



HAL
open science

Physiopathologie de l'inflammation cutanée: rôle de l'activation de l'immunité innée cutanée dans le développement de l'eczéma allergique de contact

Marlene Bonneville

► To cite this version:

Marlene Bonneville. Physiopathologie de l'inflammation cutanée: rôle de l'activation de l'immunité innée cutanée dans le développement de l'eczéma allergique de contact. Immunologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2006. Français. NNT: . tel-00125271

HAL Id: tel-00125271

<https://theses.hal.science/tel-00125271>

Submitted on 18 Jan 2007

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.

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le 1^{er} décembre 2006

par

Marlène BONNEVILLE

**PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFLAMMATION CUTANEE :
Rôle de l'activation de l'immunité innée cutanée dans le développement de
l'eczéma allergique de contact**

**Directeur de thèse :
Pr Jean-François NICOLAS**

JURY :

**Mr Alain CLAUDY, Président du jury
Mr Philippe MUNETTE, Rapporteur
Mr Salah MECHELI, Rapporteur
Mr Martin RÖCKEN, Examineur
Mr Alain DENIS, Invité
Mme Ingrid PERNET, Invitée
Mr Jean-François NICOLAS, Directeur de thèse**

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans l'unité INSERM 503 en collaboration avec le Laboratoire Dermatologique Bioderma. Je tiens à remercier le Pr Jean-François Nicolas qui a dirigé mes travaux de recherches dans l'unité ainsi que le Dr Ingrid Pernet, Alain Denis et Michèle Sayag du Laboratoire BIODERMA pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Je remercie le Pr Philippe Musette et le Dr Salah Mécheri d'avoir analysé ce travail en qualité de rapporteurs. Mes remerciements s'adressent également au Pr Martin Röcken qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examineur et au Pr Alain Claudy qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Un très grand merci à Josette pour son aide précieuse à l'animalerie, et à Rosine, Marie-Thérèse et Karen pour leur aide technique au laboratoire. Je voudrais remercier tout particulièrement Cyril, Anca, Marc, Aurore et Hélène pour leurs conseils et leur soutien pendant ma thèse.

Merci à l'ensemble des personnes de l'équipe pour leur aide : Gaëlle, Béatrice, Olivier, Emmanuelle, et à nos secrétaires préférées Véronique et Pascale.

Merci également à tous les membres de l'U503 et de l'U404 pour toutes les discussions et tous les bons moments passés avec eux, en particulier Carole, Karelle, Ferial, Marie, Bertrand, Morgan, Yann, Caroline, Anne, Antoine, Martial, Christelle et Magalie.

Un grand merci aussi à Lara, Maéva, Delphine, Maryline et Véro pour leur soutien et leur amitié.

Enfin un énorme merci à mes parents et mon frère pour leur encouragement tout au long de ces années et à Cyril pour celles à venir.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur R. GARRONE

M. le Professeur G. ANNAT

M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

Directeur : M. le Professeur M. EGEA

Directeur : M. le Professeur J.P. SCHARFF

Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

SOMMAIRE

PRINCIPALES ABREVIATIONS.....	8
INTRODUCTION.....	10
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
I-LE SYSTEME IMMUNITAIRE CUTANE.....	14
1. LES CELLULES CUTANÉES.....	14
1.1. <i>Les cellules résidentes cutanées.....</i>	14
1.1.1. <i>Les cellules cutanées épidermiques.....</i>	14
1.1.2. <i>Les cellules cutanées dermiques.....</i>	20
1.2. <i>Les cellules recrutées au niveau de la peau lors de l'inflammation.....</i>	23
2. LES MOLECULES DE L'INFLAMMATION CUTANÉE.....	24
2.1. <i>Les cytokines pro-inflammatoires.....</i>	25
2.1.1. <i>Les cytokines primaires.....</i>	25
2.1.2. <i>Les cytokines secondaires et les chimiokines.....</i>	27
2.2. <i>Les autres médiateurs pro-inflammatoires.....</i>	31
2.3. <i>Les cytokines anti-inflammatoires.....</i>	33
2.4. <i>Les récepteurs Toll-like.....</i>	33
2.4.1. <i>La famille des TLR.....</i>	34
2.4.2. <i>L'expression des TLR dans les cellules cutanées.....</i>	36
2.4.3. <i>Les voies de signalisation et l'activation de l'immunité via les TLR.....</i>	37
II- LES XENOBIOTIQUES ET LES PATHOLOGIES INDUITES.....	40
1. LES IRRITANTS.....	40
1.1. <i>Les caractéristiques chimiques.....</i>	40
1.2. <i>Les modèles de prédiction de pouvoir irritant.....</i>	41
1.2.1. <i>Les modèles in vivo.....</i>	41
1.2.2. <i>Les modèles in vitro et in silico.....</i>	43
1.2.3. <i>Les tests chez l'homme.....</i>	44
2. LES HAPTENES.....	46
2.1. <i>Les caractéristiques chimiques.....</i>	46
2.2. <i>Le métabolisme cutané.....</i>	46
2.3. <i>Le pouvoir sensibilisant et ses facteurs.....</i>	47
2.4. <i>Les modèles de prédiction de pouvoir sensibilisant.....</i>	48
2.4.1. <i>Les modèles in vivo.....</i>	48
2.4.2. <i>Les modèles in vitro.....</i>	50
2.4.3. <i>Les modèles in silico.....</i>	51
3. LES PATHOLOGIES HUMAINES DE DERMATITES IRRITANTE ET ALLERGIQUE DE CONTACT..	51
3.1 <i>La dermatite irritante de contact.....</i>	51
3.2. <i>La dermatite allergique de contact.....</i>	53

III- LA PHYSIOPATHOLOGIE DES DERMATITES IRRITANTE ET ALLERGIQUE DE CONTACT	55
1. SCHEMA GENERAL	55
2. LES MODELES D'ETUDE	55
2.1. <i>Les modèles d'étude in vitro</i>	55
2.2. <i>Les modèles d'étude in vivo</i>	58
3. L'ACTIVATION DE L'IMMUNITE INNEE PAR LES XENOBIOTIQUES (DIC)	60
3.1. <i>Généralités</i>	60
3.2. <i>La pénétration dans la peau et la perte d'eau</i>	61
3.3. <i>Le signal de danger</i>	61
3.4. <i>La libération de médiateurs pro-inflammatoires</i>	65
3.4.1. <i>La libération par les KC (IL-1α)</i>	65
3.4.2. <i>L'activation d'anaphylatoxines dans le sérum (C5a, C3a)</i>	66
3.4.3. <i>La libération par les mastocytes (TNF-α, histamine, bradykinine)</i>	66
3.5. <i>La sécrétion de médiateurs inflammatoires</i>	68
3.5.1. <i>Les médiateurs pro-inflammatoires</i>	68
3.5.2. <i>Les médiateurs anti-inflammatoires</i>	70
3.6. <i>L'activation de cellules de Langerhans</i>	71
3.7. <i>L'infiltrat cellulaire inflammatoire</i>	72
3.8. <i>La cytotoxicité par les enzymes de destruction tissulaire</i>	74
3.9. <i>La cicatrisation de l'inflammation cutanée</i>	75
4. L'ACTIVATION DE L'IMMUNITE SPECIFIQUE PAR LES HAPTENES (DAC)	76
4.1. <i>L'induction de la phase de sensibilisation</i>	76
4.1.1. <i>La capture et l'apprêtement de l'allergène</i>	76
4.1.2. <i>La migration et la maturation des CD cutanées</i>	80
4.1.3. <i>Le recrutement de précurseurs de CD au niveau de la peau</i>	85
4.1.4. <i>L'activation et la constitution des LT spécifiques de l'haptène</i>	88
4.1.4.1. <i>L'activation des LT par les CD</i>	88
4.1.4.2. <i>Les LT spécifiques de l'haptène</i>	90
4.2. <i>La phase d'élicitation ou de révélation</i>	93
4.2.1. <i>La génération de l'inflammation</i>	93
4.2.2. <i>La régulation de l'inflammation</i>	96
RESULTATS	99
ARTICLE N°1 :	101
<u>Skin contact irritation conditions the development and the severity of allergic contact dermatitis</u>	
ARTICLE N°2 :	119
<u>Antigen-induced dendritic cell migration to lymph nodes dictates the severity of allergic contact dermatitis</u>	
RESULTATS SUPPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE N°2 :	143
ARTICLE N°3 : MANUSCRIT EN PRÉPARATION	147
<u>Impact of Toll-like receptor-2 signaling pathway on the development of hypersensitivity to haptens</u>	

CONCLUSION-DISCUSSION.....	157
I- L'activation de l'immunité innée cutanée par un signal de danger de type haptène.....	159
1. LE ROLE DE L'ENVIRONNEMENT INFLAMMATOIRE DE L'IRRITATION DANS LE DEVELOPPEMENT DES ECZEMAS.....	159
2. LE RECRUTEMENT PRECOCE DES PRECURSEURS DE CD AU COURS DE LA SENSIBILISATION.....	161
II- Le rôle des TLR dans le développement des eczemas de contact.....	162
1. LA REPOSE IMMUNITAIRE INNEE INDUITE PAR LES TLR.....	162
2. LES TLR : LE LIEN ENTRE LES REPOSES IMMUNITAIRES INNEE ET ADAPTATIVE.....	165
3. LA REGULATION DE LA REPOSE SPECIFIQUE PAR LES TLR.....	165
III- Apports des travaux de thèse sur la compréhension.....	
de la physiopathologie de la DAC	167
ANNEXES	169
ANNEXE 1 :	171
<u>Laminaria Ochroleuca extract reduces skin inflammation</u> (Article n°4)	
ANNEXE 2 :	177
<u>Physiopathologie de la dermatite irritante de contact</u> (G.E.R.D.A. 2004)	
ANNEXE 3 :	178
<u>Tolérance cutanée</u> (Immunologie cutanée, <i>EJD Book Series</i>)	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	180

PRINCIPALES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
CD : cellule dendritique
CD* : groupe de différenciation
CD-40L : ligand de CD40
CL : cellule de Langerhans
CLA : cutaneous lymphocyte-associated antigen
CLIP : Class II associated invariant chain peptide
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CPA : cellule présentatrice de l'antigène
CTACK : cutaneous T-cell attracting chemokine
CTLA-4 : cytotoxic T lymphocyte antigen 4
DAC : dermatite allergique de contact
DIC : dermatite irritante de contact
DNFB : 2,4-dinitrofluorobenzène
FcR : récepteur du fragment constant des immunoglobulines
FITC : isothiocyanate fluoresceine
GITR : glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor
GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Hsp : heat shock protein
HSRC : hypersensibilité retardée de contact
ICAM : intercellular adhesion molecule-1
IFN : interféron
IL : interleukine
ITAC : interféron-inducible T cell α chemoattractant
KC : kératinocyte
LPS : lipopolysaccharide (de la paroi bactérienne)
LT : lymphocyte T
MCP : monocyte chemoattractant protein
MDC : macrophage-derived chemokine
Mig : monokine induced by IFN- γ

MIP : macrophage inflammatory protein

PAMP : pathogen-associated molecular pattern

RANTES : regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted

SLC : secondary lymphoid tissue chemokine

TAP : transporter associated with antigen processing

TARC : thymus and activation-regulated chemokine

TCR : T cell receptor

TGF : transforming growth factor

Th : T helper

TLR : Toll-like receptor

TNF : tumor necrosis factor

INTRODUCTION

La peau est une barrière anatomique vivante entre le corps et l'environnement extérieur. Elle doit ainsi faire face à de nombreuses agressions physiques mais aussi chimiques, elle est la première ligne de défense biologique. La peau présente un système de défense immunitaire spécialisé dénommé « skin immun system » par Bos en 1986. Ce système immunitaire cutané regroupe des acteurs cellulaires résidents (kératinocytes, cellules de Langerhans, fibroblastes, mastocytes, macrophages, cellules endothéliales) ou recrutés (leucocytes), et une grande variété de médiateurs inflammatoires solubles (cytokines, chimiokines). Ce système permet le maintien de l'homéostasie cutanée et il est également responsable de l'activation et de la régulation des réactions inflammatoires normales et pathologiques.

L'inflammation est le résultat de l'activation d'un ensemble complexe d'interactions entre des cellules et de facteurs sécrétés. Elle se développe dans tous les types tissulaires suite à un traumatisme physique (blessure, rayons UV), infectieux (virus, bactéries) ou chimique (toxiques). Cette réaction a pour but d'éliminer l'agent inflammatoire et de favoriser la cicatrisation du tissu atteint. Cependant lorsque la réponse inflammatoire est exacerbée à cause d'une altération excessive du tissu ou d'une cicatrisation anormale, les lésions tissulaires peuvent persister aboutissant à certaines maladies chroniques comme l'eczéma allergique de contact. Cette pathologie de la peau est un excellent modèle d'étude de réponse inflammatoire spécifique de l'antigène, notamment grâce au modèle expérimental d'eczéma allergique de contact aux haptènes chez la souris, appelé l'hypersensibilité retardée de contact (HSRC). Les mécanismes établis dans ce modèle peuvent s'appliquer à des réponses inflammatoires dans d'autres épithélia que la peau.

Les réponses inflammatoires peuvent être la conséquence de deux voies d'activation immunitaire : l'activation de l'immunité innée (l'irritation pour la peau) ou de l'immunité spécifique (l'eczéma allergique par exemple). La différence réside dans la nature des acteurs cellulaires intervenants et la cinétique de déclenchement. Après l'application de l'agent inflammatoire, l'activation de l'immunité innée induit la sécrétion, par les cellules cutanées résidentes, de médiateurs inflammatoires responsables du recrutement d'un infiltrat inflammatoire polymorphe, alors que l'activation de l'immunité adaptative aboutit au recrutement de lymphocyte T (LT) spécifiques plusieurs heures après l'application de

l'antigène. C'est la nature et la dose de l'agent inflammatoire qui va être déterminant ; s'il est doué de propriétés antigéniques tels que les pathogènes et les haptènes, il déclenchera une réponse spécifique de l'antigène à dose optimale, alors qu'une blessure ou des irritants vont induire une réponse inflammatoire non spécifique. La réponse immunitaire innée participe toujours à l'activation de la réponse spécifique, c'est ainsi que « l'irritation est le lit de l'allergie ».

Dans le modèle d'HSRC, les événements précoces de l'irritation qui se déroulent lors de l'activation de l'immunité innée sont plus difficiles à étudier que les mécanismes de l'immunité spécifique. Ils restent ainsi encore mal connus et la nature précise de la relation entre l'immunité innée et le développement de la réponse adaptative reste à être définie. Dans la présente étude, nous nous sommes attachés à examiner le lien entre l'irritation et l'allergie grâce au modèle d'étude d'hypersensibilité de contact primaire (PACS, primary allergic contact sensitivity) récemment développé au laboratoire (Saint-Mezard et al., 2003b). Dans ce modèle, nous avons étudié l'importance de l'expression de cytokines, de la migration des cellules dendritiques (CD) et de l'activation des LT spécifiques dans le développement de l'HSRC aux haptènes. Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés au rôle, dans le développement des eczémas de contact, d'un récepteur de l'immunité innée récemment impliqué dans l'amélioration de maladies inflammatoires allergiques, qu'est le Toll-like receptor-2 (TLR-2) (Fukushima et al., 2006; Patel et al., 2005; Velasco et al., 2005). Après une description des populations cellulaires et des cytokines impliquées dans l'immunité cutanée induite par les chimiques (irritants et allergènes), les résultats seront présentés puis discutés.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I-LE SYSTEME IMMUNITAIRE CUTANE

1. Les cellules cutanées

La peau est constituée de nombreux types cellulaires différents, pourvus de fonctions spécifiques et variées selon de leur localisation. La peau est constituée de trois couches : (i) l'épiderme, couche superficielle comportant principalement des kératinocytes, (ii) le derme, couche inférieure correspondant à un tissu conjonctif de soutien, et (iii) l'hypoderme qui est un tissu graisseux. L'épiderme est séparé du derme par la jonction dermo-épidermique et du milieu extérieur par la couche cornée (cf. Figure 1). Cette dernière représente une véritable barrière de protection par sa composition en cellules riches en protéines, appelées cornéocytes, et dont l'espace intercellulaire est riche en lipides.

Lors d'une blessure, d'une infection ou de contact avec des chimiques, la couche cornée est traversée et/ou altérée. Une réponse inflammatoire est alors mise en place par les cellules résidentes de l'épiderme et du derme. Cette réaction induit le recrutement de cellules immunitaires circulantes.

1.1. Les cellules résidentes cutanées

1.1.1. Les cellules cutanées épidermiques

Les kératinocytes

Dans l'épiderme, les kératinocytes (KC) représentent le type cellulaire majeur (95%) assurant ainsi l'intégrité structurale. Ils jouent un rôle central dans l'immunologie de ce tissu où ils sont la principale source de cytokines (Williams and Kupper, 1996). Les KC sont importants dans l'initiation et le développement des réactions inflammatoires et immunologiques (McKenzie and Sauder, 1990). Ils sécrètent de façon constitutive certaines cytokines (IL-1 α , TNF- α , IL-6, G-CSF, TGF- β). Après stimulation, les KC sont capables de sécréter des cytokines inflammatoires (IL-1, TNF- α), des chimiokines (IL-8, IP-10), des facteurs de croissance (IL-6, GM-CSF, TGF- α) et des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) (Williams and Kupper, 1996) (cf. Figure 2). Cette sécrétion peut être induite par des stimuli externes non spécifiques tels les rayons UV et les substances chimiques, ou par des composants bactériens et viraux, ligands des TLR exprimés par les KC notamment (cf. chapitre I-2.4.1). Enfin, les KC produisent des protéines anti-microbiennes (cathélicidines et défensines). Les KC sont des cellules importantes dans la réponse immunitaire innée, et ils

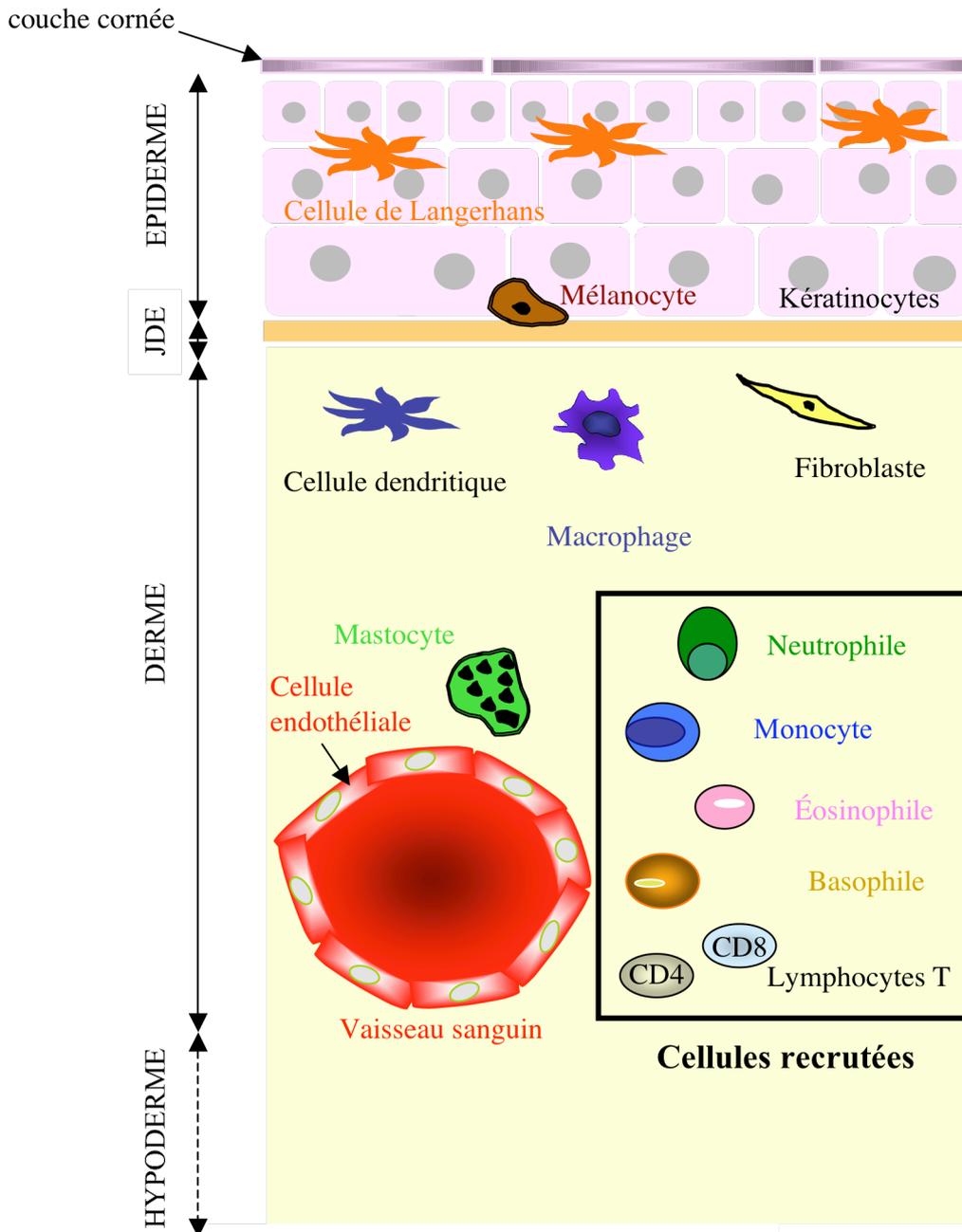


Figure 1. Schématisation des cellules résidentes et recrutées dans la peau lors d'une inflammation.

La peau est constituée de cellules résidentes qui participent à l'homéostasie du tissu mais aussi à sa défense lors de la présence de pathogènes ou de chimiques. Cette réaction inflammatoire permet le recrutement de cellules spécialisées du système immunitaire.

JDE : Jonction dermo-épidermique

Cytokines	Nomenclature	Sources	Récepteurs
Cytokines primaires			
IL-1 α		KC, CL, Me, F, Eo, Ba, Mast, Mo/Mac, En	IL-1RI, IL-1RII
IL-1 β		KC, CL, Me, Ne, Mast, Mo/Mac, En	IL-1RI, IL-1RII
TNF- α		KC*, CL, Me, F, Ne, Eo, Mast, Mo/Mac, En	TNF-RI, TNF-RII
Chimiokines de type CXC			
IL-8	CXCL8	KC, CL, Me, F, Ne, Eo, Ba, Mo/Mac, En	CXCR8
Gro β / γ ou MIP-2 (homologue souris)	CXCL2/3	KC, CL, Me, F, Mo/Mac, En	CXCR2
IP-10	CXCL10	KC, Ne, Mo/Mac, En	CXCL10
Chimiokines de type CC			
MCP-1	CCL2	KC, Me, F, Mo/Mac, En	CCR2
MCP-4	CCL13	KC	CCR2, CCR3
MIP-1 α / β	CCL3/4	CL, Ne, Eo, Ba, Mast, Mo/Mac	CCR1, CCR5
RANTES	CCL5	KC, Me, F, Eo, Ba, Mo/Mac	CCR1, CCR3, CCR5
MIP-3 α	CCL20	KC, F, En	CCR6
MIP-3 β	CCL19	Enly	CCR7
SLC	CCL21	Enly	CCR7
Cytokines régulant l'immunité humorale			
IL-12		KC, CL, Me, CD, Ne, Eo, Mo/Mac	IL-12R
IL-18		KC, CL, CD	IL-18R
Cytokines activant les lymphocytes			
IL-6		KC, CL, Me, F, Eo, Mast, Mo/Mac	IL-6R
IL-7		KC, Me	IL-7R
IL-15		KC, CL	IL-15R
Facteurs de croissance			
G-CSF		KC, Me, Mo/Mac, En	G-CSFR
M-CSF		KC, Me, Mo/Mac, En	M-CSFR
GM-CSF		KC, Me, Eo, Mast, Mo/Mac, En	GM-CSFR
TGF- α		KC, Me, Eo, Mo/Mac	TGF- α R
PDGF		KC, Mo/Mac, En	PDGF-R
VEGF		KC, Ne, Mo/Mac	VEGF-R
Cytokines immunosuppressives antagonistes			
IL-1ra		KC, Mo/Mac	IL-1RI, IL-1RII
TGF- β		KC, CL, Me, Ne, Eo, Mo/Mac	TGF- β R
IL-10		KC, CL, Me, Ne, LT, LB, Eo, Mast, Mo/Mac	IL-10R
Interféron			
IFN- γ		KC, CL, Mast, Mo/Mac	IFN- γ R

Figure 2. Les principales cytokines impliquées dans l'inflammation cutanée

D'après Williams & Kupper, 1996 et Bos, 2004.

KC : kératinocyte, CL : cellule de Langerhans, CD : cellule dendritique, Me : mélanocyte, F : fibroblaste, Ne : neutrophile, Eo : éosinophile, Ba : basophile, Mast : mastocyte, Mo/Mac : monocyte/macrophage, En : cellule endothéliale vasculaire, Enly : cellule endothéliale lymphatique

semblent aussi participer directement à l'activation de l'immunité spécifique via la sécrétion de nombreuses cytokines.

Les KC expriment à leur surface plusieurs antigènes: le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II (CMH-II) (cf. encadré n°1), la molécule d'adhésion ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1, CD54) et des molécules de co-stimulation dont B7-1 et B7-2. Cependant bien que les KC présentent ces caractéristiques, leur capacité à se comporter comme cellules présentatrices de l'antigène (CPA) reste controversée. Par contre, l'expression d'ICAM-1 induite par l'interféron- γ (IFN- γ) et le tumor necrosis factor- α (TNF- α) suggère que les KC soient plutôt impliqués dans le trafic des LT dans l'épiderme de peaux inflammatoires (Dustin et al., 1988). De plus, la molécule de co-stimulation B7-1 exprimée par les KC semble impliquée dans l'induction de la tolérance (Wang et al., 2003), en induisant la sécrétion de l'interleukine (IL)-10 anti-inflammatoire par les LT (Cao et al., 2003).

Encadré n°1 : Les molécules du CMH

Le CMH est un système multigénique, multiallélique, polymorphique et d'expression co-dominante (Revillard, 2001), qui joue un rôle majeur dans les réponses immunitaires (cf. chapitre III-4.1.1). En effet, les LT sont incapables de reconnaître un antigène sans présentation du peptide sur les molécules du CMH. Les loci sont regroupés en deux classes : classe-I (CMH-I) et classe-II (CMH-II). Chez l'homme, les gènes des protéines du CMH-I incluent entre autres les HLA-A, -B et -C et ceux du CMH-II sont organisés en 3 loci : HLA-DR, DP et DQ. Chez la souris, CMH-I correspond au locus H-2 et seuls deux loci CMH-II sont exprimés, I-A et I-E. Les molécules CMH-I interagissent avec les molécules CD8 des LT. L'expression du CMH-II est restreinte à certaines cellules de l'organisme spécialisées dans la présentation de l'antigène : les CPA, qui sont ainsi les seules capables de présenter l'antigène aux LT CD4⁺. Son expression est stimulée par l'IFN- γ en conditions inflammatoires et est induite sur les cellules endothéliales et épithéliales.

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence l'expression d'HLA-DR par les KC dans des dermatoses présentant une infiltration de LT (Lampert, 1984). La molécule HLA-DR est habituellement présente sur les cellules immunocompétentes. L'expression des autres isotypes DP et DQ a été peu étudiée. Une étude montre cependant que l'expression de HLA-DQ a été observée chez la majorité des patients présentant une dermatite irritante ou allergique, alors que l'expression d'HLA-DP était présente uniquement chez les patients atteints de dermatite allergique (Gawkrodger et al., 1987).

Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans (CL) font partie de la famille des cellules hématopoïétiques dérivées de la moelle osseuse. Ce sont des cellules dendritiques (CD) immunoactives résidant dans l'épiderme de la peau et des muqueuses. Dans l'épiderme, elles représentent 2 à 4% de la population cellulaire. Elles forment un véritable réseau de dendrites qui leur permettent d'être en contact entre elles et d'entourer les KC (cf. Figure 3). Elles jouent ainsi un rôle de sentinelles et vont être capables de détecter tous les antigènes qui franchiront la couche cornée. Elles expriment fortement le CMH-II et ont la fonction de CPA. Les CL sont caractérisées par (i) l'expression d'une lectine de type C, la Langérin (CD207), (ii) une forte expression de surface des molécules CD1a, CD1c et CD11c chez l'homme, (iii) l'expression de DEC-205 et CD11c chez la souris, et (iv) la présence de granules de Birbeck. Seuls les CL présentent des granules de Birbeck formés à partir d'invagination de la membrane cytoplasmique, ils pourraient être impliqués dans le transport intracellulaire et l'apprêtement des antigènes internalisés (Stossel et al., 1990). Par ailleurs, le nombre de CL dans l'épiderme diminuerait avec l'âge chez l'homme, de même que chez la souris qui est le modèle le plus utilisé pour étudier la migration des CL (Bhushan et al., 2002; Cumberbatch et al., 2002).

En réponse à un antigène local (dont les chimiques) et/ou un traumatisme de la peau, les CL activées quittent la peau et migrent jusqu'aux ganglions drainants via la lymphe afférente. Pendant cette migration, les CL au départ immatures avec la propriété de capter et reconnaître l'antigène (cf. chapitre III-4.1.1.1) se différencient en CD matures capables de présenter l'antigène efficacement aux LT (cf. chapitre III-4.1.4). La migration des CL est un processus complexe orchestré par des cytokines et des chimiokines qui permettent les changements nécessaires des CD (cf. chapitre III-4.1.2).

Les mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules épithéliales localisées vers la jonction dermo-épidermique. Ils synthétisent la mélanine, un pigment brun foncé responsable de la pigmentation de la peau et qui intervient dans la protection vis-à-vis des rayons UV. Ces cellules comportent des prolongements dendritiques qui leur permettent de communiquer avec plusieurs KC, l'ensemble constitue une unité épidermique de mélanisation. Leur rôle dans la réponse inflammatoire est très peu étudié bien qu'ils aient été décrits comme capables de sécréter diverses cytokines inflammatoires (cf. Figure 2) (Corsini and Galli, 2000).

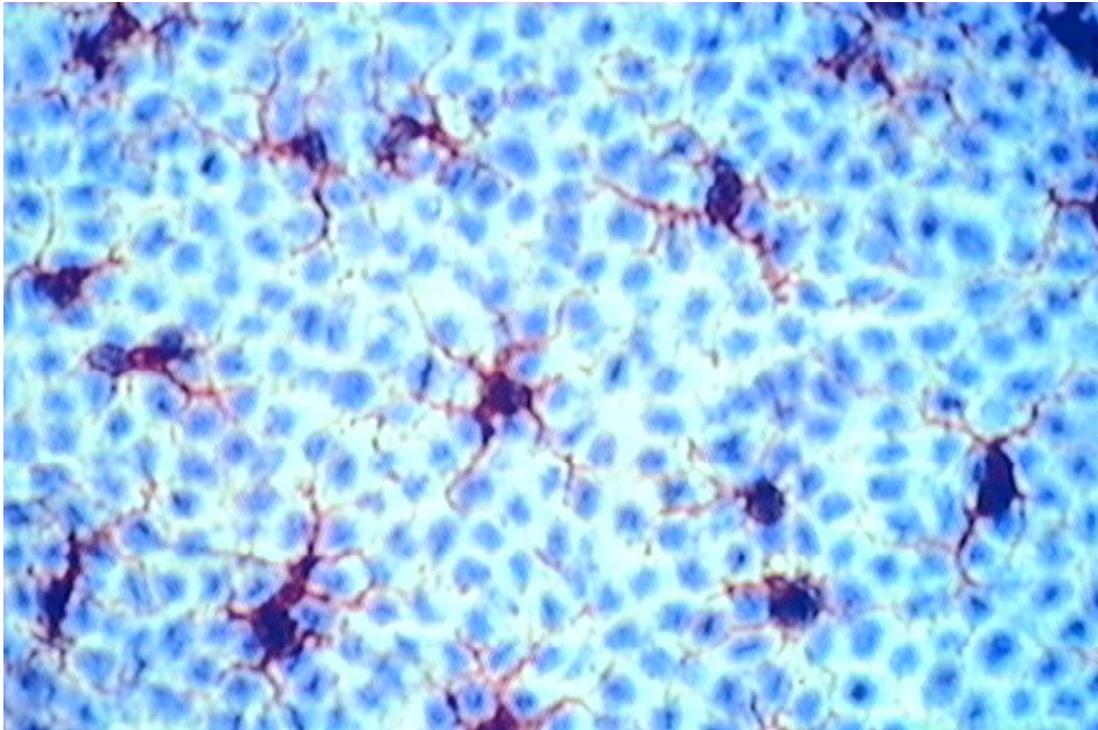


Figure 3. Immunomarquage par CD1a des cellules de Langerhans sur un feuillet épidermique de peau humaine.

Les cellules de Langerhans sont régulièrement réparties sur toute la surface de l'épiderme cutané. Elles sont en contact entre elles par l'intermédiaire de leurs dendrites. Les extrémités très fines de leur dendrites sont développées de telle façon qu'elles entourent la majorité des KC. *Agrandissement x200.*

1.1.2. Les cellules cutanées dermiques

Les fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules stromales dérivées du mésenchyme du derme. Ils ne sont habituellement pas considérés comme des cellules actives dans le système immunitaire. Cependant, plusieurs observations suggèrent que le dialogue entre les fibroblastes et les KC via les cytokines joue un rôle crucial dans l'immunité cutanée. Comme les KC, les fibroblastes sont capables de sécréter des cytokines secondaires telle que l'IL-6 en réponse à la libération de cytokines primaires (IL-1 α) (cf. Figure 2), mais en plus grande quantité (Boxman et al., 1993; Waelti et al., 1992). Les fibroblastes sont la principale source de TNF- α suite à une stimulation telle qu'une irradiation aux rayons UV (de Kossodo et al., 1995). Ces données suggèrent que les fibroblastes jouent un rôle d'amplification important en réponse aux cytokines produites par les KC.

Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules granuleuses dérivées de précurseurs myéloïdes immatures exprimant le récepteur c-kit (CD117). Les mastocytes sont présents dans les tissus muqueux et cutanés où ils sont localisés dans le derme, préférentiellement autour des vaisseaux sanguins et lymphatiques via des interactions avec la matrice extracellulaire. Ils sont aussi en relation avec les fibres nerveuses dans la peau. Ils expriment les récepteurs Fc de haute affinité pour les IgE et sont responsables des réponses allergiques immédiates dépendantes des IgE, dont la production est initiée par l'exposition d'allergènes, comme dans l'urticaire. Ils sont activés par d'autres stimuli comme des composés du complément, des chimiokines, des ligands de TLR et des neuropeptides.

Les mastocytes possèdent des granules intracytoplasmiques contenant des médiateurs préformés : le TNF- α , des protéases neutres (tryptase, chymase et peptidase carboxyl), l'histamine, la sérotonine, la bradykinine et des protéoglycanes (héparine, chondroïtine sulphate) qui sont libérés suite à l'activation des mastocytes. On distingue deux sous-populations de mastocytes : les mastocytes des muqueuses (mucosal mast cell, MMC) qui sécrètent uniquement l'enzyme tryptase, et les mastocytes des tissus conjonctifs (conjonctive tissue mast cell, CTMC) qui sécrètent de la tryptase, la chymase et la peptidase carboxyl. Les mastocytes sont aussi capables de synthétiser de nombreuses cytokines (cf. Figure 2) et des médiateurs lipidiques comme des prostaglandines, des leucotriènes et le PAF (platelet activating factor) qui participent à l'initiation et le maintien de l'inflammation en favorisant le

recrutement de leucocytes au site de l'inflammation (Gordon and Galli, 1990; Saint-Mezard et al., 2002; Williams and Kupper, 1996). La dégranulation des mastocytes diminue leur liaison avec la matrice extracellulaire. Par ailleurs, plusieurs études soulignent l'importance des mastocytes dans les phases de sensibilisation (cf. chapitre III-4.1.2) et d'élicitation (cf. chapitre III-4.2.1). Les mastocytes expriment les molécules CMH-II, CD40, CD80 et CD86 et peuvent donc se comporter comme des CPA. Les mastocytes pourraient ainsi activer les LT après migration jusqu'aux ganglions (Wang et al., 1998).

Ainsi les mastocytes, stratégiquement positionnés et fonctionnellement capables d'agir au niveau de la microvascularisation, sont impliqués dans de nombreuses réponses inflammatoires, aussi bien dans l'activation de l'immunité innée que spécifique.

Les macrophages

Les macrophages résidant 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 macrophages résidents sont susceptibles de persister très longtemps au sein d'un même tissu. Les monocytes/macrophages, issus de précurseurs myéloïdes, représentent une famille hétérogène par leur morphologie et leur localisation, assurant des fonctions de phagocytose et de présentation de l'antigène. Ils synthétisent un très grand nombre d'enzymes dont la peroxydase et l'hydrolase, expriment plusieurs classes de TLR (cf. chapitre I-2.4.2) et sont capables de sécréter divers cytokines inflammatoires (cf. Figure 2). Les macrophages expriment des marqueurs spécifiques (CD68, CD11b, CD14) ainsi que des molécules exprimées par les CD dermiques (HLA-DR, facteur XIIIa) qui leur permettent de présenter l'antigène lors d'interaction avec des LT.

Les macrophages dermiques sont des acteurs essentiels des réactions inflammatoires où ils peuvent former des syncytia par fusions de leurs membranes, aboutissant à des cellules géantes multinucléées (Revillard, 2001). 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 (cf. chapitre III-3.9).

Les cellules dendritiques dermiques

Les CD dermiques, appelées aussi dendrocytes dermiques, appartiennent à la lignée des cellules dendritiques qui constituent une population hétérogène. Chez l'homme, différentes sous-populations de CD dermiques ont été isolées grâce à des études de migration

in vitro à partir d'explants cutanés (Nestle et al., 1993). Toutes les CD du derme expriment le facteur XIIIa (Cerio et al., 1989). Trois sous-populations peuvent être distinguées sur la base de l'expression de CD1a et de CD14 : CD1a⁻CD14⁻, CD1a⁺CD14⁻ et CD1a⁻CD14⁺. Les CD1a⁻CD14⁻ constituent la population classique des CD du derme, les cellules CD1a⁺CD14⁻ représentent certainement une population de CL en train de quitter l'épiderme, alors que la population CD1a⁻CD14⁺ semblerait représenter un pool précurseurs des CD du derme.

Chez la souris, deux sous-populations de cellules dermiques CD45⁺ (marqueur de cellules hématopoïétiques) CMH-II⁺ ont été discriminées : des cellules dendritiques CD11b⁻ avec des propriétés de CPA et des monocytes/macrophages CD11b⁺ (Duraiswamy et al., 1994). Bien que les études sur les CD de la peau aient principalement porté sur les CL, les deux populations de CD cutanée semblent avoir les mêmes fonctions de capturer l'antigène, de migrer jusqu'aux ganglions drainants et d'activer des LT (cf. chapitre III-4).

Les cellules endothéliales vasculaires

L'endothélium vasculaire forme une monocouche de cellules endothéliales, il constitue la barrière anatomique entre le sang et les tissus. Les cellules endothéliales assurent la circulation et les échanges de molécules entre le sang et le fluide interstitiel dont les gaz, les ions, les protéines et permettent aussi le passage de cellules par le phénomène de diapédèse. En effet, elles ont un rôle dans l'immunité, principalement par leur contrôle de l'extravasation des leucocytes (cf. chapitre III-3.7). Elles expriment ainsi de nombreuses molécules d'adhésion qui font partie de la famille des sélectines (P-sélectine, E-sélectine) ou des immunoglobulines (ICAM, VCAM) se liant à des intégrines exprimée suite à une stimulation par des cytokines et des molécules bactériennes. De plus, les cellules endothéliales possèdent des structures intracellulaires particulières issues de l'appareil de Golgi. Elles stockent des molécules d'adhésion comme la P-sélectine, qui permettent, suite à une stimulation telle l'histamine, de mobiliser rapidement la P-sélectine à la surface (McEver et al., 1989). Par ailleurs, l'expression différentielle de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et les leucocytes est importante pour la sélectivité du recrutement des leucocytes. Par exemple, la molécule CLA (cutaneous lymphocyte antigen) est exprimée par les lymphocytes recrutés au niveau de la peau (Duijvestijn et al., 1988).

Les cellules endothéliales régulent la pression et le flux sanguins en sécrétant des vasodilatateurs (oxide nitrique, prostacycline...) et des vasoconstricteurs (thromboxane, endothéline, endopéroxyde...). Elles sécrètent aussi de nombreuses cytokines et chimiokines

permettant ainsi le recrutement de plus de cellules immunitaires compétentes au site d'inflammation (cf. Figure 2). De plus, les cellules endothéliales seraient dotées de propriétés de présentation de l'antigène grâce à l'expression de molécules de co-stimulation et de CMH-II, mais les résultats à ce sujet restent controversés (Poher et al., 1986; Seino et al., 1995; St Louis et al., 1993).

Les cellules endothéliales vasculaires peuvent être aussi bien stimulées par des signaux provenant du sang et des leucocytes que par les tissus avoisinants. Les cellules endothéliales peuvent alors répondre par (i) la vasodilatation et l'augmentation de leur perméabilité, (ii) la production de cytokines et d'autres médiateurs cellulaires, (iii) l'activation endothéliale, (iv) la conversion de leucocytes adhérents en cellules mobiles migrant au site de l'inflammation, mais aussi (v) l'angiogénèse dans le phénomène de cicatrisation.

1.2. Les cellules recrutées au niveau de la peau lors de l'inflammation

Les polynucléaires

Les polynucléaires regroupent des cellules granuleuses que sont les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Ils ont la capacité de migrer dans les tissus en réponse à un signal chimiotactique (cf. chapitre III-3.7) et de sécréter un grand nombre de cytokines inflammatoires (cf. Figure 2) (Bos, 2004).

Les neutrophiles sont des cellules phagocytaires à courte durée de vie (4 à 10 heures), représentant 60 à 70 % des leucocytes du sang. De plus, ils sécrètent de bactéricides stockés dans leurs granules, essentiels dans la défense contre les microorganismes. Ils interviennent aussi dans les lésions tissulaires des réactions immunopathologiques mettant en jeu le système du complément et les anticorps.

Les éosinophiles sont des cellules phagocytaires cytotoxiques représentant 3% des leucocytes. Ils participent à la réaction inflammatoire par recrutement précoce lors de la libération de médiateurs solubles de l'inflammation, qui sont des ligands spécifiques des récepteurs des éosinophiles. Leurs granules contiennent des protéines exerçant des activités cytotoxiques. Ces cellules sont impliquées dans certaines infections parasitaires, les réactions allergiques dues aux IgE et sous l'action de certains toxiques.

Les basophiles représentent moins de 1% des leucocytes du sang. Tout comme les mastocytes, ils ont des récepteurs de haute affinité qui, lorsqu'ils sont activés, entraînent leur dégranulation et la libération de médiateurs préformés telles l'histamine et l'héparine. Les

basophiles interviennent surtout dans les réactions allergiques, au niveau du sang, mettant en jeu les anticorps de classe IgE (Revillard, 2001).

