C., Martin,S., Padovan,E., Hartmann,U. and Kohler,J.** (1996) *T cell immune responses to haptens. Structural models for allergic and autoimmune reactions*. *Toxicology.*, 107, 141-151.
346. **Williams,I.R. and Kupper,T.S.** (1996) *Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system*. *Life Sci.*, 58, 1485-1507.
347. **Woo,K.J. and Kwon,T.K.** (2007) *Sulforaphane suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression through the modulation of multiple targets in COX-2 gene promoter*. *Int. Immunopharmacol.*, 7, 1776-1783.
348. **Xu,C., Shen,G., Chen,C., Gelinas,C. and Kong,A.N.** (2005) *Suppression of NF-kappaB and NF-kappaB-regulated gene expression by sulforaphane and PEITC through IkappaBalpha, IKK pathway in human prostate cancer PC-3 cells*. *Oncogene*, 24, 4486-4495.
349. **Xu,H., Dilulio,N.A. and Fairchild,R.L.** (1996) *T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (Il) 4/Il-10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells*. *J. Exp. Med.*, 183, 1001-1012.
350. **Xu,H., Heeger,P.S. and Fairchild,R.L.** (1997) *Distinct roles for B7-1 and B7-2 determinants during priming of effector CD8+ Tc1 and regulatory CD4+ Th2 cells for contact hypersensitivity*. *J. Immunol.*, 159, 4217-4226.



351. **Yang,J., Huck,S.P., McHugh,R.S., Hermans,I.F. and Ronchese,F.** (2006) *Perforin-dependent elimination of dendritic cells regulates the expansion of antigen-specific CD8+ T cells in vivo.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 103, 147-152.
352. **Yao,C., Sakata,D., Esaki,Y., Li,Y., Matsuoka,T., Kuroiwa,K., Sugimoto,Y. and Narumiya,S.** (2009) *Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion.* Nat. Med., 15, 633-640.
353. **Yen,J.H., Khayrullina,T. and Ganea,D.** (2008) *PGE2-induced metalloproteinase-9 is essential for dendritic cell migration.* Blood., 111, 260-270.
354. **Yokomizo,T., Izumi,T., Chang,K., Takuwa,Y. and Shimizu,T.** (1997) *A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis.* Nature., 387, 620-624.
355. **Yoshimoto,T., Nagase,H., Ishida,T., Inoue,J. and Nariuchi,H.** (1997) *Induction of interleukin-12 p40 transcript by CD40 ligation via activation of nuclear factor-kappaB.* Eur. J. Immunol., 27, 3461-3470.
356. **Yoshimura,S., Bondeson,J., Foxwell,B.M., Brennan,F.M. and Feldmann,M.** (2001) *Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines.* Int. Immunol., 13, 675-683.
357. **Youn,H.S., Lee,J.K., Choi,Y.J., Saitoh,S.I., Miyake,K., Hwang,D.H. and Lee,J.Y.** (2008) *Cinnamaldehyde suppresses toll-like receptor 4 activation mediated through the inhibition of receptor oligomerization.* Biochem. Pharmacol., 75, 494-502.
358. **Zhang,F.X., Kirschning,C.J., Mancinelli,R., Xu,X.P., Jin,Y., Faure,E., Mantovani,A., Rothe,M., Muzio,M. and Arditi,M.** (1999) *Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes.* J. Biol. Chem., 274, 7611-7614.
359. **Zhang,X., Chen,X., Song,H., Chen,H.Z. and Rovin,B.H.** (2005) *Activation of the Nrf2/antioxidant response pathway increases IL-8 expression.* Eur. J. Immunol., 35, 3258-3267.



# ANNEXES



## I. Annexe 1 : Résultats du test PGE<sub>2</sub> pour 176 molécules au regard des données in vivo (LLNA et clinique)

Molécules codées OA sont des molécules internes.

NS : sensibilisant

S : sensibilisant

Nom de la molécule	CAS	Type d'ingrédient cosmétique	PGE <sub>2</sub> 24h		PGE <sub>2</sub> 48h	LLNA	Statut clinique
			IR min	EC(40)	IR min		
Acide benzoïque	65-85-0	ANTIMICROBIEN (conservateurs, co-conservateurs)	124		61	NS	
Alcool benzylique	100-51-6	ANTIMICROBIEN (conservateurs, co-conservateurs)	56		61	NS	S (rare)
p-méthylaminophenol sulfate	55-55-0	ANTIMICROBIEN (conservateurs, co-conservateurs)	61		165	Moderate	
Chlorure de benzalkonium	8001-54-5	ANTIMICROBIEN (conservateurs, co-conservateurs)	54		95	NS	NS
OA2		PIGMENT & COLORANT	131		100	NS	
OA3		HUILE	75		75	NS	
OA6		FILMOGENE (polymère)	50		97	NS	
OA7		ANTIMICROBIEN (conservateurs, co-conservateurs)	59		59	NS	
OA8		EPAISSISSANT (minéral, polymère, silicone)	84		65	NS	
OA9		TENSIOACTIF	66		39	NS	
OA10		ACTIF	73		183	NS	
Dimethyl sulfone	67-71-0	ACTIF	98		98	NS	

OA12		ACTIF	81		69	NS	
OA13		FILMOGENE (polymère)	83		134	NS	
OA14		FILMOGENE (polymère)	90		95	NS	
OA15		SOLVANT	123		91	NS	
OA16		EPAISSISSANT (minéral, polymère, silicone)	370		800	NS	
OA17		FILMOGENE (polymère)	86		104	NS	
Glyoxal	107-22-2	ANTIMICROBIEN (conservateurs, co-conservateurs)	69		51	Moderate	S
3-diméthylaminopropylamine	109-55-7	NR non cosmétique	93		50	Moderate	S
1-Bromobutane	109-65-9	NR non cosmétique	62		61	NS	
Isopropyl myristate	110-27-0	HUILE	112		77	Weak	
Methyl salicylate	119-36-8	ANTIMICROBIEN	47		98	NS	NS
Acide sulfanilique	121-57-3	NR non cosmétique	63		68	NS	NS
Acide octanoïque	124-07-2	TENSIOACTIF	71		17	NS	
chloro octadécane	3386-33-2	NR non cosmétique	54		33	Weak	
3,5,5-Triméthylhexanoyl chloride	36727-29-4	NR non cosmétique	93		84	Moderate	
Lactic acid	50-21-5	ACTIF	87		151	NS	NS
Glycerol	56-81-5	ACTIF	93		121	NS	NS
Propylene glycol	57-55-6	SOLVANT	79		59	NS	NS
Methyl paraben	99-76-3	ANTIMICROBIEN	41		44	NS	S (fréquence faible)
Sulfanilamide	63-74-1	NR non cosmétique	59		97	NS	
Diethylsulfate	64-67-5	NR non cosmétique	110		113	Moderate	
Isopropanol	67-63-0	SOLVANT	77		73	NS	S
Butanol	71-36-3	SOLVANT	95		89	NS	
Diethylphthalate	84-66-2	ingrédient de parfum	128		86	NS	NS

ac. Tartaric	87-69-4	ACTIF	110		78	NS	
4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	ANTIMICROBIEN (conservateurs, co-conservateurs)	96		58	NS	
OA18		CIRES	106		114	NS	
OA19		ACTIF	81		84	NS	
OA22		NR non cosmétique	83		167	NS	
GLUTARALDEHYDE	111-30-8	ANTIMICROBIEN (conservateurs, co-conservateurs)	41		172	Strong	S
OA23		TENSIOACTIF	105		69	NS	
OA24		CIRES	87		124	NS	
OA31		coloration directe	193		342	NS	
OA32		coloration directe	166		229	NS	
OA34		coloration directe	99		251	NS	S
PTD, 1,4-Benzenediamine, 2-methyl-, sulfate	615-50-9	coloration d'oxydation	71		55	Strong	S
OA37		coloration d'oxydation	118		228	Strong	
OA44		coloration directe	97		85	NS	
OA45		coloration d'oxydation	328		391	Extreme	
OA46		ACTIF	105		108	NS	
OA47		coloration d'oxydation	60		80	Moderate	
OA50		filtre UV	76		76	NS	
OA51		coloration d'oxydation	111		108	Moderate	
FORMALDEHYDE	50-00-0	ANTIMICROBIEN (conservateurs, co-conservateurs)	97		56	Strong	S
OA61		ACTIF	55		71	NS	
OA64		ACTIF	294		325	Moderate	
OA65		FILMOGENE (polymère)	93		90	NS	

OA71		ACTIF	88		87	NS	
OA72		coloration directe	57		51	NS	
OA78		ACTIF	117		135	NS	
abietic acid	514-10-3		48		115	Weak	S
acid citric	77-92-9		70		29	NS	NS
Acide glycolique	79-14-1		94		96	NS	NS
Brij 52	9004-95-9		60		60	NS	NS
Dimethyl sulfate	77-78-1		117		108	Strong	
Isododecane	31807-55-3		67		67	NS	
Phthalic anhydride	85-44-9		117		120	Strong	S
Tween 20	9005-64-5		75		59	NS	
Acide salicylique	69-72-7	ANTIMICROBIEN (conservateurs, co-conservateurs)	10	25	12	NS	NS
Propyl paraben	94-13-3	ANTIMICROBIEN (conservateurs, co-conservateurs)	0	50	18	NS	S (fréquence faible)
Thioglycerol	96-27-5	DIVERS - ADDITIF TECHNIQUES	4	50	9	Strong	S
t-Butylhydroquinone	1948-33-0	DIVERS - ADDITIF TECHNIQUES	2	0,5	0	Strong	
OA1		FILMOGENE (polymère)	39	200	119	Weak	
Tween 21	9005-64-5	TENSIOACTIF	21	25	10	Weak	
OA4		ANTIMICROBIEN (conservateurs, co-conservateurs)	3	10	0	strong	
OA5		TENSIOACTIF	21	100	104	Moderate	
OA11		ACTIF	7	0,5	0	Weak	
Butyl glycidyl ether	2426-08-6	NR non cosmétique	22	100	53	Weak	S
benzyl bromide	100-39-0	NR non cosmétique	0	6,25	0	Strong	S
2-methyl-3-phenyl-2-propenal	101-39-3	ingrédient de parfum	0	6,25	0	Moderate	
1,4-phenylenediamine	106-50-3	coloration d'oxydation	0	2,5	0	Strong	S