Les polynucléaires peuvent être recrutés au cours de l'activation de l'immunité innée et spécifique, alors que les LT sont uniquement présents dans la peau dans une réponse inflammatoire spécifique.

Les lymphocytes T

Les LT sont issus de précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse différenciés dans le thymus (cf. Figure 3). Ils sont principalement présents dans les organes lymphoïdes : les ganglions lymphatiques et la rate. On distingue deux sous-populations se différenciant par l'expression des marqueurs CD4 ou CD8. Tous deux possèdent des récepteurs spécifiques d'antigène, le TCR (T cell receptor). La reconnaissance de l'antigène nécessite sa présentation par des molécules du CMH-I pour les LT CD8⁺ et CMH-II pour les LT CD4⁺. En réponse primaire, les LT naïfs sont ainsi capables de proliférer, de se différencier et de générer une population de LT effecteurs. Les LT CD4⁺ sont des LT auxiliaires alors que les LT CD8⁺ sont des LT cytotoxiques capables d'éliminer les cellules infectées par la sécrétion de perforines et de granzymes, et l'induction d'apoptose via la voie Fas-FasL. Une fois la réponse primaire résolue, seule une sous-population des LT effecteurs vont survivre et former ainsi des LT mémoires.

Dans l'eczéma de contact, les LT CD8⁺ et CD4⁺ sont les acteurs principaux de l'immunité adaptative (cf. chapitre II-3.2). Les LT recrutés dans la peau sont le plus souvent situés juste sous la jonction dermo-épidermique dont 1/3 expriment le récepteur de localisation tissulaire CLA (Bos et al., 1993). Dans une peau normale, quelques LT CD8⁺ intra-épidermiques peuvent être présents (Bos et al., 1987) et correspondraient à des cellules mémoires, signe d'une récente activation (Foster et al., 1990). Lorsqu'ils sont dans la peau les LT sont en état d'activation et expriment la molécule HLA-DR ou CD25 (Davis et al., 1988).

2. Les molécules de l'inflammation cutanée

L'ensemble des cellules de la peau décrites précédemment, sont capables de sécréter de nombreuses cytokines. Avec son arsenal de cytokines, la peau fonctionne comme une barrière immunitaire entre l'environnement extérieur et les tissus internes. Les cytokines sont des petites molécules polypeptidiques qui interagissent avec des récepteurs spécifiques, et sont produites de façon locale et transitoire en réponse à une stimulation exogène.

2.1. Les cytokines pro-inflammatoires

Les cellules cutanées résidentes synthétisent et sécrètent des médiateurs inflammatoires qui sont libérés suite à divers stimuli, comme des chimiques, l'infection par des bactéries ou des virus. Parmi ces médiateurs, des cytokines dites primaires, préstockées dans les cellules vont induire la sécrétion d'une deuxième vague de cytokines néo-synthétisées cette fois, appelées cytokines secondaires. Ce système d'induction de cytokines en cascade permet une réponse inflammatoire rapide et amplifiée.

2.1.1 Les cytokines primaires

L'interleukine-1

Trois formes d'IL-1 ont été décrites, l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-1ra (IL-1 receptor antagonist) se liant aux mêmes récepteurs. L'IL-1ra est un antagoniste de l'IL-1, elle se fixe au récepteur sans induire de signal de transduction. Il existe deux types de récepteurs, de type I (IL-1RI) et de type II (IL-1RII), mais seul le récepteur IL-1RI transmet un signal intracytoplasmique (Dinarello, 1998) conduisant à l'activation de la voie de signalisation du facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor- κ B) (cf. Figure 4).

L'IL-1 α et l'IL-1 β sont sécrétées par de nombreux types cellulaires (cf. Figure 2), la source majeure d'IL-1 α est le KC, alors que l'IL-1 β est essentiellement produite par les CL. Les KC stockent l'IL-1 α sous forme bioactive (Corradi et al., 1995) et produisent la pro-IL-1 β (31 kDa) sous forme inactive. Mais l'enzyme nécessaire au clivage de la pro-IL-1 β , la convertase ICE (IL-1 β converting enzyme), n'est pas synthétisée par les KC (Mizutani et al., 1991), uniquement par les CL, les mastocytes, les monocytes/macrophages et neutrophiles (Kupper, 1990). Les CL produisent ainsi à la fois la pro-IL-1 β et la convertase nécessaire à la sécrétion d'IL-1 β bioactive.

Les activités pro-inflammatoires de l'IL-1 α sont nombreuses, notamment (i) l'induction de sa propre expression, d'autres interleukines, de facteurs de croissance et de chimiokines, (ii) l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion favorisant l'infiltration cellulaire, (iii) la prolifération des KC et (iv) l'augmentation de l'activité des macrophages (cf. chapitre III-3.4.1). En revanche la principale fonction connue de l'IL-1 β est de faciliter la migration de CL à travers l'épiderme et la jonction dermo-épithéliale (cf. chapitre III-3.5.2).

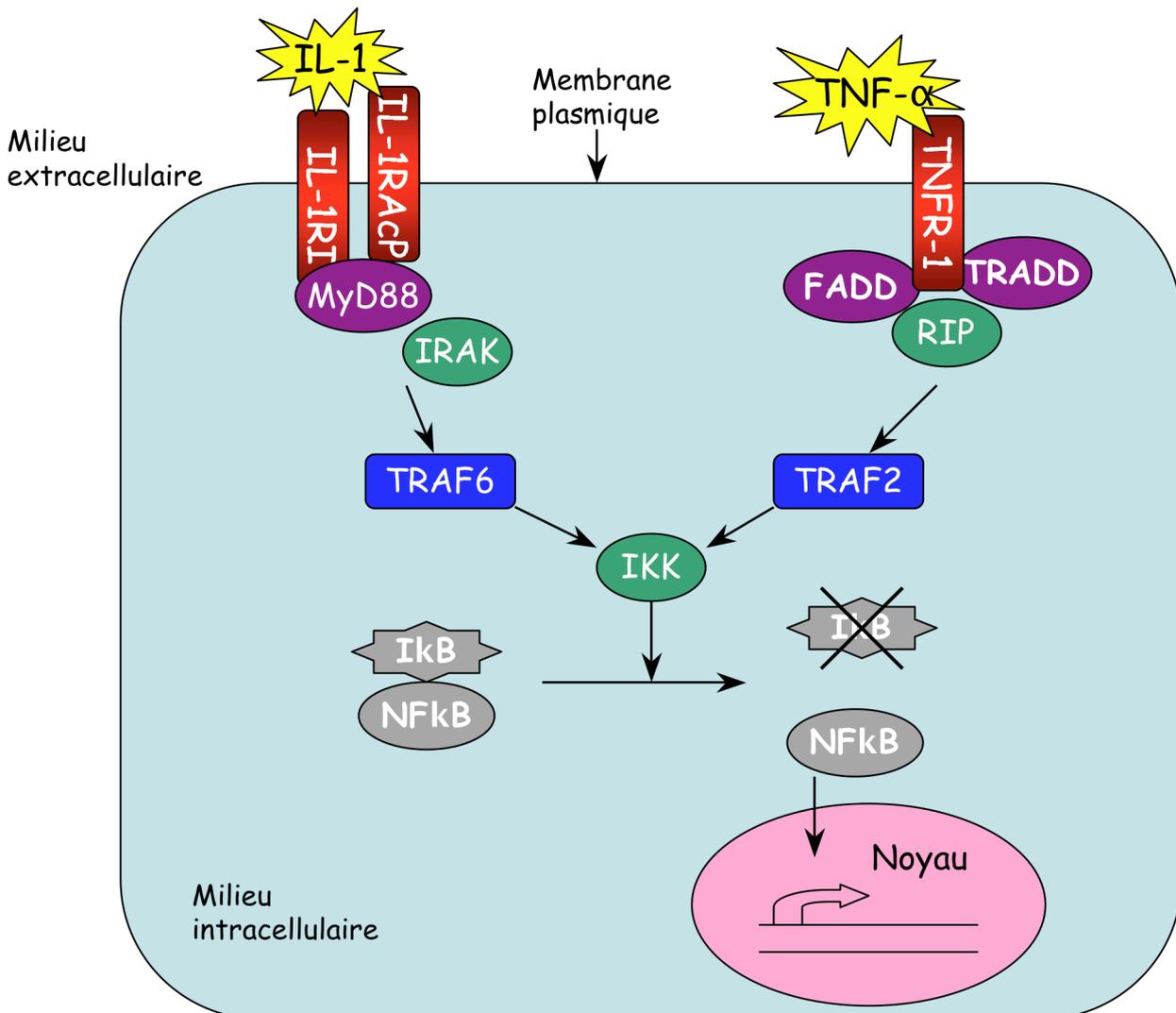


Figure 4. Schéma des voies de signalisation du facteur de transcription NF-κB des récepteurs de l'interleukine-1 (IL-1) et du tumor necrosis factor-α (TNF-α).

La liaison de l'IL-1 sur son récepteur IL-1RI et le complexe IL-1RAcP entraîne des changements cytoplasmiques de l'IL-1R conduisant au recrutement de la protéine adaptatrice MyD88 et d'une sérine-thréonine kinase IRAK (IL-1 receptor-associated kinase) suivie de l'association de TRAF-6 (TNF receptor-associated factor-6). TRAF-6 active la kinase IKK (I-κB kinase) qui, par phosphorylation, entraîne la dégradation d'IκB (inhibitor-κB) libérant ainsi la facteur de transcription NF-κB (nuclear factor-κB) qui va être capable d'activer la transcription de nombreux gènes dans le noyau.

Il en est de même pour la voie de transduction du TNF-α, l'activation des protéines adaptatrices FADD (Fas-activated death domain), TRADD (TNF-receptor associated death domain) et RIP (receptor interacting protein) permet, via TRAF-2, la libération de NF-κB.

Le tumor necrosis factor- α

Le tumor necrosis factor- α (TNF- α) existe sous deux formes, une forme soluble et une forme membranaire. La forme soluble est clivée à partir de la forme membranaire par une protéase transmembranaire appelée TACE (TNF- α converting enzyme). Il existe deux types de récepteurs exprimés par les cellules cutanées, de type I (TNF-RI, p55) de forte affinité pour la forme soluble, et de type II (TNF-RII, p75) se liant préférentiellement à la forme membranaire. Le TNF- α soluble est impliquée dans les réactions inflammatoires systémiques, alors que la forme membranaire est impliquée dans les réactions inflammatoires locales. Les deux récepteurs activent la voie de signalisation du facteur de transcription NF- κ B (cf. Figure 4).

Le TNF- α est stocké dans les mastocytes du derme (Gordon and Galli, 1990) et lors d'un stimulus il est aussi produit par les KC, les CL et d'autres types cellulaires (Kock et al., 1990; Larrick et al., 1989) (cf. Figure 2). La synthèse du TNF- α est contrôlée au niveau de sa transcription et de la stabilité de son ARNm. En fonction de la nature du chimique, l'augmentation de l'expression du TNF- α par les KC peut être induite, soit par la voie de transduction dépendante de la protéine kinase C (PKC), soit par la stabilisation de l'ARNm du TNF- α (Lisby et al., 1995). Comme l'IL-1 α , le TNF- α induit l'expression de cytokines secondaires exerçant ainsi des fonctions variées dans la génération de l'inflammation notamment dans l'infiltration des leucocytes.

2.1.2 Les cytokines secondaires et les chimiokines

L'interleukine-6

L'IL-6 est une cytokine pléiotrope, relarguée par presque toutes les cellules en réponse à un stimulus (cf. Figure 2). Sa présence est ainsi un bon marqueur de l'inflammation. L'IL-6 est un important médiateur de l'inflammation et active la production des protéines de la phase aiguë. Elle agit sur la prolifération et la différenciation des LB et des LT cytotoxiques dans la réponse immunitaire spécifique (Akira et al., 1993). Le dysfonctionnement de la production d'IL-6 pourrait contribuer aux maladies cutanées, en effet une augmentation de sa production et de l'expression son récepteur (IL-6R) a été détectée dans les peaux psoriatiques (Grossman et al., 1989). L'IL-6R active la voie de signalisation de transduction JAK/STAT (cf. Figure 5).

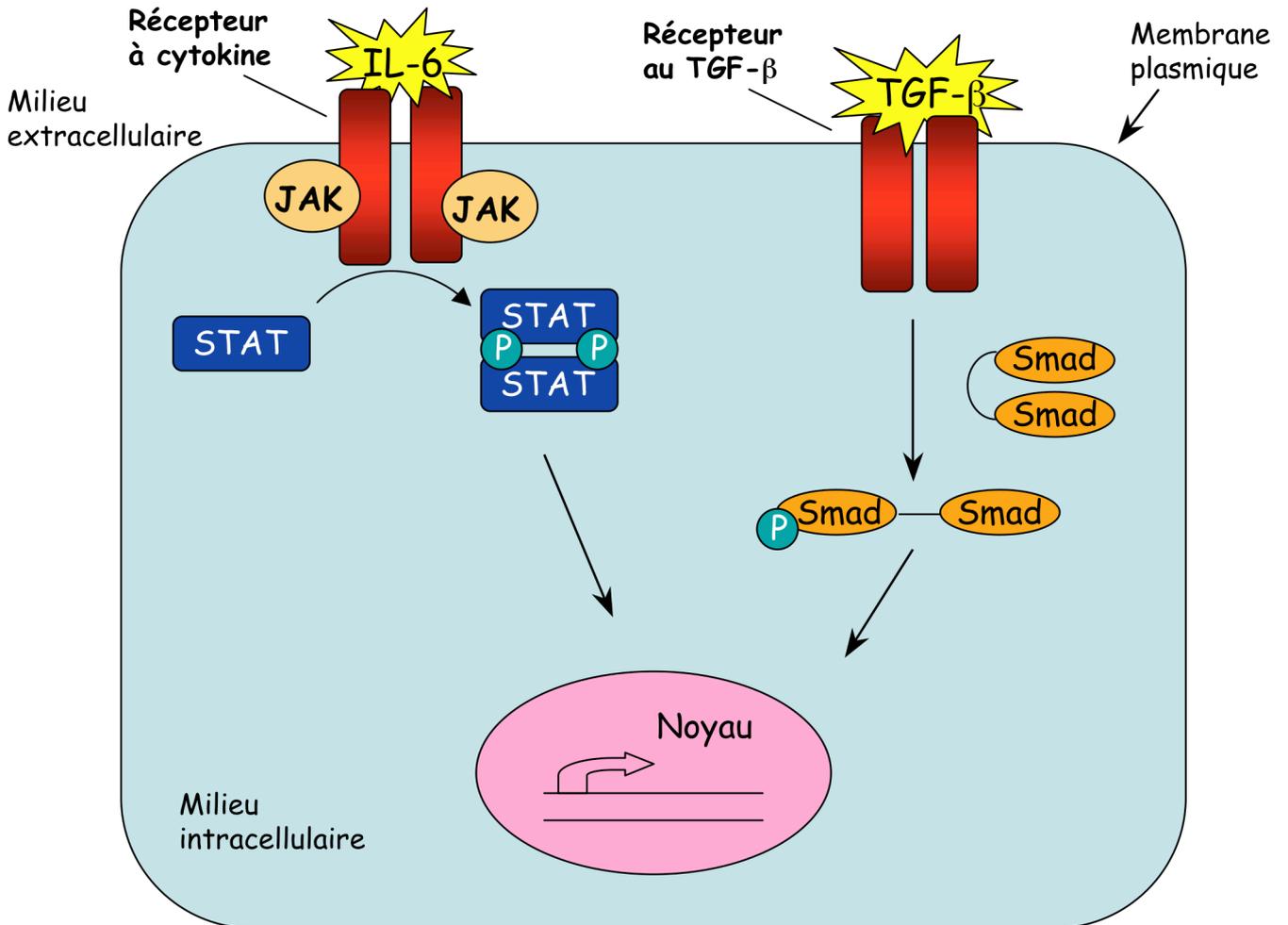


Figure 5. Schéma des voies de signalisation JAK/STAT et Smad

La liaison du ligand (GM-CSF, IL-6, IL-10, IFN) sur son récepteur entraîne la phosphorylation croisée des deux kinases associées JAK (Janus kinase). L'activation des JAK conduit au recrutement et la phosphorylation des protéines STAT (signal transducers and activators of transcription) qui, sous forme d'homodimères, vont être transloqués dans le noyau et induire la transcription de leur gènes cibles.

Le récepteur du TGF- β (transforming growth factor- β) possède un activité sérine/thréonine kinase qui permet la transduction du signal par l'activation de facteurs de transcription Smad, leur translocation dans le noyau induit la transcription de gènes comme le collagène ou d'autres protéines de la matrice extracellulaire.

Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance hématopoïétiques sont produits par de nombreux types cellulaires et régulent la différenciation et la prolifération des cellules souches hématopoïétiques. Le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) est particulièrement impliqué dans les réactions inflammatoires. C'est un facteur de croissance des neutrophiles, des éosinophiles et des macrophages, produit notamment par les KC en présence de l'IL-1 ou suite à l'application d'haptène ou d'irritant par exemple. Les récepteurs du GM-CSF ont été mis en évidence sur les macrophages, les CL et les CD. Le GM-CSF joue un rôle important dans l'immunité cutanée (i) en maintenant la viabilité des CL lors de culture *in vitro*, (ii) en participant à la maturation et la migration des CL, et (iii) dans la croissance des autres cellules résidentes ou recrutées dans la peau (Kaplan et al., 1992; Witmer-Pack et al., 1987).

Les chimiokines

Les chimiokines sont des petites protéines sécrétées (6-14 kDa) qui régulent le trafic de différents leucocytes (LT, polynucléaires), des CD et des monocytes en contrôlant leur adhésion aux cellules endothéliales, ainsi que leur migration transendothéliale et leur recrutement dans le tissu par chimiotactisme. Selon la position des résidus cystéines très conservés en position N-terminale, les chimiokines sont classées en quatre sous-familles. Les deux principales familles sont les chimiokines CC et CXC qui regroupent plus de quarante chimiokines. Les chimiokines CXC sont préférentiellement chimiotactiques pour les neutrophiles comme CXCL8 (IL-8). Les chimiokines CC recrutent d'autres leucocytes comme CCL2 (basophiles, LT), CCL3 (LT), CCL4 et CCL5 (éosinophile, LT, CD) (cf. Figure 2). Deux autres familles ont été décrites C et CX₃C, dont les seuls représentants connus sont XCL1 et XCL2 qui recrutent les LT, et CX₃CL1 (la neurotactine).

Une fois sécrétées, les chimiokines se lient à la matrice extracellulaire et aux protéoglycanes des membranes cellulaires, formant ainsi un gradient près du site de production. La combinaison des chimiokines produites dans un tissu en réponse à un agent pathogène contrôle la mise en place et l'orientation de la réponse immunitaire, en influant sur la quantité de cellules recrutées dans un tissu, mais aussi sur la nature de ces cellules recrutées en fonction des récepteurs qu'elles expriment (Moser et al., 2004). Bien que leur principal rôle soit la régulation du trafic dans les tissus, elles disposent aussi de propriétés importantes dans l'activation et la différenciation des leucocytes (Luther and Cyster, 2001). L'effet des

chimiokines sur les cellules cibles se fait via des récepteurs protéiques à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G (cf. Figure 6). Il existe quatre types de récepteurs correspondant aux quatre familles de chimiokines. La spécificité ligand/récepteur est complexe, car une chimiokine peut se lier à plusieurs récepteurs, et un récepteur peut reconnaître plusieurs chimiokines (Rossi and Zlotnik, 2000).

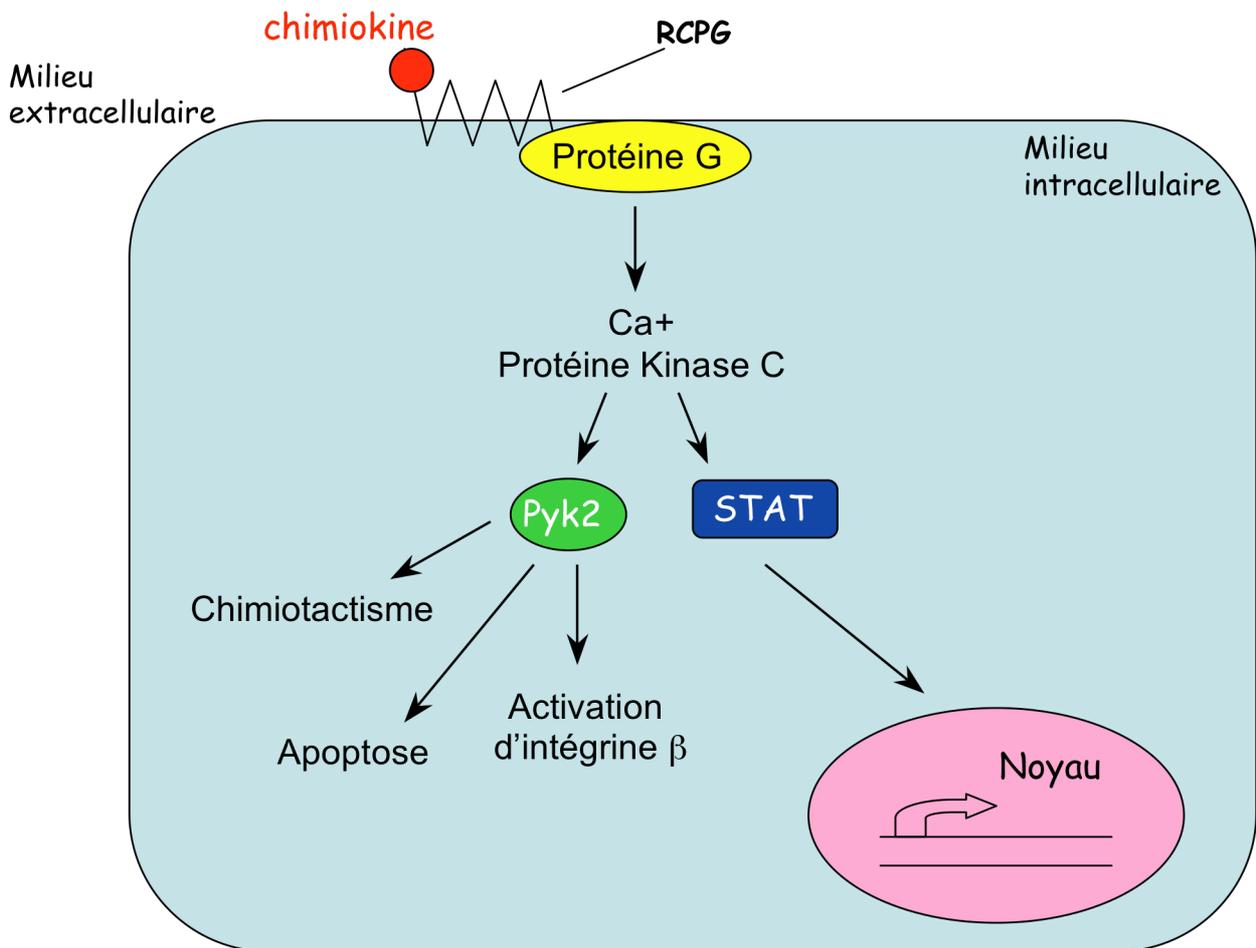


Figure 6. Schéma de la voie de signalisation des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG)

La liaison du ligand de type chimiokines sur son récepteur entraîne l'activation de protéines G hétérotrimériques couplées au récepteur et à la membrane plasmique. Le RCPG peut activer plusieurs systèmes effecteurs de transduction (Pyk2, STAT) conduisant à des effets biologiques différents (chimiotactisme, activation d'intégrine β, apoptose, transcription de gènes...). La multiplicité des voies de signalisation peut résulter du couplage du récepteur à un ou plusieurs sous-types de protéines G différentes, la dissociation de ses sous-unités, ayant chacune des possibilités d'agir sur des effecteurs différents (Ca²⁺, protéine kinase C).

La conformation active du RCPG dépend du ligand. Plusieurs points d'ancrage du ligand conduisent à des niveaux d'activation différents du récepteur et un RCPG donné peut avoir plusieurs ligands induisant des voies de transduction dépendant du ligand.

Pyk : proline rich protein tyrosine kinase; STAT : signal transducers and activators of transcription,

2.2. Les autres médiateurs pro-inflammatoires

L'acide arachidonique et ses métabolites

L'acide arachidonique est issu de phospholipides des membranes cellulaires sous l'action de la phospholipase A₂. Il est libéré rapidement en réponse à des chimiques *in vitro* et *in vivo* (Marks et al., 1998). Les métabolites de l'acide arachidonique appelés les éicosanoïdes, comme les prostaglandines, les leucotriènes et les thromboxanes, jouent un rôle important dans la réaction inflammatoire. Les effets biologiques de l'acide arachidonique sont dus essentiellement à sa conversion en de nombreux composants actifs par différentes voies enzymatiques (cf. Figure 7). La libération de ces médiateurs lipidiques varie en fonction du type cellulaire stimulé et nécessite souvent des interactions entre différents types cellulaires. Un type cellulaire peut fournir le substrat qui sera métabolisé par un autre type cellulaire. Enfin, les éicosanoïdes vont activer des récepteurs couplés à des protéines G qui peuvent être membranaires, cytosoliques ou nucléaires dans des types cellulaires différents.

Les réactifs oxygénés

Les réactifs oxygénés (OH, ¹O₂, O₂⁻, H₂O₂) appelés aussi radicaux libres oxygénés ou ROS (Reactive Oxygen Species) sont formés notamment par la chaîne de réactions des radicaux libres au niveau des mitochondries. La génération des ROS est induite par l'activation de plusieurs enzymes comme l'oxidase NADH, la cyclooxygénase, la lipooxygénase et la synthétase oxydative. La production excessive de ROS entraîne la peroxydation des lipides des membranes cellulaires, l'altération de protéines et de l'ADN entraînant la mort des cellules (Camhi et al., 1995), et active la formation de médiateurs inflammatoires issus de l'acide arachidonique. L'irradiation aux rayons UV, l'IL-1α ou le TNF-α conduisent à la génération de forte concentration de ROS. A l'homéostasie, la peau possède une protection efficace grâce à des antioxydants endogènes (glutathion, tocophérol ou vitamine E, acide ascorbique ou vitamine C...) et des enzymes spécifiques.

Le système du complément

Le système du complément est constitué de plus d'une trentaine de protéines solubles et membranaires capables d'interagir entre elles et avec les membranes de certaines cellules. L'activation en cascade de ses différents composés est à l'origine d'activités biologiques essentielles : réaction inflammatoire, phagocytose de bactéries, neutralisation de virus... L'activation du système du complément est rapide, localisée et peut s'effectuer par trois voies

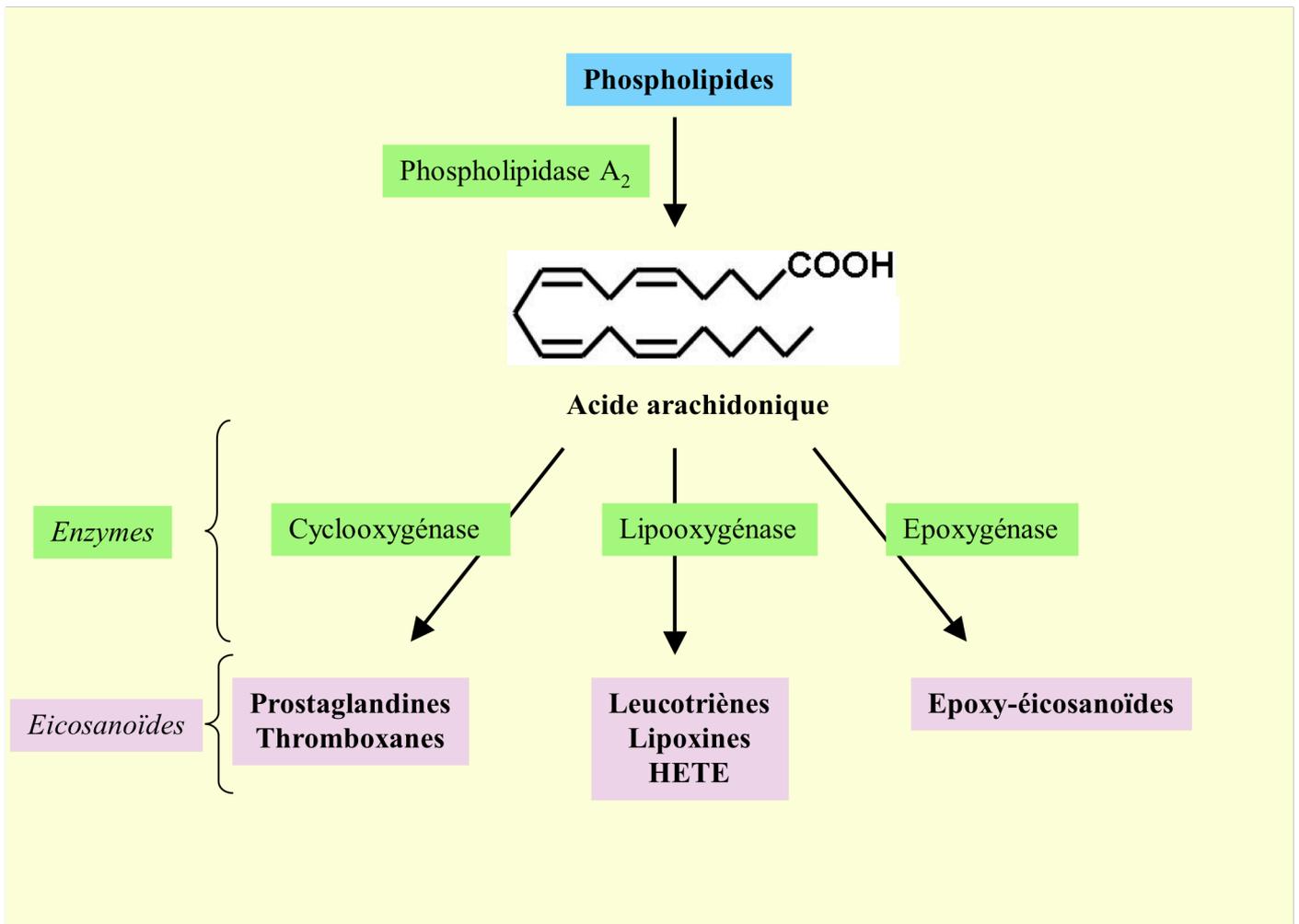


Figure 7. Les principales voies de formation des éicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique. D'après Marks *et al.*, 1998

Plusieurs voies métaboliques comme celles des cyclooxygénases (COX1, COX2) et des lipooxygénases sont responsables de la formation de la majorité des éicosanoïdes. A partir de l'acide arachidonique les cyclooxygénases vont permettre la production de prostaglandines et de thromboxanes, tandis que les lipooxygénases vont synthétiser les leucotriènes, les lipoxines et les acides éicosatétraénoïques (HETE, HPETE), et que les époxygénases conduisent à la production d'époxy-éicosanoïdes.

différentes : la voie classique, la voie alterne ou la voie des lectines. La voie classique génère notamment les anaphylatoxines C3a et C5a qui participent au recrutement des leucocytes au cours de l'inflammation (cf. chapitre III-3.4.2) (Revillard, 2001).

2.3. Les cytokines anti-inflammatoires

L'interleukine-10

A l'origine, l'IL-10 a été décrite comme une cytokine produite par les LT de type Th2 (T helper) (cf. chapitre III-4.1.4.2) et inhibant le relargage de cytokines par les cellules Th1 (Moore et al., 1993), mais il est actuellement clair que l'IL-10 est aussi produite par d'autres cellules incluant les KC, les mastocytes et les monocytes (cf. Figure 2). Lors de l'application cutanée de chimiques, l'IL-10 inhibe l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (cf. chapitre III-3.5.1). Son récepteur IL-10R active la voie de signalisation JAK/STAT (cf. Figure 5).

Le transforming growth factor- β

Le transforming growth factor- β (TGF- β) est sécrété par plusieurs types cellulaires activés, principalement par les plaquettes et les KC (cf. Figure 2). Il est impliqué dans la croissance cellulaire et la différenciation de nombreuses cellules. Le TGF- β est un signal crucial impliqué dans la suppression des réactions inflammatoires en inhibant : (i) la différenciation des macrophages, (ii) l'activité des LT et des monocytes, et (iii) la présentation antigénique des CL (Bos, 2004; Hemmi et al., 2001). Par ailleurs, il participe aussi aux réponses inflammatoires en induisant l'adhésion et le chimiotactisme des leucocytes. Ces fonctions de suppression et d'activation de l'inflammation semblent dépendre du stade de différenciation de la cellule exprimant le récepteur au TGF- β (TGF- β R) (Wahl et al., 1989), induisant l'activation des facteurs de transcription Smad (cf. Figure 5)

2.4. Les récepteurs Toll-like

Les Toll ont à l'origine été identifiés en tant que régulateur du développement embryonnaire dans la polarisation dorso-ventrale chez la drosophile *Drosophila Melanogaster* (Hashimoto et al., 1988). Les Toll sont également impliqués dans l'immunité anti-fongique de cet insecte (Lemaitre et al., 1996), ouvrant ainsi un nouvel axe de recherche

et conduisant à l'identification de protéines homologues chez les mammifères, appelés Toll-like receptor (TLR).

2.4.1. La famille des TLR

On connaît actuellement 13 membres (TLR-1 à -13) dans la famille des TLR dont 10 sont formellement identifiés chez l'homme. Les TLR reconnaissent des motifs moléculaires conservés associés à des pathogènes appelés PAMPS (pathogen-associated molecular pattern). Ce sont des glycoprotéines transmembranaires dont le domaine intracytoplasmique est similaire à celui des récepteurs aux IL-1 et IL-18 (Murphy et al., 2000). Les homologies de séquences et l'organisation génomique des gènes, ont permis d'identifier cinq sous-classes de TLR qui reconnaissent des ligands de structures similaires : TLR-1, -2, -6 (et -10) reconnaissent des lipoprotéines, TLR-4 le LPS entre autre, TLR-5 (et -11) des protéines bactériennes, TLR3 de l'ARN et TLR-7, -8 et -9 des séquences ARN ou ADN (cf. Figure 8).

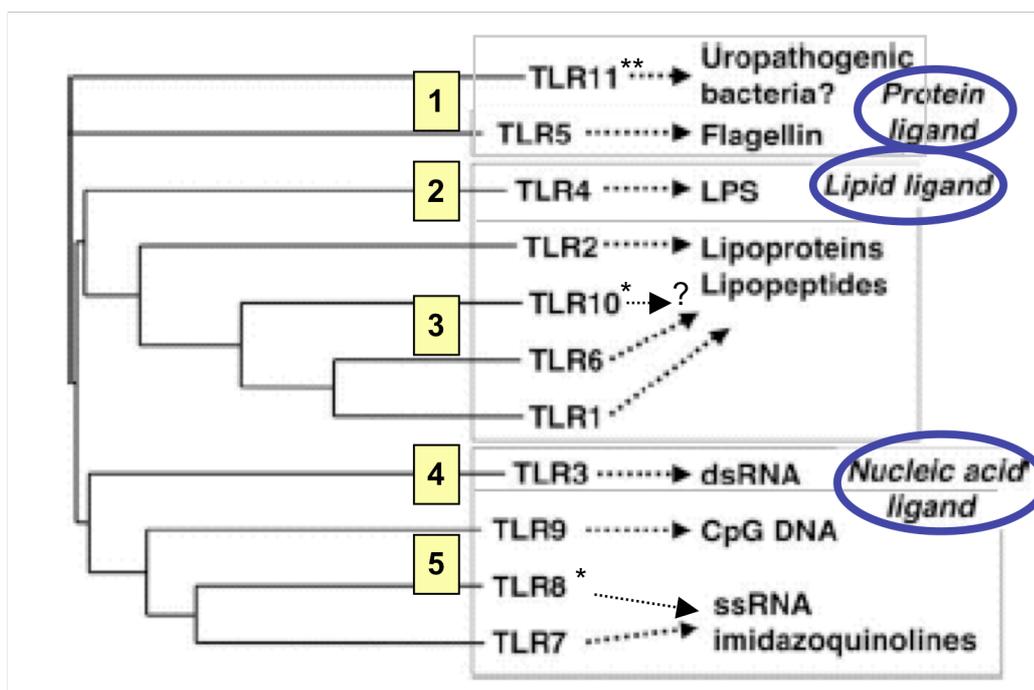


Figure 8. La phylogénie et les sous-classes des TLR

D'après Kaisho & Akira, 2004; Akira & Takeda, 2004.

Les TLR sont divisés en 5 sous-classes : TLR-3, TLR-4, et TLR-5, -11 représentent 3 sous-classes indépendantes, TLR-1, -2, -6, -10 et TLR-7, -8, -9 constituent les 2 autres sous-classes. Chaque membre de la famille des TLR reconnaît des composés pathogènes différents, en raison des variations des acides aminés du domaine extracellulaire, cependant il existe des homologies de structures moléculaires reconnues par les TLR d'une même sous-classe. Le TLR-11 reconnaît chez la souris un composé spécifique encore non identifié, issu d'une souche bactérienne uropathogène. Aucun ligand de TLR-10 n'a été identifié à ce jour.

* : non fonctionnel chez la souris; **: non fonctionnel chez l'homme

Les TLR-12 et TLR-13 ont récemment été identifiés chez la souris, mais leurs ligands n'ont par encore été découverts. Ces deux TLR ne sont pas exprimés chez l'homme (Tabeta et al., 2004). Par ailleurs, l'activation des TLR-2 et -4 peut être induite par des ligands endogènes comme les protéines de stress (Hsp) et des fragments de l'acide hyaluronique (Asea et al., 2002; Scheibner et al., 2006; Termeer et al., 2002). Ces derniers peuvent être induits par les haptènes (Albers et al., 1996; Farzaneh et al., 2005; Proksch et al., 2006), suggérant un rôle potentiel des TLR-2 et -4 dans le développement des eczemas de contact.

La localisation cellulaire des TLR n'est pas exclusivement en surface de la membrane plasmique. En effet, celle-ci est fonction du ligand reconnu. Ainsi les TLR-1, -2, -4, -5, -6 et -11 qui reconnaissent des composants de la surface des pathogènes, se retrouvent exprimés à la membrane plasmique, alors que les TLR-3, -7, -8 et -9 reconnaissant des acides nucléiques, sont dans les compartiments intracellulaires (endosomes), avec leur domaine TIR étant localisés dans le cytoplasme pour permettre la transduction du signal d'activation (cf. Figure 10).

	Type cellulaire						
	Kératinocytes ⁽¹⁾	Cellules de Langerhans		Mastocytes		Cellules dendritiques ⁽⁶⁾	
	Homme	Homme ⁽²⁾	Souris ⁽³⁾	Homme ⁽⁴⁾	Souris ⁽⁵⁾	Homme	Souris
TLR-1	+	+	-	+	?	+	+
TLR-2	+	+	+	+	+	+	+
TLR-3	+	-	?	+	+	+	+
TLR-4	-	+/-	+	+	+	-	+
TLR-5	+	-	?	+	-	+	+
TLR-6	-	-	?	+	+	+	+
TLR-7	-	-	-	+	+	-	+
TLR-8	-	+	/	-	/	+	/
TLR-9	-	-	+	+	+	-	+
TLR-10	+	-	/	-	/	+	/

Figure 9. L'expression des TLR par les principales cellules cutanées à l'homéostasie.

(1) Kollish *et al.*, 2005; (2) Takeuchi *et al.*, 2003; Curry *et al.*, 2005; Renn *et al.*, 2006 (3) Mitsui *et al.*, 2003; (4) Kulka *et al.*, 2004; (5) Matsushima *et al.*, 2004; McCurdy *et al.*, 2001; (6) Iwasaki & Medzhitov, 2004 ; Kadowaki *et al.*, 2001.

+/- : résultats controversés ; / : non fonctionnel chez la souris ; ? : non étudié

2.4.2. L'expression des TLR dans les cellules cutanées

Les cellules cutanées résidentes expriment plusieurs TLR dont l'activation induit la sécrétion de cytokines responsables du recrutement des cellules du système immunitaire, et permettant une réponse rapide à une infection. Cependant l'expression des TLR varie suivant l'état de différenciation ou d'activation des cellules et peut être différente selon l'espèce (différence homme/souris) (cf. Figure 9). Aussi il est difficile d'établir la distribution cellulaire précise de chaque TLR, notamment par manque d'outils : avec un faible nombre d'anticorps spécifiques contre les TLR. Les données portent ainsi principalement sur l'analyse de l'expression des ARNm associée à des tests de fonctionnalité (cf. Figure 9).

Dans la peau humaine normale, les TLR-1, -2, -3 et -5 sont exprimés de façon constitutive et sont fonctionnels chez des KC humains en culture primaire en présence de ligands spécifiques. Le TLR-4 est à la limite de la détection mais devient fortement exprimé en présence de ligands de LPS (Baker et al., 2003; Kollisch et al., 2005; Song et al., 2002). De la même façon, le TLR-9 n'est pas détecté dans la peau normale ni chez l'homme ni chez la souris, mais son expression et son activation sont induites par une simple injection d'eau saline chez la souris (Liu et al., 2003). En conditions inflammatoires comme dans le psoriasis, l'expression des TLR-1 et -2 est augmentée, alors que celle de TLR-5 est diminuée dans les KC (Baker et al., 2003). Les fibroblastes expriment les TLR-1, -2, et -4 qui sont fonctionnels *in vitro* (Curry et al., 2003). En ce qui concerne les TLR-7 et TLR-8, leur expression et leur activation dans la peau semblent être induite par la stimulation d'un de leur ligand, l'imiquimode, cependant ces résultats restent controversés (Kollisch et al., 2005; Kono et al., 1994).

De nombreuses études portent sur l'expression de TLR par les CD et montrent que leur expression est très variable selon le type de CD étudiées. Les CL semblent exprimer moins de TLR que les CD conventionnelles (cf. Figure 9) et sont également moins sensibles aux ligands des TLR (Takeuchi et al., 2003). Les mastocytes expriment la plupart des TLR (cf. Figure 9) et répondent aux ligands des TLR-1, -2, -3, -4 et -6 chez l'homme (Iwasaki and Medzhitov, 2004) et TLR-2, -3, -4, -7 et -9 chez la souris (Matsushima et al., 2004; Supajatura et al., 2002). Les neutrophiles expriment tous les TLR excepté TLR-3 mais ne répondent pas aux ligands de TLR-9. Les éosinophiles expriment TLR-1, -4, -7, -9 et -10 mais ne répondent qu'aux ligands de TLR-7 (Iwasaki and Medzhitov, 2004).