1,4-benzoquinone	106-51-4	coloration directe	0	1	9	Extreme	S
Ethylène diamine, EDA	107-15-3	DIVERS - ADDITIF TECHNIQUES	17	50	40	Moderate	S
Hydroxycitronellal	107-75-5	ingrédient de parfum	27	20	29	Weak	S
3-phenylenediamine	108-45-2	coloration d'oxydation	3	12,5	14	Strong	
Resorcinol	108-46-3	coloration d'oxydation	2	6,25	0	Moderate	S
Hexane	110-54-3	NR non cosmétique	0	6,25	0	NS	
Diethylenetriamine	111-40-0	DIVERS - ADDITIF TECHNIQUES	3	50	6	Moderate	S
Safranal	116-26-7	ingrédient de parfum	25	50	37	Moderate	
Benzyl benzoate	120-51-4	ingrédient de parfum	9	100	61	Weak	S (rare)
Ethyl vanilline	121-32-4	ingrédient de parfum	13	50	31	NS	
Propyl gallate	121-79-9	ingrédient de parfum	0	5	3	Strong	S
4-phenyl-3-buten-2-one, Benzylideneacetone	122-57-6	ingrédient de parfum	0	12,5	0	Moderate	
Phenylacetaldehyde	122-78-1	ingrédient de parfum	15	10	18	Moderate	
Hydroquinone	123-31-9	ACTIF	3	0,5	39	Strong	S
Tetramethylthiuram disulfide	137-26-8	NR non cosmétique	0	0,1	0	Moderate	S
Diethyl maleate	141-05-9	NR non cosmétique	3	5	3	Moderate	
Sodium Lauryl Sulfate, SDS	151-21-3	TENSIOACTIF	6	25	3	NS	NS
Oxazolone	15646-46-5	NR non cosmétique	0	1	5	Extreme	S
Farnesal	19317-11-4	ingrédient de parfum	15	2,5	26	Weak	
1,2-benzisothiazolin-3-one	2634-33-5	ANTIMICROBIEN	2	1	13	Moderate	S
Diacetyl, 2,3 butanedione	431-03-8	ingrédient de parfum	2	200	74	Weak	
Furil	492-94-4	NR non cosmétique	14	50	20	NS	
Hydrocortisone	50-23-7	ACTIF	0	6,25	0	NS	S
2-Nitro-p-phenylenediamine	5307-14-2	coloration directe	0	6,25	0	Strong	S
Trimellitic anhydride	552-30-7	NR non cosmétique	14	200	6	Moderate	

1-Phenyl-1,2-propanedione	579-07-7	DIVERS - ADDITIF TECHNIQUES	5	50	18	Moderate	
Methyl methanesulfonate	66-27-3	NR non cosmétique	4	7,5	92	Moderate	
Trans-2-Hexenal	6728-26-3	ingrédient de parfum	0	25	0	Moderate	
Coumarin	91-64-5	ingrédient de parfum	0	100	0	NS	S
6-Methylcoumarin	92-48-8	ingrédient de parfum	0	10	7	NS	
1-Thioglycerol	96-27-5	DIVERS - ADDITIF TECHNIQUES	4	6,25	4	S	S
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene, DNCB	97-00-7	NR non cosmétique	0	0,1	6	Extreme	S
Isoeugenol	97-54-1	ingrédient de parfum	0	1	0	Moderate	S
Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	NR non cosmétique	19	200	61	Weak	S
OA20		ingrédient de parfum	0	6,25	0	NS	
OA21		ANTIMICROBIEN	15	5	100	Strong	S
OA25		coloration directe	0	6,25	0	Moderate	
OA26		coloration directe	3	12,5	3	Strong	
OA27		coloration directe	3	25	24	Moderate	
OA28		coloration directe	0	6,25	0	Strong	
4-Amino-3-nitrophenol	610-81-1	coloration directe	0	6,25	0	Strong	
OA29		coloration directe	0	6,25	0	Extreme	S
OA30		coloration directe	16	200	22	Moderate	
OA33		coloration directe	5	2,5	0	NS	
OA35		coloration d'oxydation	4	25	4	Strong	
Resorcinol	108-46-3	coloration d'oxydation	0	6,25	0	Moderate	S
OA36		coloration directe	3	6,25	0	NS	
p-PHENYLENEDIAMINE	624-18-0	coloration d'oxydation	1	2,5	10	Extreme	
OA38		coloration d'oxydation	12	10	154	Strong	
OA39		coloration d'oxydation	18	20	108	Strong	