2.4.3. Les voies de signalisation et l'activation de l'immunité via les TLR

Deux voies majeures sont à ce jour identifiées. La voie utilisant le facteur de différenciation myéloïde MyD88 (myeloid differentiation factor 88) est commune au récepteur de l'IL-1, l'IL-18 et aux TLR (excepté TLR-3). Cette voie appelée voie dépendante du facteur MyD88, aboutie à l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui induit des cytokines pro-inflammatoires (cf. Figure 10). Une voie indépendante du facteur MyD88 a été également identifiée pour les TLR-3 et TLR-4. Cette voie utilise la protéine TRIF pour initier la transduction du signal et conduit à l'activation à la fois des facteurs de transcription NF- κ B et d'IRF-3, débouchant ainsi sur la production d'IFN- β et l'induction des gènes dépendants des IFN. La stimulation des TLR-7, -8 et -9 peut conduire à la production d'IFN, le mécanisme est encore non connu mais dépendant de la protéine MyD88 (Akira and Takeda, 2004; Kaisho and Akira, 2004).

Les TLR peuvent induire plusieurs types de réponses immunitaires. Ils activent les cellules immunitaires innées afin de déclencher une réponse inflammatoire face à un pathogène bactérien ou anti-virale, tels les kératinocytes, les mastocytes, les macrophages et les neutrophiles qui vont sécréter diverses cytokines et chimiokines. Les TLR participent également à la réponse spécifique en activant les CD, notamment en favorisant leur maturation. Ils ont récemment été décrit comme impliqués dans l'activation des LT effecteurs et des LT régulateurs. Ainsi les TLR sont à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité spécifique.

Figure 10. Les principaux ligands et les voies de signalisation des TLR.

D'après Kaisho & Akira, 2004; Akira & Takeda, 2004.

L'interaction entre les TLR et leurs ligands semble être directe au moins en ce qui concerne les TLR-4 et TLR-9.

La voie de signalisation dépendante de MyD88

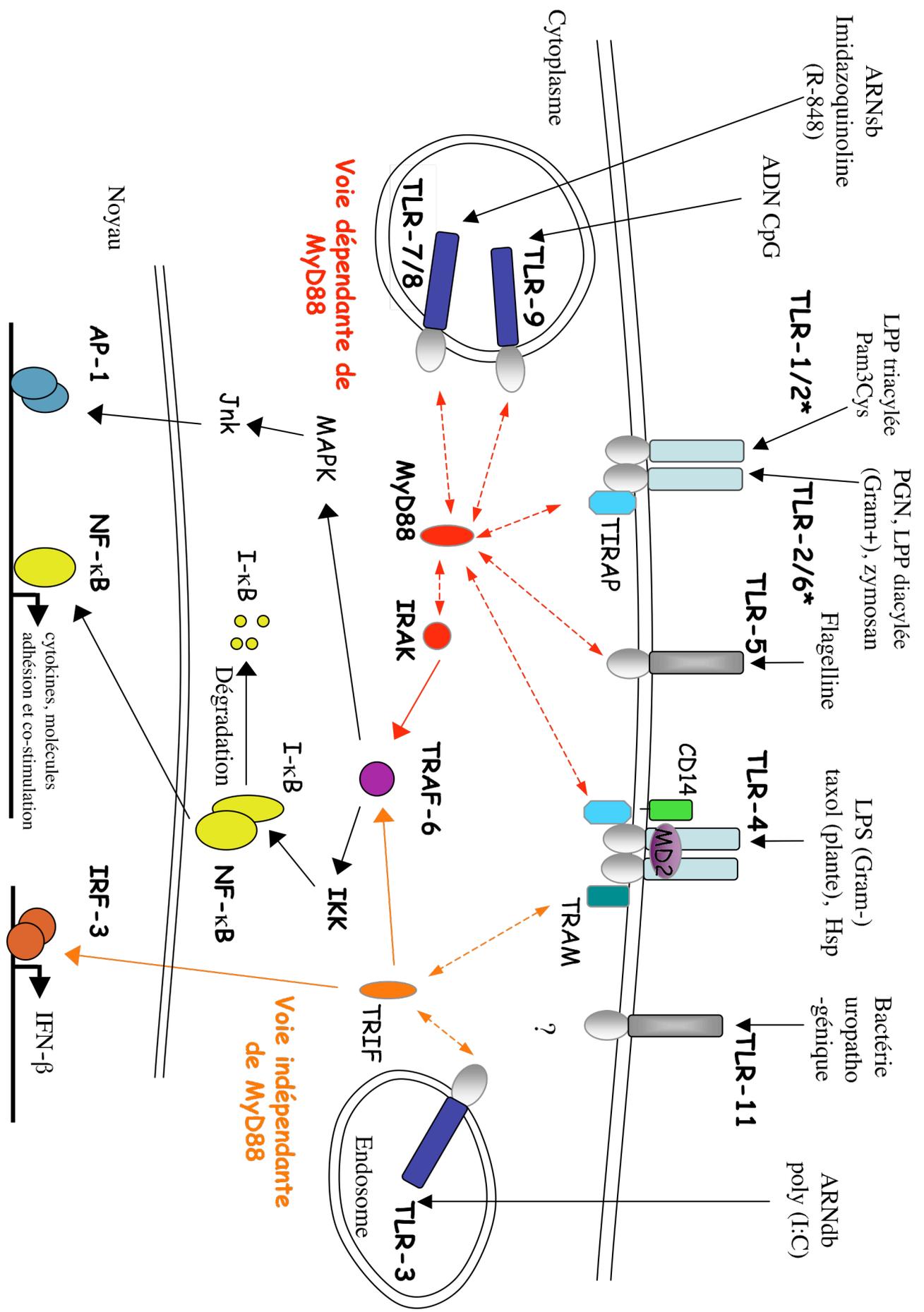
Les TLR, à l'exception de TLR3, recrutent suite à leur stimulation, la protéine adaptatrice MyD88. Cette dernière va activer la protéine kinase IRAK (IL-1R-associated kinase) qui va recruter et s'associer à la protéine TRAF-6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor-6). Le dimère IRAK/TRAF-6 se dissocie du récepteur formant un complexe avec d'autres protéines. Ce complexe subit des réarrangements conduisant à l'activation des MAPK (mitogen-activated protein kinases) et du complexe IKK (I κ B kinase) qui phosphoryle la protéine I- κ B entraînant la libération du facteur de transcription NF- κ B. La translocation dans la noyau de NF- κ B ainsi libéré, va induire l'expression de gènes cibles. Pour les TLR-2 et TLR-4, la protéine TIRAP (TIR-domain-containing protein) est indispensable pour le recrutement de la protéine MyD88. Le TLR-4 nécessite aussi l'association des protéines CD14 et MD2 à sa partie extracellulaire pour stabiliser son expression à la membrane plasmique et accroître sa sensibilité au ligand.

La voie de signalisation indépendante de MyD88 et l'induction de l'IFN- β

Les TLR-3 et TLR-4 recrutent la protéine TRIF (TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- β) suite à leur stimulation. Cette protéine adaptatrice interagit avec la protéine TRAF-6 qui conduit à l'activation du facteur NF- κ B. La protéine TRIF interagit également avec des protéines kinases qui phosphorylent IRF-3 (IFN regulatory factor-3) conduisant à l'induction du gène de l'IFN- β (interferon- β). Le recrutement de TRIF au TLR-4 nécessite la protéine adaptatrice TRAM (TRIF-related adaptor molecule).

* : Le TLR-2 est sous forme hétérodimérique soit avec TLR-1 (TLR-2/TLR-1) ou TLR-6 (TLR-2/TLR-6) reconnaissant ainsi des ligands distincts. Aucune forme homodimérique active de TLR-2 n'a été mise en évidence à ce jour.

db : double brin ; *Hsp* : heat shock protein ; *LPP* : lipoprotéine ; *LPS* : lipopolysaccharide ; *PGN* : peptidoglycane ; *poly(I:C)* : acide polyinosinic-polycytidylic ; *sb*, simple brin.



II- LES XENOBIOTIQUES ET LES PATHOLOGIES INDUITES

Le système immunitaire cutané peut être activé par divers stimuli, telle une blessure, une exposition aux UV ou à des chimiques. Les xénobiotiques sont des chimiques non protéiques pouvant être de deux types : irritants ou haptènes.

Les irritants sont capables d'activer le système immunitaire inné cutané conduisant à une irritation cutanée qui peut évoluer en une maladie inflammatoire, la dermatite irritante de contact (DIC). En tant que molécules chimiques, ils ne sont pas détectés par le système immunitaire, mais par leurs propriétés physicochimiques toxiques il déclenche un signal de danger responsable de l'activation de la réponse innée. Les molécules impliquées dans le signal de danger sont sous forme préstockée dans les cellules du tissu endommagé, pour initier rapidement la réponse immunitaire, et sous forme néo-synthétisée afin de la mettre en place. Selon la nature du chimique, la dose et la fréquence d'exposition, l'irritation cutanée peut aboutir à des manifestations cliniques plus ou moins visibles.

Les haptènes sont, en plus d'être pourvu d'un pouvoir irritant, capables d'induire une réponse immunitaire adaptative via l'activation de LT spécifiques de l'haptène. Leur pouvoir irritant induit un signal de danger nécessaire à la phase de sensibilisation. Les haptènes sont responsables de l'eczéma allergique de contact appelé aussi dermatite allergique de contact (DAC). On parle aussi de réactions d'hypersensibilité de type IV, ou d'hypersensibilité retardée de contact (HSRC), dont le terme est souvent utilisé dans le cas de modèles animaux *in vivo*. Comme pour les irritants, les haptènes ne sont pas reconnus directement par le système immunitaire, mais par leur propriété de liaison aux protéines ils sont capables de former des peptides hapténisés pouvant être présentés au système immunitaire et ainsi déclencher l'activation de LT spécifiques.

1. Les irritants

1.1. Les caractéristiques chimiques

Un irritant est un chimique capable d'altérer et/ou de pénétrer dans la peau par ses propriétés physicochimiques et ainsi être toxique au contact des cellules cutanées. La corrosivité et la capacité de pénétration dans la peau sont deux paramètres importants du pouvoir irritant des xénobiotiques, propriétés notamment utilisées dans la détermination de la toxicité de nouveaux chimiques (Barratt, 1995) (cf. chapitre II-1.2.2). Le pouvoir irritant

d'une substance est lié (i) à sa capacité à rompre et/ou pénétrer la barrière cutanée (cf. encadré n°2) et (ii) à sa toxicité conduisant à la perturbation des membranes des cellules cutanées.

L'effet des irritants sur les cellules se caractérise par une perturbation du fonctionnement des cellules. L'hétérogénéité des propriétés physicochimiques des molécules irritantes explique des effets variables sur les cellules. Les solvants et les détergents perturbent les membranes cellulaires et leur fluidité par leur actions sur les lipides, comme le sulfate de sodium dodecyl (SDS) appelé aussi sulfate de sodium lauryl (SLS) souvent utilisé dans les études. Les acides et les alcalins modifient le pH membranaire, ce qui a de nombreuses conséquences sur le métabolisme cellulaire. De nombreux chimiques perturbent ainsi les échanges cellulaires avec l'extérieur. Ces modifications induisent l'activation et/ou la mort des cellules par apoptose ou par nécrose suivant la nature et la dose de l'irritant. Ces cellules vont ainsi libérer des médiateurs pro-inflammatoires (histamines, prostaglandines, cytokines...) qui seront responsables de l'activation du système immunitaire inné cutané induisant l'inflammation. Le pouvoir irritant dépend de la dose, de la durée et de la fréquence d'exposition, mais aussi de facteurs environnementaux (pollution, stress, infection...) et génétiques, il est donc difficile de prévoir chez un individu donné les effets d'un produit donné. En fait tout chimique est un irritant cutané potentiel, un faible pouvoir irritant et une exposition relativement limitée fait apparaître certains chimiques peu irritants comme non irritants.

1.2. Les modèles de prédiction de pouvoir irritant

Divers modèles *in vivo* et *in vitro* ont été développés afin de déterminer le pouvoir irritant d'un chimique et ainsi d'être classer par la législation européenne. Les premiers modèles décrits sont des tests *in vivo* sur des animaux.

1.2.1. Les modèles *in vivo*

Le modèle de Draize est historiquement le test de prédiction d'un irritant le plus utilisé. Il consiste à appliquer sur la face dorsale de 3 à 6 lapins albinos, le chimique d'intérêt de façon semi-occlusive (gaze) pendant 24 heures, puis un score est attribué en fonction des observations cliniques sur le site d'application après 24, 48 et 72 heures (cf. Figure 11). Cependant la reproductibilité et la prédiction par rapport aux résultats obtenus chez l'homme restent faibles (Basketter et al., 1997), malgré (i) des modifications de procédure au niveau de

Encadré n°2

La pénétration de la barrière cutanée

Pour qu'une substance soit irritante et/ou allergisante, elle doit tout d'abord pénétrer la barrière cutanée protégée par la couche cornée riche en protéines et en lipides.

Pour les chimiques hautement irritants dit corrosifs, comme les acides et les alcalins forts, le contact avec la surface de la peau est suffisant. En effet, ils sont capables de dissoudre la couche cornée et d'entraîner la coagulation des protéines.

Les autres chimiques doivent traverser la couche cornée pour exercer leur propriétés toxiques. En plus de facteurs intrinsèques de la peau (hydratation, âge, variabilité anatomique, métabolisme enzymatique, pathologie...), plusieurs propriétés du chimique facilitent la pénétration de l'épiderme via la couche cornée : sa forte hydrophobicité, l'absence de groupements chargés, son coefficient de partition, son faible encombrement stérique et son faible poids moléculaire (<1000 Da) (Basketter, 1998; Berard et al., 2003). Il est ainsi possible par des analyses de relation entre la structure et l'activité (SAR) de déterminer le potentiel toxique d'une substance. Ces paramètres ne donnent cependant qu'une mesure indirecte de la quantité réelle qui atteint sa cible (épiderme ou derme selon l'action du chimique), qui dépend aussi de la dose appliquée.

Grade	Description de la réponse
0	Aucune réaction
+	Réaction positive faible (érythème souvent peu sévère ou déshydratation au site d'application)
++	Réaction positive modérée (érythème visible parfois étendu)
+++	Réaction positive forte (érythème fort souvent étendu avec un œdème)

Figure 11. Evaluation clinique de la réaction irritante.

D'après Basketter *et al.*, 1997

l'application du chimique, avec (ii) des produits de référence pendant plusieurs jours, et (iii) au niveau du nombre (statistiquement plus important) et du choix des animaux (cobayes, souris) (Andersen et al., 2006; Wahlberg, 1993). Ce modèle est encore utilisé pour classer les irritants de façon plus ou moins comparable à celle chez l'homme. La recherche de méthodes alternatives à l'utilisation d'animaux a conduit au développement de nombreux modèles *in vitro*.

1.2.2. Les modèles *in vitro* et *in silico*

Les modèles *in vitro* consistent à évaluer différents changements physiologiques telles la cytotoxicité, l'altération tissulaire et cellulaire, et la réponse inflammatoire sur des modèles *ex-vivo* (biopsies de peau, peau issue de chirurgie esthétique) ou de cultures cellulaires (KC, fibroblastes, peau reconstituée à partir de cellules sur un biofilm) (Basketter et al., 1999; Netzlaff et al., 2005). Par exemple, le chimique d'intérêt est incubé sur une peau reconstituée à partir de culture de KC humains sur un filtre de polycarbonate, puis la viabilité des cellules, la sécrétion et l'expression d'IL-1 α et d'IL-8, et la morphologie du « tissu » sont évaluées après 24 heures (de Brugerolle de et al., 1999). Cependant aucune méthode de prédiction *in vitro* n'a été validée par le Centre Européen de Validation des Méthodes Alternatives (ECVAM), notamment à cause de la faible reproductibilité lors des transferts de technologies entre laboratoires. L'utilisation de tels modèles est donc limitée (Botham, 2004; Kandarova et al., 2005).

Une méthode *in silico* appelée QSAR (relation structure-activité quantitative) permet de prédire la toxicité d'un chimique à partir de sa structure et de ses propriétés physicochimiques. Cette analyse utilise des méthodes statistiques afin de corrélérer des données biologiques des modèles *in vivo* avec des modèles structuraux. Dans le cas de l'irritation, le modèle lapin du test de Draize sert de base de données biologiques. Par exemple le système d'expertise appelé DEREK (Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge) a permis de réaliser une base de données toxicologiques à partir de l'identification de sous-structures associées à certains types d'activités toxiques (Barratt, 2000; Sanderson and Earnshaw, 1991). Ces méthodes d'analyses statistiques deviennent de plus en plus robustes mais nécessitent encore d'être affinées : par le choix des données biologiques avec l'utilisation des tests sur l'homme, et par la prise en compte du métabolisme cutané qui peut modifier la structure d'un chimique et devenir moins ou au contraire plus irritant.

1.2.3. Les tests chez l'homme

Chez l'homme l'utilisation de patch est la méthode la plus courante et la plus proche des conditions réelles d'exposition par rapport aux tests de scarification (Frosch and Kligman, 1976) ou d'applications répétées du chimique (Bowman et al., 2003). La méthode consiste à appliquer pendant 4 heures une quantité standardisée du chimique à tester sur la peau d'un volontaire sous un patch occlusif. Pour éviter toute réaction exacerbée, le test est surveillé 15 min, 30 min puis toutes les heures suivant l'application (Basketter et al., 1997). Puis un score est attribué en fonction des observations cliniques sur le site d'application, de la même façon que pour le modèle du lapin de Draize (cf. Figure 11). Les chimiques sont classés comme non irritant, irritant ou corrosif, correspondant pour la législation européenne à non classé, R38 ou R34 respectivement (cf. Figure 12). Basketter *et al.* montrent que sur 20 chimiques considérés comme irritants par la législation européenne (basée sur le modèle du test de Draize) seuls huit sont effectivement irritants chez l'homme (Basketter et al., 1997) (cf. Figure 13). Cette méthode de patch est fondée sur des principes éthiques avec une exposition progressive au chimique en présence de contrôles irritants positifs.

Une approche complémentaire intéressante pour déterminer le pouvoir irritant d'un nouveau chimique serait l'utilisation dans une première étape de l'analyse QSAR, et en absence de forte toxicité déterminer une dose à appliquer afin de le tester sur un modèle animal, avant de le tester chez l'homme.

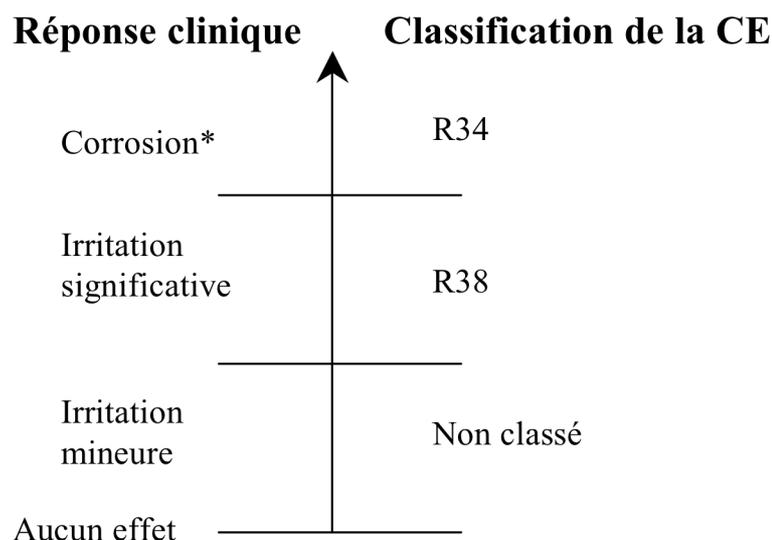


Figure 12. Nomenclature des substances irritantes selon la communauté européenne (CE). D'après Basketter *et al.*, 1997

* : une corrosion entraîne une destruction irréversible des tissus de la peau

Chimique	Classification de la CE	Classification d'après les tests humains
Chlorure de benzalkonium	R34	R38
Acide octanoïque	R34	R38
SDS (20%)	R38	R38
Hydroxide de sodium (0,5%)	R38	R38
Décanol	R38	R38
Percarbonate de sodium	R38	NC
Acide acétique (10%)	R38	NC
Eugénol	R38	NC
Acide hydrochlorique (10%)	R38	NC
SDS (10%)	NC	R38
Acide lactique	NC	R38
Isopropanol	NC	NC
Polyéthylène glycol	NC	NC

Figure 13. Classification de chimiques irritants selon la constitution européenne (CE) et les résultats de patch tests humains. D'après Basketter *et al.*, 1997.

NC : non classé, R38 : irritant, R34 : corrosif.

2. Les haptènes

2.1. Les caractéristiques chimiques

Les haptènes sont des chimiques hautement réactifs, qui en plus d'être plus ou moins irritants, sont capables de se lier de façon covalente ou non covalente avec certains acides aminés des protéines. Ces molécules sont des composés chimiques de faible poids moléculaire (inférieur à 1000 Da), capables de pénétrer à travers une peau saine (cf. encadré n°2). Leur faible poids moléculaire et leur liaison aux protéines sont indispensables pour induire une réponse immunitaire. A l'exception des métaux, comme le nickel, qui établissent des liaisons faibles avec des acides aminés, la majorité des haptènes (2,4-dinitrofluorobenzène, DNFB ; 2,4-dinichlorofluorobenzène, DNCB ; Héryl cinnamaldéhyde, HCA...) correspond à des molécules électrophiles qui interagissent de façon covalente avec des résidus nucléophiles de protéines cutanées. Cette réaction est sélective : un haptène se fixe sur un acide aminé particulier (DNFB-lysine, nickel-histidine). Ces liaisons haptène/acide aminé sont suffisamment stables pour engendrer des modifications de la reconnaissance antigénique des peptides du soi et induire ainsi une réponse contre les protéines hapténisées. Les haptènes peuvent se lier aux protéines exogènes (sérum), endogènes ou directement aux peptides situés dans la poche des molécules du CMH-I et CMH-II à la surface des cellules.

Les haptènes capables d'induire une DAC sont des molécules présentes dans l'environnement quotidien et professionnel : métaux, détergent, solvant, cosmétiques, plantes, textiles, goudron, médicaments... Les haptènes doivent parfois subir des transformations chimiques dans la peau pour véritablement acquérir leur propriété de liaison aux protéines.

2.2. Le métabolisme cutané

Certains haptènes ne sont pas capables d'interagir directement avec des protéines, ce sont des prohaptènes. Leur métabolisation par des enzymes cutanées, l'oxydation ou l'exposition aux rayons UV est nécessaire pour les transformer en métabolites réactifs (eugénol, paraphénylènediamine, cinnamaldéhyde...) (Griem et al., 1998). La cellule dispose de processus de détoxification permettant d'éliminer les métabolites réactifs, mais leur accumulation suite à une dose trop forte ou à un défaut dans leur élimination peut conduire à une cytotoxicité et à leur fixation en grand nombre sur des protéines cellulaires.

Par exemple la cinnamaldéhyde correspond à un métabolite issu de la réaction enzymatique de l'alcool cinnamique (chimique non haptène) par l'alcool déshydrogénase

(ADH) cellulaire (Basketter, 1992; Smith et al., 2000). Ce métabolite réactif est ensuite détoxifié par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) ou l'ADH en acide cinnamique, un dérivé plus hydrophile qui est plus facilement éliminé, ou par sa conjugaison au glutathion (directement ou via la glutathion-S-transférase) (cf. Figure 14). Ainsi la rupture de l'équilibre entre l'activation et la détoxification de la cinnamaldéhyde peut entraîner l'accumulation de ce métabolite réactif dans la cellule, capable alors d'interagir avec des protéines.

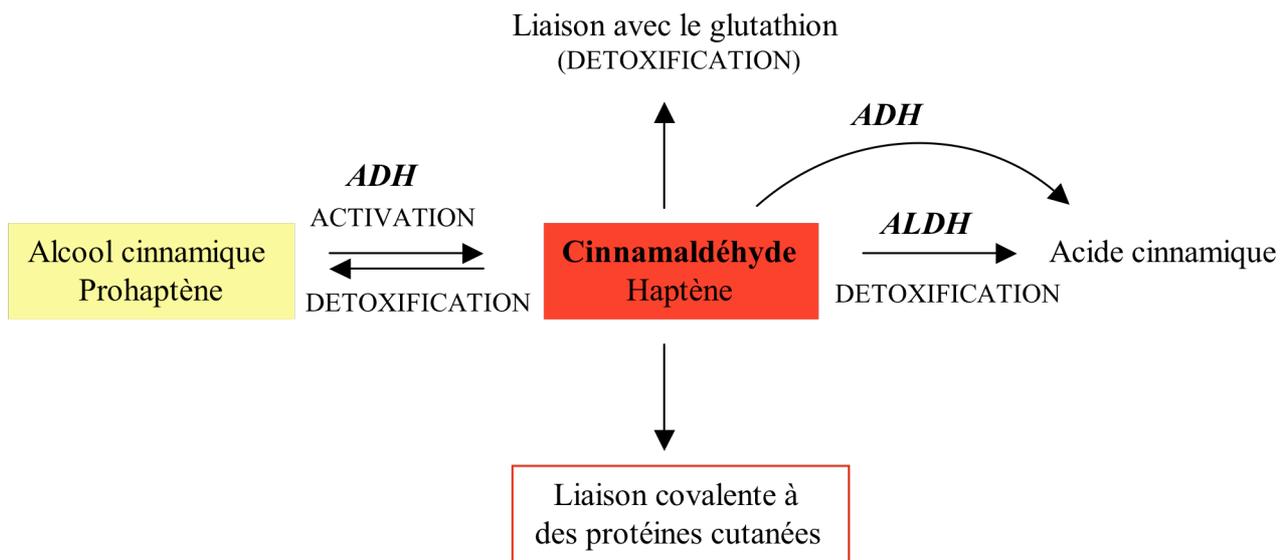


Figure 14. Métabolisme cutané du cinnamaldéhyde et de l'alcool cinnamique.
D'après Smith *et al.* 2000

2.3. Le pouvoir sensibilisant et ses facteurs

Les haptènes n'ont pas tous la même capacité de sensibilisation. On distingue les haptènes dits forts voir extrêmes, capables d'induire une sensibilisation chez une majorité d'individus, ce sont des haptènes expérimentaux absents dans la vie quotidienne comme le DNFB et l'oxazolone. Les haptènes dits modérés voire faibles n'affectent qu'une partie très restreinte de la population exposée, c'est le cas du nickel et de la paraphénylènediamine (cf. Figure 15). Le pouvoir sensibilisant correspond à la dose nécessaire d'haptène pour induire une sensibilisation : plus une dose élevée est nécessaire pour sensibiliser l'individu, plus le pouvoir sensibilisant de l'haptène est faible (Gerberick et al., 2004). Il dépend de la nature du chimique qui influence la pénétration, la fixation de l'haptène sur des protéines et la toxicité responsable du déclenchement de l'inflammation cutanée. Cependant la dose à laquelle l'individu est exposé est aussi un facteur important dans la sensibilisation : à très faible dose,

un haptène n'est pas allergisant mais au contraire peut induire une tolérance (Steinbrink et al., 1996). La détermination du pouvoir sensibilisant ne reflète pas tout à fait la fréquence de DAC rencontrée chez les individus. En effet, le nickel qui est un haptène faible, est la cause la plus fréquente de DAC en Europe, du faite de la fréquence d'exposition dans la vie quotidienne. D'autres facteurs environnementaux sont également importants comme le stress (Saint-Mezard et al., 2003a), l'infection et des prédispositions génétiques qui favorisent la sensibilisation d'un individu à un haptène (Proksch et al., 2006). Cependant la comparaison de pouvoirs sensibilisants de différents haptènes à l'avantage de classer les chimiques potentiellement plus « réactifs » (cf. Figure 15), et ceci grâce à des modèles de prédiction de pouvoir sensibilisant.

2.4. Les modèles de prédiction de pouvoir sensibilisant

2.4.1. Les modèles *in vivo*

Pendant plusieurs décennies le cobaye a été l'animal de choix pour les études de prédiction du pouvoir sensibilisant cutané (Basketter et al., 1999). Le plus utilisé est le Guinea Pig Maximisation Test (GPMT), qui consiste en 6 injections du chimique plus adjuvant par voie intra-dermique le premier jour du test, sur une dizaine de cobayes. Le 7^{ème} jour un patch occlusif est disposé pendant 48 heures sur les sites d'injections afin de sensibiliser les cobayes. Puis 2 semaines plus tard (jour 21), la révélation de la réaction est réalisée pendant 24 heures par un patch occlusif, appliqué aussi en parallèle sur un groupe contrôle de cobayes non sensibilisés. Ensuite la réaction inflammatoire est évaluée 24 et 48 heures plus tard (Magnusson and Kligman, 1969). L'injection par voie intra-dermique du chimique avec un adjuvant, ne reflète pas les conditions réelles de contact avec un chimique. Et malgré l'élaboration de protocoles plus adaptés, la reproductibilité et l'interprétation des résultats sont contestées (Frankild et al., 1996; Kligman and Basketter, 1995). Plusieurs stratégies ont été adoptées pour limiter ces défauts, mais le développement de nouvelles approches plus efficaces en fait un modèle de moins en moins utilisé.

La méthode du Local Lymph Node Assay (LLNA) est basée sur l'étude de la prolifération cellulaire de ganglions drainants le site d'application du chimique dans un modèle de souris (Basketter et al., 1996; Kimber et al., 2001). Cette approche définit un chimique comme sensibilisant lorsque la prolifération est supérieure ou égale à 3 fois celle du véhicule (utilisé pour diluer le chimique), pour la concentration testée (Basketter et al., 2000).

Chimique	Source	Pouvoir sensibilisant
Oxazolone	Chimie	Extrême
p- Phénylènediamine	Cosmétique (colorant capillaire)	Extrême
2,4-Dinitrofluorobenzène	Chimie	Extrême
2,4-Dinitrochlorobenzène	Chimie	Extrême
Glutaraldéhyde	Conservateur, antiseptique	Fort
Formaldéhyde	Cosmétique, textile, résine	Fort
Aldéhyde cinnamique	Parfum, arôme	Fort
Eugénol	Cosmétique, antiseptique	Moyen
Aldéhyde héxylcinnamique	Cosmétique (parfum)	Moyen
Hydroxycitronellale	Cosmétique (parfum)	Moyen
Linalool	Cosmétique (parfum)	Moyen
Citral	Parfum, arôme	Moyen
Vanilline	Parfum, arôme	Faible
Propyl paraben	Cosmétique	Faible
Amoxicilline, cyanamide, cetrimide	Médicament	Faible

Figure 15. Classification de chimiques sensibilisants selon leur potentiel de sensibilisation chez l'homme. D'après Basketter *et al.*, 2005

Cette méthode manque cependant de sensibilité pour détecter les chimiques les plus faiblement sensibilisants et donne également des faux positifs (Loveless et al., 1996). Elle présente l'avantage de diminuer le nombre d'animaux utilisés qui, de plus, sont sacrifiés avant de développer cliniquement la pathologie. Ce modèle a été validé par le Comité International de Coordination de la Validation des Méthodes Alternatives (ICCVAM) et est utilisé pour classer les haptènes en fonction de leur pouvoir sensibilisant (cf. Figure 15) (Gerberick et al., 2004). Cette classification corrèle avec les résultats obtenus chez l'homme qui permettent de confirmer l'absence d'activité sensibilisante d'une formule sous certaines conditions d'utilisation et d'exposition. Cependant ces tests chez l'homme ne permettent en aucun cas de déterminer le réel pouvoir sensibilisant du chimique (Kimber et al., 2001; Roggeband et al., 1999).

2.4.2. Les modèles *in vitro*

Comme pour la détermination d'un pouvoir irritant, des modèles alternatifs se développent mais l'activation de la réponse immunitaire spécifique est difficile à reproduire *in vitro* puisqu'elle nécessite de nombreux acteurs cellulaires qui ne résident pas dans la peau. Ils vont ainsi être centrés sur une étape précise de la réponse immunitaire. De nombreux modèles portent sur l'activation de la CD, impliquée dans la capture et la présentation de l'haptène en tant qu'antigène, ou sur l'activation des LT qui génèrent la réponse spécifique (Kimber et al., 1999). Par exemple, des études montrent la sécrétion d'IL-1 β par les CL en présence d'allergènes et non en présence d'irritants (Enk et al., 1993a; Enk and Katz, 1992a). Une méthode consiste à générer des CL à partir de sang humain et de suivre l'expression d'IL-1 β en présence du chimique dans la culture cellulaire (Pichowski et al., 2001). Mais les chimiques ne sont pas toujours solubles et les résultats restent encore peu sensibles, sûrement à cause de la réduction de ces modèles à un type cellulaire dans une réponse inflammatoire qui compte de nombreux acteurs différents qui coopèrent.

Une autre stratégie consiste à déterminer plusieurs marqueurs spécifiques de l'activation de la sensibilisation. Ainsi les micropuces à ADN se développent dans ce domaine et permettent par exemple de visualiser l'effet d'un haptène sur l'expression de plusieurs milliers de gènes de CD générées à partir de sang humain (Gildea et al., 2006; Pennie and Kimber, 2002).

2.4.3. Les modèles *in silico*

La méthode de relation structure-activité (SAR) permet de déterminer le pouvoir sensibilisant d'un chimique à partir de l'index relatif d'alkylation (RAI) basé sur l'hydrophobicité, les propriétés électrophiles et la dose. L'approche QSAR plus empirique (cf. chapitre II-1.2.2) permet aussi à partir du modèle *in vivo* de cobayes (GPMT) de déterminer un risque de pouvoir sensibilisant (résumé dans (Basketter, 1998)). Cependant cette étude reste restreinte à certains types de chimiques et ne prend pas en compte leurs propriétés physicochimiques. Par contre, les données du LLNA ont permis de relancer le QSAR avec comme pour les irritants, le système d'expertise DEREK (cf. chapitre II-1.2.2).

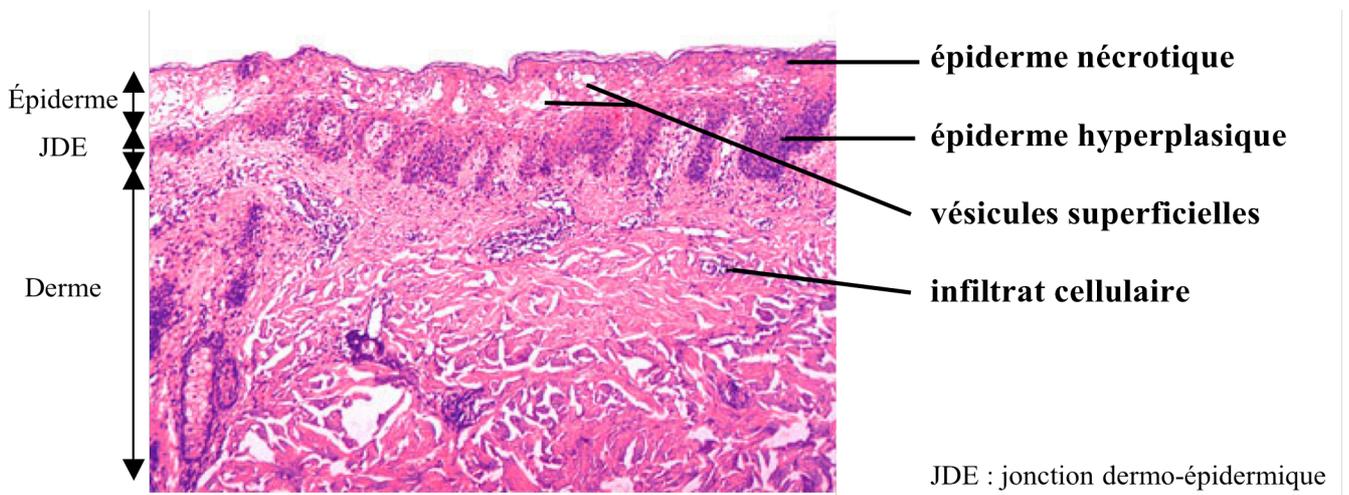
3. Les pathologies humaines de dermatites irritante et allergique de contact

3.1 La dermatite irritante de contact

Bien que la DIC soit moins étudiée que la DAC, elle représente 60% à 80% des dermatites de contact professionnelles (Belsito, 2005). La DIC est le résultat d'une réponse immunitaire cutanée non spécifique qui peut être d'origine physique et plus fréquemment chimique. Cette dermatite peut être définie comme étant causée par un agent externe qui génère une réaction inflammatoire cutanée directe. Selon la nature, la concentration et le temps d'exposition de l'irritant, les caractéristiques cliniques peuvent être différentes (Willis et al., 1989), d'autant plus que d'un individu à l'autre les réactions varient aussi (Smith et al., 2004).

La DIC est difficilement différenciable de la DAC d'un point de vue histologique et clinique. Cependant la pycnose (rétraction du noyau correspondant à une lésion nucléaire irréversible témoignant de la mort cellulaire) et la prédominance de vésicules superficielles (soulèvements épidermiques) contenant des cellules polynucléaires sont caractéristiques de la DIC (cf. Figure 16). Chez le sujet atteint, la DIC est responsable d'une sensation de brûlure qui reste localisée. Ce sont les mains qui sont le plus souvent affectées car elles sont les plus en contact avec les produits chimiques. Différents types de DIC sont décrites (Basketter et al., 1999; Krasteva et al., 1999b):

- La DIC aiguë, au contact d'irritants forts, présente au site de contact un érythème (rougeur) avec des vésicules et un œdème (gonflement). Le cas le plus fréquent est une exposition accidentelle au travail.

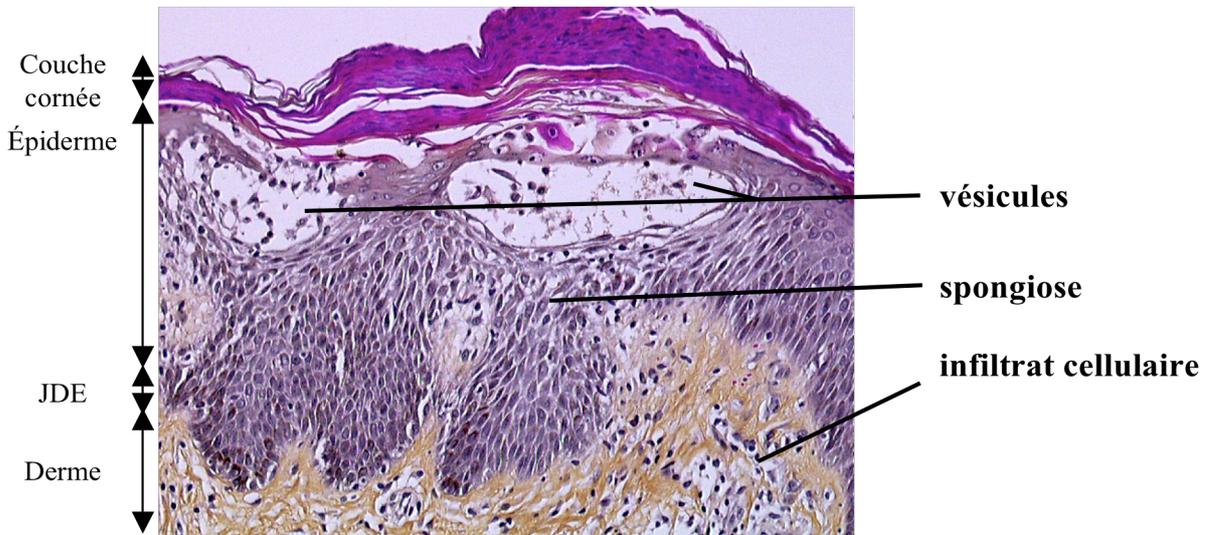


1. Coupe histologique caractéristique d'une peau atteinte de DIC.

Coloration hématoxiline et éosine.



2. Photographies d'une dermatite allergique de contact au chrome (utilisé dans le tanage du cuir des chaussures)



3. Coupe histologique caractéristique de peau atteinte de DAC

Coloration hématoxiline et éosine

Figure 16. Photographies cliniques et histologiques de la DIC et de la DAC

- La DIC aiguë retardée est une DIC aiguë mais qui n'apparaît que 8 à 24 heures après l'exposition à certains chimiques (anthraline, epichlorhydrine, oxyde d'éthylène...).
- La réaction irritante correspond au développement d'érythèmes et de gerçures les premiers mois d'exposition répétée de l'individu à un irritant et/ou lors de travaux fréquents dans des conditions humides (coiffeurs, nourrices, femmes de ménage...). La réaction irritante génère des altérations de la peau invisibles chez la majorité des individus, mais elle évolue souvent en DIC cumulative.
- La DIC cumulative est la dermatite de contact la plus fréquente. Elle se développe suite à des contacts répétés avec des irritants à intervalle de temps insuffisants pour la guérison. L'inflammation est alors plus importante, l'érythème et les gerçures sont associés à une peau sèche avec une hyperkératose et une lichenification (éruptions papuleuses avec épaissement de l'épiderme provoquant de violentes démangeaisons).
- La dermatite irritante traumatique se développe lentement après un traumatisme aigu de la peau (brûlure, lacération...). Elle reste peu fréquente mais peut entraîner des gerçures et une lichenification avec une guérison relativement longue.
- La dermatite pustuleuse et acnéiforme se caractérise par la formation de pustules, de papules et de comédons après contact avec des cosmétiques, des huiles, des métaux, des graisses, du goudron...
- La dermatite subjective correspond à une irritation de la peau non visible cliniquement mais avec des sensations de démangeaisons, de piqûres ou de picotements souvent au niveau du visage. La pathophysiologie n'est pas connue.

3.2. La dermatite allergique de contact

La DAC est une forme d'HSRC correspondant à une réponse immunitaire générée par les LT, qui se déroule en deux étapes (cf. chapitre III-1). La première, généralement silencieuse du point de vue clinique, correspond au premier contact avec l'haptène, qui aboutit à la sensibilisation de l'individu. Puis la seconde, suite à un autre contact avec ce même haptène (sur le même site ou à un site distinct) génère une inflammation due au recrutement de LT spécifiques de l'haptène avec le développement de signes cliniques.

Chez les individus sensibilisés, la DAC apparaît et se développe 24 à 96 heures après le contact avec l'haptène. Elle est localisée au site de contact avec un érythème et un œdème

qui évoluent en papules, vésicules suintantes et couvertes de croûtes (cf. Figure 16). Contrairement à la DIC qui est douloureuse comme une brûlure, la DAC s'accompagne d'intenses prurits (vives démangeaisons). De plus elle peut s'étendre et même se propager à des sites distants du site de contact, souvent de façon symétrique.

On distingue la DAC aiguë de chronique par la présence d'une spongiose qui résulte d'un œdème intercellulaire épidermique. La spongiose est souvent limitée aux couches inférieures de l'épiderme, mais dans le cas de réaction sévère elle peut affecter les couches supérieures. Dans la phase aiguë, l'accumulation intense de fluide entraîne la formation de vésicules qui peuvent rompre à la surface de l'épiderme (cf. Figure 16). Les vaisseaux papillaires sont dilatés avec un infiltrat périvasculaire lymphohistiocytaire et la partie supérieure du derme est oedémateuse. L'infiltrat s'étend jusque dans l'épiderme et s'accumule dans les vésicules spongiotiques. Dans la phase chronique de la DAC, la spongiose diminue, l'épiderme devient hyperplasique (résistant et imperméable) et une parakératose (kératinisation anormale avec absence de la couche granuleuse et persistance de noyaux pycnotiques) se développe (Krasteva et al., 1999b).

Une meilleure compréhension de la physiopathologie des dermatites de contact ces dernières années, a permis de mieux identifier le type de dermatites et les facteurs mis en cause, et ainsi de mieux les traiter.

III- LA PHYSIOPATHOLOGIE DES DERMATITES IRRITANTE ET ALLERGIQUE DE CONTACT

1. Schéma général

La physiopathologie de la DAC est caractérisée par deux phases : la sensibilisation et l'élicitation (cf. Figure 17). La phase d'élicitation est à présent bien connue (cf. chapitre III-4), contrairement aux événements précoces qui se déroulent les heures suivant l'application d'un haptène pendant la sensibilisation. De part son pouvoir irritant, un haptène est capable d'activer l'immunité innée cutanée. Ainsi nous allons nous intéresser dans un premier temps à la physiopathologie de l'irritation cutanée induite par les xénobiotiques, avant de décrire le développement de la réponse spécifique.

Une partie des connaissances de la physiopathologie de la DIC et de la DAC est basée sur des études chez l'homme, principalement à partir de biopsies de peau (au site du patch test) ou de prélèvements sang de patients qui permettent de visualiser les cellules présentes et de déterminer l'expression de cytokines (Sebastiani et al., 2002). Mais la quantité de matériel biologique est faible et l'étude des mécanismes en amont reste très limitée. Ainsi la majorité des connaissances vient de modèles *in vivo* chez la souris et *in vitro*.

2. Les modèles d'étude

2.1. Les modèles d'étude *in vitro*

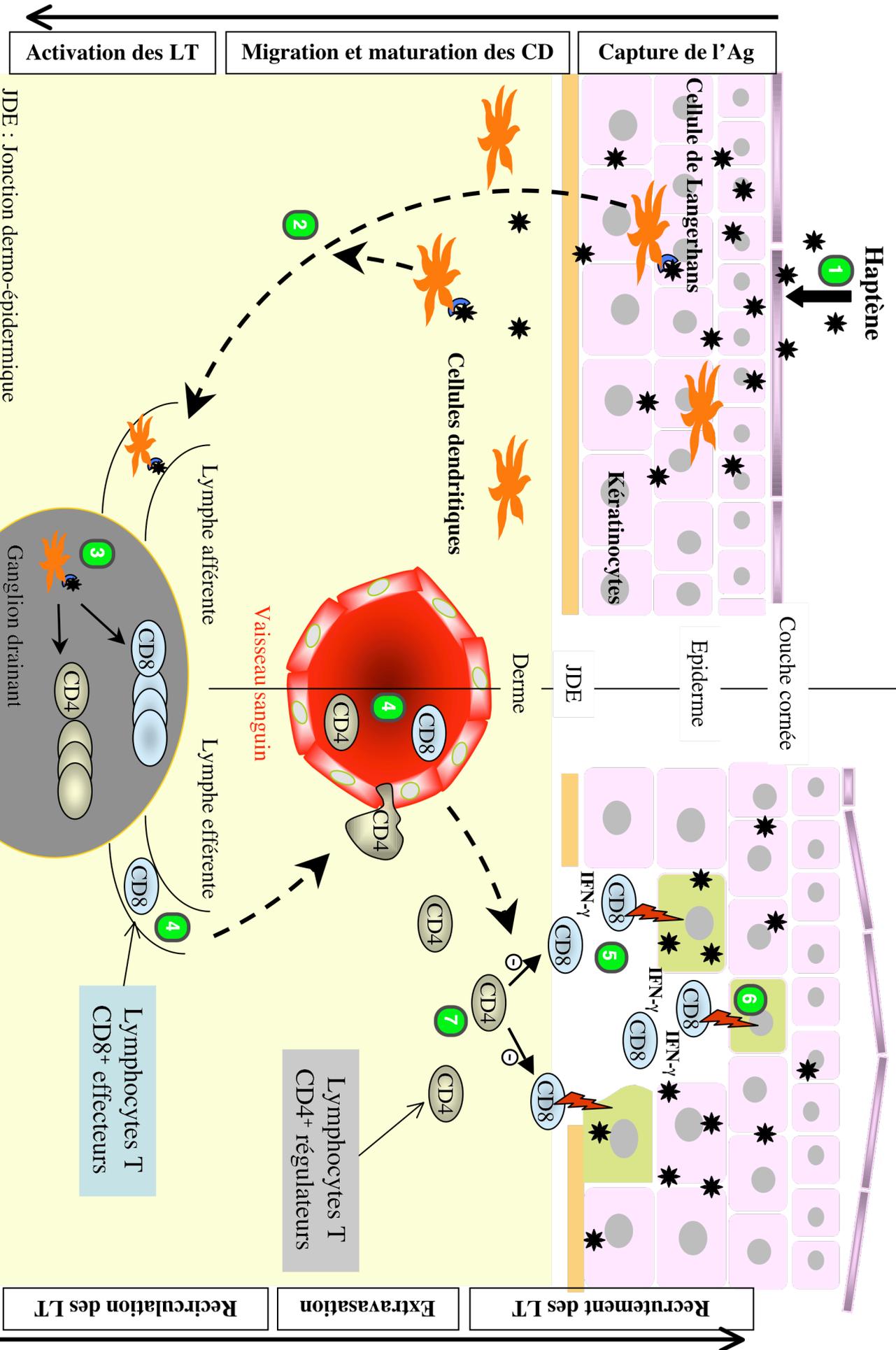
Les modèles d'étude *in vitro* de la DIC et de la DAC portent principalement sur la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires. Par exemple pour l'étude de la DIC, des lignées cellulaires de KC, murines ou humaines, sont mis en culture en présence du chimique d'intérêt, et l'effet des chimiques est ensuite détecté par la mesure de la sécrétion de cytokines par RT-PCR ou dosage ELISA (Effendy et al., 2000; Wilmer et al., 1994). Plus récemment la mise au point de modèles de peaux reconstituées est aussi utilisée dans ce type d'étude (Blaha et al., 2000; Fletcher et al., 2001). Certaines équipes utilisent des modèles *ex-vivo* plus proches de la réalité, en réalisant des cultures de KC ou de fibroblastes à partir de prélèvements de peau humaine (Newby et al., 2000) ou en cultivant l'explant de peau entier en présence du chimique, afin d'étudier la migration des CD et des CL qui vont ainsi se retrouver dans le milieu de culture (Jacobs et al., 2006). Pour la DAC en particulier, les modèles *in vitro* sont utilisés pour étudier un type cellulaire défini comme les LT, les CD ou

Figure 17. La physiopathologie de la dermatite allergique de contact.

L'application épicutanée de l'haptène induit une activation du système immunitaire inné cutané (étape 1), associée à la migration et la maturation des cellules de Langerhans (CL) et des cellules dendritiques (CD) du derme qui présentent l'haptène (Ag) aux lymphocytes T (LT) dans le ganglion drainant (étape 2). Ces CD activent des populations LT spécifiques CD8⁺ effectrices et CD4⁺ régulatrices (étape 3) qui vont ensuite recirculer en périphérie (étape 4). Lors d'un deuxième contact avec le même haptène, les LT CD8⁺ spécifiques sont recrutés dans la peau et activés (étape 5). De part leur cytotoxicité et leur production d'IFN- γ , les LT CD8⁺ effecteurs sont responsables de la mise en place de l'inflammation et de la lésion d'eczéma (étape 6) qui va être résolue lors de l'arrivée secondaire de LT CD4⁺ régulateurs sécrétant des cytokines⁹ anti-inflammatoires (étape 7).

Phase de sensibilisation

Phase d'élicitation



JDE : Jonction dermo-épidermique

les CL souvent générées à partir de monocytes différenciés *in vitro*. L'analyse porte sur la sécrétion de cytokines, et l'activation lymphocytaire induite par les CD présents en culture.

Cependant, ces modèles *in vitro* restent limités par rapport à la complexité des interactions des différents types cellulaires mise en jeu dans la peau et les ganglions.

2.2. Les modèles d'étude *in vivo*

La souris est le modèle le plus utilisé dans l'étude de la DIC et de la DAC. Pour l'étude de la DAC le protocole classique est l'HSRC, décrit à l'origine par Gad *et al.* (Gad *et al.*, 1986). L'animal est sensibilisé par une ou plusieurs doses d'haptène, souvent sur la face ventrale préalablement rasée. Puis 5 à 7 jours plus tard, l'élicitation de la réponse, appelée aussi « challenge », s'effectue à une dose non irritante du même haptène sur une oreille de souris sensibilisée ; et sur l'autre oreille contrôle, seul le véhicule dans lequel le chimique a été dilué est appliqué. Des souris contrôles non sensibilisées reçoivent une seule application de l'haptène sur l'oreille, ce qui permet d'évaluer le pouvoir irritant de l'haptène. Différentes voies de sensibilisation sont possibles afin d'étudier en particulier le rôle des CD et des LT. L'inflammation (œdème) de l'oreille est mesurée par le MEST (Mouse Ear Swelling Test) (cf. Figure 18). L'analyse de l'étude porte ainsi principalement sur l'oreille qui est utilisée comme site d'application du chimique et permet de suivre l'inflammation (i) en mesurant l'épaisseur de l'oreille mais aussi (ii) pour en extraire facilement l'ARNm afin d'étudier l'expression de cytokines (Enk and Katz, 1992a; Kondo *et al.*, 1994), (iii) visualiser les cellules résidentes et recrutées par immunohistochimie ou cytométrie en flux. La réponse immunitaire correspondante est facilement accessible grâce à l'étude des cellules présentes dans les ganglions drainants et la rate (Le Borgne *et al.*, 2006). Cependant ce modèle permet de suivre uniquement la réponse spécifique.

Un autre modèle a été récemment développé au sein du laboratoire, le PACS (Primary Allergic Contact Sensitivity). Ce test permet de suivre, sur le même site, l'irritation cutanée et l'HSRC. Dans ce modèle, les souris reçoivent une seule application de l'haptène sur l'oreille. Les heures suivant l'application, les souris développent une réaction inflammation non spécifique, dépendante de la dose utilisée. L'inflammation diminue dans les jours suivants, puis 5 à 6 jours plus tard, l'inflammation spécifique se développe sur le même site, ceci grâce à la persistance de l'haptène pendant plusieurs jour au site d'application cutané (Saint-Mezard *et al.*, 2003b).

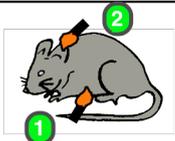
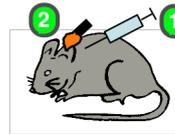
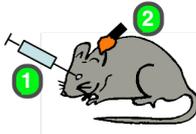
Modèle d'étude	Type d'immunisation		Protocole	Avantages
HSRC classique mesurée par le MEST (Mouse Ear Swelling Test)	Sensibilisation cutanée		Sensibilisation sur le ventre puis élicitation sur l'oreille 5 jours plus tard	Etude de la réponse spécifique sur l'oreille et au niveau cellulaire dans les ganglions drainants
	Injection de BMDC hapténisées		Immunsation par injection de BMDC hapténisées en sous-cutanée, puis élicitation sur l'oreille 5 jours après	Etude du rôle des CD injectées dans le développement de la réponse spécifique
	Transfert de LT spécifiques		Injection en intraveineux de lymphocytes issus de souris sensibilisées puis élicitation sur l'oreille 24 heures après	Etude du rôle des lymphocytes injectés dans le développement de la réponse spécifique
PACS Primary Allergic Contact Sensitivity	Sensibilisation cutanée		Une seule application de l'haptène sur l'oreille	Etude des réponses innée et spécifique sur l'oreille et au niveau cellulaire dans les ganglions drainants

Figure 18. Les différents modèles d'études de l'HSRC chez la souris
BMDC: Bone-marrow derived dendritic cells

3. L'activation de l'immunité innée par les xénobiotiques (DIC)

Les haptènes et les irritants sont capables d'induire tous deux une irritation cutanée. Pour plus de clarté, nous définissons ainsi comme xénobiotiques : les haptènes et les irritants.

3.1. Généralités

L'activation de l'immunité innée résulte de l'effet cytotoxique direct d'un agent chimique ou physique sur la peau. Les xénobiotiques génèrent une irritation chez la majorité des individus lorsqu'ils sont appliqués en concentration suffisante pendant une durée adéquate. Comme décrit précédemment, il existe différentes formes de DIC, les mécanismes sont similaires mais pour simplifier la compréhension du déroulement des différentes étapes de la réponse inflammatoire innée, nous allons nous intéresser à la DIC aiguë qui correspond à l'établissement d'une inflammation non spécifique dans une peau saine.

Avec la diversité des modèles décrits dans la littérature, il est difficile d'établir un profil d'expression de cytokines caractéristique de la DIC ou de la DAC et généralisable à tous les xénobiotiques. Tout d'abord en fonction du xénobiotique utilisé la réponse inflammatoire peut être différente (Willis et al., 1989; Wilmer et al., 1994). Ensuite, en fonction du modèle utilisé, selon si l'étude est réalisée *in vivo* sur la peau dans son ensemble (Holliday et al., 1997) ou uniquement sur les KC (Enk and Katz, 1992a), ou *in vitro* sur des KC en culture (Kock et al., 1990), les profils des cytokines peuvent varier. De plus, la sensibilité de la technique choisie peut jouer sur la détection de cytokines qui ont leurs effets à des taux relativement faibles. La technique de RT-PCR semble plus sensible que la technique d'ELISA, bien que la quantité d'ARNm ne reflète pas toujours la présence de protéines bioactives. Enfin la réponse inflammatoire est dépendante du fond génétique des souris (Nakae et al., 2001), il existe donc des différences intra-espèces mais également inter-espèces. Les événements décrits au cours de l'irritation cutanée ne reflètent qu'une vision généralisée de l'irritation cutanée et ne sont pas toujours formellement démontrés.

Les réponses moléculaires et cellulaires qui suivent le contact avec un xénobiotique restent encore mal comprises. Mais plusieurs mécanismes potentiels peuvent être considérés : (i) la rupture de la couche cornée induisant la perte d'eau et/ou la pénétration de la substance irritante, (ii) la rupture ou la perturbation des membranes des KC libérant des médiateurs pro-inflammatoires, (iii) la synthèse de médiateurs inflammatoires par les cellules cutanées, (iv) la cytotoxicité due à la libération des médiateurs ou des enzymes de destruction tissulaire et (v)

des effets directs sur les vaisseaux sanguins du derme et les molécules d'adhésion générant un infiltrat inflammatoire (cf. Figure 19).

3.2. La pénétration dans la peau et la perte d'eau

La peau grâce notamment à la couche cornée, est une véritable barrière biologique qui préserve le corps de toutes influences extérieures et de perte d'eau endogène. Cependant certaines substances sont capables d'altérer la couche cornée grâce à leurs propriétés physicochimiques. Celles-ci facilitent leur pénétration dans les couches plus profondes de l'épiderme (cf. encadré n°2) entraînant une perte d'eau transépidermique.

Les KC représentent la majorité des cellules épidermiques, elles sont donc les premières cellules avec les CL à répondre en présence d'un xénobiotique. Mais le xénobiotique va diffuser dans toutes les couches de la peau et ainsi activer toutes les cellules résidentes comme les mastocytes, les fibroblastes, les macrophages et les CD. Cette activation de la réponse innée est initiée par le signal de danger généré par le toxique.

3.3. Le signal de danger

Les xénobiotiques induisent un signal de danger qui conduit à l'activation de l'immunité innée et qui est indispensable pour induire une réponse immunitaire spécifique. En effet, des souris déficientes en Fc γ R, chaîne du récepteur de forte affinité à l'IgE exprimé par les mastocytes et les basophiles et du récepteur IgG présent sur la plupart des cellules du système immunitaire, ne présentent pas d'activation de l'immunité innée, mais développent une réponse spécifique normale (Takai et al., 1994). Ces souris déficientes en Fc γ R présentent une réponse spécifique à oxazolone diminuée par rapport aux souris sauvages, montrant l'importance de l'activation de l'immunité innée par les propriétés irritantes de l'haptène dans le développement de la réponse spécifique (Zhang and Tinkle, 2000). D'autres études montrent que les irritants ont un rôle adjuvant dans la réponse allergique d'un individu à un haptène (Agner et al., 2002; McLelland et al., 1991)

Par ailleurs, Grabbe *et al.* montrent que le potentiel irritant d'un haptène est essentiel pour l'activation de la réponse spécifique. En effet, une dose suboptimale d'oxazolone (non sensibilisante) induit une réponse spécifique en appliquant à faible dose un autre haptène, le TNCB (Grabbe et al., 1996).

Figure 19. La physiopathologie de la dermatite irritante de contact.

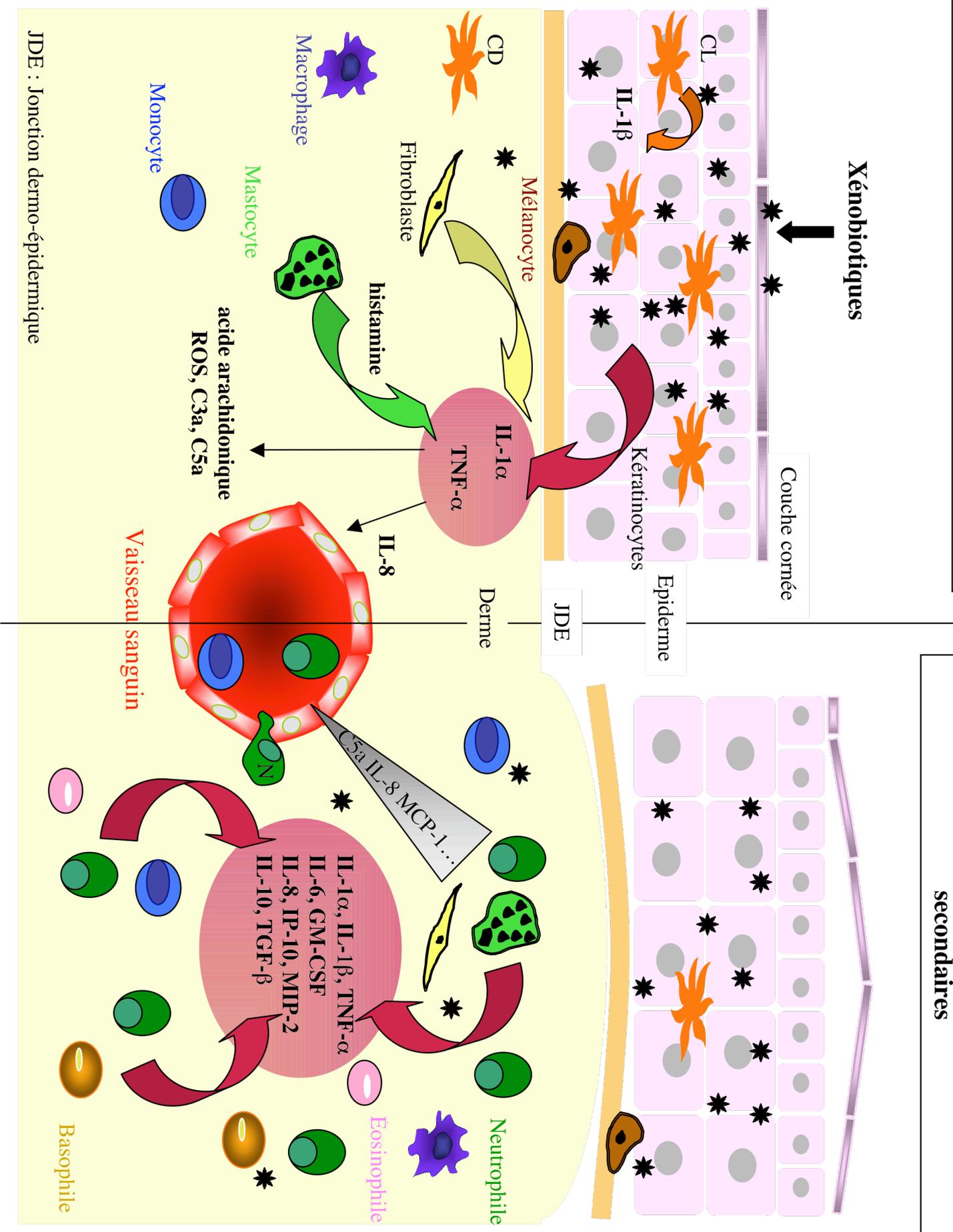
L'application épicutanée d'un xénotiotique induit l'activation du système immunitaire inné cutané qui se déroule en deux étapes : une phase précoce d'activation caractérisée par la libération de médiateurs pro-inflammatoires induisant, dans un deuxième temps la mise en place de l'irritation par l'infiltration de nombreux leucocytes dans la peau.

La toxicité du xénotiotique entraîne la libération de médiateurs pro-inflammatoires (signal de danger) par les kératinocytes, les mastocytes et cellules de Langerhans (CL) : l'IL-1 α , l'IL-1 β , le TNF- α , l'histamine, les éicosanoïdes (métabolites de l'acide arachidonique), les résidus libre oxygénés (ROS) et les anaphylatoxines (C3a, C5a). Ces médiateurs primaires, notamment l'IL-1 α et le TNF- α , induisent une cascade de sécrétion de cytokines secondaires par les cellules résidentes cutanées, principalement par les fibroblastes, qui amplifient ainsi l'inflammation.

La sécrétion de chimiokines comme l'IL-8, l'IP-10 et MIP-2 permet le recrutement de neutrophiles, d'éosinophiles, de basophiles et de monocytes/macrophages qui sont responsables de l'œdème. Les cytokines produites par les leucocytes vont amplifier à leur tour l'inflammation cutanée en recrutant de nouveaux leucocytes. Le rôle des leucocytes consiste à éliminer l'agent exogène par phagocytose.

Enfin les cytokines anti-inflammatoires l'IL-10 et le TGF- β participent à la régulation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, et les fibroblastes ainsi que les macrophages initient alors le processus de cicatrisation.

Libération et induction de médiateurs primaires



Donc l'immunité spécifique cutanée nécessite deux signaux :

- l'activation de cellules effectrices spécifiques de l'antigène, via le pouvoir immunogène des haptènes en se liant à des protéines,
- un signal pro-inflammatoire non spécifique de l'antigène, par le pouvoir irritant des haptènes.

Tous deux sont donc induits par l'application d'une dose suffisante d'haptène. Le deuxième signal peut être considéré comme un signal de danger nécessaire à l'activation de l'immunité innée cutanée (Matzinger, 1994; Matzinger, 1998) (cf. chapitre II-1.1). Le modèle de signal de danger est une notion relativement récente qui propose que l'immunité innée soit plus ancienne que « le système immunitaire inné ». La différence est que contrairement au système immunitaire inné qui est activé par une entité extérieure (bactérie, virus), le modèle de signal de danger est induit lorsqu'une cellule est stressée, endommagée ou meurt de façon non conventionnelle, qu'il y ait un agent exogène ou non (Matzinger, 1998). Ce concept de signal de danger permettrait d'expliquer que, le contexte dans lequel un xénobiotique est reconnu par le système immunitaire, détermine la nature de la réponse : tolérance ou inflammation. Ainsi, deux personnes dont le seuil de perception est différent pourraient répondre de façon opposée avec un contact identique. La traduction de la perception et de la transmission du danger par le système immunitaire correspond initialement à l'activation de l'immunité innée. Dans ce sens, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un haptène faible ne génère pas de signal de danger, mais des conditions environnementales (frottements, présences de substances irritantes...) et/ou endogènes (stress psychologique, polymorphismes génétiques des cytokines...) peuvent induire un signal de danger en synergie avec la présence d'un haptène faible et ainsi contribuer à la sensibilisation de l'individu.

En conclusion, le signal de danger lié à l'activation de l'immunité innée (via les cytokines pro-inflammatoires) est nécessaire à la sensibilisation par un haptène et dépend des caractéristiques individuelles (prédispositions génétiques) et des conditions environnementales.

3.4. La libération de médiateurs pro-inflammatoires

3.4.1. La libération par les KC (IL-1 α)

La perturbation de la barrière cutanée par des produits irritants déclenche la production de cytokines inflammatoires par les KC chez la souris et chez l'homme (Nickoloff and Naidu, 1994; Wood et al., 1992). Les produits irritants sont capables de rompre la membrane cellulaire des KC qui libèrent ainsi leur cytoplasme contenant notamment de l'IL-1 α sous forme bioactive. Dans un épiderme sain, le réservoir d'IL-1 α est naturellement éliminé par desquamation dû au fait que l'IL-1 α n'a pas de séquence hydrophobe pour la sécrétion transmembranaire (Welss et al., 2004). Donc la libération d'IL-1 α ne s'effectue que d'une cellule ayant subi des perturbations membranaires (Dinarello, 1998). La rupture membranaire semble se faire aussi indirectement via le stress oxydatif (Willis et al., 1998). En effet, les KC produisent de façon constitutive et suite à l'action de médiateurs inflammatoires comme l'IL-1 α , des réactifs oxygénés ROS. L'analyse des ROS est difficile en raison de leur très courte durée de vie, ainsi la présence de stress oxydatif est démontrée indirectement par l'activité d'enzymes comme la superoxide dismutase (Camera et al., 2003) et la glutathion S-transférase (Willis et al., 2001), ou encore par la présence d'inhibiteurs de ROS qui conduisent à une diminution de l'œdème (Fuchs and Milbradt, 1994). D'autres mécanismes de perturbations des KC sont proposés comme la modification de la fluidité membranaire ou l'interaction du chimique avec des protéines transmembranaires qui pourraient induire via des récepteurs membranaires un signal de transduction initiant la réponse inflammatoire (Welss et al., 2004).

L'IL-1 α est une cytokine primaire dans l'inflammation, sa libération induit une véritable cascade inflammatoire (cf. chapitre III-3.5). En effet l'injection intradermique d'IL-1 α recombinant chez la souris et chez l'homme génère un infiltrat inflammatoire (Camp et al., 1990; Granstein et al., 1986), de même des souris transgéniques qui surexpriment l'IL-1 α développent une inflammation cutanée spontanée (Groves et al., 1995b). L'IL-1 α active la phospholipase A₂, une enzyme clef dans l'induction de la cascade de l'acide arachidonique (cf. chapitre I-2.2). Les métabolites actifs issus de l'acide arachidonique, les éicosanoïdes (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes) participent localement et de façon transitoire à la formation de l'œdème, l'invasion leucocytaire, et au niveau cellulaire à la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Marks et al., 1998). L'IL-1 α est aussi capable d'augmenter l'infiltration des leucocytes en induisant l'expression de molécules d'adhésion à la surface de

cellules endothéliales, des fibroblastes et des CD (Groves et al., 1992). Enfin l'IL-1 α participe à la cicatrisation en stimulant la prolifération des KC et des fibroblastes (Kupper and Groves, 1995).

3.4.2. L'activation d'anaphylatoxines dans le sérum (C5a, C3a)

Des études *in vitro* ont montré que la couche cornée est capable d'activer le système du complément et générer l'anaphylatoxine C5a par une voie indépendante des anticorps (Tagami, 1992). Ainsi, l'accumulation de matériels de la couche cornée semble jouer un rôle crucial dans l'induction de l'inflammation via l'activation du système du complément. Le système du complément est directement impliqué dans la réaction inflammatoire du fait de l'action des anaphylatoxines C3a et C5a (cf. chapitre I-2.2). C5a augmente la mobilité et le chimiotactisme des neutrophiles et des basophiles, provoque leur dégranulation et la production de ROS. Il mobilise aussi l'acide arachidonique membranaire et augmente l'expression de molécules d'adhésion, ce qui accroît l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire. C5a active aussi les monocytes/macrophages et induit la dégranulation des mastocytes. Ainsi de façon indirecte, le C5a augmente la perméabilité vasculaire et la contraction des muscles lisses. Du fait de ses effets inflammatoires puissants, sa demi-vie est très courte dans la circulation. L'action de C3a est moindre que celle de C5a, il provoque une faible agrégation des neutrophiles et une induction de ROS (Roitt et al., 1997). Cependant, le caractère redondant et interconnecté des systèmes d'activation plasmiques est tel que l'étude des déficits génétiques en protéines du complément ne révèle pas de diminution des réactions inflammatoires.

3.4.3. La libération par les mastocytes (TNF- α , histamine, bradykinine)

Le TNF- α est stocké sous forme bioactive dans les mastocytes péritonéaux chez la souris et libéré suite à une stimulation de type IgE/antigène (Gordon and Galli, 1990), et dans les mastocytes du derme chez l'homme (Walsh et al., 1991). Lors d'un stimulus inflammatoire, il est aussi produit par des KC en culture et par des CL enrichies à partir de biopsies humaines (Kock et al., 1990; Larrick et al., 1989). L'injection d'anticorps anti-TNF- α chez des souris CBA/Ca abolit la DIC et la DAC (Piguet et al., 1991). En effet, le TNF- α induit la sécrétion de cytokines inflammatoires secondaires (Kondo and Sauder, 1997) (Banno et al., 2004), et est capable d'augmenter l'infiltration des leucocytes en induisant l'expression de molécules d'adhésion à la surface de cellules endothéliales, des fibroblastes et des CD *in*

vivo chez la souris et chez l'homme (Gordon and Galli, 1990; Groves et al., 1995a). Cette propriété de TNF- α est d'autant plus efficace que les mastocytes, capables de libérer le TNF- α , sont localisés dans le derme près des vaisseaux sanguins. Par ailleurs, une étude par puce à ADN de l'effet de TNF- α sur des KC humains en culture montre que le TNF- α ne semble pas uniquement impliqué dans l'initiation de l'inflammation mais aussi dans la réparation et la guérison de la peau (Banno et al., 2004). Cependant le rôle essentiel du TNF- α dans l'inflammation cutanée reste encore controversé et n'est pas généralisable à tous les cas d'irritation. Ainsi, une inflammation cutanée n'est pas toujours dépendante de la production de TNF- α chez la souris BALB/c (Holliday et al., 1997).

Les mastocytes possèdent des granules intracytoplasmiques qui contiennent de l'histamine, des bradykinines, des protéinases, et des protéoglycanes (héparine...). (Saint-Mezard et al., 2002). Suite à divers stimuli comme les anaphylatoxines (C5a, C3a), les allergènes, les neuropeptides et les ligands de TLR, les mastocytes dégranulent l'histamine induisant la vasodilatation, la vasoperméabilisation et l'infiltration cellulaire responsables de l'œdème (Kubes and Kanwar, 1994). Sa demi-vie courte (environ 1 min) lui confère une action rapide mais transitoire (Church and Levi-Schaffer, 1997). La bradykinine présente les mêmes capacités d'action que l'histamine et entraîne aussi la douleur et la margination des leucocytes (Vane and Botting, 1987). Les protéinases sont principalement des convertases capables de cliver les proIL-1 en IL-1 (cf. chapitre I-2.1.1) et des enzymes de destruction tissulaire (cf. chapitre III-3.8). L'héparine empêche la coagulation sanguine.

L'IL-1 α , le TNF- α , et l'histamine stockés dans les cellules cutanées et la libération d'acide arachidonique, de ROS et d'anaphylatoxines, semblent être des composants clés dans l'initiation de la réponse inflammatoire cutanée. Ce système de libération a l'avantage d'être instantané puisqu'il ne nécessite pas de synthèse, et ne dépend donc pas de la viabilité de la cellule qui peut être compromise par la toxicité du xénobiotique. Ce signal local permet d'activer des cellules voisines et résidant plus profondément dans la peau (et moins exposées à la toxicité du chimique), qui vont être capables de synthétiser un panel de cytokines et chimiokines générant et contrôlant l'inflammation.

3.5. La sécrétion de médiateurs inflammatoires

3.5.1. Les médiateurs pro-inflammatoires

Les médiateurs pro-inflammatoires communs aux xénobiotiques

L'IL-1 α induit chez des KC humains en culture par voie autocrine sa propre expression dès 15 min (Wilmer et al., 1994) et l'expression d'autres médiateurs inflammatoires, comme l'IL-8 et l'IL-6. Les fibroblastes amplifient la réponse inflammatoire en co-culture avec des KC humains par l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Newby et al., 2000; Williams and Kupper, 1996).

L'IL-8 (CXCL8) est rapidement sécrétée, dès 1 heure par les KC humains en culture en présence d'un irritant (SDS) ou d'un haptène (DNFB) (Mohamadzadeh et al., 1994), puis elle est produite en plus grande quantité par les fibroblastes, les cellules endothéliales et les monocytes/macrophages humains après stimulation avec l'IL-1 α en culture (Kristensen et al., 1991). Ceci suggère que les KC ont un rôle d'initiation de la réponse inflammatoire qui est ensuite assurée par les autres cellules cutanées. L'expression de transcrits d'IL-8 est également induite via la stimulation de TNF- α (Larsen et al., 1989) et aussi de façon indépendante de l'IL-1 α et du TNF- α suite à la présence d'irritants (huile de croton ou phénol) (Wilmer et al., 1994). L'IL-8 est une chimiokine qui permet le recrutement de leucocytes (Schroder, 1995). En effet, l'injection d'anticorps anti-IL-8 chez des lapins atteints de divers réactions inflammatoires aiguës prévient totalement de l'infiltration et de l'action des neutrophiles (Harada et al., 1994). L'IL-8 serait aussi impliquée dans l'angiogenèse (cf. chapitre III-3.9) (Koch et al., 1992).

De même, CXCL10 (IFN-induced protein 10, IP-10) et CXCL2/3 (Growth-regulated oncogen, GRO- β/γ), dont l'homologue chez la souris est MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) sont aussi des chimiokines mitogènes pour les neutrophiles. En effet, lorsqu'elles sont injectées en sous-cutanée dans la patte de souris naïves, elles induisent des réactions inflammatoires caractérisées par l'infiltration de neutrophiles (Sherry and Cerami, 1991; Wolpe et al., 1988). CXCL10 et MIP-2 sont sécrétées par de nombreuses cellules cutanées (Kaplan et al., 1987; Wolpe et al., 1989) (cf. Figure 2).

L'IL-6 sécrétée en condition inflammatoires par les KC, les fibroblastes, les monocytes/macrophages et les cellules endothéliales (Boxman et al., 1993; Sironi et al., 1989), stimule la prolifération des KC (Grossman et al., 1989) et a un rôle de pyrogène endogène (Helle et al., 1988). Un autre facteur de croissance, le GM-CSF, dont l'expression

est aussi induite par l'IL-1 α dans des KC et des fibroblastes humains *in vitro* (Kupper et al., 1988; Zucali et al., 1986), est capable d'augmenter rapidement la production et la fonction des granulocytes et des macrophages qui sont des cellules effectrices clefs dans l'activation et la réparation de l'inflammation (cf. chapitre III-3.9).

Les médiateurs pro-inflammatoires « spécifiques » aux haptènes

De nombreuses études sur l'expression des cytokines inflammatoires portent sur les différences entre celles impliquées dans la DIC et dans la DAC afin de trouver des marqueurs spécifiques de chacune de ces réactions. De façon générale, les haptènes induisent quelques heures après leur application, les mêmes cytokines que les irritants : IL-1 α , TNF- α , GM-CSF, IL-6, IL-8, IL-10, MIP-2 et IP-10 (Enk and Katz, 1992a; Kondo et al., 1994; Mohamadzadeh et al., 1994).

Cependant plusieurs études montrent que l'IL-1 β serait spécifique de la DAC (Enk et al., 1993a; Enk and Katz, 1992a; Muller et al., 1996). Dans la peau de souris BALB/c, l'IL-1 β est exprimée dès 15 minutes après l'application d'un haptène (Enk and Katz, 1992a) et est impliquée dans la migration des CL de l'épiderme aux ganglions drainants (Cumberbatch et al., 1997). L'IL-1 β serait nécessaire et suffisante pour induire une HSRC. En effet, l'injection d'anticorps anti-IL-1 β chez des souris avant l'application de TNCB, prévient complètement de la sensibilisation (Enk et al., 1993a). De plus, Shornick *et al.* montrent que des souris 129/B6 déficientes en IL-1 β , sensibilisées au TNCB puis révélées par injection de TNBS (équivalent soluble du TNCB), ne développent pas d'HSRC. En revanche, ces souris sont capables de développer une HSRC à l'oxazolone ou à forte dose de TNCB au moment de la sensibilisation (Shornick et al., 1996; Zheng et al., 1995). Ces résultats controversés peuvent être expliqués par les deux méthodes de révélation différentes : l'oxazolone est appliquée sur la peau pour la sensibilisation et la révélation, contrairement au TNBS. Cette différence induirait des réponses immunitaires distinctes, d'autant plus que ce ne sont pas les mêmes antigènes. Par ailleurs, une étude plus récente de Nakae *et al.* ne montre aucune différence significative de l'HSRC au TNCB (appliqué sur la peau pour la sensibilisation et l'élicitation) entre des souris sauvages C57Bl/6 et leur souris déficientes en IL-1 β (sur fond génétique C57Bl/6) (Nakae et al., 2001). D'après Nakae *et al.*, l'action d'IL-1 β peut être différente selon les espèces, ce qui expliquerait ces résultats controversés (Nakae et al., 2001; Shornick et al., 1996). Ainsi il semblerait que selon le fond génétique, la nature et la dose d'haptène, l'IL-1 β ne soit pas absolument nécessaire pour initier l'HSRC. Par ailleurs, l'injection intradermique d'IL-1 β dans des souris BALB/c induit l'expression de nombreuses cytokines inflammatoires

(IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-10 et MIP-2) suggérant que l'IL-1 β jouerait aussi un rôle dans l'initiation de la réponse inflammatoire en tant que cytokine primaire (Cumberbatch et al., 1997; Enk et al., 1993a).

Une sous-unité de l'IL-12, IL-12p40, a aussi été décrite comme étant induite 4 à 24 heures suivant l'application d'un haptène et non d'un irritant par des KC humains *in vivo* (Muller et al., 1994). L'IL-12 est sécrétée surtout par les monocytes/macrophages et les CD. L'injection intrapéritonéale d'antisérum anti-IL-12 avant et pendant la sensibilisation de souris naïves inhibe l'HSRC (Muller et al., 1996). Donc l'IL-12 semble être un facteur important dans la phase de sensibilisation (Schwarz, 1995). Cependant dans notre laboratoire, nous n'avons détecté aucune expression d'IL-12p40 chez des souris, 6 heures après l'application de DNFB (données non montrées).

3.5.2. Les médiateurs anti-inflammatoires

L'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 est induite principalement par les KC suite à l'application d'irritants ou d'haptènes (Enk and Katz, 1992b; Kondo et al., 1994). Des souris déficientes pour l'IL-10 présentent une irritation augmentée par rapport aux souris sauvages (Berg et al., 1995), suggérant un rôle important dans la régulation de l'inflammation de l'irritation. L'IL-10 limite les dommages immunopathologiques de la peau en inhibant l'expression de cytokines pro-inflammatoires IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α et GM-CSF (de Waal Malefyt et al., 1991; Enk et al., 1994). Cependant la majorité des travaux sur l'IL-10 porte sur inhibition de la réponse spécifique causée par un haptène. En effet, l'IL-10 est décrite comme un inhibiteur crucial dans l'HSRC puisque l'injection d'IL-10 recombinant dans des souris avant la phase d'élicitation inhibe significativement l'HSRC au TNCB et la prolifération secondaire spécifique *in vitro* (Enk et al., 1994; Muller et al., 1996). L'IL-10 préviendrait, en plus de l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires, de l'augmentation d'expression des molécules de co-stimulation sur les CL immatures (Enk et al., 1993b), mais de façon tardive (Enk and Katz, 1992b; Ferguson et al., 1994), ce qui suggère une inhibition et non une tolérance totale.

Une autre cytokine anti-inflammatoire, le TGF- β est moins étudiée dans l'inflammation cutanée. La surexpression de TGF- β dans l'épiderme de souris transgéniques conduit au développement de maladies de peau comparable au psoriasis chez l'homme (Li et al., 2004) et à un épiderme hypoplasique (Sellheyer et al., 1993), ce qui suggère son rôle dans

la prévention de l'hyperprolifération des KC (Hancock et al., 1988). Le TGF- β induit aussi la synthèse l'IL-1ra qui est un antagoniste de l'IL-1 en se fixant sur le récepteur à l'IL-1, mais n'induisant aucune transduction du signal (Muzio et al., 1994). Par ailleurs, des souris déficientes en TGF- β présentent un défaut de CL dans l'épiderme (Borkowski et al., 1996; Borkowski et al., 1997) et un dysfonctionnement de migration des CD dermiques jusqu'aux ganglions (Hemmi et al., 2001). Ainsi le TGF- β pourrait jouer un rôle dans l'initiation de la phase de sensibilisation. Cependant des études plus approfondies permettraient de déterminer la source et la cinétique de sécrétion de TGF- β suite à l'application d'un haptène.

Ainsi par ce système d'activation en cascade, la réponse inflammatoire est rapide avec la génération d'un véritable réseau de cytokines. Les xénobiotiques induisent l'expression d'un grand nombre de cytokines et de chimiokines, créant un environnement pro-inflammatoire qui va favoriser à la fois la migration de CL et le recrutement de leucocytes.

3.6. L'activation de cellules de Langerhans

Les CL établissent un véritable réseau de contact avec les KC dans l'épiderme. Mais lors de l'application d'un xénobiotique, leurs dendrites se rétractent leur donnant une forme ronde et leur densité dans l'épiderme diminue, traduisant une migration des CL en dehors de l'épiderme. Ces modifications sont induites aussi bien par des irritants (Brand et al., 1993; Willis et al., 1990) que par des haptènes (Silberberg et al., 1976). En effet, le SDS induit la migration de CL de l'épiderme via la lymphe jusqu'aux ganglions drainants chez l'homme (Brand et al., 1993; Smith et al., 2004). Des expériences chez la souris ont montré que l'application de SDS induisait une prolifération cellulaire dans les ganglions drainants le site (Loveless et al., 1996; Montelius et al., 1994). Cependant une dose toxique d'irritant semble nécessaire à la migration des CL et la nature de l'irritant semble aussi être importante (Willis et al., 1990), contrairement aux haptènes (Jacobs et al., 2006).

Les CL, comme les CD dermiques, ont un rôle d'initiation de la réponse spécifique en présentant l'antigène aux LT dans les ganglions drainants. Or les irritants n'ont pas cette capacité d'être présentés en tant qu'antigène comme les haptènes. Ainsi la maturation et la migration des CL induites par des irritants ne conduisent pas à une sensibilisation. En fait, la forte induction de certaines cytokines inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , TGF- β , GM-CSF, IL-

18, MIP-1 β) par les irritants serait suffisante à induire la maturation et la migration de CL (cf. chapitre III-4.1.2.).