OA40		coloration d'oxydation	22	2,5	110	Extreme	
m-aminophenol, 3-aminophenol, 3-hydroxyaniline	591-27-5	coloration d'oxydation	10	6,25	0	Strong	S
2-Methyl-5-hydroxyethylaminophenol	55302-96-0	coloration d'oxydation	0	6,25	0	NS	
OA41		coloration d'oxydation	6	25	9	Moderate	
OA42		coloration directe	19	25	4	NS	
OA43		coloration d'oxydation	0	6,25	0	Moderate	
OA48		ACTIF	0	0,5	0	NS	
OA49		ACTIF	5	50	0	NS	
OA52		coloration d'oxydation	6	30	204	Strong	
OA53		coloration directe	2	6,25	0	Moderate	
OA54		coloration directe	2	6,25	0	NS	
OA55		coloration d'oxydation	4	5	0	Extreme	
OA56		coloration d'oxydation	12	50	35	Moderate	
OA57		coloration d'oxydation	10	25	29	Moderate	
OA58		coloration d'oxydation	2	6,25	0	Moderate	
OA59		coloration d'oxydation	2	6,25	0	Moderate	
OA60		coloration d'oxydation	14	50	21	Moderate	
OA62		coloration d'oxydation	5	20	8	Moderate	
OA63		coloration d'oxydation	0	25	0	Weak	
OA66		coloration d'oxydation	3	12,5	0	Moderate	

OA67		coloration d'oxydation	3	12,5	15	Moderate	
OA68		ACTIF	11	200	22	Weak	
OA69		coloration d'oxydation	19	200	35	NS	
OA70		ANTIMICROBIEN (conservateurs, co-conservateurs)	12	10	4	Moderate	
OA73		coloration d'oxydation	27	100	6	NS	
OA74		coloration d'oxydation	0	2,5	0	Extreme	
OA75		coloration d'oxydation	11	25	0	Strong	
OA76		coloration d'oxydation	21	200	38	Moderate	
OA77		coloration d'oxydation	6	100	7	NS	
OA79		coloration d'oxydation	15	100	0	Strong	
OA80		coloration d'oxydation	4	0,75	97	Strong	
OA81		coloration d'oxydation	15	25	5	Moderate	
OA82		coloration d'oxydation	14	100	15	Strong	
4-allylanisole, Estragole	140-67-0	ingrédient de parfum	7	50	89	Weak	
4-nitrobenzyl bromide	100-11-8		17	0,75	23	Extreme	S
Chlorhexidine	55-56-1		8	0,5	2	Weak	
Cinnamaldehyde	104-55-2	ingrédient de parfum	24	2,5	2	Moderate	S
Citral	5392-40-5	ingrédient de parfum	27	25	10	Weak	S
Eugenol	97-53-0	ingrédient de parfum	0	1	0	Weak	S
Phenyl benzoate	93-99-2		5	50	7	Weak	S
TNBS	2508-19-2		19	25	26	Extreme	S

## II. Annexe 2 : Coordonnées de la courbe ROC pour IR<sub>min</sub> de PGE<sub>2</sub> à 24h

Seuil de positivité inférieur ou égal à <sup>a</sup>	Sensitivity	1 - Specificity
26,00	,789	,250
33,00	,807	,263
40,00	,817	,263
44,00	,826	,275
47,50	,826	,288
49,00	,835	,288
52,00	,835	,300
54,50	,844	,313
55,50	,844	,325
56,50	,844	,338
57,50	,844	,350
58,50	,853	,350
59,50	,862	,375
60,50	,872	,388
61,50	,881	,388
62,50	,881	,400
64,50	,881	,413
66,50	,881	,425
68,00	,881	,438
69,50	,890	,450
70,50	,890	,463
71,50	,899	,475
72,50	,899	,488
73,50	,899	,500
74,50	,899	,513
75,50	,899	,538
76,50	,899	,550
78,00	,899	,563
80,00	,899	,575
81,50	,899	,600

### III. Annexe 3 : Résultats IR<sub>min</sub> et IR<sub>max</sub> pour marqueurs TNF-α et IL-1β (50 molécules de référence)

NS : sensibilisant

Molécule	PGE <sub>2</sub>		TNF-α				IL-1β				LLNA
	IR min	IR max	IR min	EC(50)	IR max	EC(150)	IR min	EC(50)	IR max	EC(150)	
Eugenol	0	0	0	200	98		50		100	1	Weak
Chlorhexidine	2	55	8	5	80		25	5	68		Weak
NiSO4	8	52	29	10	99		68		82		Weak
Isopropyl myristate	56	149	97		109		86		118		Weak
Tween21	10	158	43	200	148		64		120		Weak
Hydroxycitronellal	27	228	92		110		76		98		Weak
Acide abietique	48	286	81		104		24	20	87		Weak
Phenyl benzoate	7	142	106		125		106		241	200	Weak
Citral	10	173	119		125		35	10	118		Weak
Butyl glycidyl ether	22	110	10	200	133		5	50	90		Weak
Isoeugenol	0	10	0	25	76		0	10	69		Moderate
Cinnamaldehyde	2	71	0	10	50		24	15	468	1	Moderate
Phenylacetaldehyde	7	105	80		111		20	30	82		Moderate
Diethylsulfate	69	221	72		107		24	100	75		Moderate
Diethyl maleate	3	77	3	20	223	1	6	10	89		Moderate
TMTD	0	91	65		100		32	1	69		Moderate
Propyl gallate	0	0	68		142		90		200	10	strong
PPD	1	117	138		219	1	110		160	5	strong
Hydroquinone	3	130	90		185	0,5	65		100		strong
Phthalic anhydride	117	338	91		126		70		90		strong
Glutaraldéhyde	81	199	65		125		29	7,5	99		strong
Formaldéhyde	80	118	96		122		104		145		strong
MDBGN	0	194	62		97		69		79		strong
Dimethyl sulfate	117	256	101		138		58		91		strong
Oxazolone	3	15	81		89		33	100	105		extreme
DNCB	33	76	60		67		55		100		extreme
PAP	0	46	248		351	1	22	1	49		extreme
TNBS	19	63	87		104		34	50	71		extreme

MCI	58	142	83		106		67		103		extreme
4-nitrobenzyl bromide	17	113	55		90		75		102		extreme
Methyl paraben	31	133	89		138		66		188	200	NS
Propyl paraben	2	125	42	50	133		49	50	100		NS
MnCl2	123	186	86		168	50	1277				NS
Acide salicylique	10	116	94		120		116		196	200	NS
Acide sulfanilique	68	183	91		130		81		107		NS
Acide octanoïque	71	134	103		361	50	101		401	100	NS
Saccharin	101	112	107		163	200	97		101		NS
Butanol	95	120	87		109		78		111		NS
Acide citrique	68	142	43	200	109		51		111		NS
Vanilline	11	26	220		339	1	58		862	25	NS
4-Hydrobenzoic acid	65	88	99		149		58		91		NS
Isopropanol	77	120	83		95		61		90		NS
Propylene glycol	79	130	89		103		80		206		NS
Methylsalicylate	47	105	81		100		73		118		NS
6 methylcoumarine	0	91	0	50	85		21	200	2297	1	NS
Acide lactique	99	196	85		121		91		125		NS
SDS	6	102	8	50	192	5	35	50	168	5	NS
Glycerol	85	125	91		114		79		120		NS
Tween20	59	133	86		151	1	40	200	119		NS
Acide glycolique	96	131	90		102		49	200	66		NS

#### IV. Annexe 4 : Résultats comparatifs de la prédiction des tests PGE<sub>2</sub>, MUSST, DPRA, Nrf2-HTS et LLNA et catégories de réactivité chimique (Toxtree) pour 160 molécules

Molécules codées OA sont des molécules internes.

NS : sensibilisant

S : sensibilisant

INC : non classé

Nom de la molécule	CAS	PGE <sub>2</sub>	MUSST	DPRA	NRF2-HTS	LLNA	Toxtree
Acide benzoïque	65-85-0	NS	NS	INC	NS	NS	No binding
Alcool benzylique	100-51-6	NS	NS	NS	NS	NS	No binding
p-méthylaminophenol sulfate	55-55-0	NS	S	S	S	Moderate	Michael Acceptor
Chlorure de benzalkonium	8001-54-5	NS	INC	NS	S	NS	
OA2		NS	INC	S	S	NS	No binding
OA3		NS	INC	NS	NS	NS	No binding
OA6		NS	INC	INC	S	NS	
OA7		NS	S	NS	NS	NS	No binding
OA8		NS	NS	INC	NS	NS	
OA9		NS	INC	INC	INC	NS	
OA10		NS	INC	INC	NS	NS	
Diméthyl sulfone	67-71-0	NS	NS	NS	NS	NS	No binding
OA12		NS	NS	NS	NS	NS	Acyl Transfer agent
OA13		NS	INC	INC	NS	NS	
OA14		NS	INC	INC	S	NS	
OA15		NS	INC	NS	NS	NS	No binding
OA16		NS	INC	INC	NS	NS	
OA17		NS	NS	NS	NS	NS	
Glyoxal	107-22-2	NS	S	S	S	Moderate	No binding
3-diméthylaminopropylamine	109-55-7	NS	NS	NS	S	Moderate	Schiff base formation
1-Bromobutane	109-65-9	NS	INC	NS	NS	NS	SN2
Isopropyl myristate	110-27-0	NS	NS	NS	NS	Weak	No binding
Méthyl salicylate	119-36-8	NS	NS	NS	NS	NS	No binding