3.7. L'infiltrat cellulaire inflammatoire

A l'homéostasie, une partie des leucocytes circulent dans le sang et l'autre moitié « roulent » sur les cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins. Cette adhésion réversible s'appelle aussi la margination (cf. Figure 20). Au cours de la réaction inflammatoire cutanée, les chimiokines libérées vont créer un gradient de concentration jusqu'aux vaisseaux sanguins conduisant à la migration extravasculaire de différents types cellulaires sensibles à ces chimiokines et générant ainsi un œdème de la peau. Cet infiltrat cellulaire au niveau de la peau lors d'une inflammation est favorisé par la vasodilatation des vaisseaux du derme et l'expression de molécules d'adhésion induite par les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 α et le TNF- α . La majorité des études sur l'adhérence des leucocytes et la transmigration portent sur les neutrophiles représentant la grande majorité des leucocytes circulant et étant donc prédominants au niveau du site d'inflammation. A partir de travaux *in vitro* avec un système de chambre fluide ou *in vivo* par microscopie intravitale, quatre étapes successives ont été identifiées pour aboutir au passage du leucocyte à travers les cellules endothéliales : la margination, l'activation du leucocyte, d'adhésion ferme et la diapédèse (cf. Figure 20) (Bos, 2004). Au cours de ce processus, le leucocyte est activé par des chimiokines qui sont libérées par les cellules endothéliales et les autres cellules cutanées résidentes, et il est dirigé jusqu'au site d'inflammation par le gradient de chimiokines. Le profil de chimiokines sécrétées détermine les types cellulaires recrutés au site d'inflammation.

Les chimiokines des neutrophiles sont C5a du système du complément, PAF, IL-8 et dans une moindre mesure CXCL2/3, celles des éosinophiles sont PAF, C3a, C5a, IL-8, CCL5 (regulation and activated normal T cell expressed and secreted, RANTES), éotaxine et celles des basophiles PAF, C3a, C5a, IL-8, CCL2 -1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP) et CCL5. Chez l'homme, des prélèvements de l'infiltrat cellulaire généré dans une ampoule montrent que les neutrophiles sont les premiers leucocytes à arriver sur le site de l'inflammation, dès 3 heures (Kuhns et al., 1992). Puis les phagocytes mononucléaires dérivés de monocytes du sang deviennent le type cellulaire le plus abondant (Lee et al., 2000). Les éosinophiles et les basophiles sont ensuite préférentiellement recrutés au site d'inflammation allergique (Bochner and Schleimer, 1994). La cinétique et la spécificité de recrutement sont certainement dues au profil d'expression de cytokines et des chimiokines.

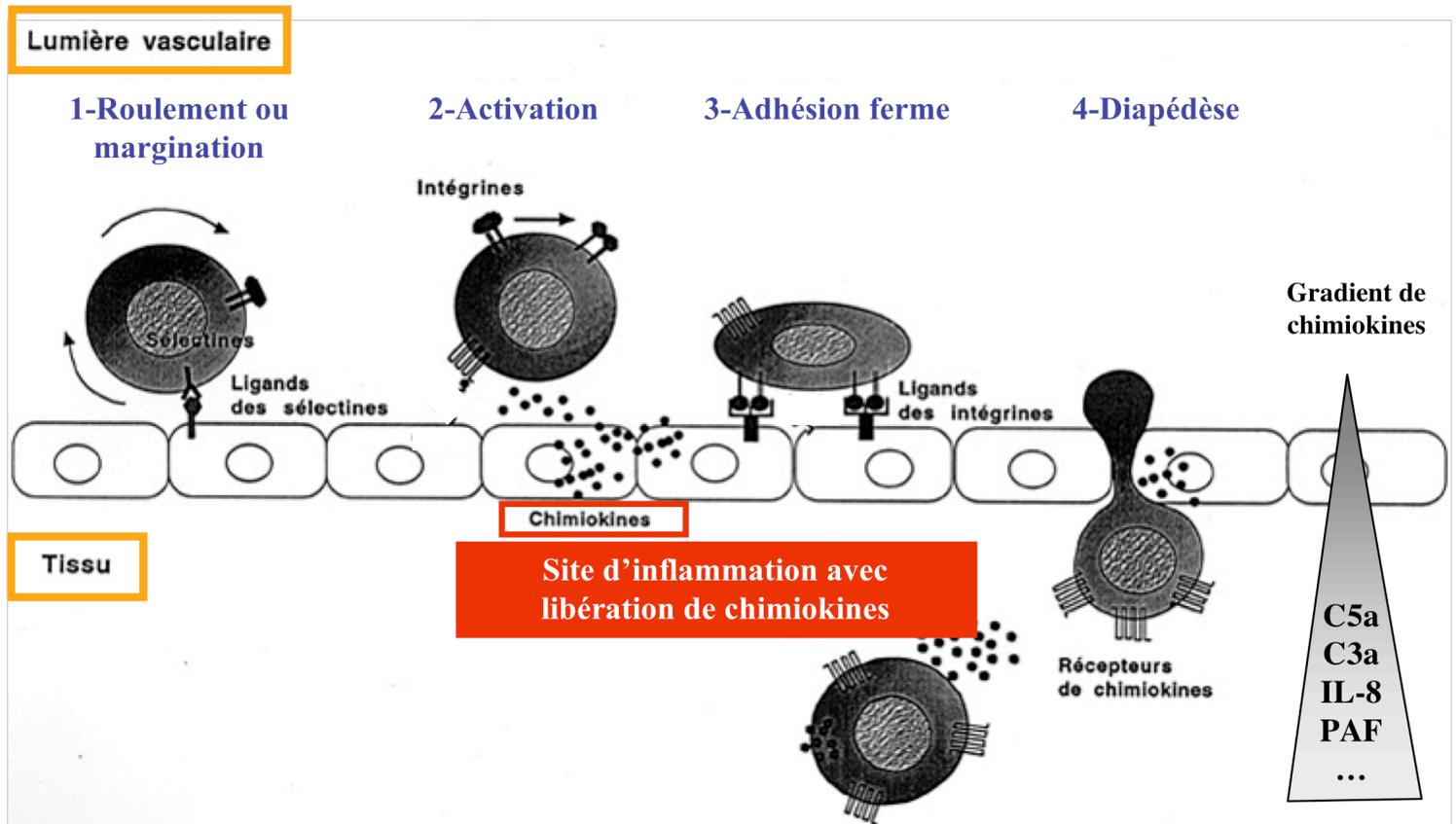


Figure 20. Schéma de recrutement des leucocytes au niveau du site d'inflammation.

1. Dans la circulation sanguine, le leucocyte est ralenti par des interactions réversibles de L-sélectine (CD62L) sur le leucocyte avec un ligand oligosaccharidique sur les cellules endothéliales, et par des interactions E- et P-sélectines (CD62E et CD62P) des cellules endothéliales avec des ligands du leucocyte. C'est le « rolling » ou la margination.
2. L'IL-8 et d'autres chimiokines produites entre autre par les cellules endothéliales pendant une inflammation induit l'expression d'intégrines (molécules d'adhésion) par le leucocyte activé.
3. Le leucocyte adhère de façon stable et irréversible grâce à l'interaction de l'intégrines β_2 avec ICAM-1 (CD54), une immunoglobuline des cellules endothéliales.
4. Le leucocyte migre ainsi entre deux cellules endothéliales dirigé par le gradient de concentration de chimiokines, c'est la diapédèse. Elle nécessite la rupture (i) de l'interaction de l'intégrine β_2 avec ICAM entre les deux types cellulaires et (ii) des jonctions serrées entre les cellules endothéliales. Le leucocyte est ainsi dirigé jusqu'au site d'inflammation par le gradient de chimiokines.

Ces leucocytes recrutés ne sont pas spécifiques du stimulus exogène responsable de l'inflammation. Leur principal rôle est de phagocyter les micro-organismes et les particules non organiques étrangères, ce qui ne semble pas utile dans le cas de toxicité par un xénobiotique. Cependant cette fonction de phagocytose peut s'avérer utile, puisque la pénétration du xénobiotique dans la peau a pu altérer la barrière cutanée (cf. chapitre II-2.1) facilitant ainsi le passage de particules exogènes. Les neutrophiles et les éosinophiles sont capables de phagocyter des particules et contiennent des granules permettant de tuer des micro-organismes ingérés et des parasites par lyse extracellulaire. Les basophiles eux possèdent des granules contenant des médiateurs inflammatoires notamment l'histamine. Cette dégranulation est activée par les mêmes chimiokines qui permettent le recrutement au niveau du site de l'inflammation (Bos, 2004). Les neutrophiles et les éosinophiles participent aussi à l'amplification de la réponse inflammatoire en générant la production de ROS via la présence d'oxidase NADH à leur membrane. Les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles sont capables aussi de synthétiser des leucotriènes à partir d'acide arachidonique et du PAF (Henderson, 1991). Donc le recrutement de leucocytes et notamment des granulocytes amplifie la réponse inflammatoire, permettant une activation autocrine et le recrutement d'autres leucocytes.

Cet infiltrat cellulaire associé à une exsudation de fluide génère un œdème et une destruction tissulaire au site d'application du xénobiotique.

3.8. La cytotoxicité par les enzymes de destruction tissulaire

Des protéinases cellulaires sont à l'origine de destruction de certains tissus entraînant des lésions cutanées (Lazarus and Barrett, 1974). L'un des mécanismes à l'origine de ces altérations est la destruction protéolytique de protéines matricielles tels le collagène ou l'élastine. Il existe plusieurs familles de protéinases impliquées dans le cadre de l'irritation cutanée (Revillard, 2001):

- les protéinases granulaires libérées par exocytose par les mastocytes et les neutrophiles, et capables de cliver des protéines matricielles ;

- les métalloprotéinases de la matrice (MMP) produites par les leucocytes et les cellules endothéliales capables de dégrader les principaux constituants des matrices conjonctives extracellulaires. Leur synthèse est stimulée par l'IL-1 α , le TNF- α et l'IL-6.

Elles favorisent le trafic des cellules dans la peau et la migration des CL et des CD à l'extérieur de la peau (cf. chapitre III-4.1.2).

L'irritation cutanée induite par un xénobiotique entraîne ainsi des lésions cutanées importantes, qui se résorbent après l'inflammation par la mise en place du phénomène de cicatrisation.

3.9. La cicatrisation de l'inflammation cutanée

Les plaquettes sont les cellules initiatrices de la cicatrisation par la formation d'un tissu granulaire (granulome) en recrutant les neutrophiles et les monocytes/macrophages, puis stimulant les fibroblastes et les KC. Les macrophages phagocytent les débris cellulaires et les cellules altérées, dégradent des protéines matricielles (par des collagénases et d'élastases) et interagissent fortement avec les fibroblastes en contrôlant leur mobilisation, leur prolifération et leur sécrétion. Les fibroblastes jouent un rôle essentiel dans ce processus dynamique de cicatrisation en sécrétant des protéines matricielles nécessaires à la régénération du tissu lésé. En parallèle de cette fibrose, l'angiogénèse qui correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, se met en place. Elle comprend la migration des cellules endothéliales, leur prolifération et leur maturation (Roitt et al., 1997).

Toutes ces étapes de fibrose et d'angiogénèse conduisent à la formation d'un granulome cicatriciel et sont orchestrées par un ensemble de cytokines (IL-10, TNF- α ...), chimiokines (IL-8, CXCL2/3...) et médiateurs (TGF- β , fibronectines...) sécrétés par les acteurs de la cicatrisation.

L'irritation cutanée correspond à une cascade d'événements permettant d'éliminer le xénobiotique. Selon la nature, la dose et le temps d'exposition du chimique, l'irritation peut rester silencieuse d'un point de vue clinique tout en présentant au niveau moléculaire les caractéristiques de l'activation de l'immunité innée cutanée ; ou au contraire, elle peut générer des lésions cliniques importantes correspondant à une DIC. Cependant, dans les deux cas, un haptène est capable d'induire une sensibilisation par l'activation du système immunitaire spécifique impliquant l'activation de LT.

4. L'activation de l'immunité spécifique par les haptènes (DAC)

4.1. L'induction de la phase de sensibilisation

La phase de sensibilisation correspond à la migration des CD jusqu'au ganglion et à la présentation aux LT par les CD de l'antigène qui est une protéine hapténisée que l'on nommera allergène. Les LT sont incapables de reconnaître un antigène sous forme native et entière, sans présentation du peptide sur les molécules du CMH. La présentation de l'antigène à un LT par une CD dépend de sa capacité à capter cet antigène et à l'apprêter sur les molécules du CMH. Les CD cutanées sont dites « immatures » car elles ne sont pas capables d'activer des LT naïfs, mais elles possèdent des propriétés de capture et d'apprêtement de l'antigène.

4.1.1. La capture et l'apprêtement de l'allergène

La capture de l'allergène

Les CD peuvent internaliser les antigènes par trois mécanismes différents : la macropinocytose, la phagocytose et l'endocytose via des récepteurs membranaires. La macropinocytose est la capacité des CD immatures à absorber une grande quantité de fluide extracellulaire de façon constitutive. Ce mécanisme dépendant de l'actine repose sur la formation de replis invaginés de la membrane plasmique qui fusionnent pour former de larges vésicules de 0,5 à 3 μm renfermant des solutés ou des antigènes présents en phase fluide (Sallusto et al., 1995). La phagocytose permet aux CD d'internaliser des particules entières, comme des billes de latex ou des parasites cutanés présent dans l'environnement (Inaba et al., 1993). Enfin un autre mode de capture plus sélectif est l'endocytose dépendante de récepteurs membranaires. Ainsi les CD cutanées immatures expriment des récepteurs participant à ce type d'endocytose : les CL expriment la Langérine (CD207), DEC-205 (CD205) et les CD dermiques expriment DEC-205, le récepteur au mannose des macrophages CD206 et DC-SIGN (CD209) (Jiang et al., 1995; Valladeau et al., 2000). Les CD expriment également (i) des récepteurs scavenger qui reconnaissent des lipoprotéines, (ii) des récepteurs au fragment constant des immunoglobulines, qui participent à l'acquisition d'antigènes exogènes par internalisation de complexes immuns et (iii) des récepteurs aux IgE, IgG et IgA (Geissmann et al., 2001; Maurer et al., 1998; Regnault et al., 1999). Tous ces mécanismes contribuent à la grande efficacité de capture des antigènes par les CD puisque de très faible quantité

d'antigène suffisent à une présentation efficace de l'antigène par les CD (Sallusto et al., 1995).

La prise en charge de protéines solubles injectées par voie intradermique lors de la réponse d'HSR classique semble se réaliser majoritairement par macropinocytose, par contre les données sur les haptènes sont moins claires. En effet les haptènes peuvent se lier aussi bien aux protéines solubles qu'aux protéines membranaires (cf. chapitre II-2.1), qui pourront ainsi être prises en charge une fois hapténisées par macropinocytose et par phagocytose, respectivement. Par ailleurs, les propriétés liposolubles de certains haptènes leur permettraient de traverser la bicouche lipidique des cellules et de se lier aux protéines endogènes du cytosol (Dupuis, 1982) sans qu'aucun système de capture n'intervient.

L'apprêtement de l'allergène

Les allergènes internalisés et présents dans la cellule sont ensuite traités par les systèmes enzymatiques des CD. Une partie des allergènes capturés peuvent également être dirigés vers des compartiments où ils ne sont pas digérés, ce qui permet leur présentation aux LB (Bergtold et al., 2005). Les fragments peptidiques obtenus sont associés aux molécules du CMH-I et du CMH-II et pourront être ainsi présentés aux LT CD8⁺ et CD4⁺ respectivement. Classiquement, les protéines 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. Ainsi, selon la présence ou non de l'haptène dans le cytosol, la présentation antigénique se fera selon l'une ou l'autre des deux voies de présentation (cf. Figure 21). Cependant il est aujourd'hui admis que ce modèle est trop restrictif.

La voie CMH-I

Les haptènes qui se lient aux protéines endogènes (grâce à leur capacité à traverser la membrane plasmique) vont être présentés par les molécules du CMH-I sous la forme de peptide endogènes hapténisés. Ces antigènes, comme les protéines cytosoliques hapténisées, sont dégradés en peptides dans le cytosol par un complexe supramoléculaire, le protéasome. Les peptides sont ensuite transportés dans le réticulum endoplasmique par le transporteur TAP (transporter associated with antigen processing) (Van Kaer et al., 1992). Ce transporteur permet la translocation active et sélective de peptides de 7 à 13 acides aminés à travers de la membrane du réticulum endoplasmique (Momburg et al., 1994). Les peptides s'associent alors aux molécules du CMH-I dans le site de chargement du peptide. La molécule du CMH-I

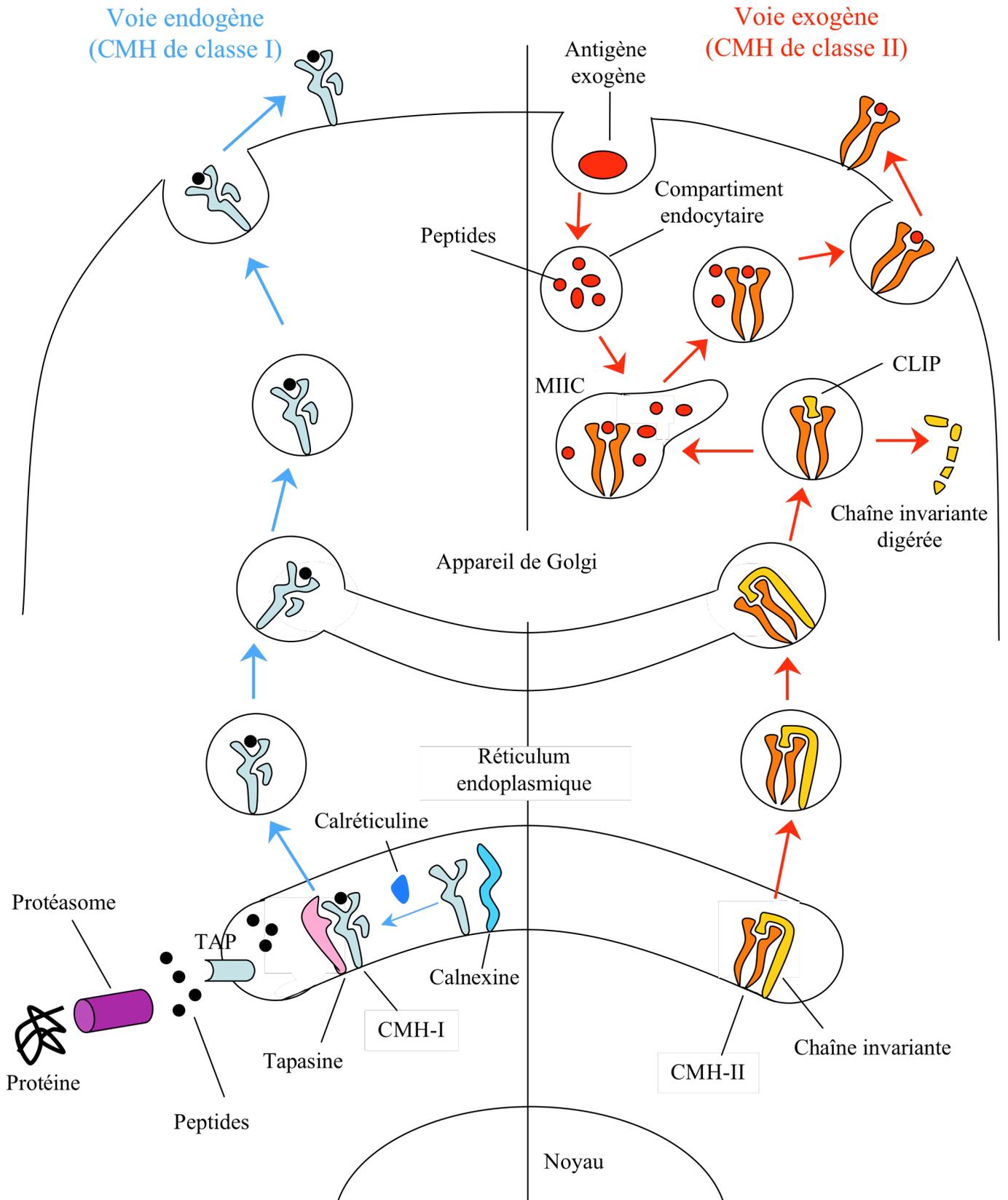


Figure 21. Modèles des voies de présentation de l'antigène pour les antigènes endogènes (en bleu) et les antigènes exogènes (en rouge).

D'après Revillard, 2001.

est constituée d'une chaîne lourde polymorphe α et d'une chaîne légère peu polymorphe, la β 2-microglobuline (β 2-m). Ce complexe est composé de plusieurs protéines. La calnexine permet l'association des deux chaînes du CMH-I dans le réticulum endoplasmique. Une seconde protéine chaperonne, la calréticuline, permet l'association de ce dimère à la tapasine qui assure l'association de la molécule du CMH-I avec le complexe TAP (Cresswell et al., 2005). Les molécules de CMH-I ainsi chargées en peptides vont être adressées à la membrane plasmique. Certains haptènes se complexent directement aux peptides endogènes présentés par les molécules de CMH-I à la membrane plasmique (Dupuis, 1982).

La voie CMH-II

Les protéines exogènes hapténisées et internalisées par endocytose, passent par les endosomes précoces puis tardifs pour atteindre ensuite des compartiments endosomiaux/lysosomiaux, appelés MIIC, riches en protéinases et molécules du CMH-II. Les protéines sont alors dégradées en peptides de 12 à 35 acides aminés. Les vésicules d'exocytose du trans-Golgi, qui contiennent des molécules de CMH-II néo-synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique, fusionnent avec le compartiment MIIC. La molécule de CMH-II constituée d'une chaîne α et d'une chaîne β s'associe à la chaîne invariante Ii ainsi qu'aux protéines HLA-DM et HLA-DO, qui facilitent l'adressage des molécules de CMH-II dans le compartiment MIIC. Au niveau de ces compartiments, la chaîne invariante, qui joue un rôle de protéine chaperonne, subit un début de dégradation par les cathépsines, ne laissant en place qu'un peptide résiduel, le CLIP (Class II associated invariant chain peptide), empêchant toute liaison prématurée avec un autre peptide (Lotteau et al., 1990; Roche and Cresswell, 1990). La molécule HLA-DM (ou son homologue murin H2-M) permet ensuite l'échange entre le peptide CLIP et un peptide issu de la dégradation des protéines exogènes (Sloan et al., 1995). Les complexes CMH-II/peptide qui en résultent sont adressés vers la membrane plasmique. Dans les CD immatures, la chaîne invariante Ii n'est pas complètement dégradée et le peptide CLIP se détache plus difficilement de la niche à peptide (Pierre and Mellman, 1998). Les molécules de CMH-II nouvellement synthétisées ne peuvent ainsi pas être efficacement chargées en peptides et sont retenues dans les compartiments lysosomiaux. De ce fait, seul un petit nombre des complexes CMH-II/peptide est adressé à la membrane dans les CD immatures.

Le phénotype immature des CD cutanées est donc étroitement lié à leur fonction de capture et de présentation de l'antigène. Ce maintien des CD au stade immature perdure jusqu'à ce qu'un stimulus, comme l'application d'un haptène, induise un signal de danger,

conduisant à la maturation et à la migration des CD vers les ganglions drainants, lieux de présentation des antigènes aux LT naïfs.

4.1.2. La migration et la maturation des CD cutanées

La migration et la maturation de CD semblent étroitement liées. Des cytokines comme le TNF- α et l'IL-1 β , connues pour induire la migration de ces cellules induisent aussi leur maturation (Cumberbatch and Kimber, 1992; Roake et al., 1995).

La migration des CD (cf. Figure 22)

La migration des CD cutanées vers les ganglions drainants est essentielle à l'établissement de la phase de sensibilisation. En effet lorsque le drainage lymphatique est altéré, l'HSRC ne peut se développer. Des études de migration des CD suite à l'application d'un haptène naturellement fluorescent, le FITC (isothiocyanate fluoresceine), montrent que 24 à 48 heures après des CD fluorescentes sont observées dans les ganglions drainants (Macatonia et al., 1986; Macatonia et al., 1987). Des greffes de peau ont permis de confirmer l'origine cutanée de ces CD (Kripke et al., 1990). Les CD cutanées migrent de façon continue à un taux basal relativement faible, mais qui augmente lors d'un signal inflammatoire (Kamath et al., 2002). Ce processus de migration résulte de plusieurs facteurs, dont la production de cytokines inflammatoires favorisant la survie et le détachement des CL des KC avoisinant via des protéinases.

Pour quitter l'épiderme, les CL doivent se détacher des KC puis traverser la lame basale (Stoitzner et al., 2002). L'interaction E-cadhérine/E-cadhérine permet l'adhésion des CL avec les KC. Ce contact cellulaire est essentiel à la cohésion des CL dans l'épiderme (Borkowski et al., 1994). La liaison du TNF- α et de l'IL-1 β à leurs récepteurs respectifs (TNF- α RII, IL-1RI) exprimés à la surface des CL, s'accompagne d'une diminution du taux de E-cadhérines à la surface des CL, permettant une désolidarisation des CL avec les KC (Schwarzenberger and Udey, 1996; Wang et al., 1997; Wang et al., 1996). L'IL- β et le TNF- α inhibent également l'expression des récepteurs de chimiokines CCR1, 2, 5 et 6 à la surface des CL. Les CL ne sont donc plus retenues dans l'épiderme par les chimiokines qui y sont produites : CCL3, CCL4 et principalement CCL20 (MIP-3 α) (Dieu et al., 1998). Le TNF- α et l'IL- β induisent en parallèle la surexpression à la surface des CL de molécules d'adhésion comme le ICAM-1, l'intégrine α 6 et des variants de CD44 qui leur permettent d'établir des liens avec la matrice extracellulaire. Des travaux plus récents montrent que les mastocytes activés jouent un rôle important dans l'initiation de la migration de CL (Yokozeki et al., 2003)

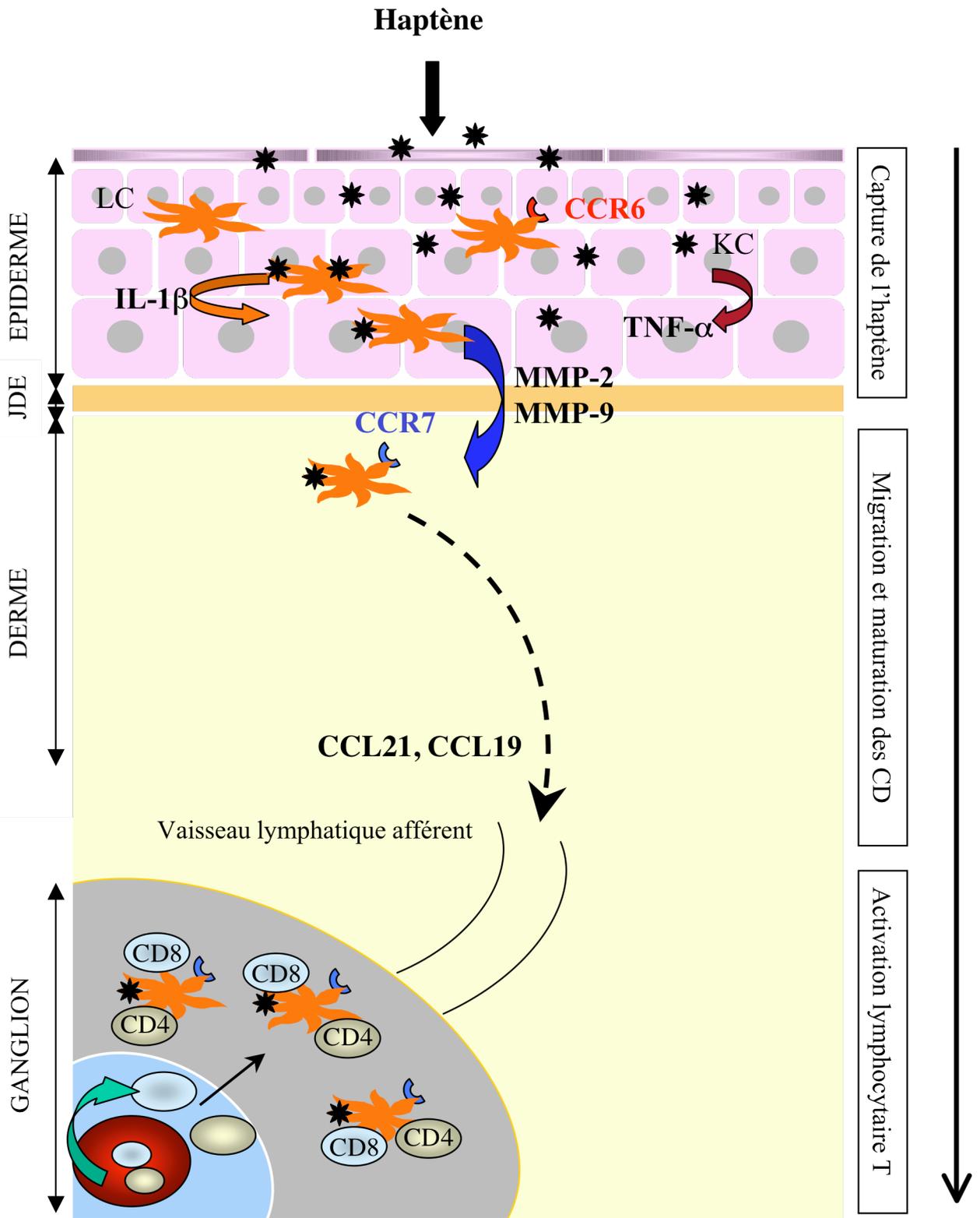


Figure 22. Schéma de la phase de sensibilisation de la DAC

Les CL capturent l'haptène dans l'épiderme, puis traversent la jonction dermo-épidermique grâce à la production de MMP-2 et MMP-9. L'expression de CCR7 par les CL leur permet ensuite de gagner le ganglion lymphatique drainant via la lymphe afférente en réponse aux gradients de chimiokines CCL21, produite par les cellules veines à endothélium épais et CCL19, produites par les cellules résidentes des zones paracorticales des ganglions.

et certainement via leur libération et leur sécrétion de TNF- α et d'histamine (Jawdat et al., 2004). L'IL-18 produite par les CL et les KC semble aussi contribuer à la migration des CL via un mécanisme dépendant du TNF- α et de l'IL- β (Cumberbatch et al., 2001; Wang et al., 2002). Par ailleurs, l'IL-10 et le TGF- β en inhibant la sécrétion de TNF- α et d'IL-1 β sont capables de diminuer la migration et la maturation des CL jusqu'aux ganglions drainants (Geissmann et al., 1999; Wang et al., 1999).

Afin de gagner le derme, les CL doivent franchir la jonction dermo-épidermique. Les métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9, qui lysent les protéines de la matrice extracellulaire, sont nécessaires pour la migration à travers la lame basale et le derme, (Kobayashi et al., 1999; Ratzinger et al., 2002). Les CL sont capables de sécréter les métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9, de plus le TNF- α participerait à l'activation de la MMP-9 dans l'épiderme (Han et al., 2001; Ratzinger et al., 2002). Au niveau du derme, les CD surexpriment le récepteur CCR7 augmentant leur sensibilité aux chimiokines CCL19 (MIP-3 β) et CCL21 (secondary lymphoid chemokine, SLC) produites par les cellules endothéliales lymphatiques (Cyster, 1999; Dieu et al., 1998). Le rôle de CCL21 au cours de l'HSRC est basé sur les observations d'Endeman *et al.*, démontrant une absence de réponse inflammatoire chez les souris injectées avec un anticorps anti-CCL21, lors de la phase de sensibilisation et non lors de la phase d'élicitation (Engeman et al., 2000). La chimiokine CCL21 est produite par les cellules endothéliales lymphatiques et par les cellules stromales des aires T des ganglions lymphatiques (Gunn et al., 1998; Ngo et al., 1999). Par ailleurs, l'injection de TNF ou IL-1 α dans le derme augmente radicalement l'expression de CCL21 dans les cellules endothéliales lymphatiques ce qui a pour conséquence directe une augmentation de la migration des CD et de l'activation des LT qui en résulte dans le ganglion (Martín-Fontecha et al., 2003). Ainsi en suivant le gradient de chimiokines, les CD cutanées gagnent la lymphe afférente, puis se positionnent au niveau de la zone paracorticale, riche en LT, des ganglions drainant la zone de contact avec l'haptène. Les LT naïfs présents dans le sang circulent en permanence au niveau de cette zone ganglionnaire. La présence de CD ayant acquis l'haptène au niveau de la peau est détectée dans les ganglions lymphatiques dès 12 heures après application de l'haptène (Kripke et al., 1990). Les CD dermiques migrent plus rapidement vers les ganglions drainants que les CL 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 CD dermiques dans la sensibilisation. Mais jusqu'à récemment, les CL ont été considérées comme les seules CD cutanées nécessaires et suffisantes pour induire la sensibilisation.

Les CL ne sont pas essentielles pour la sensibilisation

Deux populations de CD résidant dans la peau sont susceptibles d'être impliquées dans la migration des CD : les CL dans l'épiderme et les CD dermiques (cf. chapitre I-1.1.). Toutes deux sont des CD immatures capables de capturer et de migrer aux ganglions drainants pour présenter l'haptène en tant qu'antigène aux LT. Cependant les CL ont pendant longtemps été considérées comme les seules CD responsables de l'induction de la phase de sensibilisation. En effet, suite à l'application topique d'un haptène, plus de 40% des CL deviennent activées et quittent l'épiderme. Et des études d'HSRC sur des souris déficientes en CL par traitements aux rayons UV montrent l'absence de sensibilisation (Toews et al., 1980), confirmées par d'autres travaux étudiant la migration jusqu'aux ganglions drainants des CL qui initient la réponse immunitaire (Macatonia et al., 1987; Ruedl et al., 2001; Stoitzner et al., 1999). Cependant ces études, en se focalisant sur le comportement des CL, ne montrent que des preuves indirectes de l'activation des LT par les CL (Sille et al., 2005), et des recherches plus récentes suggèrent qu'au contraire les CL ne seraient pas les CPA impliquées majoritairement dans l'activation des LT par des antigènes dérivés de la peau.

En effet des souris où la déficience en CL est inductible, présentent une HSRC significativement diminuée, mais la faible réponse suggère qu'en absence de CL, les CD dermiques sont capables d'induire une réponse spécifique (Bennett et al., 2005). D'autres travaux sur ces mêmes souris montrent que les CL ne sont pas nécessaires à l'activation des LT spécifiques dans les ganglions drainants (Kissenpfennig et al., 2005). Par ailleurs, Kaplan *et al.* montrent sur d'autres souris déficientes en CL une HSRC augmentée suggérant leur implication dans la régulation de la réponse inflammatoire spécifique (Kaplan et al., 2005). Les CL ne semblent donc pas indispensables dans la phase de sensibilisation, et les CD du derme y jouent un rôle important, tout comme les précurseurs de CD recrutés au site d'application de l'haptène (Le Borgne et al., 2006) (cf. chapitre III-4.1.3).

La migration des CD cutanées est-elle réellement nécessaire à l'activation des LT ?

Une étude montre qu'une protéine injectée en sous-cutanée, peut diffuser en moins de 2 heures jusqu'au ganglion drainant et être présentée via des complexes du CMH-II par les CD résidentes du ganglion (Itano et al., 2003). Ce phénomène de diffusion passive peut également s'appliquer aux haptènes qui quelques minutes après leur application sur la peau sont détectés dans le sang, la lymphe puis très rapidement au sein des ganglions. L'haptène peut donc être très rapidement présenté par les CD résidentes du ganglion. Cependant ce mécanisme de présentation de protéines solubles dans le ganglion, ne minimise en rien le rôle essentiel des CD qui migrent à partir du tissu. En effet, les CD résidentes du ganglion, qui présentent ces complexes CMH/peptide, induisent seulement une activation partielle des LT spécifiques, évaluée par un faible taux de production d'IL-2 et de prolifération cellulaire. La migration des CD du derme, qui prennent en charge la protéine injectée en sous-cutanée est essentielle pour poursuivre l'activation des LT qui avait été initiée par les complexes CMH/peptide des CD ganglionnaires (Itano et al., 2003).

La maturation des CD

Lors de leur maturation, les CD perdent leur capacité à capturer les antigènes, mais augmentent leur capacité à les présenter. Le terme de maturation recouvre un ensemble de modifications morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles qui confère aux CD la capacité d'activer efficacement les LT. Ces phénomènes ont pu être largement étudiés *in vitro*, mais leur validation *in vivo* n'est pas encore définitive. La maturation est induite par différents signaux de danger, notamment des produits issus d'agents pathogènes, comme le LPS et les autres ligands de TLR, des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α et l'IL-1 β ou le CD40 ligand (CD40L) (Banchereau et al., 2000).

Ce processus est associé à une augmentation de l'expression des molécules de CMH-I et de CMH-II chargées en peptides antigéniques à la surface des CD via une augmentation de la synthèse et de la demi-vie de ces complexes en surface (Pierre and Mellman, 1998; Rescigno et al., 1998). La maturation des CD s'accompagne également d'une perte de leur capacité à internaliser des antigènes *in vitro*. En effet, les récepteurs à l'antigène tel que le récepteur au mannose, les FcR, voient leur expression chuter, puis les granules de Birbeck (caractéristiques des CL) disparaissent (Sallusto et al., 1995; Sallusto and Lanzavecchia, 1994) ; la machinerie cellulaire qui contrôle la macropinocytose et la phagocytose est ensuite verrouillée au cours de la maturation (Garrett et al., 2000). Parallèlement, les CD acquièrent un certain nombre de molécules co-stimulatrices (CD80, CD86, CD40, CD83), de molécules

d'adhésion (ICAM-1 ou CD54, LFA-3 ou CD58) ainsi que des récepteurs de chimiokines (CCR4, 7 et CXCR4), leur permettant de migrer et d'atteindre les zones paracorticales des ganglions drainants la peau où elles pourront interagir et présenter l'antigène aux LT naïfs. En plus de l'expression de ces récepteurs de membrane, le processus de maturation des CD passe également par leur capacité à produire des chimiokines et des cytokines qui leur permettra d'attirer les LT et de polariser la réponse T.

Ce modèle, où la maturation est liée au processus de migration, suggère que la plupart des CD ayant migrées d'un tissu ont les propriétés de CD matures, cependant *in vivo* un petit pourcentage des CD Langérine⁺ (CD207) semblent immatures (Geissmann et al., 2002; Stoitzner et al., 2003). De telles observations suggèrent que la migration des CD pourrait se faire à l'état immature et serait ainsi dissociée du processus de maturation. Cette hypothèse est confortée par le fait que des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou le TGF- β inhibent l'acquisition des marqueurs de maturation des CL (CD80, CD86, et CMH-II) sans inhiber la surexpression de CCR7 (Geissmann et al., 1999). Des CD immatures pourraient ainsi garder la capacité de migrer jusqu'aux ganglions drainants (Ruedl et al., 2001).

4.1.3. Le recrutement de précurseurs de CD au niveau de la peau

Récemment, les précurseurs de CD recrutés au niveau du site d'application de l'haptène ont été décrits comme jouant un rôle crucial dans l'activation des LT CD8⁺ au niveau des ganglions drainants (Le Borgne et al., 2006). A l'homéostasie, il existe une migration constante de CD et de leurs précurseurs vers la peau qui permet le renouvellement continu des CD cutanées. En réponse à divers stimuli comme les bactéries, les virus et les haptènes, ce recrutement est rapidement augmenté. L'application d'haptène sur la peau induit, dès 2 heures, l'accumulation de CD dans la peau (Desvignes et al., 1998). Cependant l'origine de ces CD n'est pas connue. Il est possible qu'elles dérivent de monocytes sanguins puisque ce sont des précurseurs de CD en conditions inflammatoires (Geissmann et al., 2003; Ginhoux et al., 2006). Ces précurseurs expriment des molécules du CMH-II et plusieurs études montrent que les monocytes CD11b⁺ Gr1^{int} (appelés aussi CD11b⁺ Gr1^{+/low}) sont les précurseurs de CD recrutés dans la peau qui se différencient en CD, captent l'antigène, puis migrent aux ganglions drainants (Geissmann et al., 2003; Qu et al., 2004; Randolph et al., 1999; Sunderkotter et al., 2004). Ils ont une morphologie plus ronde que les CD résidentes, mais une fois recrutés dans la peau, ces précurseurs se différencient en CD avec une forme dendritique typique.

Pour parvenir à la peau, les CD et leurs précurseurs doivent passer la barrière endothéliale vasculaire par le même mécanisme migratoire transendothéliale décrit précédemment pour les leucocytes (cf. chapitre III-3.7). L'expression de récepteurs à sélectines distincts, par les différentes populations de précurseurs sanguins de CD, contrôle la nature des populations recrutées selon l'état d'inflammation du tissu. Ainsi la L-sélectine est exprimée par les monocytes « inflammatoires » Gr1⁺, mais pas par les monocytes « résidents » Gr1⁻ (Geissmann et al., 2003). Le recrutement des précurseurs de CD est orchestré par divers chimiokines qui favorisent leur migration dans le derme ou jusqu'à l'épiderme.

Les couples récepteur/chimiokine principalement impliqués dans le recrutement des précurseurs de CD dans le derme sont en particulier les récepteurs CCR2, CCR1 et CCR5 et leurs ligands (cf. Figure 2). Plusieurs études montrent que CCR2 (récepteurs des chimiokines CCL2 et CCL13) joue un rôle important dans le recrutement des monocytes en conditions inflammatoires. En effet CCL2 (MCP-1), qui est produite dans la peau en conditions inflammatoires (Merad et al., 2002), induit la migration de monocytes *in vitro* (Randolph and Furie, 1995) et est nécessaire à la migration des monocytes *in vivo* (Merad et al., 2002; Peters et al., 2000). Les chimiokines CCR1 et CCR5 semblent également importantes pour la migration de précurseurs de CD vers les tissus inflammatoires puisque des CD immatures migrent en réponse à CCL3 et CCL5, deux ligands de CCR1 et CCR5 (Dieu-Nosjean et al., 2000). De plus, des antagonistes de CCR1 et CCR5 diminuent le recrutement de CD dans les voies aériennes de rat infectés par une bactérie (Stumbles et al., 2001).

Le couple CCR6/CCL20 est également important pour le recrutement de CL dans l'épiderme. En effet, CCL20 (MIP-3 α), dont l'expression est augmentée par les cellules épidermiques *in vivo* lors d'une inflammation (Dieu-Nosjean et al., 2000; Vanbervliet et al., 2002), est la chimiokine la plus efficace pour induire la migration *in vitro* des précurseurs de CL (Dieu-Nosjean et al., 2000). De plus, les souris déficientes en CCR6 présentent une absence de recrutement de CD au site d'application de l'haptène à dose suboptimale (Le Borgne et al., 2006). Par ailleurs, le TGF- β et l'IL-10 pourraient favoriser l'expression de CCR6 sur des précurseurs recrutés et permettre leur migration vers l'épithélium (Dieu-Nosjean et al., 2001; Yang et al., 1999).