Acide sulfanilique	121-57-3	NS	NS	INC	NS	NS	No binding
Acide octanoïque	124-07-2	NS	S	NS	INC	NS	No binding
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one, MCI	26172-55-4	NS	S	S	NS	Extreme	SN2
chloro octadécane	3386-33-2	NS	INC	INC	INC	Weak	SN2
3,5,5-Trimethylhexanoyl chloride	36727-29-4	NS	S	S	NS	Moderate	Acyl Transfer agent
Lactic acid	50-21-5	NS	NS	NS	NS	NS	No binding
Glycerol	56-81-5	NS	NS	NS	NS	NS	No binding
Propylene glycol	57-55-6	NS	NS	INC	NS	NS	No binding
Methyl paraben	99-76-3	NS	S	NS	S	NS	No binding
Sulfanilamide	63-74-1	NS	NS	NS	NS	NS	No binding
Diethylsulfate	64-67-5	NS	S	S	NS	Moderate	SN2
Isopropanol	67-63-0	NS	NS	NS	NS	NS	No binding
Butanol	71-36-3	NS	NS	NS	NS	NS	No binding
Diethylphthalate	84-66-2	NS	NS	NS	NS	NS	No binding
ac. Tartaric	87-69-4	NS	NS	NS	NS	NS	No binding
4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	NS	NS	NS	NS	NS	No binding
OA18		NS	INC	NS	NS	NS	
OA19		NS	INC	INC	NS	NS	
OA22		NS	NS	S	NS	NS	
GLUTARALDEHYDE	111-30-8	NS	S	S	S	Strong	Schiff base formation
OA23		NS	S	NS	NS	NS	
OA24		NS	INC	NS	NS	NS	
OA31		NS	NS	NS	S	NS	No binding
OA32		NS	NS	S	NS	NS	No binding
OA34		NS	NS	NS	NS	NS	No binding
PTD, 1,4-Benzenediamine, 2-methyl-, sulfate 1,4-Benzenediamine, 2-methyl-, sulfate	615-50-9	NS	S	S	S	Strong	Michael Acceptor
OA37		NS	S	S	S	Strong	Michael Acceptor
OA44		NS	S	S	S	NS	Michael Acceptor

OA45		NS	INC	S	S	Extreme	Michael Acceptor
OA46		NS	NS	NS	NS	NS	No binding
OA47		NS	S	S	S	Moderate	Acyl Transfer agent
OA50		NS	INC	NS	INC	NS	No binding
OA51		NS	S	S	S	Moderate	Michael Acceptor
FORMALDEHYDE	50-00-0	NS	S	S	S	Strong	Schiff base formation
OA61		NS	S	NS	NS	NS	No binding
OA64		NS	S	NS	S	Moderate	Acyl Transfer agent
OA65		NS	INC	NS	NS	NS	
OA71		NS	INC	NS	S	NS	Acyl Transfer agent
OA72		NS	INC	INC	NS	NS	No binding
OA78		NS	INC	INC	NS	NS	No binding
Acide salicylique	69-72-7	S	NS	INC	NS	NS	No binding
Propyl paraben	94-13-3	S	S	NS	S	NS	No binding
Thioglycerol	96-27-5	S	INC	S	INC	Strong	No binding
t-Butylhydroquinone	1948-33-0	S	INC	S	S	Strong	Michael Acceptor
OA1		S	INC	NS	NS	Weak	
Tween 21	9005-64-5	S	S	S	INC	Weak	
OA4		S	INC	S	NS	strong	
OA5		S	S	S	S	Moderate	
OA11		S	INC	S	S	Weak	
Butyl glycidyl ether	2426-08-6	S	S	S	NS	Weak	SN2
benzyl bromide	100-39-0	S	INC	S	S	Strong	SN2
2-methyl-3-phenyl-2-propenal	101-39-3	S	INC	S	NS	Moderate	Michael Acceptor
1,4-phenylenediamine	106-50-3	S	S	S	S	Strong	Michael Acceptor
1,4-benzoquinone	106-51-4	S	S	S	S	Extreme	Michael Acceptor
Ethylène diamine, EDA	107-15-3	S	S	NS	NS	Moderate	Schiff base formation
Hydroxycitronellal	107-75-5	S	INC	S	S	Weak	Schiff base formation
3-phenylenediamine	108-45-2	S	S	S	S	Strong	Michael Acceptor
Resorcinol	108-46-3	S	S	S	INC	Moderate	Michael Acceptor
Hexane	110-54-3	S	NS	NS	NS	NS	No binding

Diethylenetriamine	111-40-0	S	NS	NS	NS	Moderate	Schiff base formation
Safranal	116-26-7	S	INC	S	S	Moderate	Schiff base formation
Benzyl benzoate	120-51-4	S	INC	NS	NS	Weak	Acyl Transfer agent
Ethyl vanilline	121-32-4	S	INC	NS	S	NS	Schiff base formation
Propyl gallate	121-79-9	S	S	S	S	Strong	Michael Acceptor
4-phenyl-3-buten-2-one, Benzylideneacetone	122-57-6	S	INC	S	S	Moderate	Michael Acceptor
Phenylacetaldehyde	122-78-1	S	INC	S	NT	Moderate	Schiff base formation
Hydroquinone	123-31-9	S	S	S	S	Strong	Michael Acceptor
Tetramethylthiuram disulfide	137-26-8	S	INC	S	S	Moderate	No binding
Diethyl maleate	141-05-9	S	INC	S	S	Moderate	Michael Acceptor
Sodium Lauryl Sulfate, SDS	151-21-3	S	INC	S	S	Weak	No binding
Oxazolone	15646-46-5	S	NS	S	S	Extreme	Acyl Transfer agent
Farnesal	19317-11-4	S	INC	S	S	Weak	Schiff base formation
1,2-benzisothiazolin-3-one	2634-33-5	S	INC	S	S	Moderate	SN2
Diacetyl, 2,3 butanedione	431-03-8	S	S	S	S	Weak	Schiff base formation
Furil	492-94-4	S	S	S	INC	NS	Schiff base formation
Hydrocortisone	50-23-7	S	NS	S	NS	NS	Schiff base formation
2-Nitro-p-phenylenediamine	5307-14-2	S	S	S	S	Strong	Michael Acceptor
Trimellitic anhydride	552-30-7	S	NS	NS	NS	Moderate	Acyl Transfer agent
1-Phenyl-1,2-propanedione	579-07-7	S	S	S	NT	Moderate	Schiff base formation
Methyl methanesulfonate	66-27-3	S	S	S	S	Moderate	SN2
Trans-2-Hexenal	6728-26-3	S	INC	S	NT	Moderate	Michael Acceptor
Coumarin	91-64-5	S	NS	NS	S	NS	Michael Acceptor
6-Methylcoumarin	92-48-8	S	INC	NS	S	NS	Michael Acceptor
1-Thioglycerol	96-27-5	S	INC	S	INC	S	No binding
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene, DNCB	97-00-7	S	INC	S	S	Extreme	SNAr

Isoeugenol	97-54-1	S	S	S	NS	Moderate	Michael Acceptor
Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	S	S	S	NS	Weak	Michael Acceptor
OA20		S	S	INC	INC	NS	No binding
OA21		S	INC	S	S	Strong	2 Mechanisms
OA25		S	S	S	S	Moderate	Michael Acceptor
OA26		S	INC	S	S	Strong	Michael Acceptor
OA27		S	INC	S	S	Moderate	Michael Acceptor
OA28		S	NS	S	S	Strong	Michael Acceptor
4-Amino-3-nitrophenol	610-81-1	S	S	S	S	Strong	Michael Acceptor
OA29		S	S	S	S	Extreme	Michael Acceptor
OA30		S	S	S	S	Moderate	Schiff base formation
OA33		S	S	S	S	NS	Michael Acceptor
OA35		S	INC	INC	S	Strong	Michael Acceptor
Resorcinol	108-46-3	S	S	S	S	Moderate	Michael Acceptor
OA36		S	INC	INC	INC	NS	Michael Acceptor
p-PHENYLENEDIAMINE	624-18-0	S	S	S	S	Extreme	Michael Acceptor
OA38		S	S	S	S	Strong	Michael Acceptor
OA39		S	S	S	S	Strong	Michael Acceptor
OA40		S	S	S	S	Extreme	Michael Acceptor
m-aminophenol, 3-aminophenol, 3-hydroxyaniline	591-27-5	S	S	NS	S	Strong	Michael Acceptor
2-Methyl-5-hydroxyethylaminophenol	55302-96-0	S	S	S	S	NS	Michael Acceptor
OA41		S	S	S	NS	Moderate	Michael Acceptor
OA42		S	S	S	S	NS	Michael Acceptor
OA43		S	S	S	S	Moderate	Acyl Transfer agent
OA48		S	S	NS	INC	NS	2 Mechanisms
OA49		S	S	NS	INC	NS	No binding
OA52		S	S	S	S	Strong	Michael Acceptor
OA53		S	INC	INC	S	Moderate	Michael Acceptor
OA54		S	INC	INC	S	NS	Michael Acceptor
OA55		S	INC	S	S	Extreme	No binding
OA56		S	S	S	S	Moderate	No binding

OA57		S	S	S	INC	Moderate	No binding
OA58		S	S	S	S	Moderate	Michael Acceptor
OA59		S	INC	S	S	Moderate	Michael Acceptor
OA60		S	S	S	S	Moderate	Michael Acceptor
OA62		S	S	S	S	Moderate	Michael Acceptor
OA63		S	INC	S	S	Weak	Michael Acceptor
OA66		S	S	S	S	Moderate	Michael Acceptor
OA67		S	S	S	S	Moderate	Michael Acceptor
OA68		S	NS	INC	NS	Weak	Acyl Transfer agent
OA69		S	NS	S	NS	NS	SN2
OA70		S	S	NS	S	Moderate	No binding
OA73		S	NS	S	NS	NS	SN2
OA74		S	S	S	S	Extreme	Michael Acceptor
OA75		S	INC	S	S	Strong	2 Mechanisms
OA76		S	INC	S	NS	Moderate	SN2
OA77		S	INC	S	NS	NS	2 Mechanisms
OA79		S	S	S	INC	Strong	2 Mechanisms
OA80		S	INC	S	S	Strong	Michael Acceptor
OA81		S	INC	S	S	Moderate	Michael Acceptor
OA82		S	INC	INC	INC	Strong	Michael Acceptor
4-allylanisole, Estragole	140-67-0	S	NS	S	NS	Weak	Michael Acceptor



## RESUME

---

Les sensibilisants de contact sont des molécules réactives électrophiles qui ont la capacité de modifier des protéines de la peau pour former un antigène. Au delà de ce mécanisme d'hapténisation, le signal de danger induit par les sensibilisants conduisant à l'activation des cellules dendritiques (DC) est un élément déterminant dans l'induction de cellules T spécifiques de l'haptène. Dans le contexte du 7<sup>ième</sup> amendement à la directive cosmétique européenne, la mise en place d'une batterie de tests *in vitro* permettant de prédire le potentiel sensibilisant de molécules est indispensable pour l'industrie cosmétique. Tandis que la plupart des études *in vitro* étudient les signaux de danger induits par les sensibilisants dans des modèles homéostasiques, nous nous sommes intéressés à l'effet des sensibilisants sur la mise en place d'une réponse inflammatoire.