Le recrutement de CD ou de précurseurs de CD dans le derme puis dans l'épiderme nécessiterait donc l'intervention séquentielle de plusieurs chimiokines (cf. Figure 23). Les précurseurs circulants, comme les monocytes sanguins, sont capables de répondre à CCL13 mais pas CCL20 (Vanbervliet et al., 2002), alors que les cellules CD14⁺ ayant traversées le

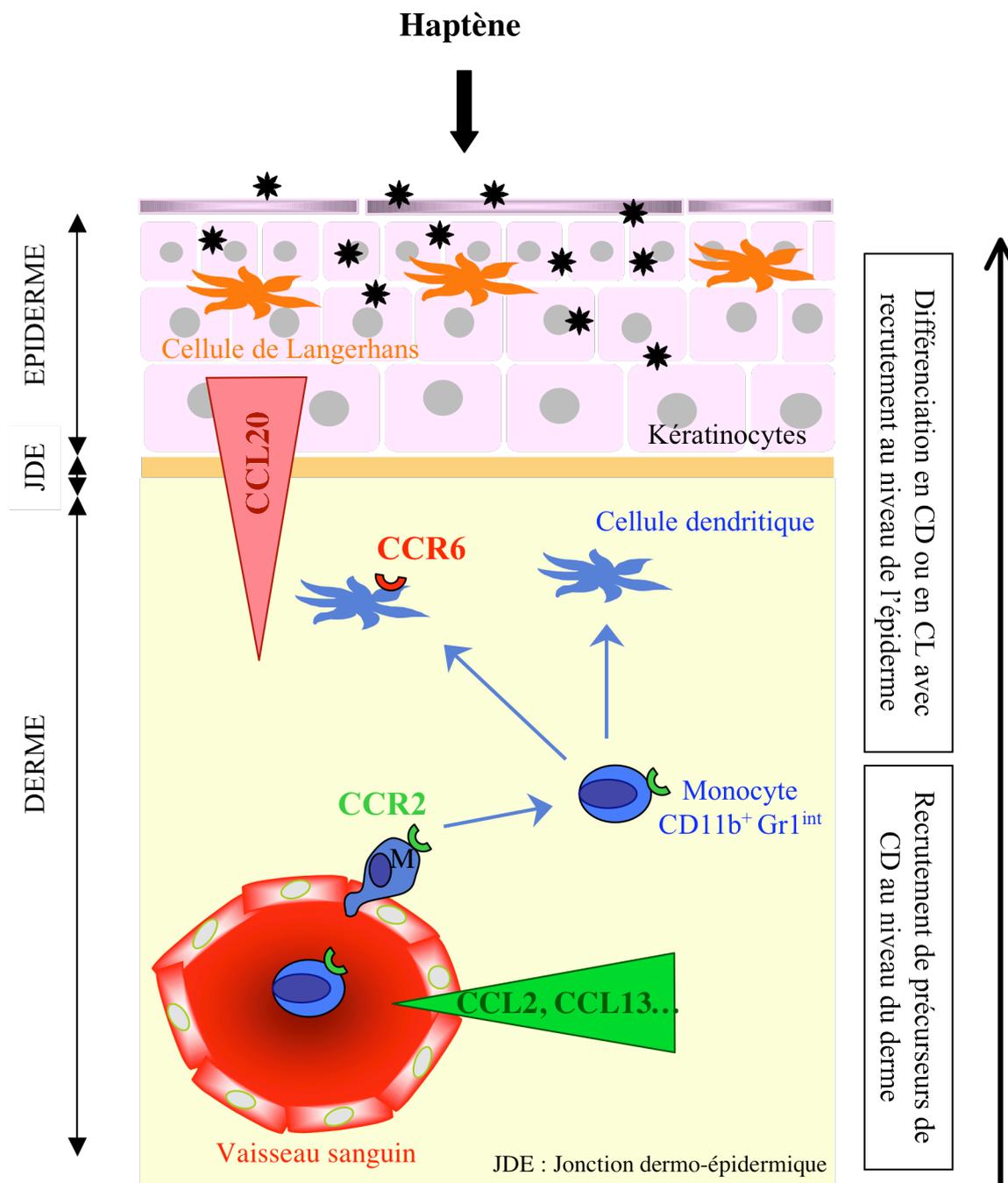


Figure 23. Modèle de recrutement des précurseurs de CD dans la peau chez la souris.

D'après Vanderberliet et al. 2002; Geissmann et al., 2003; Merad et al., 2002; Le Borgne et al., 2006

Suite à l'inflammation induite par l'application d'un haptène, des monocytes CD11b⁺ Gr1^{int} sont recrutés dans le derme grâce à la production locale de chimiokines telles que CCL2 et CCL13. Ces monocytes peuvent se différencier en CD gagnant rapidement les ganglions drainants. Ces précurseurs de CD au cours de leur différenciation acquièrent l'expression de CCR6 favorisant leur recrutement vers l'épiderme, et une partie se différencie localement en CL en réponse au TGF-β et à l'IL-10.

derme répondent à CCL20 (Larregina et al., 2001), ce qui suggère que les capacités migratoires des précurseurs de CD sont régulées au cours de leur différenciation. De plus, CCL13 est exprimée par les cellules épithéliales basales proches des vaisseaux sanguins, alors que CCL20 est exprimée par des couches épithéliales plus superficielles (Vanbervliet et al., 2002). Ces deux chimiokines forment donc des gradients complémentaires : les précurseurs migreraient vers le derme via CCL13, où ils acquerraient l'expression de CCR6 en réponse à des cytokines présentes, puis migreraient alors dans l'épiderme via CCL20.

4.1.4. L'activation et la constitution des LT spécifiques de l'haptène

Plusieurs approches complémentaires ont permis de montrer que l'HSRC était dépendante de la mise en place de populations lymphocytaires T effectrices au cours de la phase de sensibilisation. Le transfert de LT de souris sensibilisées à des souris naïves s'accompagne du transfert de la sensibilisation. D'autre part, la déplétion en LT chez des souris sensibilisées abroge la sensibilisation de ces animaux. Enfin, les souris athymiques ou les patients atteints d'aplasie thymique (syndrome de Di George) sont incapables d'être sensibilisés (Waksman, 1978). L'utilisation de souris déficientes soit en molécule de CMH-I, soit en molécule de CMH-II, a permis de démontrer que lors des réactions d'HSRC, les CD activent à la fois des LT CD4⁺ et des LT CD8⁺.

4.1.4.1. L'activation des LT par les CD

Le récepteur des LT, le TCR, ne peut interagir avec un antigène que si celui-ci est présenté par des molécules du CMH (Zinkernagel and Doherty, 1974). Par ailleurs, deux signaux d'activation sont requis pour permettre aux LT naïfs de mettre en place une réponse antigénique. Le premier signal fait intervenir la reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR. Le deuxième signal implique les molécules de co-stimulation et/ou la sécrétion de cytokines par les CD pour l'acquisition de fonctions effectrices ou régulatrices par les LT. La capacité d'activer les LT naïfs est une propriété des CPA que sont les CD cutanées. L'activation lymphocytaire va conduire à l'expansion clonale des LT spécifiques de l'haptène présents dans le répertoire pré-immun.

L'interaction du TCR avec le complexe CMH/peptide

Le TCR se présente sous la forme d'un hétérodimère composé de deux chaînes glycoprotéiques de la superfamille des immunoglobulines. Les chaînes du TCR sont composées d'une partie distale variable et d'une partie proximale constante reliées entre elles

par une jonction et associées au sein de la membrane à un groupe de protéines dénommé CD3 qui permet d'assurer la transduction des signaux (Garcia et al., 1996). Des cascades d'évènements cytoplasmiques conduisent ensuite à l'expression de différents gènes d'activation via les facteurs de transduction NF- κ B, AP-1 et NF-AT. Les molécules CD4 et CD8, exprimées à la surface des LT, jouent un rôle de co-récepteur lors de l'interaction entre les LT et la CD, en stabilisant l'interaction entre le TCR et la molécule du CMH. La molécule CD4 interagit avec la molécule de CMH-II et la molécule CD8 avec celle du CMH-I. Ces molécules participent activement au développement thymique des LT et par la suite à leur activation en intervenant dans la transduction du signal (Veillette et al., 1988).

Les molécules de co-stimulation et la tolérance périphérique

La présence ou l'absence de ce deuxième signal constitue un des mécanismes impliqués dans le phénomène de tolérance périphérique. Ce signal est régi par l'interaction de couples récepteur/ligand, présents à la surface des LT et des CD. Les CD, lors de leur maturation, augmentent nettement l'expression de CD80 (B7-1) et de CD86 (B7-2), deux ligands de CD28 (Reiser and Schneeberger, 1996; Symington et al., 1993). L'engagement de CD28 a différents effets, notamment l'augmentation de l'expression du gène de l'IL-2 via NF-AT (Fraser et al., 1991) et du gène anti-apoptotique Bcl-XL protégeant les cellules T du signal apoptotique conféré par l'engagement du TCR (Boise et al., 1995). Les souris déficientes en CD28 présentent une réduction drastique du développement des réactions d'HSRC (Kondo et al., 1996). Le second signal d'activation fourni par l'engagement de CD28 apparaît donc essentiel à l'établissement des réactions d'HSRC. Dans un modèle d'HSRC, CD86 semble nécessaire pour l'activation des LT CD8⁺ effecteurs et des LT CD4⁺ régulateurs, alors que CD80 semble nécessaire uniquement à l'activation des LT CD4⁺ régulateurs (Xu et al., 1997). Les molécules de co-stimulation permettent également de réguler l'activation des LT. Ainsi l'engagement du TCR et de CD28 entraîne rapidement la translocation de la molécule CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CD152) dont l'interaction avec CD80 et CD86 inhibe la synthèse d'IL-2 et protège les cellules T d'une activation incontrôlée (Krummel and Allison, 1996).

Suivant le contexte inflammatoire dans lequel les CD présentent les complexes CMH/peptide et le niveau d'expression des molécules co-stimulatrices à leur surface, les CD peuvent être soit inductrices d'une immunité soit tolérogènes. Ainsi la prise en charge d'un antigène par les CD dans des conditions non inflammatoires peut induire des LT tolérogènes ou régulateurs (Treg). En effet, *in vitro*, les CD immatures dérivées de monocytes induisent la

différenciation des LT en Treg (Jonuleit et al., 2000), ce qui suggère un rôle des CD immatures dans la tolérance périphérique. Il se peut également que les CD soient rendues tolérogènes suite à la phagocytose de corps apoptotiques (Lu and Lemke, 2001), ceci aboutissant à la production de grande quantité de cytokines anti-inflammatoire comme l'IL-10 (Fadok et al., 2000; Savill and Fadok, 2000), capable d'inhiber l'expression des molécules de co-stimulation (Ding et al., 1993).

La synapse immunologique et le dialogue CD/LT

Au niveau de la zone paracorticale des ganglions lymphatiques, les LT CD4⁺ et CD8⁺ circulent en permanence au contact des CD. Les interactions entre la CD et le LT sont stabilisées grâce à la formation d'une synapse immunologique dans la zone de contact entre les membranes plasmiques des deux cellules, au niveau desquelles se concentrent les molécules d'adhésion, du CMH et de co-stimulation. La formation de la synapse est initiée par l'interaction LFA et ICAM 2/3 du LT avec ICAM-1 (CD54) et DC-SIGN (CD209) de la CD mature respectivement. D'autres molécules TCR, des molécules CD4 et CD8 et des molécules de co-stimulation comme CD28 sont ensuite recrutées au niveau de la synapse immunologique, suite à une réorganisation du cytosquelette (Krummel et al., 2000). La formation de la synapse immunologique permet des interactions stables entre la CD et le LT, essentielles à l'activation complète des LT effecteurs (Huppa et al., 2003; Hurez et al., 2003). L'expression par les CD matures de toutes les molécules nécessaires à la formation de la synapse est donc nécessaire à l'induction d'une réponse T efficace. Les LT activés via leur TCR peuvent en retour exercer des effets sur la CD, on parle de dialogue CD/LT. L'engagement d'un petit nombre de TCR et de CD28 au niveau de la synapse conduit rapidement à l'expression de la molécule CD40L (CD154) à la surface des LT. L'interaction du CD40L avec le CD40 exprimé à la surface des CD amplifie l'expression des molécules de co-stimulation ce qui permet d'augmenter l'intensité du signal et améliorer la survie des CD (Caux et al., 1994).

4.1.4.2. Les LT spécifiques de l'haptène

De ce dialogue CD/LT dans le ganglion, résulte l'activation des LT naïfs CD4⁺ et CD8⁺ quelques jours après l'application de l'haptène sur la peau. A ce moment les LT vont acquérir des capacités de prolifération et leurs fonctions effectrices. Classiquement, l'activation optimale des LT CD8⁺ naïfs nécessite des signaux reçus par les LT CD4⁺, appelés ainsi LT CD4⁺ auxiliaires. Cette propriété des LT CD4⁺ activés implique l'expression de

CD40L à leur surface (Ridge et al., 1998). Cependant dans le modèle d'HSRC aux haptènes forts, l'activation des LT CD8⁺ ne nécessite pas l'aide des LT CD4⁺ ni l'implication de l'interaction CD40/CD40L. En effet, chez des souris déficientes en CD40L l'HSRC au DNFB est normale (Gorbachev et al., 2001). Il semblerait que la capacité pro-inflammatoire forte des haptènes éviterait la nécessité des LT CD4⁺ et serait suffisante pour déclencher une réponse lymphocytaire cytotoxique des LT CD8⁺ avec une fréquence élevée de précurseurs (Mintern et al., 2002; Schuurhuis et al., 2000).

Selon le profil de cytokines sécrétées, on distingue la sous-population de LT CD4⁺ de type Th1 qui produit de l'IFN- γ , de l'IL-2, et du TNF- α et la sous-population de LT CD4⁺ de type Th2 qui sécrètent l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10, et l'IL-13 (O'Garra, 1998). Par analogie à cette classification type 1/type 2, on distingue des sous-populations de LT CD8⁺ cytotoxiques (Tc) de type 1 (sécrétion d'IFN- γ , d'IL-2, et de TNF- α) et de type 2 (sécrétion d'IL-4, d'IL-5, et d'IL-10).

Depuis ces 10 dernières années, des études montrent que les LT CD8⁺ sont les principales cellules effectrices de l'HSRC aux haptènes forts et faibles (Kehren et al., 1999; Vocanson et al., 2006), alors que les LT CD4⁺ se comportent comme des cellules régulatrices (Cavani et al., 2001; Gorbachev and Fairchild, 2001; Krasteva et al., 1999a). En effet, des souris déficientes en LT CD8⁺, suite à l'inactivation du gène de la β 2-microglobuline ou une déplétion en LT CD8⁺, présentent une HSRC abolie ou fortement diminuée. De plus, des souris déficientes en LT CD4⁺, suite à une inactivation de CMH-II ou une déplétion en LT CD4⁺, présentent une réponse d'HSRC exacerbée (Bour et al., 1995). Et l'analyse de la production de cytokines par les LT CD4⁺ et CD8⁺ après restimulation *in vitro* par des CD hapténisées montre que les LT CD8⁺ produisent des cytokines de type Th1, principalement l'IFN- γ , alors que les LT CD4⁺ produisent principalement des cytokines de type Th2, comme IL-4, IL-5 et IL-10 (Xu et al., 1996). Cependant des controverses existent quand au rôle effecteur des LT CD8⁺ dans l'HSRC. Certaines études montrent que les LT CD4⁺ seraient majoritairement effecteurs dans l'HSRC au FITC (Dearman and Kimber, 2000) ou dans la DAC chez l'homme (Cavani et al., 2001; Cavani et al., 1998; Girolomoni et al., 2001).

La recirculation en périphérie des LT activés

Une fois activés, les LT vont quitter des ganglions lymphatiques via les canaux efférents et rejoindre le canal thoracique puis la circulation sanguine, pour migrer vers les tissus périphériques et en particulier vers la peau. Cette émigration implique la modification de l'expression de récepteurs de chimiokine et d'adressage. La majorité des LT activés perdent l'expression de CCR7, récepteur de CCL19 (MIP-3 β) et de CCL21 (SLC), produits au niveau des ganglions, et ne recirculeront plus désormais vers ces mêmes ganglions. Les LT CCR7⁻ constitueraient une population de cellules mémoires périphériques. L'autre population de cellules CCR7⁺ constitueraient des cellules mémoires centrales qui recirculent par le sang et la lymphe dans les ganglions (Sallusto et al., 1999b). Dans le cas d'une seconde exposition à l'antigène, les cellules mémoires périphériques seraient capables de sécréter de façon très rapide l'IFN- γ et CCL5 (RANTES), alors que les cellules mémoires centrales permettrait le maintien de clones spécifiques de l'antigène à une fréquence plus élevée que dans le répertoire pré-immun au cours du temps. Cette population lymphocytaire serait ainsi plus facilement remobilisable.

Une analyse histologique de peau inflammatoire de souris sensibilisées et révélées montrent que les LT CD4⁺ et CD8⁺ expriment plus ou moins le CCR4, l'intégrine α 4 β 1 et la molécule CLA (Berg et al., 1991; Campbell et al., 1999). L'interaction de la molécule CLA et de CCR4 avec leurs ligands respectifs (E- et P-sélectines), et la molécule CCL17 (thymus and activation-regulated chemokine, TARC), exprimées de façon constitutive à la surface des cellules endothéliales des veinules post-capillaire cutanées, permettent aux LT de migrer du sang vers le derme (Erdmann et al., 2002; Reiss et al., 2001). L'extravasation des LT dans le conjonctif dermique requiert ensuite l'interaction séquentielle des récepteurs VLA-4 et LFA-1 présents à la surface des LT et de leurs ligands respectifs VCAM-1 et ICAM-1 exprimés à la surface des cellules endothéliales (Santamaria et al., 1995). Cette migration des LT des ganglions vers la périphérie, se produit à un niveau basal en l'absence de tout nouveau contact avec l'haptène et est placée sous le contrôle de l'homéostasie T.

La phase de sensibilisation conduit, via le rôle essentiel des CD, à l'établissement de populations de LT spécifiques de l'haptène qui seront massivement recrutées lors d'un contact ultérieur avec le même haptène.

4.2. La phase d'élicitation ou de révélation

La phase d'élicitation constitue l'expression clinique de l'HSRC. Lorsque le délai nécessaire à la différenciation et l'expansion des populations spécifiques des LT est écoulé (10 à 15 jours chez l'homme et 5 à 6 jours chez la souris), la persistance de l'haptène ou tout nouveau contact avec le même haptène va entraîner l'apparition d'un infiltrat inflammatoire au site d'application. La réponse optimale est atteinte en 72 heures chez l'homme et en 24 heures chez la souris.

4.2.1. La génération de l'inflammation

La mise en place de l'inflammation

Le recrutement de l'infiltrat inflammatoire repose sur l'augmentation du flux sanguin, de l'expression de molécules d'adhésion et de la production de chimiokines inflammatoires. Ces dernières conduisent à l'infiltration cutanée de LT spécifiques de l'haptène activés lors de la sensibilisation, puis au recrutement de cellules spécialisées de l'inflammation comme les polynucléaires. De façon similaire à la phase de sensibilisation, le second contact avec l'haptène induit rapidement une libération de TNF- α et d'IL-1 β (Enk et al., 1993a; Heufler et al., 1992). Ce premier signal inflammatoire induit, dès 6 heures après l'application de l'haptène, le recrutement dans la peau de LT CD8⁺ effecteurs. Une seconde vague de recrutement à la fois de LT CD8⁺ de type Th1 et de LT CD4⁺ de type Th2 intervient plus tardivement entre 24 et 48 heures (Akiba et al., 2002). Ce recrutement en deux étapes distinctes au niveau de la peau, pourrait s'expliquer par une expression échelonnée de différents types de chimiokines.

70 % des LT de la DAC qui infiltrent la peau expriment CXCR3, récepteurs des chimiokines CXCL9 (monokine induced by IFN- γ , Mig), CXCL10 (IP-10) et CXCL11 (interferon-inducible T cell α chemoattractant, I-TAC) (Albanesi et al., 2001; Flier et al., 1999). Des analyses comparatives de l'expression de récepteurs à chimiokines des LT CD4⁺ et CD8⁺ montrent une forte expression de CXCR3 par les LT CD8⁺ et de CCR4 par les LT CD4⁺, récepteur de CCL17 (TARC) et de CCL22 (macrophages derived chemokine, MDC) (Iellem et al., 2001; Sebastiani et al., 2002). En effet, le couple CXCR3/CXCL10 semble jouer un rôle important dans le recrutement des LT CD8⁺, alors que les LT CD4⁺ semble recrutés par CCR4/CCL17 (Reiss et al., 2001). Une fois recrutés dans la peau, les LT activés représentent une véritable source de chimiokines.

Les mécanismes impliqués dans l'initiation du recrutement des LT sont encore mal connus : est-ce l'activation de quelques LT spécifiques présents dans la peau grâce à la circulation de LT (par la voie sanguine) qui initie le recrutement d'autres LT spécifiques, ou est-ce la sécrétion de chimiokines par les KC suite à la toxicité de l'haptène qui recrute les LT ? Une étude favorise cette deuxième hypothèse en montrant l'expression de CCL2 (MCP-1) par les cellules épidermiques avant même l'arrivée des premiers LT CD8⁺ (Goebeler et al., 2001). De plus, la surexpression de CCL2 au niveau de KC de souris transgéniques entraîne une HSRC augmentée associée à une augmentation de l'infiltrat cellulaire (Nakamura et al., 1995). Donc CCL2 semble être un candidat intéressant dans l'initiation du recrutement des LT ; de même que le TNF- α qui comme nous l'avons vu induit la sécrétion d'IL-8 (cf. chapitre III-3.5.1). Ensuite, l'arrivée des LT CD8⁺ coïncide avec l'expression de CXCL9, CXCL10, CCL5, CCL17 et CCL22 qui sont détectées dans la peau à partir de 12 heures. Et l'expression de CCL17 et CCL22 augmente pour atteindre un maximum vers 48 heures (Goebeler et al., 2001). Ainsi l'arrivée précoce des premiers LT CD8⁺, associée à une forte production d'IFN- γ , induirait la sécrétion des chimiokines CXCL9 et CXCL10 par les KC et d'autres cellules de la peau (Albanesi et al., 2001). Ces chimiokines attirent préférentiellement les LT CD8⁺, qui expriment de fort niveau de CXCR3 (Bonecchi et al., 1998). En effet, des souris déficientes en CXCL10 présentent un défaut de recrutement des LT producteurs d'IFN- γ au niveau de la peau et une incapacité à développer une réaction d'HSRC (Dufour et al., 2002). Puis l'expression maximale de CCL17, plus tardive permettrait le recrutement des LT CD4⁺. CCL27 (cutaneous T cell attracting chemokine, CTACK) est une autre chimiokine décrite dans l'adressage cutané des LT CD4⁺ (Homey et al., 2002). Cette chimiokine se lie à son récepteur CCR10 qui est présent à la fois à la surface des LT CD4⁺ et CD8⁺. CCL27 est constitutivement exprimée par les KC et voit sa production augmenter en présence d'IL-1 β et de TNF- α (Homey et al., 2000). Les LT sont également caractérisés par une forte expression la molécule d'adressage cutané CLA (Borges et al., 1997).

Le rôle effecteur des LT CD8⁺ cytotoxiques

Une fois recrutés dans la peau, les LT CD8⁺ établis pendant la phase de sensibilisation reconnaissent spécifiquement, via leur TCR, les peptides hapténisés présentés par les CPA cutanées. La reconnaissance spécifique de peptides hapténisés par les LT s'accompagne de la libération de cytokines de type 1 dont l'IFN- γ . La présence d'IFN- γ induit la production de

chimiokines décrites précédemment, ainsi que la synthèse d'IL-1 α , IL-6, TNF- α , IL-8, GM-CSF, CCL2 et MIP-2 par les cellules dermiques et épidermiques ce qui amplifie la réponse inflammatoire avec l'induction du recrutement de monocytes inflammatoires et de LT. Par ailleurs, les mastocytes jouerait un rôle important dans le recrutement des neutrophiles et des LT CD8⁺ au cours de l'HSRC. En effet, les mastocytes du derme ont été décrits comme essentiels dans le contrôle du recrutement des neutrophiles dans l'HSRC via leur sécrétion de TNF- α et de MIP-2 (Biedermann et al., 2000; Wang and Thorlacius, 2005). Le TNF- α faciliterait l'infiltrat par l'augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1, et MIP-2 serait responsable du gradient chimiotactique et de la migration des neutrophiles vers le site de l'inflammation. De plus, une autre étude montre que l'intensité de l'infiltrat de neutrophiles contrôle le nombre de LT CD8⁺ spécifiques recrutés au site de révélation (Engeman et al., 2004). Donc les mastocytes en plus d'être impliqués dans l'amplification de l'immunité innée et la migration de CL, semblent être déterminants dans le recrutement des LT CD8⁺ effecteurs de l'HSRC, plaçant les mastocytes au centre de la réponse immunitaire cutanée induite par les haptènes.

Au cours de l'HSRC, la seule libération d'IFN- γ par les LT CD8⁺ ne semble pas être suffisante à la génération de l'inflammation. En effet, des souris déficientes pour les deux voies de cytotoxicité des LT CD8⁺, Fas/FasL et perforine, sont incapables de développer une réponse d'HSRC, bien que les LT CD8⁺ spécifiques producteurs d'IFN- γ aient été identifiés au niveau de la zone d'application de l'haptène (Kehren et al., 1999). La nécessité d'une invalidation des deux voies de cytotoxicité, Fas/Fas-L et perforine, pour supprimer l'inflammation, suggère la participation de chacune d'elles dans le processus inflammatoire (Kehren et al., 1999). L'IFN- γ serait en fait impliqué dans l'intensité de l'inflammation (Lu et al., 1998a; Saulnier et al., 1995), en induisant l'augmentation de l'expression de Fas sur les KC, les rendant plus sensibles à l'apoptose (Trautmann et al., 2001). Les KC se apparaissent comme les principales cellules cibles de l'effet cytotoxique des LT CD8⁺ (Traidl et al., 2000). L'apoptose des KC coïncide avec l'arrivée des LT CD8⁺ au niveau de l'épiderme et augmente proportionnellement au nombre de LT CD8⁺ infiltrant la peau (Akiba et al., 2002). Ces dommages pourraient faciliter l'accès de l'haptène jusqu'au derme, donnant lieu à une apoptose des cellules endothéliales (Trautmann et al., 2001).

Par ailleurs, les cellules NK (natural killer) représentant une sous-population des lymphocytes qui possèdent une activité cytotoxique spontanée, ont été décrites comme des cellules effectrices dans l'HSRC. Des souris dépourvues de LT et LB sont capables de faire

une HSRC au DNFB (O'Leary et al., 2006), cependant l'implication des cellules NK au cours de la sensibilisation et/ou de la révélation n'est pas encore connue.

L'activation et le recrutement cutané des LT CD8⁺ spécifiques de l'haptène entraînent une cascade de production de cytokines et de chimiokines, conduisant à l'infiltration massive de cellules mononucléées responsables de l'inflammation, et de la détérioration du tissu. Après un maximum atteint entre 24 et 48 heures, l'inflammation diminue lentement, alors que l'haptène est encore présent. Ceci suggère donc un phénomène de régulation active qui limite l'extension du tissu endommagé et assure le maintien de l'intégrité de la peau.

4.2.2. La régulation de l'inflammation

L'infiltrat des LT CD8⁺, qui atteint son maximum vers 24 heures (Akiba et al., 2002), est suivi d'une arrivée massive de cellules CD4⁺ de type Th2 contenant les LT régulateurs entre 24 et 36 heures (Cavani et al., 2001).

Comme nous l'avons évoqué précédemment, ce recrutement tardif et massif de LT CD4⁺ de type Th2 peut s'expliquer par la recirculation de ces cellules au niveau des ganglions drainants lors d'une seconde exposition à l'haptène (Tang and Cyster, 1999). Une autre hypothèse suggère l'implication de la chimiokine CCL1 sécrétée par les LT CD8⁺ activés au niveau de la peau, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de CCL22 par les macrophages activés (Sallusto et al., 1999a). Ces deux chimiokines attirent spécifiquement les LT de type Th2 qui expriment CCR4 et CCR8. CCL1 attirerait plus précisément les LT régulateurs producteurs d'IL-10 et spécifiques de l'haptène, appelées les cellules Tr1 (Sebastiani et al., 2001).

Si le rôle des LT CD4⁺ dans la régulation de l'intensité et de la durée de l'HSRC semble évident, la nature précise de cette (ces) sous-population(s) CD4⁺ n'est pas clairement définie. Trois sous-populations de LT CD4⁺ régulateurs, l'une non spécifique d'haptène (LT CD4⁺ CD25⁺) (Dubois et al., 2003b), les deux autres spécifiques (LT Th2 et Tr1) (Cavani et al., 2000; Xu et al., 1996), ont plus particulièrement été étudiées dans l'eczéma. Elles sont toutes les trois capables de synthétiser en grande quantité des cytokines immunosuppressives (IL-10 ou TGF-β). Une synergie entre les différentes sous-populations de LT CD4⁺ est envisageable, de même qu'une interaction avec d'autres types cellulaires.

Les cellules Tr1 sécrètent principalement de l'IL-10 qui bloque la présentation de l'antigène par les CD, inhibant ainsi la fonction des LT effecteurs dans les ganglions (Cavani

et al., 2000). Au niveau du derme, la libération d'IL-10 par les cellules régulatrices semble se produire dès leur arrivée puis retrouve en quelques heures un niveau basal (Sebastiani et al., 2001). Ce pic majeur d'IL-10 serait suffisant pour induire l'arrêt de l'expansion du processus inflammatoire observé à 24 heures après le contact avec l'haptène. D'autres types cellulaires comme les KC produisent de l'IL-10 (Enk and Katz, 1992b; Kondo et al., 1994) dont la production assurerait un maintien de l'effet suppresseur induit par la libération massive d'IL-10 par les LT CD4⁺. De plus, dans plusieurs modèles d'HSRC chez la souris, les LT CD4⁺ sécréteurs d'IL-10 ont été décrits comme responsables de la tolérance aux haptènes (Artik et al., 2001; Desvignes et al., 2000; DiIulio et al., 1996). Les cellules Tr1 sont principalement induites par la présence d'IL-10 et de TGF-β, tandis que les CD4⁺ CD25⁺ sont des cellules régulatrices « naturellement » présentes.

Plus récemment, des LT CD4⁺ exprimant constitutivement CD25⁺ (IL-2Rα) ont été identifiés chez l'homme et chez la souris (Sakaguchi et al., 2001; Shevach, 2002). Ces cellules sont anergiques suite à l'activation du TCR *in vitro*. Elles expriment le facteur de transcription Foxp3, essentiel à leur développement et leur fonction suppressive (Fontenot et al., 2003) et la molécule de co-stimulation GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor) (Ronchetti et al., 2004). Les LT CD4⁺ CD25⁺ expriment aussi fortement CTLA-4 (impliqué dans la tolérance périphérique) et 30% des LT CD4⁺ CD25⁺ circulants expriment CLA, ce qui suggère qu'ils pourraient rapidement être recrutés dans la peau lors d'une inflammation. Des expériences d'inhibition de prolifération des LT CD4⁺ CD25⁻ par des LT CD4⁺ CD25⁺ montrent leur rôle inhibiteur en réponse à différents antigènes (Cavani et al., 2003). Les LT CD4⁺ CD25⁺ inhibent la production d'IL-2 et induisent l'arrêt du cycle cellulaire des LT CD8⁺ ou CD4⁺ par un mécanisme de contact cellule à cellule probablement via CTLA-4 et le TGF-β membranaire, mais indépendant de l'IL-10 (Shevach, 2002, pour revue Romagnani, 2006)). De plus, l'effet immunosuppresseur des cellules T CD4⁺ CD25⁺ n'est pas spécifique de l'antigène : une fois activées par un antigène donné, ces LT peuvent supprimer une réponse proliférative des LT CD4⁺ CD25⁻ de spécificité antigénique différente (Thornton and Shevach, 2000). Les LT CD4⁺ CD25⁺ sont impliqués dans la régulation de l'eczéma, ainsi que dans le phénomène de tolérance aux haptènes (Dubois et al., 2003a; Dubois et al., 2003b).

Ainsi, le système immunitaire a la capacité intrinsèque de réguler la réponse lymphocytaire T aux haptènes dont les pathologies se développent seulement dans le cadre d'une rupture de l'équilibre entre les réponses effectrices et régulatrices.

En résumé de cette étude bibliographique, les connaissances actuelles sur la physiopathologie de l'inflammation cutanée supportent l'hypothèse selon laquelle l'activation des LT spécifiques d'antigène, à l'origine des eczémas allergiques, dépend d'événement précoces qui impliquent l'activation de l'immunité cutanée innée, responsable des eczémas irritants. Cette dernière est ainsi capable d'influencer l'induction de la réponse adaptative notamment via la sécrétion de cytokines favorisant la migration des CD de la peau jusqu'aux ganglions drainants. Le développement de l'eczéma allergique de contact semble donc dépendre très fortement des propriétés irritantes de l'haptène qui pourrait impliquer la voie des TLR. Les travaux personnels qui suivent analysent le lien entre irritation et allergie cutanée et démontrent, grâce à l'utilisation de modèles animaux, que l'hypothèse formulée ci-dessus est juste.

RESULTATS

Article n°1 :

**Skin contact irritation conditions the development and the severity of
allergic contact dermatitis**

**M. Bonneville, A. Hennino, M. Vocanson, C. Chavagnac, J. Bénetière, I. Pernet, A. Denis,
and JF Nicolas.**

Manuscrit accepté pour publication au Journal Investigative of Dermatology

La dermatite irritante de contact (DIC) est une maladie inflammatoire de la peau induite par des chimiques de faible poids moléculaire, tels les haptènes qui sont doués de propriétés pro-inflammatoires. La dermatite allergique de contact est une complication fréquente de la DIC. Elle est induite par des lymphocytes T spécifiques de l'haptène qui sont activés dans les ganglions drainants par les cellules dendritiques (CD) cutanées ayant migrées. Le but de cette étude est d'analyser la relation entre la DIC et la DAC au DNFB dans les souris C57BL/6 et BALB/c, qui développent une inflammation cutanée respectivement sévère et modérée (Figures 1 et 3).

Nous utilisons le modèle de la DAC primaire, où une seule exposition au DNFB induit en quelques heures une DIC non spécifique puis une réponse allergique spécifique à partir de 6 jours (Figure 3). Suite à l'application cutanée de DNFB, les souris C57BL/6 développent une réponse de DIC dépendante de la dose, sévère (Figure 1) et associée à une plus forte augmentation d'ARNm codant pour les interleukines (IL)-1 β , IL-6 et IL-10 par rapport aux souris BALB/c (Figure 2). L'exposition de la peau à une faible dose de DNFB génère dans les deux souches, une faible DIC qui se résout en quelques heures. Alternativement, l'application cutanée d'une concentration intermédiaire ou forte de DNFB induit une DIC déclenchant une DAC dont l'intensité est proportionnelle à l'intensité de la DIC, et qui est plus forte dans les souris C57BL/6 versus BALB/c. En conclusion, l'irritation cutanée de contact induite par les haptènes conditionne le développement et la sévérité de la DAC.

Skin contact irritation conditions the development and severity of allergic contact dermatitis

Marlene Bonneville¹, Cyril Chavagnac¹, Marc Vocanson¹, Aurore Rozieres¹, Josette Benetiere¹, Ingrid Pernet², Alain Denis², Jean-Francois Nicolas^{1,3,4} and Ana Hennino¹.

AFFILIATION

1 : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U503, IFR128, BioSciences Lyon-Gerland, Lyon F-69007, France

2 : Développement Industrialisation et Promotion de Technologies Avancées (DIPTA) SAS, 505 rue Pierre Berthier, F-13855, Aix-en-Provence, France

3 : CH Lyon-Sud, Department of Clinical Immunology and Allergy, Pierre-Benite, F-69495, France

4: UFR Lyon-Sud, UCB Lyon1, Oullins, F-69600, France.

CORRESPONDENCE

J-F. NICOLAS, UCBL-INSERM U503, IFR128, 69375 Lyon Cx 07.

Phone: 33-437-282-348 Fax: 33-478-861-528. E-mail: nicolas@cervi-lyon.inserm.fr

KEY WORDS: Allergy, skin innate immunity, contact dermatitis, hapten, inflammation

RUNNING HEAD: Skin contact irritation and allergy

ABSTRACT

Irritant contact dermatitis (ICD) is a frequent inflammatory skin disease induced by skin contact with low m.w. chemicals such as haptens endowed with pro-inflammatory properties. Allergic contact dermatitis (ACD) is a frequent complication of ICD and is mediated by hapten-specific T cells primed in lymph nodes by skin emigrating DC. The aim of the present study was to analyze the relationship between ICD and ACD to DNFB in C57BL/6 and BALB/C mice, which develop a severe and a moderate skin inflammation, respectively. Upon a single skin painting with DNFB, C57BL/6 developed within hours a more severe dose-dependent ICD response as compared to BALB/C mice, which was associated with enhanced up-regulation of interleukin (IL)-1 β , IL-6 and IL-10. Skin exposure to a low dose of DNFB resulted, in both strains, in a low ICD that resolved in a few hours. Alternatively, skin painting with either an intermediate or a high DNFB concentration induced an ICD that subsequently gave rise to an ACD reaction whose intensity was proportional to the magnitude of the ICD response and was more severe in C57BL/6 mice than in BALB/C mice. In conclusion, the hapten-induced skin contact irritation conditions the development and the severity of ACD.

INTRODUCTION

Contact dermatitis (CD) is a frequent inflammatory skin disease induced by skin exposure to low m.w. chemicals, endowed with both pro-inflammatory and antigenic properties (Rowland et al., 2001; Saint-Mezard et al., 2004b). Through their pro-inflammatory properties, haptens generate a non antigen-specific skin inflammation also known as irritant contact dermatitis (ICD) (Basketter et al., 1999). Following contact with the skin, haptens cause activation of skin cells resulting in the rapid production of a whole array of inflammatory cytokines (including IL-1 β , IL-6, TNF- α) and chemokines (including CCL20) involved the recruitment and activation of dendritic cell (DC) precursors and in the migration of skin DC to draining lymph nodes (LNs) (for review (Pastore et al., 2004; Saint-Mezard et al., 2004b). In addition, haptens become immunogenic after covalent binding to discrete amino-acid residues of proteins and by generating modified self proteins to induce allergic contact dermatitis (ACD) (Lepoittevin and Leblond, 1997; Smith Pease et al., 2003). ACD, also referred to as contact sensitivity (CHS) is a DTH reaction mediated by hapten-specific T cells, which are primed in LNs and recruited in the skin during the afferent and efferent phase of the reaction, respectively (Blauvelt et al., 2003; Saint-Mezard et al., 2004b). Upon skin

contact, the hapten is taken up by immature skin DCs which migrate from the skin to the paracortical area of draining LNs, where they prime hapten-specific T cells through presentation of hapten-protein complexes on MHC molecules (Bour et al., 1995; Krasteva et al., 1998). A subsequent skin challenge with the same hapten leads to the rapid recruitment of effector T cells in the skin, that initiate inflammation via induction of keratinocyte apoptosis (Bour et al., 1995; Kehren et al., 1999). We and others have demonstrated that ACD to the strong hapten dinitrofluorobenzene (DNFB) in mice is mediated by CD8⁺ cytotoxic T cells and down-regulated by CD4⁺ T cells (Girolomoni et al., 2004; Gorbachev and Fairchild, 2001; Saint-Mezard et al., 2004a).

Clinical evidence supports the hypothesis that ICD promotes the development of ACD and conditions its severity (Uter et al., 2005). Furthermore, it is widely accepted that the susceptibility of individuals to develop ACD directly correlates with the pro-inflammatory properties of haptens (Smith et al., 2002). The severity of ACD can greatly vary from a mild and transient skin inflammation with pruritus and redness only to a severe long lasting exsudating dermatitis. Factors which control the severity of ACD include the nature of haptens (ranging from strong to weak sensitizers), their concentrations and the conditions of exposure, most of ACD responses being observed in occupational settings (Kimber et al., 2003). Indeed, haptens comprise very diverse chemicals, including a limited number of strong contact sensitizers able to sensitize more than 90% of naive individuals after a single skin contact and thousands of weak haptens that can induce sensitization in a small proportion of individuals only (occupational disease) (Diepgen and Kanerva, 2006; Pierard-Franchimont et al., 2006). Although the ability of a given hapten to induce ACD is linked to its antigenicity, its intrinsic pro-inflammatory property is essential for efficient priming of specific T-cell precursors (Enk and Katz, 1992; Flint et al., 1998; Le Borgne et al., 2006) Bonneville *et al.*, 2006 submitted for publication). It has been known for nearly 40 years that irritation/inflammation can enhance ACD responses. Experimental studies in guinea pig models (Magnusson and Kligman, 1969) as well as in human maximization tests (Kligman, 1966) have shown that co-administration of adjuvants or irritants with haptens could markedly increase the hapten-induced ACD reaction. However, evidence that the quality and magnitude of the ACD reaction depends on the nature and strength of the inflammatory signals delivered by haptens during the course of ICD reactions is still lacking.

Here, we investigated the relationship between ICD and ACD reactions in C57BL/6 (B6) and BALB/C (BALB) mice, which develop a severe or mild skin inflammation to

DNFB, respectively. We used the model of primary CHS induced by a single DNFB painting on the ear (Saint-Mezard et al., 2003). In this model, persistence of the hapten in the skin for several days leads within 6 days to the development of hapten-specific T cells which can infiltrate the sensitized skin site and induce a CHS reaction. Therefore, in primary CHS, the magnitude of the skin inflammation at day 6 depends solely on the antigenic and pro-inflammatory signals delivered by hapten exposure at day 1, allowing a direct comparison of both ICD and ACD responses in different strains of mice. We show that ICD responses are dose-dependent and much higher in B6 than in BALB mice. More importantly, the intensity of the ACD reaction is correlated to that of the ICD response, demonstrating that the hapten-induced skin contact irritation conditions the development and the severity of ACD.

RESULTS

ICD responses are more severe in C57BL/6 mice than in BALB/C mice.

Different doses of DNFB (0.1%, 0.3% or 0.5%) applied onto the ear induced an ICD reaction manifested by ear swelling, which developed within 1 hour after DNFB painting in both BALB and B6 mice. The ICD reaction was dose-dependent and presented as a mild, moderate and severe skin inflammation in response to low, intermediate and high DNFB concentrations, respectively (**Figure 1a and 1b**). The ICD reactions were dramatically higher in B6 (**Figure 1b**) than in BALB mice (**Figure 1a**). Indeed, at each DNFB concentration, ear swelling was 3 fold higher in B6 skin as compared to BALB mice. Thus, the skin of B6 mice seems to be more sensitive to the pro-inflammatory effects of DNFB than that of BALB mice.

The peak and the kinetics of the ICD reaction varied between the two strains. In BALB mice, the ICD peaked between 1 and 3 hours irrespective of the dose and decreased thereafter. Alternatively, in B6 mice, only low DNFB concentration induced an ICD reaction with a peak at 1 hour; intermediate and high concentrations of DNFB resulted in an ICD peak delayed at 3-6 hours with persistence of the skin inflammation up to 24 hours after sensitization.

Histological analysis of 0.3% DNFB-treated ears at 6 hours after skin painting confirmed that the skin inflammation, as revealed by dermal edema and cell infiltration in the dermis, was more pronounced in B6 (**Figure 1c, panel 4**) than in BALB mice (**Figure 1c, panel 3**). Collectively these results show that B6 mice have a “high ICD responder” status whereas BALB mice have a “low ICD responder” status.

The severity of ICD correlates with high levels of IL-1 β /IL-6 mRNA and low levels of IL-10 mRNA.

To get better insights into the molecular mechanisms involved in the development of ICD reactions we next analyzed, by RNA protection assay, the expression of pro-inflammatory (IL-1 α , IL-1 β , IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in the ear skin, 3 hours after skin exposure to DNFB. The ear skin of naive and vehicle-treated BALB mice contained only trace amounts of IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 mRNA (**Figure 2**). DNFB sensitization induced a dose-dependent up-regulation of both IL-1 β and IL-6 (**Figure 2b**) with a 2 and 4 fold increase in the levels of both cytokines induced by 0.3% and 0.4% DNFB, respectively, as compared to 0.1% DNFB. IL-10 mRNA upregulation was lower than that of IL-1 β and IL-6. No significant up-regulation of IL-1 α mRNA was observed at any DNFB concentration (**Figure 2a**). Similar up-regulation of IL-1 β and IL-6, and too a lesser extend of IL-10, was found in DNFB-painted B6 mice (data not shown). These results show that in both mouse strains, the intensity of ICD is correlated with the production of IL-1 β and IL-6 by skin cells.

Next, we compared the levels of IL-1 β and IL-10 in the skin of B6 and BALB mice at 3 and 6 hours after DNFB painting. The high ICD responder B6 mice produce twice more IL-1 β mRNA than BALB mice (**Figure 2c**). Alternatively, expression of IL-10 mRNA was consistently higher in the low ICD responder BALB as compared to B6 mice (**Figure 2d**). These results suggest that the differential production of pro- and anti-inflammatory cytokines may explain the differences in the intensity of ICD reactions observed in B6 and BALB mice.

The intensity of ICD reaction dictates the severity of ACD responses.

Mice were sensitized by DNFB and ear swelling was measured the following hours (for ICD) and every day from day 4 until day 16 (for ACD). As previously observed, B6 mice developed a more intense dose-dependent ICD as compared to BALB mice (**Figure 3a and 3b**, left panel). In both strains, intermediate and high DNFB concentrations induced typical ACD responses characterized by bell-shaped ear swelling curves, which peaked between day 6 to 8 depending on the hapten concentration and on the mouse strain (**Figure 3a and 3b**, right panel). Down-regulation of ACD reaction started at day 9 and was almost complete by day 16. For each mouse strain, the intensity of ACD reactions was proportional to the concentration of DNFB used for sensitization and therefore directly

correlated to the magnitude of the ICD reaction. Consequently, B6 mice developed more severe ACD reactions than BALB mice. Of note, a low DNFB concentration was responsible for an early ICD reaction but was unable to induce an ACD reaction irrespective of the mouse.

Since we have previously shown that the ACD is mediated by IFN- γ -producing CD8⁺ T cells primed in draining LNs and recruited in the skin (Kehren et al., 1999), we next analyzed the T cell response in the skin and auricular draining LNs of B6 and BALB mice sensitized with DNFB. We observed a direct correlation between i) the severity of the ICD reaction, ii) the numbers of DNFB-specific CD8⁺ T cells in LNs (ELISPOT assay), iii) the magnitude of the recruitment of IFN- γ -producing CD8⁺ T cells (RT-PCR analyses) and iv) the intensity of ACD at day 6 (data not shown).

DISCUSSION

The present study shows that the development and severity of ACD depend on the quality and magnitude of the ICD reaction. Skin exposure to increasing doses of DNFB induced a dose-dependent ICD, which developed as early as 1 hour after skin painting and resolved in a few hours to a few days depending on the DNFB concentration. More importantly, the intensity of ACD was proportional to the concentration of DNFB used for sensitization and therefore directly correlated to the magnitude of the ICD reactions. B6 mice were more sensitive than BALB mice to the pro-inflammatory effect of DNFB and exhibited a 3 fold increase in both immediate ICD and late ACD responses.

ICD is the clinical outcome of the rapid release of pro-inflammatory cytokines in skin sites exposed to haptens that promote local recruitment of inflammatory cells from blood. *In vivo* and *in vitro* studies have documented that haptens can activate skin cells and induce the production of several cytokines including IL-1 β which, by stimulating the migration of skin DC to lymph nodes, has a key role in sensitization. Lack of IL-1 β results in failure to initiate ACD (Effendy et al., 2000; Enk et al., 1993; Shornick et al., 1996). Alternatively, IL-10 is an important down-regulatory factor for ACD and acts by inhibiting effector T cell activation. Our data confirm previous studies showing the rapid up-regulation of IL-1 β , IL-6 and IL-10 by skin cells exposed to strong haptens (Enk and Katz, 1992; Kondo et al., 1994) and further show that the intensity of ICD is proportional to the level of IL-1 β and IL-6 transcripts, both in B6 and BALB mice. More importantly, B6 and BALB mice which

develop severe and mild ICD reactions, respectively, express an opposite pattern of production of IL-1 β and IL-10. The IL-1 β /IL-10 ratio is dramatically higher in B6 than in BALB mice, suggesting that the strain differences in the intensity of ICD could rely on the intrinsic ability of a mouse strain to produce pro-inflammatory rather anti-inflammatory cytokines following hapten stimulation.

Besides cytokine production, hapten sensitization leads within a few hours to the recruitment from blood of myeloid DC precursors and migration of immature skin DC to lymph nodes. We and others have recently shown that hapten-induced recruitment of blood DC precursors into the skin dictates the severity of allergic contact dermatitis (Le Borgne et al., 2006) Bonneville *et al.*, 2006 submitted for publication). Interestingly, we found that upon DNFB painting, more blood-derived DC precursors are recruited from blood into skin in the high ACD responder B6 mice as compared to the low ACD responder BALB mice. Consequently, higher numbers of skin emigrating DC reaching the draining lymph node and enhanced numbers of effector T cells were primed in B6 mice versus BALB mice. Thus, the correlation between the irritant properties of haptens and the magnitude of the ACD reaction suggests that the skin recruitment of DC precursors results from the adjuvant properties of haptens.

The initial dogma according which immunity results from “self non self discrimination” has recently been challenged by the “danger signal” model, which proposes that the strength of inflammatory signal delivered by the immunogen dictates the outcome of immunisation on sensitization or tolerance (Matzinger, 2002). Haptens, by modifying self proteins generate new antigenic motifs presented to specific T cell precursors. However, not all haptens are capable of sensitization after a single skin exposure and we have reported that weak haptens such as fragrance allergens are unable to prime ACD effector T cells (Vocanson et al., 2006). Indeed, weak haptens can lead to sensitization under specific conditions only, including higher and more frequent exposures. Thus, recognition of hapten-modified self peptides by T cells does not preclude induction of hapten-specific T cell-mediated skin inflammation. Alternatively, our data support that sufficient “danger signal” provided by haptens at the site of sensitization and manifested by pro-inflammatory cytokine and chemokine production is a pre-requisite for generation of ACD. That strong haptens are able to deliver potent danger signals to skin innate immunity was

recently demonstrated by Leborgne *et al.* who showed that DNFB behaves as an adjuvant able to promote the priming of CD8⁺ T cells specific to an irrelevant co-administered protein antigen (Le Borgne *et al.*, 2006). Along these lines, Grabbe *et al.* reported that a given hapten could promote induction of an ACD reaction in response to a non cross-reactive hapten (Grabbe *et al.*, 1996). Indeed, oxazolone-specific ACD could develop in oxazolone-sensitized mice upon challenge with both oxazolone and TNCB at infra-optimal doses unable to sensitize for ACD. Our data further emphasize that the danger signal provided by the strong hapten DNFB is dose-dependent and conditions the intensity of the ICD reaction. Indeed, the two high DNFB concentrations (0.3 and 0.5%) induced dose-dependent ICD leading to ACD responses, while the low DNFB dose (0.1%) resulted in a mild ICD reaction, correlated with low levels of IL-1 β , unable to give rise to an ACD response. As previously shown, decreasing further the DNFB concentration to as low as 0.01%, a concentration devoided of irritant properties, is responsible for tolerance to DNFB, which prevents the development of ACD to high DNFB concentrations (Maurer *et al.*, 2003). Collectively, these observations strongly support that the adjuvant properties of strong haptens contribute in both ICD and ACD and further emphasize that "danger" signals depending on the intrinsic pro-inflammatory properties of the hapten and on the skin sensitivity of the host are required for induction of the initial ICD reaction that contributes to the severity of ACD.

Although the reason why different individuals develop severe or mild ACD reactions in response to identical hapten stimulation is not known, our results indicate that the genetic susceptibility to the adjuvant effect of haptens is the crucial parameter that conditions the magnitude of ACD. B6 skin cells appears more sensitive to the DNFB-induced inflammatory signals than BALB skin cells inasmuch as they produce higher levels of IL-1 β and IL-6 (Figure 2) and increased amounts of CCL20, a chemokine involved in the recruitment of blood DC precursors into the skin (Le Borgne *et al.*, 2006) Bonneville *et al.*, 2006 submitted for publication). In addition, the variable susceptibility to ACD in B6 and BALB mice could be explained by strain-dependent differences in mast cell and macrophage functions. Indeed, following stimulation with Toll-like receptor ligands like LPS, peritoneal macrophages of B6 mice produce higher levels of TNF- α (Watanabe *et al.*, 2004), which induces DC migration to LNs. In addition, mast cells were shown to contribute to ACD via release of TNF- α and MIP-2 (Biedermann *et al.*, 2000). At

the basal state, mast cells are more abundant in skin of B6 than of BALB mice and produce, following UV stimulation (Hart et al., 1998) and anti-IgE induced activation (Noguchi et al., 2005), increased levels of immediate mediators including histamine and β -hexosaminidase. Since histamine is involved in vasodilatation and vasopermeation, its enhanced secretion by B6 mast cells may also contribute to the increased dermal oedema by allowing more efficient recruitment of blood cells, through interaction with H1-receptors on endothelial cells.

In conclusion our data demonstrate that the development and severity of ACD depend on early inflammatory events occurring within hours after sensitization and suggest that genetic susceptibility of ACD in human may result from differences in host sensitivity to the adjuvant effect of haptens that could explain the diversity of clinical presentations of ACD among patients.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Female C57BL/6 and BALB/c mice (7-10 weeks of age) were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Animals were left to acclimate for one week before entering the study. Five mice were used per group. Mice were provided food and water ad libidum. All experimental procedures were in accordance with the CREEA (Comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale) guidelines on animal welfare.

Reagents

2,4-dinitro-fluorobenzene (DNFB) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was diluted in acetone:olive oil vehicle (4:1 vol/vol), freshly before application.

Assay for primary allergic contact sensitivity

The model has been described extensively elsewhere (Saint-Mezard et al., 2003). Naive mice were sensitized at day 0 by a single application of various doses of DNFB applied on the left ear, whereas the same volume of vehicle was applied on the right ear. At various time after ear sensitization, ear thickness was measured with a spring-loaded micrometer (J15, Blet SA, Lyon, France). Ear swelling was calculated by subtracting the initial value from the value recorded on the corresponding time, and further subtracting any swelling recorded for vehicle-control ear from ear swelling recorded for the hapten-applied ear.

Histology

Ears were fixed in a 3% formalin solution for 24 hours and processed whole through a routine 15 hours cycle to paraffin wax embedding. 4 µm sections were cut using a microtome and mounted on Superfrost® Plus slides. Sections were dried overnight at 37°C. The slides were dewaxed in Ottix® baths and staining according to routine hematoxylin and eosin (HE) staining procedure.

mRNA extraction and multiprobe RNase protection assays

At 3 and 6 hours after the ear painting, ear samples were collected from vehicle and DNFB-treated mice and frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using the RNAXEL kit (Eurobio, F-91953, Les Ulis, France). Chemokines mRNA levels were measured by RNase protection assays using the Riboquant kit (BD Pharmingen) following the instructions of the supplier. The quantity of protected mRNA was determined using a PhosphorImager and ImageQuant software (all from Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

REFERENCES

- Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I., and Willis, C. (1999). Contact irritation mechanisms. In *Toxicology of contact dermatitis* (Wiley J & sons), pp. 11-38.
- Biedermann, T., Kneilling, M., Mailhammer, R., Maier, K., Sander, C. A., Kollias, G. *et al.* (2000). Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J Exp Med* *192*, 1441-1452.
- Blauvelt, A., Hwang, S. T., and Udey, M. C. (2003). 11. Allergic and immunologic diseases of the skin. *J Allergy Clin Immunol* *111*, S560-570.
- Bour, H., Peyron, E., Gaucherand, M., Garrigue, J. L., Desvignes, C., Kaiserlian, D. *et al.* (1995). Major histocompatibility complex class I-restricted CD8⁺ T cells and class II-restricted CD4⁺ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol* *25*, 3006-3010.
- Diepgen, T. L., and Kanerva, L. (2006). Occupational skin diseases. *Eur J Dermatol* *16*, 324-330.
- Effendy, I., Loffler, H., and Maibach, H. I. (2000). Epidermal cytokines in murine cutaneous irritant responses. *J Appl Toxicol* *20*, 335-341.
- Enk, A. H., Angeloni, V. L., Udey, M. C., and Katz, S. I. (1993). An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 beta in the initiation of primary immune responses in skin. *J Immunol* *150*, 3698-3704.
- 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.
- Flint, M. S., Dearman, R. J., Kimber, I., and Hotchkiss, S. A. (1998). Production and in situ localization of cutaneous tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 6 (IL-6) following skin sensitization. *Cytokine* *10*, 213-219.
- Girolomoni, G., Gisondi, P., Ottaviani, C., and Cavani, A. (2004). Immunoregulation of allergic contact dermatitis. *J Dermatol* *31*, 264-270.
- Gorbachev, A. V., and Fairchild, R. L. (2001). Induction and regulation of T-cell priming for contact hypersensitivity. *Crit Rev Immunol* *21*, 451-472.
- Grabbe, S., Steinert, M., Mahnke, K., Schwartz, A., Luger, T. A., and Schwarz, T. (1996). Dissection of antigenic and irritative effects of epicutaneously applied haptens in mice. Evidence that not the antigenic component but nonspecific proinflammatory effects of haptens determine the concentration-dependent elicitation of allergic contact dermatitis. *J Clin Invest* *98*, 1158-1164.
- Hart, P. H., Grimbaldston, M. A., Swift, G. J., Jaksic, A., Noonan, F. P., and Finlay-Jones, J. J. (1998). Dermal mast cells determine susceptibility to ultraviolet B-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice. *J Exp Med* *187*, 2045-2053.
- Kehren, J., Desvignes, C., Krasteva, M., Ducluzeau, M. T., Assossou, O., Horand, F. *et al.* (1999). Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity. *J Exp Med* *189*, 779-786.
- Kimber, I., Basketter, D. A., Butler, M., Gamer, A., Garrigue, J. L., Gerberick, G. F. *et al.* (2003). Classification of contact allergens according to potency: proposals. *Food Chem Toxicol* *41*, 1799-1809.
- Kligman, A. M. (1966). The identification of contact allergens by human assay. 3. The maximization test: a procedure for screening and rating contact sensitizers. *J Invest Dermatol* *47*, 393-409.
- 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.
- Krasteva, M., Kehren, J., Horand, F., Akiba, H., Choquet, G., Ducluzeau, M. T., *et al.* (1998). Dual role of dendritic cells in the induction and down-regulation of antigen-specific cutaneous inflammation. *J Immunol* *160*, 1181-1190.
- Le Borgne, M., Etchart, N., Goubier, A., Lira, S. A., Sirard, J. C., van Rooijen, N., *et al.* (2006). Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8⁺ T cell crosspriming in vivo. *Immunity* *24*, 191-201.
- Lepoittevin, J., and Leblond, I. (1997). Hapten-peptide T cell receptor interactions: molecular basis for recognition of haptens by T lymphocytes. *Eur J Dermatol* *7*, 151-154.
- 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.
- Matzinger, P. (2002). An innate sense of danger. *Ann N Y Acad Sci* *961*, 341-342.
- Maurer, M., Seidel-Guyenot, W., Metz, M., Knop, J., and Steinbrink, K. (2003). Critical role of IL-10 in the induction of low zone tolerance to contact allergens. *J Clin Invest* *112*, 432-439.
- Noguchi, J., Kuroda, E., and Yamashita, U. (2005). Strain difference of murine bone marrow-derived mast cell functions. *J Leukoc Biol* *78*, 605-611.
- Pastore, S., Mascia, F., Mariotti, F., Dattilo, C., and Girolomoni, G. (2004). Chemokine networks in inflammatory skin diseases. *Eur J Dermatol* *14*, 203-208.
- Pierard-Franchimont, C., Quatresooz, P., Berardesca, E., Plomteux, G., and Pierard, G. E. (2006). Environmental hazards and the skin. *Eur J Dermatol* *16*, 322-324.
- Rowland, T. L., McHugh, S. M., Deighton, J., Ewan, P. W., Dearman, R. J., and Kimber, I. (2001). Differential effect of thalidomide and dexamethasone on the transcription factor NF-kappa B. *Int Immunopharmacol* *1*, 49-61.
- Saint-Mezard, P., Berard, F., Dubois, B., Kaiserlian, D., and Nicolas, J. F. (2004a). The role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol* *14*, 131-138.
- Saint-Mezard, P., Krasteva, M., Chavagnac, C., Bosset, S., Akiba, H., Kehren *et al.* (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.
- Saint-Mezard, P., Rosieres, A., Krasteva, M., Berard, F., Dubois, B., Kaiserlian, D., and Nicolas, J. F. (2004b). Allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol* *14*, 284-295.
- Shornick, L. P., De Togni, P., Mariathasan, S., Goellner, J., Strauss-Schoenberger, J., Karr, R. W., Ferguson, T. A., and Chaplin, D. D. (1996). Mice deficient in IL-1beta manifest impaired contact hypersensitivity to trinitrochlorobenzene. *J Exp Med* *183*, 1427-1436.
- Smith, H. R., Basketter, D. A., and McFadden, J. P. (2002). Irritant dermatitis, irritancy and its role in allergic contact dermatitis. *Clin Exp Dermatol* *27*, 138-146.
- Smith Pease, C. K., Basketter, D. A., and Patlewicz, G. Y. (2003). Contact allergy: the role of skin chemistry and metabolism. *Clin Exp Dermatol* *28*, 177-183.
- Uter, W., Johansen, J. D., Orton, D. I., Frosch, P. J., and Schnuch, A. (2005). Clinical update on contact allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* *5*, 429-436.
- Vocanson, M., Hennino, A., Cluzel-Tailhardat, M., Saint-Mezard, P., Benetiere, J., Chavagnac, C. *et al.* (2006). CD8⁺ T cells are effector cells of contact dermatitis to common skin allergens in mice. *J Invest Dermatol* *126*, 815-820.
- Watanabe, H., Numata, K., Ito, T., Takagi, K., and Matsukawa, A. (2004). Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock* *22*, 460-466.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the staff of the Plateau de Biologie Experimentale de la Souris. This work was supported by institutional grants from INSERM. M.B. is supported by Laboratoire BIODERMA.

The authors declare no conflict of interest.

FOOTNOTES

M. Bonneville, A. Hennino, M. Vocanson, C. Chavagnac, J. Benetiere, K. Rodet, R. Tedone, I. Pernet, A. Denis and JF Nicolas (2006). Antigen-induced dendritic cell migration to lymph nodes dictates the severity of allergic contact dermatitis. *Submitted for publication.*

Abbreviations

ACD: allergic contact dermatitis

B6: C57BL/6

BALB: BALB/C

CD: contact dermatitis

CHS: contact hypersensitivity

DC: dendritic cell

DNFB: 2,4-dinitro-fluorobenzene

ICD: irritant contact dermatitis

LN: lymph node

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Skin contact irritation is more severe in C57BL/6 mice than in BALB/C mice.

A single skin painting with 0.1% (\diamond), 0.3% (\square) or 0.5% (\triangle) DNFB on the left ear (and vehicle on the right ear) of BALB/C (white) **(a)** and C57BL/6 (black) **(b)** mice induced within hours an immediate ear skin inflammation. Results are expressed as the mean ear swelling \pm SD. **(c)** Histological analysis of ear sections from BALB/C and C57BL/6 mice, 6 hours after vehicle (1, 2) or DNFB (3, 4) sensitization. HE staining. Original magnification: $\times 100$. Results are representative of three independent experiments.

Figure 2. The severity of ICD correlates with high levels of IL-1 β /IL-6 mRNA and low levels of IL-10 mRNA.

(a) Detection and quantification of mRNA for IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and IL-10 by RNase protection assay in the skin of DNFB-treated BALB/C mice 3 hours after sensitization. Controls include expression of mRNA in the ear skin of naive mice and of vehicle-treated mice at 3 hours. **(b)** Histograms representations of the relative quantities of IL-1 β (black bars), IL-6 (white bars) and IL-10 (grey bars) mRNA recovered from the different experimental conditions, as compared to expression of GAPDH mRNA as reference gene. **(c,d)** Comparison of the expression levels of IL-1 β **(c)** and IL-10 **(d)** mRNA levels by RNase protection assay in the skin of BALB/C (white bars) and C57BL/6 (black bars) mice, 3 and 6 hours following 0.3 % DNFB sensitization. Controls include mRNA levels in the ear skin of naive mice and of vehicle-sensitized mice. mRNA relative quantities were compared with GAPDH mRNA as standards.

Figure 3. The intensity of ICD reaction dictates the severity of ACD responses.

DNFB-induced skin inflammation was analyzed in groups of five BALB/C **(a)** and C57BL/6 mice **(b)** within hours (left panel) and days (right panel) following sensitization with DNFB 0.1% (\diamond, \blacklozenge), 0.3% (\square, \blacksquare) or 0.5% ($\triangle, \blacktriangle$) on the left ear and vehicle on the controlateral ear. Results are expressed as the mean ear swelling \pm SD. Data are representative of four experiments.

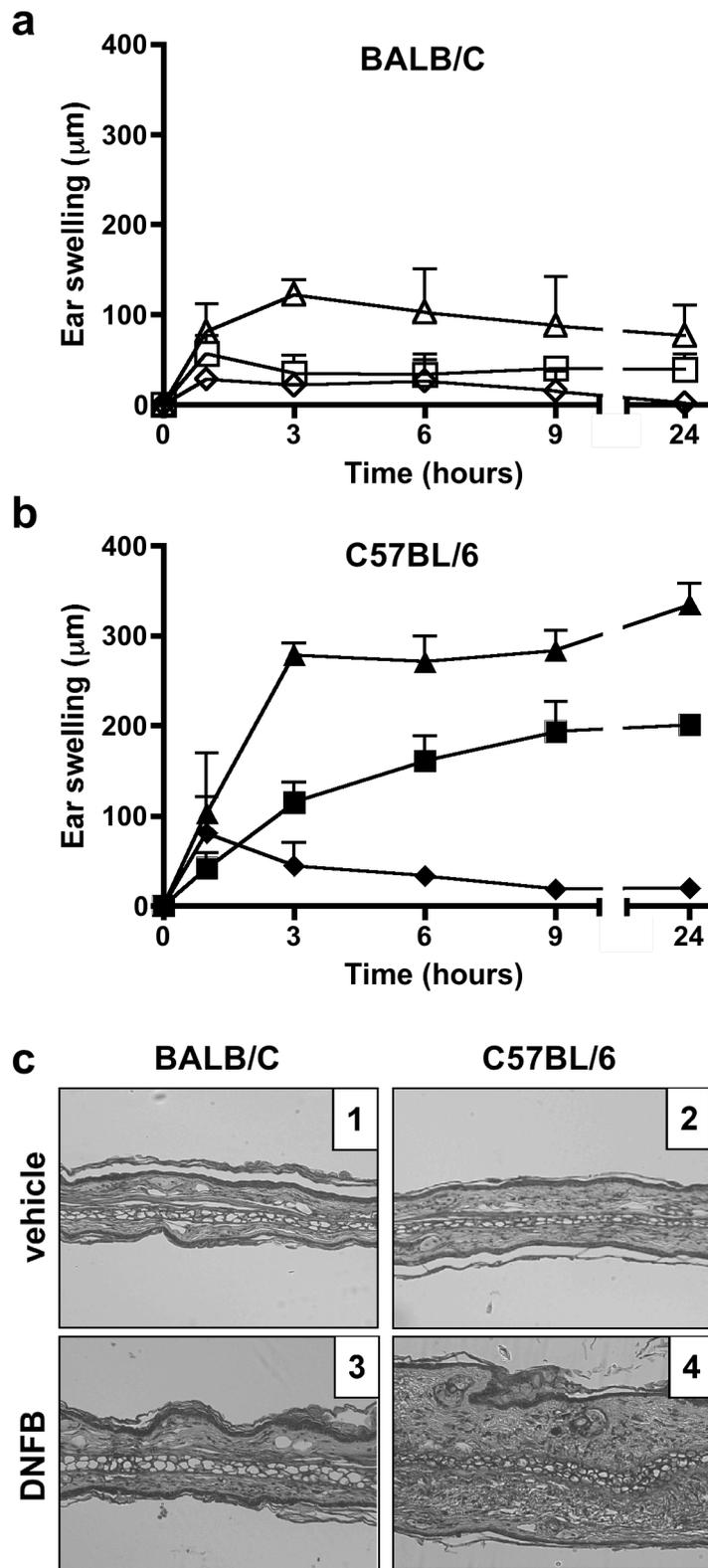


Figure 1

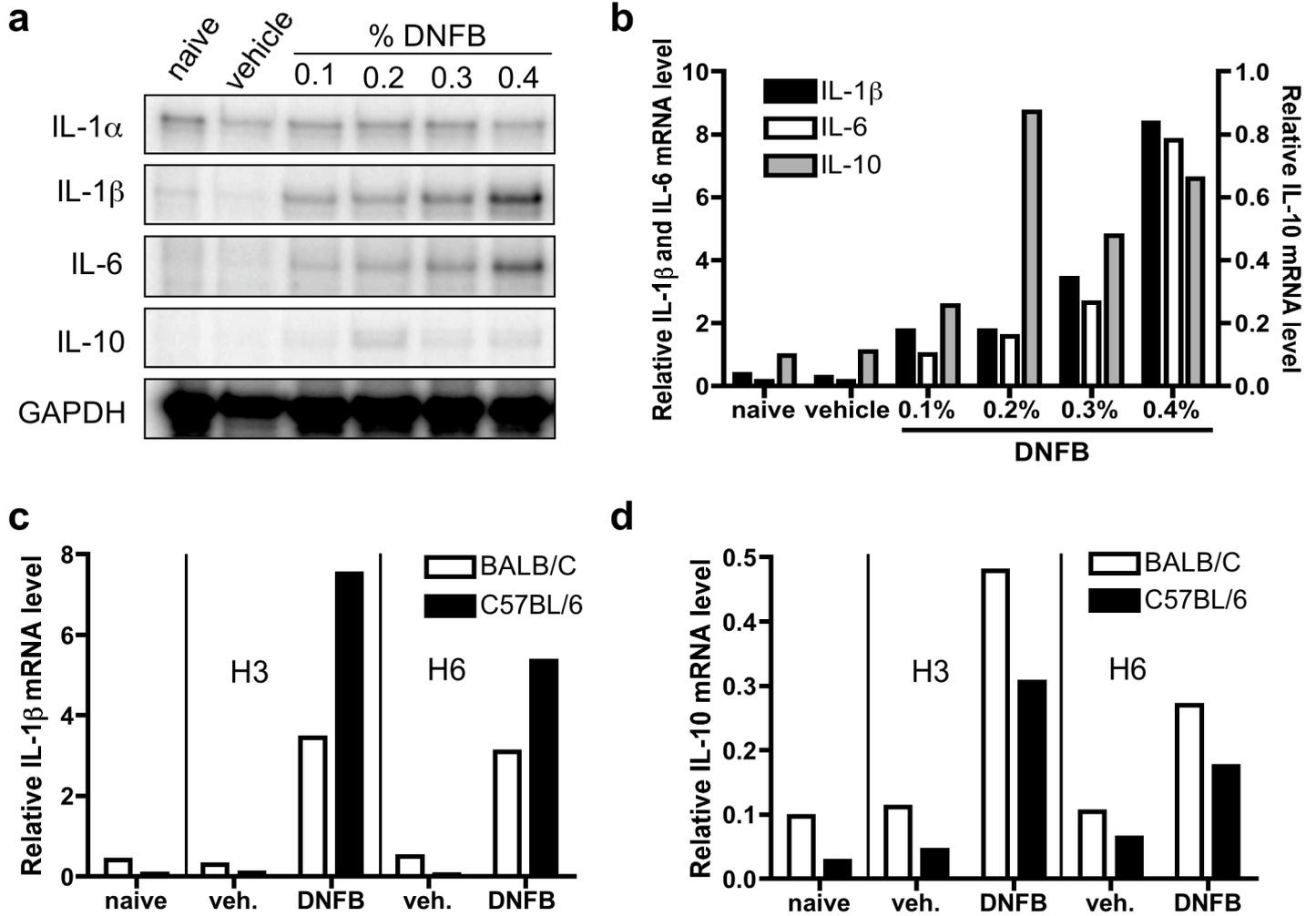


Figure 2

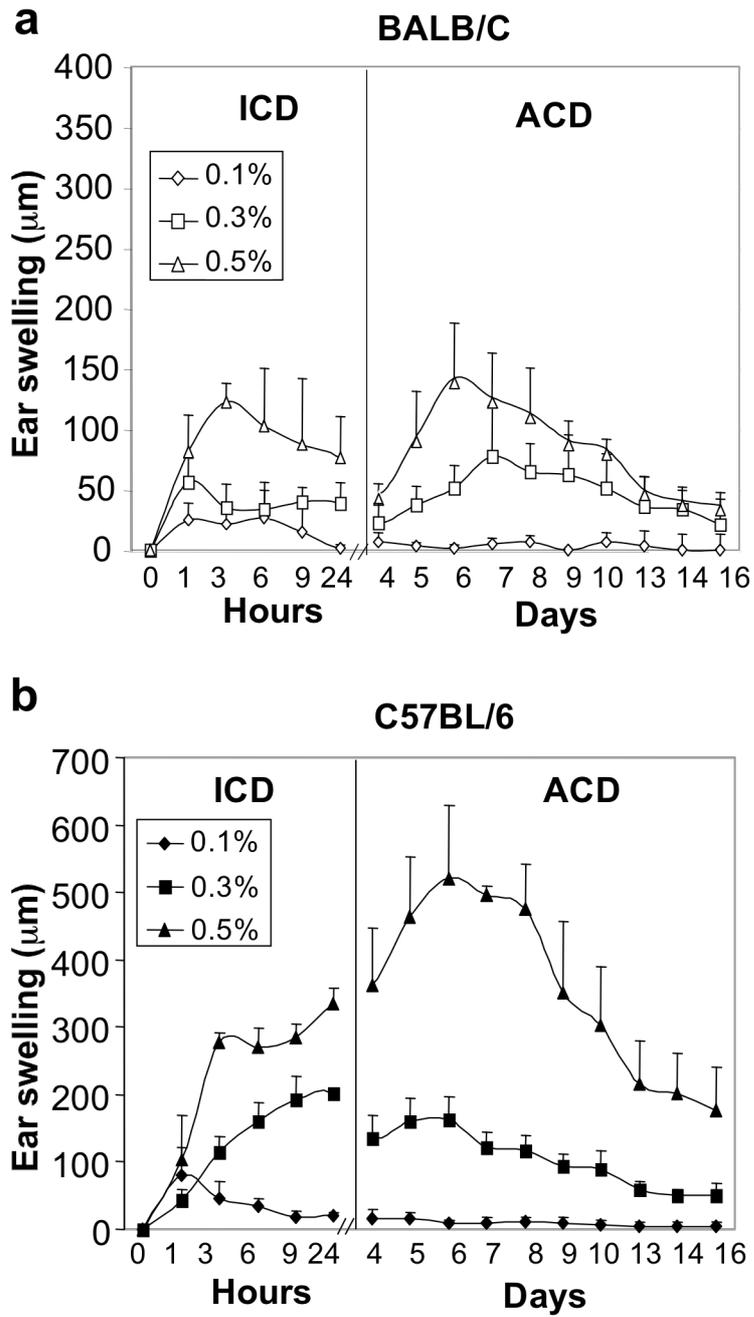


Figure 3

Article n°2 :

Antigen-induced dendritic cell migration to lymph nodes dictates the severity of allergic contact dermatitis

M. Bonneville, A. Hennino, M. Vocanson, C. Chavagnac, J. Benetiere, K. Rodet, R. Tedone, I. Pernet, A. Denis and JF Nicolas.

Manuscrit soumis à l'European Journal of Immunology

La dermatite allergique de contact (DAC) est une maladie inflammatoire cutanée fréquente induite par l'exposition cutanée de chimiques de faible poids moléculaires. La DAC est médiée par des lymphocytes T (LT) spécifiques d'haptène, activés dans les ganglions par les cellules dendritiques (CD) qui migrent depuis la peau pendant la phase de sensibilisation. Ces LT infiltrent le site exposé à l'haptène pendant la phase d'élicitation et induit la réponse inflammatoire de la DAC. La sévérité de la DAC dépend de plusieurs paramètres dont la nature de l'haptène, sa concentration et l'état immunitaire du patient.

Le but de cette étude est d'analyser les mécanismes qui contrôlent l'intensité de la DAC au DNFB dans deux souches de souris, C57BL/6 et BALB/c, qui développent respectivement une inflammation cutanée sévère ou modérée. Suite à l'application topique de DNFB, les souris C57BL/6 recrutent plus de précurseurs de CD du sang vers la peau que les souris BALB/c (Figure 5). Par conséquent, les souris C57BL/6 présentent trois fois plus de CD dérivées de la peau que les souris BALB/c dans les ganglions à 24 heures après l'immunisation au DNFB (Figure 3). Cet effet est responsable de réponses immunitaires spécifiques de l'haptène plus fortes chez les souris C57BL/6 incluant l'augmentation : i) du nombre de LT spécifiques activés pendant la sensibilisation (Figure 2), ii) du nombre de LT effecteurs infiltrant la peau au site d'application du DNFB pendant l'élicitation (Figure 1,C-F), iii) de l'inflammation de la peau à 6 jours (Figure 1, A et B). Par conséquent, la sévérité de la DAC dépend des événements cutanés précoces impliquant le recrutement de précurseurs de CD dans la peau.

Antigen-induced dendritic cell migration to lymph nodes dictates the severity of allergic contact dermatitis

Marlène Bonneville^{*}, Ana Hennino^{*}, Cyril Chavagnac^{*}, Josette Benetiere^{*,†}, Karen Rodet^{*,‡}, Rosine Tedone^{*,†}, Marc Vocanson^{*,†}, Ingrid Pernet[§], Alain Denis[§] and Jean-François Nicolas^{*,†,‡}

AFFILIATION

^{*} INSERM U503, IFR128, BioSciences Lyon-Gerland, Lyon F-69007, France ;

[†] UCB Lyon1, Lyon, F-69007, France ;

[‡] CH Lyon-Sud, Department of Clinical Immunology and Allergy, Pierre-Benite, F-69495, France ;

[§] DIPTA SAS, 505 rue Pierre Berthier, F-13855, Aix-en-Provence, France

RUNNING TITLE

DC migration in ACD

KEY WORDS

Dendritic cell, hapten, migration, contact sensitivity, allergic contact dermatitis.

ABSTRACT

Allergic contact dermatitis (ACD) is a frequent inflammatory skin disease induced by skin exposure to low m.w. chemicals called haptens. ACD is mediated by hapten-specific T cells primed in lymph nodes (LNs) by dendritic cells (DCs) migrating from the skin during the sensitization phase. These T cells infiltrate the hapten-exposed site during the elicitation phase and induce the ACD inflammatory reaction. The severity of ACD is conditioned by several parameters including the nature of the hapten, its concentration and the patient's immune status. The aim of the present study was to analyze the mechanisms which control the intensity of ACD to DNFB in two strains of mice which develop a severe (C57BL/6) and moderate (BALB/C) skin inflammation, respectively. Upon skin painting with DNFB, C57BL/6 mice recruited more DC precursors from blood to skin than BALB/C mice. Consequently, C57BL/6 mice displayed three times more skin-derived DC than BALB/C mice in LNs 24 h after DNFB immunization. This effect was responsible for enhanced hapten-specific immune responses in C57BL/6 mice including: i) priming of enhanced numbers of specific T cells in LNs during sensitization; ii) infiltration of higher numbers of effectors T cells in the DNFB-painted skin site during elicitation; iii) increased skin inflammation at day 6. Therefore, the severity of ACD relies on early skin events involving recruitment of DC precursors into the skin.

INTRODUCTION

Allergic contact dermatitis (ACD), also referred to as contact hypersensitivity (CHS) is a frequent T cell-mediated inflammatory skin disease and is one of the most common occupational diseases (1-3). ACD occurs after epicutaneous exposure to low m.w. chemicals called haptens, which covalently bind to aminoacid residues on self or exogenous proteins and therefore generate new antigenic determinants (4). Besides, haptens are endowed with intrinsic proinflammatory properties, necessary for optimal hapten-specific T cell immunization (1, 5, 6). During sensitization of the epidermis, the reactive hapten is taken up by immature skin dendritic cells (DCs) which migrate from the skin to the paracortical area of draining lymph nodes (LNs), where they prime hapten-specific T cells (7, 8). A subsequent skin challenge with the same hapten leads to the rapid recruitment of IFN- γ -producing CD8⁺ T cells in the skin where they induce inflammation through keratinocyte apoptosis (7, 9). We and others have demonstrated, in murine models, that ACD is mediated by CD8⁺ cytotoxic T cells and down-regulated by CD4⁺ T cells (for

review, 1).

The severity of ACD varies greatly and ranges from a mild and transient skin inflammation with pruritus and redness only to a severe long lasting exsudating dermatitis. Factors which control the severity of ACD include the nature of haptens (ranging from strong to mild sensitizers) and their concentrations. Although the sensitizing properties of haptens are linked to their ability to generate new antigenic motifs following interaction with self-proteins, their proinflammatory properties are mandatory for optimal immunogenicity. Indeed, activation of skin innate immunity by haptens is required for differentiation and mobilization of DCs from the skin to draining LNs and for optimal priming of CD8⁺ T cell precursors (10, 11). The patient's immune status plays also an important role in the outcome of ACD since different patients exposed to the same concentration of hapten may develop a mild to severe ACD (12). However the mechanisms which control the patient's sensitivity to haptens and which govern the severity of ACD remain unknown.

Here, we investigated the mechanisms which control the intensity of ACD in C57BL/6 (B6) and BALB/C (BALB) mice, which develop a severe or mild skin inflammation to DNFB, respectively. We used the model of primary contact hypersensitivity (CHS) induced by a single hapten painting on the ear (13). In this model, persistence of the hapten in the skin for several days leads within 6 days to the development of hapten-specific T cells which can infiltrate the sensitized skin site and induce a CHS reaction (13). Therefore, in primary CHS, the magnitude of the skin inflammation at day 6 depends solely on the antigenic and proinflammatory signals delivered by hapten exposure at day 1 allowing a direct comparison of CHS responses in different strains of mice. We show that the number of DCs recruited in skin a few hours after DNFB sensitization, and ultimately the number of DCs that end up in draining LNs, directly impacts on T cell priming and on CHS severity. The high CHS responder B6 mice recruited more DC precursors than the low responder BALB mice and this was associated with higher numbers of specific T cells induced in LNs and enhanced numbers of effector T cells recruited in hapten-exposed skin in B6 versus BALB mice. Therefore the magnitude of the CHS reaction at day 6 depends on early events occurring a few hours after sensitization and involving the migratory properties of skin DC.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Female C57BL/6 and BALB/C mice (7-10 week old) were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Animals were left to acclimate for one week before entering the study. Five mice were used per group. Mice were housed individually and were provided food and water ad libidum. All experimental procedures were in accordance with the CREEA (Comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale) guidelines on animal welfare.

Reagents

2,4-dinitro-fluorobenzene (DNFB) was diluted in acetone:olive oil (4:1). Fluorescein isothiocyanate (FITC) was diluted in acetone:dibutylphthalate (1:1). Dinitrobenzenesulfonic acid (DNBS) and trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) were used for *in vitro* studies (all from SIGMA, St. Louis, MO).

Assay for primary allergic contact sensitivity

The model has been described extensively elsewhere (13). Briefly, naive mice were sensitized at day 0 by a single application of 0.3% DNFB applied on the left ear, whereas the same volume of vehicle was applied on the right ear. At various time after ear sensitization, ear thickness was measured with a spring-loaded micrometer (J15, Blet SA, Lyon, France). Ear swelling was calculated by subtracting the initial value from the value recorded on the corresponding time, and further subtracting any swelling recorded for vehicle-control ear from ear swelling recorded for the hapten-applied ear.

Histology

Ears were fixed in a 3% formalin solution for 24 h and processed whole through a routine 15 h cycle to paraffin wax embedding. 4 µm sections were cut using a microtome and mounted on Superfrost® Plus slides. Sections were dried overnight at 37°C. The slides were dewaxed in Ottix® baths and staining according to routine hematoxylin and eosin (HE) staining procedure.

Immunohistochemical analysis of ear sections and epidermal sheets

Day 6 DNFB-treated ears were deep frozen in isopentane precooled in liquid nitrogen, embedded in O.C.T. compound (Tissue-Tek®). Cryostat sections (5 µm) were mounted on Superfrost® Plus slides and dried overnight at room temperature (RT), before being fixed in ice cold acetone for 10 min. Slides were dried at RT, rehydrated in TBS tween, and

incubated with anti-CD8 α mAb (KT15 Lyt 2 clone, Immunotech, Marseille, France) for 1 h at RT in humid chamber. Specific binding was revealed after 30 min incubation with biotinylated goat anti-rat IgG Ab (Vector Laboratories, Burlingame, CA) before streptavidin biotin complex / HRP incubation (ABC kit Dako, Carpinteria, CA). The reaction was developed using 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) substrate and H₂O₂ (Dako). Negative control was performed in ear samples using Ab dilution buffer alone.