Lorsque la lignée U937 est différenciée avec du PMA et stimulée avec du LPS, les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et Nrf2 sont activés et l'acide arachidonique (AA) est métabolisé au travers de la cascade cPLA<sub>2</sub>/COX-2. L'ensemble de ces voies activées conduit à la production par les U937 d'un grand nombre de médiateurs inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-8, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, TxB<sub>2</sub>). Dans ce modèle, nous avons analysé l'effet de 6 sensibilisants de potentiels variés (DNCB, PPD, HQ, PG, CIN, EUG) et montré que de façon inattendue, tous les sensibilisants étudiés diminuent significativement et de façon spécifique la production de tous les prostanoïdes et en particulier de PGE<sub>2</sub> induite par PMA/LPS. Nous avons de plus démontré que selon les sensibilisants, les cibles de cette inhibition au sein de la cascade métabolique de l'AA diffèrent, même si elles se focalisent la plupart du temps (sauf pour le DNCB) sur l'enzyme COX-2 (inhibition de son expression et/ou de son activité). Pour le DNCB, le mécanisme d'inhibition semble plutôt impliquer sa capacité à réagir fortement avec les groupements résidus thiols, ce qui se traduit en particulier par la déplétion du GSH intracellulaire et engendrerait l'inhibition des synthèses dépendantes du GSH pour leurs activités.

En parallèle de cette étude mécanistique, nous avons appréhendé la problématique du point de vue statistique et vérifié sur un set plus important et diversifié de molécules (160 molécules) que le paramètre « inhibition de PGE<sub>2</sub> » pouvait être un bon test de prédiction de l'HSRC. L'étude statistique a permis de déterminer le modèle prédictif du test PGE<sub>2</sub> et de mettre en évidence de bonnes performances (78%) par rapport aux prédictions du LLNA. Au-delà, une certaine complémentarité du test PGE<sub>2</sub> avec d'autres tests *in vitro* (MUSST, Nrf2-HTS) a pu être mise en évidence.

En conclusion, au travers de cette étude, nous avons pu mettre en évidence de nouvelles propriétés biochimiques des sensibilisants. Même si la signification biologique de la diminution de PGE<sub>2</sub> par les sensibilisants de contact demeure complexe d'interprétation, ce paramètre a permis le développement d'un test qui prédit avec de bonnes performances le caractère sensibilisant de molécules et dont la position au sein d'une batterie prédictive d'évaluation de l'allergie de contact reste à être précisée.

**Mots clés :** Allergie de contact, U937, prostaglandine E<sub>2</sub>, tests alternatifs à l'animal de prédiction potentiel sensibilisant

## ABSTRACT

---

Contact sensitizers are defined as reactive molecules (electrophilic) which have the ability to modify skin proteins to form an antigen (hapten). In addition to the haptentation mechanism, danger signals, leading to the activation of dendritic cells, are described to be crucial for the effective induction of an hapten-specific T cell immune response. In the context of the 7<sup>th</sup> amendment to the Cosmetic Directive, the cosmetic industry is concerned by the challenge of finding non-animal approaches to assess the sensitizing potential of chemicals. While danger signals induced by sensitizers in steady-state conditions have already been analyzed, we chose to investigate the impact of sensitizers on the course of an inflammatory response.

For this purpose we used the U937 cell line differentiated with PMA and activated with LPS. In these conditions, cells produce a large amount of inflammatory mediators (IL- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-8, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, TxB<sub>2</sub>) through the activation of pathways leading to the activation of the transcription factors NF- $\kappa$ B and Nrf2 and through AA metabolism by the cPLA<sub>2</sub>/COX-2 cascade. Interestingly, we showed that 6 contact sensitizers with various potential (DNCB, PPD, HQ, PG, CIN, EUG) significantly and specifically decrease the production of prostanoids and in particular of PGE<sub>2</sub> induced by PMA/LPS. We further demonstrated that there is no unique inhibition profile of the sensitizers even if the majority (except for DNCB) of the effects applies on COX-2 (i.e. inhibition of the expression and/or activity). For DNCB, inhibition mechanism appears to be dependant of its capacity to react with thiols residues and in particular to deplete intracellular glutathione possibly leading to the inactivation of the PG-synthases.

In parallel, we assess a statistical analysis on 160 molecules that allow us to define the test parameters (a molecule is a sensitizer if the PGE<sub>2</sub> inhibition at 24h is more than 60%) and to calculate the test performance toward LLNA (78%). Moreover we demonstrated that the PGE<sub>2</sub> test could be complementary to other already existing *in vitro* tests like MUSST or Nrf2-HTS.

In summary, we add here a new insight into the multiple biochemical effects described so far for sensitizers. Even if the underlying biological relevance remains unclear, the parameter "PGE<sub>2</sub> inhibition" is good test for skin sensitization evaluation. Further studies will precise how this parameter could be implemented into an alternative testing strategy for the evaluation of skin sensitization.

**Key words:** Allergic contact dermatitis, U937, prostaglandin E<sub>2</sub>, non animal testing