Epidermis from naive and hapten-treated ears was peeled off the connective tissue by incubation for 1 h at 37°C in PBS supplemented with EDTA 20 mM (Sigma). The sheets were cut into small pieces, rinsed and incubated overnight at 4°C with rat IgG2b anti-mouse Ia (clone CD311) or isotype-matched irrelevant Ab. After three washes in PBS/1% bovine serum albumin, the specific binding was revealed as described above for ear sections.

mRNA extraction and quantitative RT-PCR analysis

Ear samples were collected from vehicle- and DNFB-treated mice and frozen in liquid nitrogen. The detection of RNA was conducted as described in detail elsewhere (14). In brief, total RNA was extracted using the RNAXEL kit (Eurobio, F-91953, Les Ulis, France). After DNase I treatment, 1 mg of total RNA was reverse transcribed using poly dT15 primers and Subscript II reverse transcriptase (90 min, 37°C; Gibco BRL) (Invitrogen, F95613, Cergy Pontoise). The relative level of expression was calculated by normalizing with the mean expression of HPRT, G3PDH and actine genes. The cDNA obtained was amplified using different sets of primers. For HPRT the sense primer is 5'-TCA TTA TGC CGA GGA TTT GGA -3' and antisense 5'-CAG AGG GCC AC ATG TGA TG -3'. For G3PDG the sense primer is 5'-GCA TGG CCT TCC GTG TTC -3' and antisense 5'-TGT CAT CAT ACT TGG CAG GTT TCT -3'. For Actine the sense primer is 5'-AAG ATC TGG CAC CAC ACC TTC T -3' and antisense 5'-TTT TCA CGG TTG GCC TTA GG -3'. For CD8 the sense primer is 5'-CTT GTG CCT CAA ACT GCA AG-3' and antisense 5'-CCG CTA AAG GCA GTT CTC C -3'. For IFN- γ the sense primer is 5'-CCA GCG CCA AGC ATT CAA TGA G -3' and the antisense primer is 5'-GAC AAT CTC TTC CCC ACC CCG -3'. The PCR were performed with Platium® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen) on Applied Biosystems GeneAmp 7600 thermocycler (1 min at 94°C, 1 min 30 s at 60°C, 2 min at 72°C).

FACS analysis of skin cells

Ears were harvested 6 h and 6 days after sensitization, pooled by treatment group (n=3), rinsed with PBS, split with the aid of forceps, and cut in small pieces. After 1 h of

incubation at 37°C in RPMI Hepes 25mM, SVF 10%, collagenase 400U/ml, DNase I 0.2mg/mL (400U/ml), cells were filtered, washed and counted. Single cell suspensions prepared from ears were preincubated for 15 min at 4°C with the 2.4G2 hybridoma supernatant to block Fc γ receptor binding. Subsequently, cells were washed with azide 0.01%, SVF 1% in PBS and labeled with anti-mouse APC anti-CD45 (30-F11), PE-Cy5 anti-CD4 (L3T4), FITC anti-CD11b (M1/70), PE anti-Gr1 (RB6-8C5) (BD PharMingen) or PE anti-CD8 α (Ly2) (CALTAG) mAbs. Finally cells were washed and analyzed with FACSsalibur (BD Biosciences).

Ag pulsing of antigen-presenting cells (APC)

Irradiated splenocytes were resuspended in RPMI 1640 without FCS containing DNBS (2 mM, pH8) and incubated at 37°C for 10 min.

***In vitro* secondary T cell proliferation**

Auricular LNs were harvested 5 days after DNFB sensitization and CD8⁺ T cells were purified through positive selection using mini MACS columns (Miltenyi Biotech, Paris, France). The resulting cell suspensions contained >95% viable CD8⁺ T cells. *In vivo* hapten-primed CD8⁺ T cells (10⁵ cells/well) were cocultured for 3 days at 37°C in 96-well plates with 5x10⁵ irradiated DNBS-treated as described above or untreated syngenic spleen cells from naive mice. The proliferative responses were assessed on day 3 of culture by ³H-thymidine incorporation (1 μ Ci/well) for the last 8 h of culture. The results are expressed as total cpm or proliferation index calculated as follows : (cpm in cultured T cells + DNBS-treated spleen cells)/(cpm in cultured T cells + untreated spleen cells).

IFN- γ Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISPOT)

The number of IFN- γ -producing cells was determined using an ELISPOT assay. Briefly, 96 well-nitrocellulose plates (MAHA N4510, Millipore, Saint Quentin-en-Yvelines, France) were coated 2 h at 37°C with anti-IFN- γ Abs (R46A2, BD-PharMingen, Le Pont de Claix, France) and blocked with PBS/1% BSA for 2 h at 37 °C. The plates were washed five times with PBS/0.05% tween before use. Auricular draining LNs of mice sensitized at day 0 with DNFB were harvested at day 5 and cell suspensions were prepared. LN cells were incubated overnight at 37°C in different numbers in the presence of 0.4 mM DNBS (or 0.2 mM TNBS). After washing, plates were incubated for 2 h at 37°C, 5% CO₂ with a biotinylated anti-IFN- γ Ab (XMG1.2, BD-PharMingen). IFN- γ spot-forming cells (IFN- γ -SFC) were developed using Avidin HRP (CliniSciences, Montrouge, France) incubated for 20 min at RT, and extensively washed before adding the substrate (Aminoethyl carbazole

(AEC), Sigma). The number of IFN- γ -SFC present in each well was counted using the Carl Zeiss vision ELISPOT (Carl Zeiss Vision, D-85399, Hallberghoos, Germany) and the results were expressed as IFN- γ -SFC /10⁶ LN cells.

Statistics

Statistics were performed using the paired two-tailed Student's t test.

RESULTS

CHS to DNFB is more severe in C57BL/6 mice than in BALB/C mice.

As previously described (13), primary CHS to DNFB was obtained by application of a single dose of 0.3% DNFB on the left ear of naive mice at day 0 which induced a skin inflammatory reaction starting at day 5, peaking at day 6-7 and quickly subsiding thereafter. No CHS response was induced on the right ear of the same mice which received the acetone/olive oil vehicle alone. **Figure 1A** shows that B6 mice developed a more severe primary CHS than BALB mice with a 2 to 3 fold increase in ear swelling at both day 5 and 6 ($p < 0.01$). Histological analysis of DNFB-sensitized ears confirmed that the skin inflammation at day 6 was more severe in B6 mice (**Figure 1B1**) than in BALB mice (**Figure 1B2**) including increase in dermal oedema, vascular enlargement, cellular infiltration of the dermis and epidermal thickness (**Figure 1B1**). The histological aspect of the skin of vehicle-sensitized mice was that of normal mouse skin and was similar in B6 and BALB mice (**Figure 1B, 3 and 4**).

The severity of the CHS reaction is proportional to the numbers of specific CD8+ T cells induced by DNFB sensitization.

Since IFN- γ -producing CD8+ T cells are effector cells of CHS (9, 15), we postulated that the enhanced CHS response observed in B6 mice was secondary to increased numbers of CD8+ T cells primed in draining LNs in the first days following immunization and subsequently recruited in the skin at day 6. Analysis of skin T cell infiltration at day 6 was done by three different approaches. Immunohistochemical staining of skin sections with anti-CD8 mAbs showed that B6 mice have recruited increased numbers of CD8+ T cells compared to BALB mice (**Figure 1C**). Of note, epidermal CD8+ T cells were found in higher numbers in B6 mice than in BALB mice (**Figure 1C**). No CD8+ T cells were detected in the skin of vehicle-sensitized mice (data not shown).

Quantitative PCR analysis for CD8 and IFN- γ mRNA indicated that up-regulation of CD8 and IFN- γ mRNA occurred in DNFB-sensitized skin of both strains of mice and was much more pronounced in B6 than in BALB mice (**Figure 1D**). CD8 and IFN- γ mRNA were neither found in the skin of naive or of vehicle-sensitized mice (data not shown). Finally, analysis of CD8⁺ (and CD4⁺) T cell recruitment in DNFB-sensitized skin was carried out by FACS staining of skin cell suspensions (**Figure 1E**). In vehicle-sensitized mice (as in normal mice), most of the T cells infiltrating the skin were CD4⁺ T cells (18% and 16% of total CD45⁺ cells in B6 and BALB, respectively, **Figure 1E** upper right panel) while CD8⁺ T cells represented only 5% (B6) to 2% (BALB) of skin CD45⁺ cells (**Figure 1E** lower right panel). In DNFB-sensitized skin, B6 mice recruited more CD8⁺ T cells than CD4⁺ T cells (18% vs 11% of CD45⁺ skin cells; CD8/CD4 ratio = 1.8) whereas BALB mice recruited preferentially CD4⁺ T cells to CD8⁺ T cells (23% vs 10%; CD8/CD4 = 0.5) (**Figure 1, E and F**). Accordingly, the CD8/CD4 ratio varied from 1.8 in B6 mice to 0.5 in BALB mice (**Figure 1F**). These data show that the severity of CHS responses is correlated with the numbers of CD8⁺ T cells recruited in the skin.

We next analyzed the DNFB-specific CD8⁺ T cell pool in the draining LNs of both strains of mice. The DNFB-specific immune response was higher in B6 compared to BALB mice as shown by the higher proliferative responses and IFN- γ ELISPOT responses (**Figure 2**). Purified CD8⁺ T cells from B6 mice exhibited higher secondary proliferative responses upon *in vitro* restimulation with DNBS (proliferation indexes: 19.9 for B6 and 11.5 for BALB) (**Figure 2A**). Furthermore, B6 mice displayed 3 times more specific IFN- γ -producing T cells than BALB mice (mean frequency: 363 SFC/10⁶ LN cells for B6 and 112 SFC/10⁶ LN cells for BALB) (**Figure 2B**).

Thus the magnitude of CHS responses is proportional to the numbers of specific CD8⁺ T cells induced by DNFB immunization and recruited in the skin at day 6.

Higher numbers of skin DCs migrate to draining LNs in B6 versus BALB mice

Because DCs need to migrate from the skin to draining LNs to induce T cell priming and CHS response (16), we next examined the FITC-induced DC migration in both strains of mice (17, 18). FITC was applied onto the ventral skin of naive mice, and the number of FITC⁺ DC (defined as FITC⁺ CD86⁺ CD11c⁺ cells) in draining LNs was analyzed 24 h later (**Figure 3**). B6 mice exhibited a 3 to 6 -fold increase in the number of FITC⁺ DC cells compared to BALB mice (**Figures 3, A and B**). Moreover FITC⁺ DC

from B6 mice presented a more mature phenotype with higher expression of CD86 than BALB mice (**Figure 3C**), as previously described by Liu *et al.* (19).

Next, we addressed the question of the origin of the skin migrating DCs found in LNs 24 h after hapten exposure. These could correspond either to resident skin DCs which are mobilized by hapten contact or to DCs recently recruited in the skin as DC precursors by the proinflammatory signals induced by DNFB painting (20). The two strains of mice displayed similar numbers of epidermal class II⁺ Langerhans cells (LC) in naive skin as well as in 24 h hapten-treated epidermis (**Figures 4, A and B**). However, naive B6 mice ear skin contained more CD11c⁺ CD45⁺ cells than BALB mice ear skin suggesting that B6 mice have greater numbers of dermal DCs than BALB mice (**Figure 4C**). **Figure 5** shows that DNFB painting was followed by a rapid and transient influx of CD45⁺ leucocytes in the dermis which peaked at 6 h, confirming recent studies of Leborgne *et al.* (20). Although similar numbers of CD45⁺ cells were recruited in the skin of B6 and BALB mice (data not shown), important differences in the subsets of the recruited cells were observed. FACS analysis of gated CD45⁺ CD11b⁺ skin cells using the Gr1 marker defined three different CD11b⁺ subsets depending on the level of expression of Gr1 antigen and corresponding, as previously described (20, 21), to neutrophils (Gr1^{high}), DC precursors (Gr1^{int}), and monocytes (Gr1^{neg}). Vehicle-treated skin of B6 mice contained less CD11b⁺ Gr1^{int} cells than that of BALB (**Figure 5A**). Application of DNFB induced a dramatic increase (8 fold) in the number of CD11b⁺ Gr1^{int} in B6 skin (**Figure 5, A and B**). In contrast only a modest increase (2 fold) in the recruitment of DC precursors was observed in hapten-painted BALB skin (**Figure 5, A and B**).

Since CCL20 chemokine is involved in the recruitment of DC precursors from the blood to the skin (20, 22), we next tested the expression of CCL20 mRNA in the skin of both strains of mice and observed that DNFB painting induced a strong up-regulation of CCL20 1 h after DNFB sensitization, which was more pronounced in B6 versus BALB mice (**Figure 5C**).

These data show that B6 mice recruit more DC precursors than BALB mice following hapten skin contact probably because they produce higher levels of CCL20 and further suggest that recruited but not resident cells account for the observed increased numbers of skin migrating LN DCs in B6 versus BALB strain.

DISCUSSION

The present study shows that the magnitude and quality of ACD reactions depend on events occurring in the very first hours following sensitization and involving DC migration to draining LNs. The number of skin DCs able to reach the LNs is the critical parameter responsible for a series of events leading to low or high CHS responses. Indeed, we observed a direct correlation between: i) the number of skin migrating DCs 24 h after sensitization, ii) the number of specific T cells primed in LNs, iii) the number of effector CD8⁺ T cells infiltrating the skin at day 5. The number of skin migrating DCs dictates the differences in the intensity of CHS responses between two individuals since a given concentration of hapten induced dramatic differences in DC migration and CHS responses in B6 and BALB mice which developed a severe and mild skin inflammation, respectively. The magnitude of DC migration induced by different concentrations of hapten in the same individual is also responsible for quantitative differences in the severity of CHS. In this respect we observed a correlation between the migration rate of skin DC and the intensity of CHS reaction in B6 mice exposed to increasing concentrations of DNFB (data not shown). Our data are in line with studies by Kimber *et al.* showing a concomitant increase in lymphocyte proliferative responses and DC migration in regional LNs following skin painting with haptens (23). More recently, Martin-Fontecha *et al.* demonstrated that antigen-specific CD4⁺ T cell priming in popliteal LNs was proportional to the numbers of antigen-loaded DC injected s.c. in footpads and able to reach the popliteal LNs (24). Therefore, our observations strongly support the hypothesis that, besides the cytokine secretion profile and the expression of co-stimulatory molecules, the abundance of Ag-presenting DCs in lymphoid organs is a critical factor in the magnitude of a T cell response to Ags *in vivo* (25). Of note, our data provide additional informations on the clinical consequences of the enhanced T cell priming resulting from the increased migration of antigen-loaded DCs. We observed a direct correlation between the numbers of CD8⁺ T cells primed in LNs, the numbers of CD8⁺ T cells able to infiltrate the skin and the magnitude of the ACD reaction. This observation implies that the major parameter which controls the intensity of ACD is the quantity and quality of CD8⁺ T cell priming.

DCs are mandatory for efficient T cell priming. However, the nature of the skin DC subset responsible for priming of specific effector T cells in LNs draining the sensitization site remains largely debated. Resident skin DCs and more precisely epidermal LCs which are at the direct contact with cutaneous applied antigens have been postulated to be involved in the capture and processing of haptens followed by DC migration to draining

LNs. However, recent studies have challenged this hypothesis by showing firstly that LCs are dispensable for priming effector T cells of CHS (26-28) and secondly that DCs newly recruited in the skin are necessary for an efficient hapten-specific immune response (20). Our data are in line with these latter studies and show that the recruitment of DC precursors in the dermis is a critical event following hapten painting whereas no changes were observed in the numbers of epidermal LCs. Furthermore, the magnitude of the DC recruitment correlated with the numbers of skin migrating DCs in LNs and with the intensity of CD8⁺ T cell priming and CHS reaction. However, among the differences which exist at homeostasis between B6 and BALB mice, it is noteworthy that the skin of B6 mice contains more CD11c⁺ cells than that of BALB mice (**Figure 4A** and 29). Since the number of LCs are similar in the two strains of mice this observation suggests that dermal DCs are more numerous in B6 and that they could participate in the increased migratory properties of B6 skin DC.

Although our data strongly argue for a direct link between the numbers of skin migrating DCs and the intensity of CHS responses, additional strain-related factors may play a role in the differences of CHS intensity in B6 and BALB mice. Firstly, B6 DCs appear more efficient than BALB DC for antigen presentation to T cells. They express higher levels of MHC class II and CD86 molecules under steady state conditions (**Figure 3C** and 19) and produce more T cell activating cytokines (e.g. IL-1, IL-12 and IL-15) upon stimulation (30, 31). Secondly, the proportion of CD8⁺ T cells among total T cells is increased in B6 versus BALB mice implying that the repertoire of hapten-specific CD8⁺ T cell precursors is larger in B6 than in BALB mice. Thirdly, B6 T cells produce higher levels of IFN- γ following TCR engagement by immobilized anti-TCR mAb than BALB T cells (30). All these differences between the two strains probably contribute to the optimal specific T cell activation which follows hapten presentation by skin migrating DCs.

Several clinical and experimental evidences indicate that the proinflammatory effects of haptens significantly contribute to the elicitation of CHS responses and that the capacity of the hapten to evoke proinflammatory stimuli rather than its antigenicity is responsible for the intensity of CHS (32, 33). Recent *in vivo* animal tests that have been developed to assess the allergenicity of chemicals, have revealed that the sensitizing potential of haptens correlates with their proinflammatory properties. The most reliable test, referred to as the local lymph node assay, measures the hapten-induced proliferation of cells in the LNs draining the site of hapten painting (34). Strong haptens induce a high proliferation rate whereas weak haptens are responsible for only a modest proliferation of LN cells (35).

More recent studies have reported that strong haptens such as DNFB behave as adjuvants promoting the priming of CD8⁺ T cells specific to nominal protein antigens *in vivo* via *de novo* recruitment of DC precursors from blood (20).

Upon skin contact, haptens induce activation of skin cells resulting in the rapid production of a whole array of inflammatory cytokines (including IL-1 β , IL-6, TNF- α) involved in the recruitment, activation and migration of skin DCs (for review 1, 36). Extravasation of blood monocytes and DC precursors into the skin is governed by local gradients of chemokines, especially CCL20 which induce chemotaxis of immature DCs through binding to the CCR6 receptor (20, 37). The requirement of the CCR6/CCL20 pathway in the recruitment of DC precursors in skin during ACD was recently demonstrated by studies showing that DNFB up-regulates CCL20 expression in skin and that CCR6^{o/o} mice develop an impaired CHS to DNFB (20). That CCL20 is pivotal in the hapten-induced recruitment of DC precursors is further supported by our data showing that CCL20 mRNA is rapidly up-regulated after hapten skin contact and is expressed at higher levels in B6 than in BALB mice. Analysis of cytokine production in the skin following DNFB sensitization showed that, besides CCL20, other molecules (IL-1 β , IL-6) are overexpressed in the skin of B6 compared to BALB mice (data not shown). Along these lines, Noguchi *et al.* reported that activated mast cells from B6 mice released a larger amount of histamine than BALB mice, which may participate in the increased recruitment of blood cells via binding to histamine receptors on endothelial cells (38). Collectively, our data suggest that the skin cells of B6 mice are more sensitive than those of BALB mice to the adjuvant effect of haptens and that this susceptibility is at the origin of the increased inflammation induced by DNFB sensitization.

In conclusion, our data demonstrate that the numbers of skin DCs able to migrate to lymphoid organs dictates the severity of ACD and further suggest that genetic differences in the reactivity to the adjuvant properties of haptens explains the various clinical presentations of ACD observed among patients. Attempts to enhance the threshold of activation of innate skin immunity may allow improving the symptoms of ACD.

Acknowledgements

The authors would like to thank M. Le Borgne, B. Dubois and D. Kaiserlian for helpful discussions, and the staff of the Plateau de Biologie Experimentale de la Souris and the Plateforme de Cytometrie en Flux for their technical assistance.

REFERENCES

1. Saint-Mezard, P., A. Rosieres, M. Krasteva, F. Berard, B. Dubois, D. Kaiserlian, and J. F. Nicolas. 2004. Allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 14:284.
2. Diepgen, T. L., and L. Kanerva. 2006. Occupational skin diseases. *Eur J Dermatol* 16:324.
3. Pierard-Franchimont, C., P. Quatresooz, E. Berardesca, G. Plomteux, and G. E. Pierard. 2006. Environmental hazards and the skin. *Eur J Dermatol* 16:322.
4. Lepoittevin, J., and I. Leblond. 1997. Hapten-peptide T cell receptor interactions: molecular basis for recognition of haptens by T lymphocytes. *Eur J Dermatol* 7:151.
5. McFadden, J. P., and D. A. Basketter. 2000. Contact allergy, irritancy and 'danger'. *Contact Dermatitis* 42:123.
6. Smith, H. R., D. A. Kelly, A. R. Young, D. B. Basketter, and J. P. McFadden. 2002. Relationship between 2,4-dinitrochlorobenzene elicitation responses and individual irritant threshold. *Contact Dermatitis* 46:97.
7. Bour, H., E. Peyron, M. Gaucherand, J. L. Garrigue, C. Desvignes, D. Kaiserlian, J. P. Revillard, and J. F. Nicolas. 1995. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol* 25:3006.
8. Krasteva, M., J. Kehren, F. Horand, H. Akiba, G. Choquet, M. T. Ducluzeau, R. Tedone, J. L. Garrigue, D. Kaiserlian, and J. F. Nicolas. 1998. Dual role of dendritic cells in the induction and down-regulation of antigen-specific cutaneous inflammation. *J Immunol* 160:1181.
9. Kehren, J., C. Desvignes, M. Krasteva, M. T. Ducluzeau, O. Assossou, F. Horand, M. Hahne, D. Kagi, D. Kaiserlian, and J. F. Nicolas. 1999. Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity. *J Exp Med* 189:779.
10. Enk, A. H., and S. I. Katz. 1992. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1398.
11. Flint, M. S., R. J. Dearman, I. Kimber, and S. A. Hotchkiss. 1998. Production and in situ localization of cutaneous tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 6 (IL-6) following skin sensitization. *Cytokine* 10:213.
12. Cvetkovski, R. S., K. J. Rothman, J. Olsen, B. Mathiesen, L. Iversen, J. D. Johansen, and T. Agner. 2005. Relation between diagnoses on severity, sick leave and loss of job among patients with occupational hand eczema. *Br J Dermatol* 152:93.
13. Saint-Mezard, P., M. Krasteva, C. Chavagnac, S. Bosset, H. Akiba, J. Kehren, J. Kanitakis, D. Kaiserlian, J. F. Nicolas, and F. Berard. 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.

14. Delassus, S., G. C. Coutinho, C. Saucier, S. Darche, and P. Kourilsky. 1994. Differential cytokine expression in maternal blood and placenta during murine gestation. *J Immunol* 152:2411.
15. Akiba, H., J. Kehren, M. T. Ducluzeau, M. Krasteva, F. Horand, D. Kaiserlian, F. Kaneko, and J. F. Nicolas. 2002. Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8⁺ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *J Immunol* 168:3079.
16. Engeman, T. M., A. V. Gorbachev, R. P. Gladue, P. S. Heeger, and R. L. Fairchild. 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.
17. Macatonia, S. E., S. C. Knight, A. J. Edwards, S. Griffiths, and P. Fryer. 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.
18. Saint-Mezard, P., C. Chavagnac, S. Bosset, M. Ionescu, E. Peyron, D. Kaiserlian, J. F. Nicolas, and F. Berard. 2003. Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo. *J Immunol* 171:4073.
19. Liu, T., T. Matsuguchi, N. Tsuboi, T. Yajima, and Y. Yoshikai. 2002. Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. *Infect Immun* 70:6638.
20. Le Borgne, M., N. Etchart, A. Goubier, S. A. Lira, J. C. Sirard, N. van Rooijen, C. Caux, S. Ait-Yahia, A. Vicari, D. Kaiserlian, and B. Dubois. 2006. Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8⁺ T cell crosspriming in vivo. *Immunity* 24:191.
21. Lagasse, E., and I. L. Weissman. 1996. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J Immunol Methods* 197:139.
22. Dieu-Nosjean, M. C., C. Massacrier, B. Homey, B. Vanbervliet, J. J. Pin, A. Vicari, S. Lebecque, C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, A. Zlotnik, and C. Caux. 2000. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med* 192:705.
23. Kimber, I., A. Kinnaird, S. W. Peters, and J. A. Mitchell. 1990. Correlation between lymphocyte proliferative responses and dendritic cell migration in regional lymph nodes following skin painting with contact-sensitizing agents. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 93:47.
24. MartIn-Fontecha, A., S. Sebastiani, U. E. Hopken, M. Uguccioni, M. Lipp, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2003. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 198:615.
25. Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2001. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat Immunol* 2:487.
26. Bennett, C. L., E. van Rijn, S. Jung, K. Inaba, R. M. Steinman, M. L. Kapsenberg, and B. E. Clausen. 2005. Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol* 169:569.
27. Kaplan, D. H., M. C. Jenison, S. Saeland, W. D. Shlomchik, and M. J. Shlomchik. 2005. Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* 23:611.
28. Kissenpfennig, A., S. Henri, B. Dubois, C. Laplace-Builhe, P. Perrin, N. Romani, C. H. Tripp, P. Douillard, L. Leserman, D. Kaiserlian, S. Saeland, J. Davoust, and B.

- Malissen. 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.
29. Sauder, D. N., and S. I. Katz. 1983. Strain variation in the induction of tolerance by epicutaneous application of trinitrochlorobenzene. *J Invest Dermatol* 80:383.
 30. Liu, T., H. Nishimura, T. Matsuguchi, and Y. Yoshikai. 2000. Differences in interleukin-12 and -15 production by dendritic cells at the early stage of *Listeria monocytogenes* infection between BALB/c and C57 BL/6 mice. *Cell Immunol* 202:31.
 31. Von Stebut, E., J. M. Ehrchen, Y. Belkaid, S. L. Kostka, K. Molle, J. Knop, C. Sunderkotter, and M. C. Udey. 2003. Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. *J Exp Med* 198:191.
 32. Smith, H. R., D. A. Basketter, and J. P. McFadden. 2002. Irritant dermatitis, irritancy and its role in allergic contact dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 27:138.
 33. Grabbe, S., M. Steinert, K. Mahnke, A. Schwartz, T. A. Luger, and T. Schwarz. 1996. Dissection of antigenic and irritative effects of epicutaneously applied haptens in mice. Evidence that not the antigenic component but nonspecific proinflammatory effects of haptens determine the concentration-dependent elicitation of allergic contact dermatitis. *J Clin Invest* 98:1158.
 34. Kimber, I., R. J. Dearman, D. A. Basketter, C. A. Ryan, and G. F. Gerberick. 2002. The local lymph node assay: past, present and future. *Contact Dermatitis* 47:315.
 35. Basketter, D. A., L. Balikie, R. J. Dearman, I. Kimber, C. A. Ryan, G. F. Gerberick, P. Harvey, P. Evans, I. R. White, and R. J. Rycroft. 2000. Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42:344.
 36. Pastore, S., F. Mascia, F. Mariotti, C. Dattilo, and G. Girolomoni. 2004. Chemokine networks in inflammatory skin diseases. *Eur J Dermatol* 14:203.
 37. Vanbervliet, B., B. Homey, I. Durand, C. Massacrier, S. Ait-Yahia, O. de Bouteiller, A. Vicari, and C. Caux. 2002. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *Eur J Immunol* 32:231.
 38. Noguchi, J., E. Kuroda, and U. Yamashita. 2005. Strain difference of murine bone marrow-derived mast cell functions. *J Leukoc Biol* 78:605.

FOOTNOTES

Grant support : This work was supported by institutional grants from INSERM. M.B. is supported by Laboratoire BIODERMA.

Conflict of interest: none.

Correspondence should be addressed to

Jean-François Nicolas, INSERM U503, IFR 128, 21 av Tony Garnier, 69375 Lyon

Phone: 33-437-282-348 Fax: 33-437-282-341

E-mail: jean-francois.nicolas@chu-lyon.fr or nicolas@cervi-lyon.inserm.fr

Abbreviations

B6: C57BL/6

BALB: BALB/C

BM: bone-marrow

DC: dendritic cell

DNBS: dinitrobenzenesulfonic acid

DNFB: 2,4-dinitro-fluorobenzene

HPRT: hypoxanthine phosphoribosyltransferase

LN: lymph node

RT: room temperature

SFC: spot forming cells

TNBS: trinitrobenzenesulfonic acid

FIGURE LEGENDS

Figure 1. CHS to DNFB is more severe in C57BL/6 mice than in BALB/C mice.

(A) Primary CHS to DNFB was analyzed in groups of five C57BL/6 (black bars) and BALB/C mice (white bars) sensitized at day 0 with 0.3% DNFB on the left ear and painted with the vehicle on the controlateral ear. Results are expressed as the mean ear swelling \pm SD at days 5 and 6. **: $p < 0.01$. (B) Histological analysis of the CHS reaction at day 6 in DNFB- (1, 2) and vehicle- (3, 4) sensitized ear skin. HES staining. The letter c in the figures represents ear cartilage. Magnification x80. Results are representative of three independent experiments. (C) Immunohistochemical staining of CD8⁺ T cells in ear cryostat sections of DNFB-sensitized mice at day 6. The dotted line represents the dermal-epidermal junction. Magnification x 300. (D) Quantitative RT-PCR analysis of CD8 and IFN- γ mRNA in the ear skin of DNFB- or vehicle-painted C57BL/6 (black bars) and BALB/C (white bars) mice at day 6. Data represent mean values from triplicate measurements of CD8 and IFN- γ mRNA expression ratio (arbitrary units) to that of house keeping genes. (E-F) FACS analysis of CD8⁺ and CD4⁺ T cells infiltrating the skin during CHS to DNFB at day 6. (E) Dot plot analysis of CD4 and CD8 staining on CD45⁺ skin cells showing the percentage of CD4⁺ (left number) and CD8⁺ (right number) T cells. (F) CD8⁺/CD4⁺ T cell ratio in the ear skin of C57BL/6 (black bars) and BALB/C mice (white bars) (F). Data are representative of three independent experiments.

Figure 2. Increased CD8⁺ T cell priming in C57BL/6 mice compared to BALB/C mice.

The specific T cell response during primary CHS to DNFB was analyzed at day 5 after sensitization in the auricular draining LNs of C57BL/6 (black bars) or BALB/C mice (white bars) (3 mice/group) sensitized at day 0 with 0.3% DNFB. (A) DNFB-specific CD8⁺ T cells proliferation in LNs of day 5 DNFB-sensitized mice. Purified CD8⁺ T cells from the auricular draining LN were restimulated *in vitro* for 3 days with DNBS or medium alone. Results are expressed as total cpm and proliferation indexes (*). (B) DNFB-specific IFN- γ -producing cells were determined by ELISPOT assay in auricular LN cells from day 5 DNFB-sensitized mice after overnight restimulation with DNBS or TNBS. Results are expressed as the number of spot forming cells (SFC) per 10^6 LN cells.

Figure 3. Higher numbers of skin DCs migrate to draining LNs in C57BL/6 compared to BALB/C mice.

FACS analysis of skin migrating DC in draining LNs, 24 h after FITC painting. (A) dot-plot analysis of FITC⁺ CD86⁺ CD11c⁺ cells, (B) absolute numbers of FITC⁺ CD86⁺ CD11c⁺ cells, and (C) expression level of CD86 on FITC⁺ CD11c⁺ cells (mean \pm SD of 4 mice per group). Data are representative of three independent experiments.

Figure 4. Analysis of skin resident DC.

(A) Immunohistochemical staining of epidermal sheets of naive mice using anti-MHC class II mAb. (B) class II⁺ LCs were counted and data are expressed as numbers of LC per 0.05 mm² in the ear skin epidermis of C57BL/6 and BALB/C mice. (C) FACS analysis of skin cell suspensions, recovered from the ear skin of naive C57BL/6 and BALB/C mice and stained for CD45 and CD11c. Data are expressed as the number of CD11c⁺ CD45⁺ skin cells and are representative of three independent experiments.

Figure 5. Increased numbers of blood DC precursors are recruited in the skin of C57BL/6 versus BALB/C mice following DNFB sensitization.

FACS analysis of cell suspensions from ear skin isolated 6 h after DNFB or vehicle painting. (A-B) Gated CD45⁺ CD11b⁺ hematopoietic cells from skin of C57BL/6 (left) and BALB/C (right) were analyzed for the expression of Gr1. Results are expressed as percentage of gated CD11b⁺ CD45⁺ cells found in the skin of DNFB- or vehicle- treated B6 and BALB mice (A) and as the ratio of the numbers of Gr1^{int} CD11b⁺ CD45⁺ cells in DNFB- versus vehicle-treated ear in C57BL/6 (black bars) and BALB/C (white bars) mice (B). (C) RT-PCR analysis of CCL20 mRNA expression in ears of B6 (black bars) and BALB (white bars) 1 h after DNFB painting.

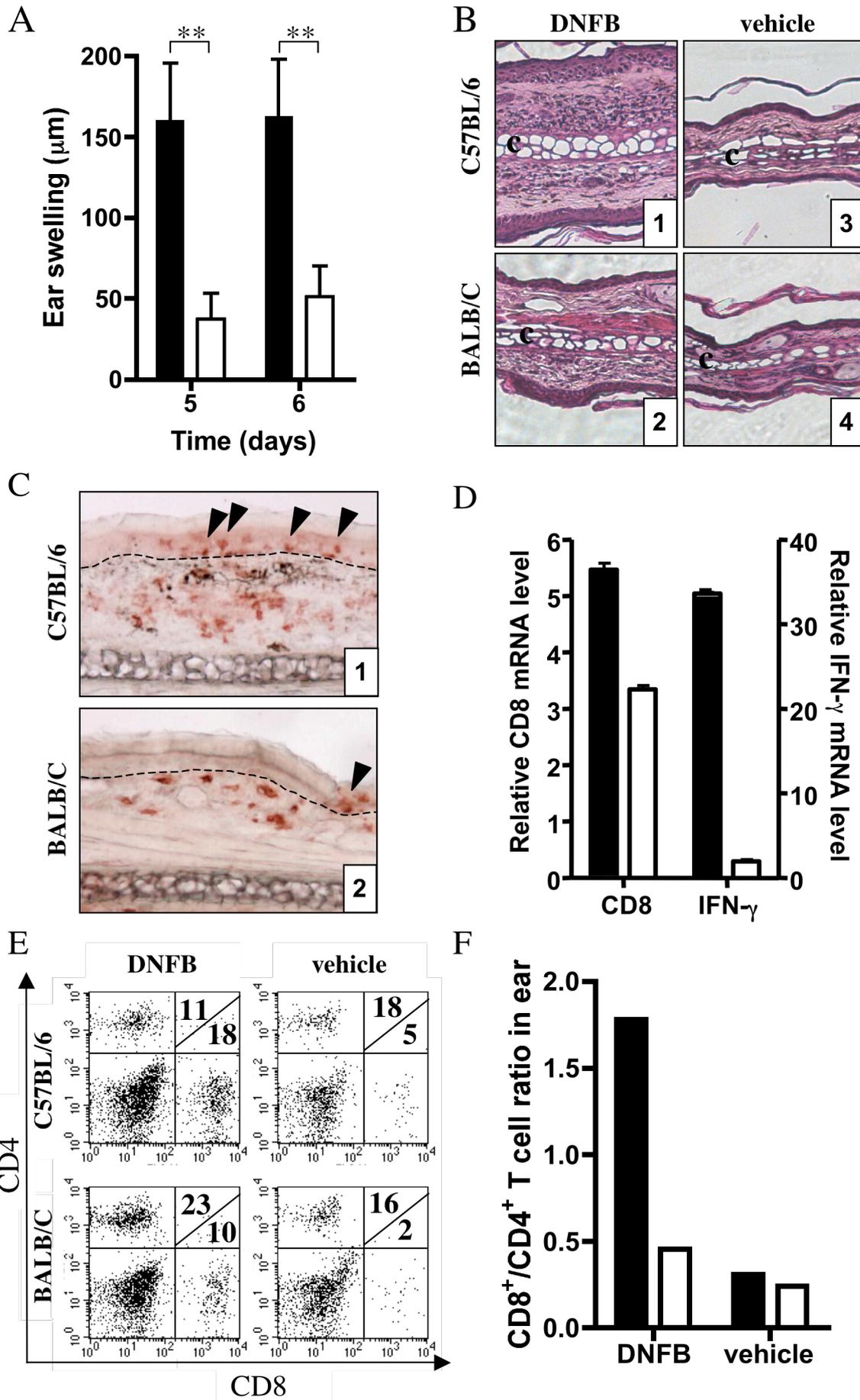


Figure 1

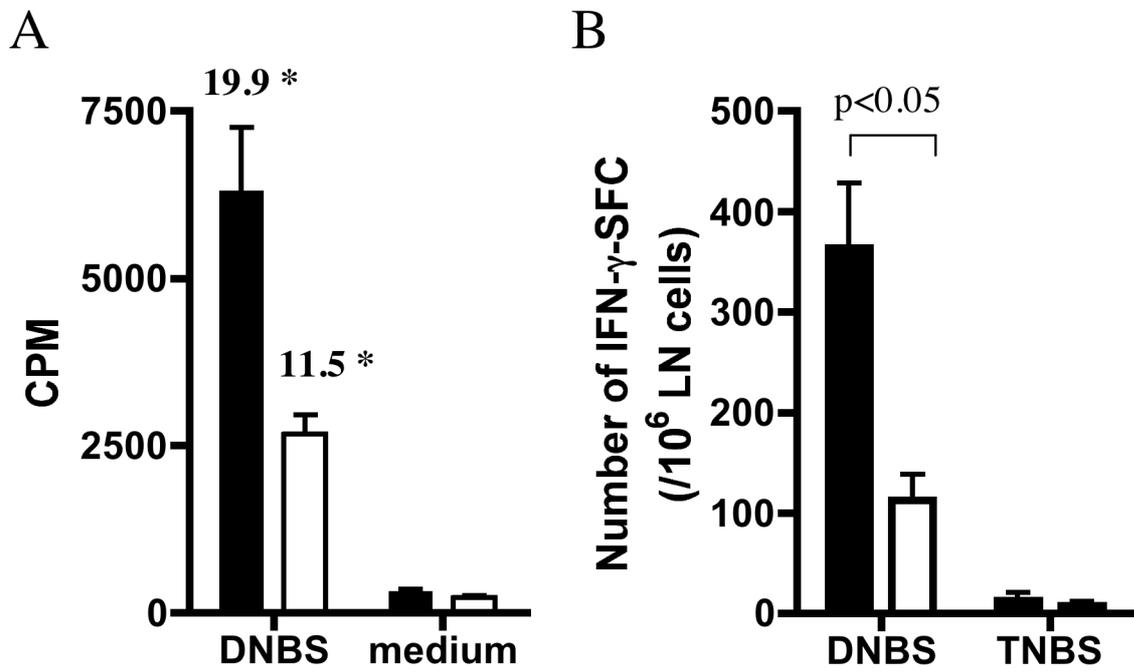


Figure 2

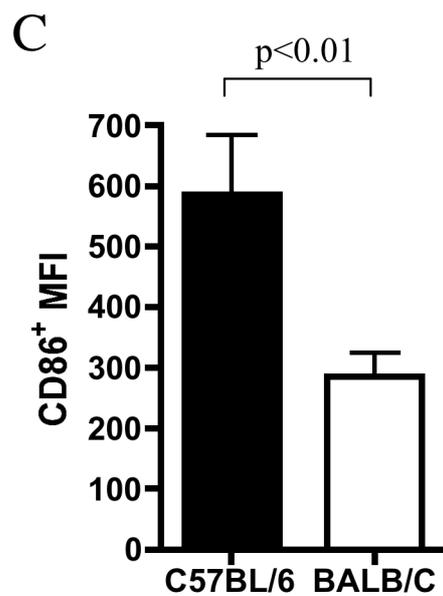
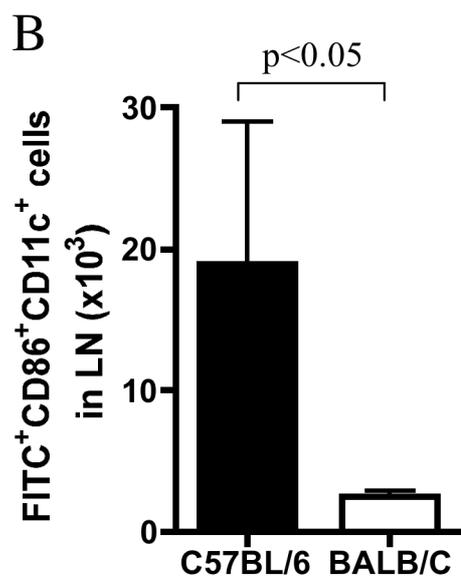
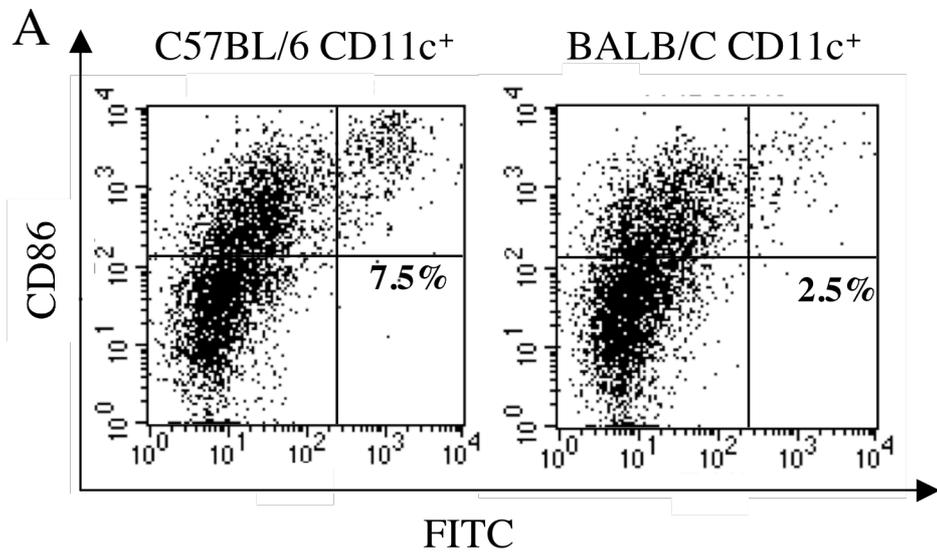


Figure 3

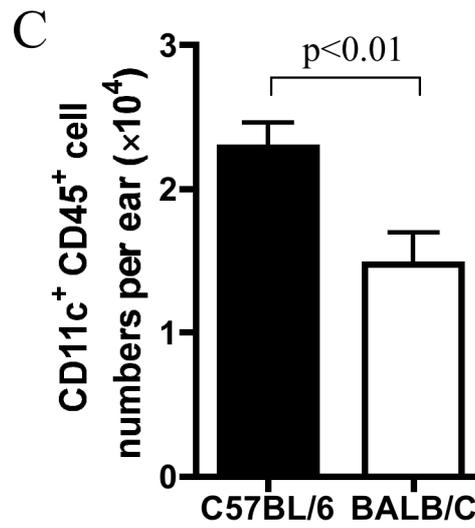
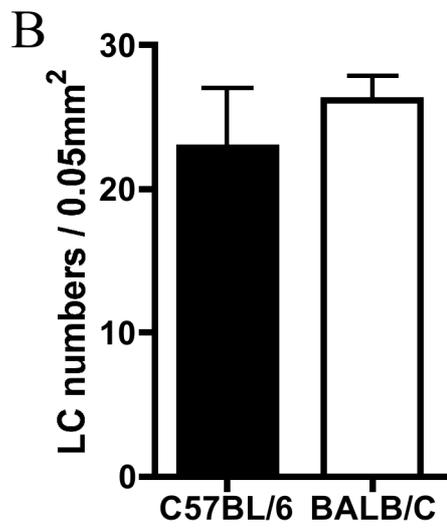
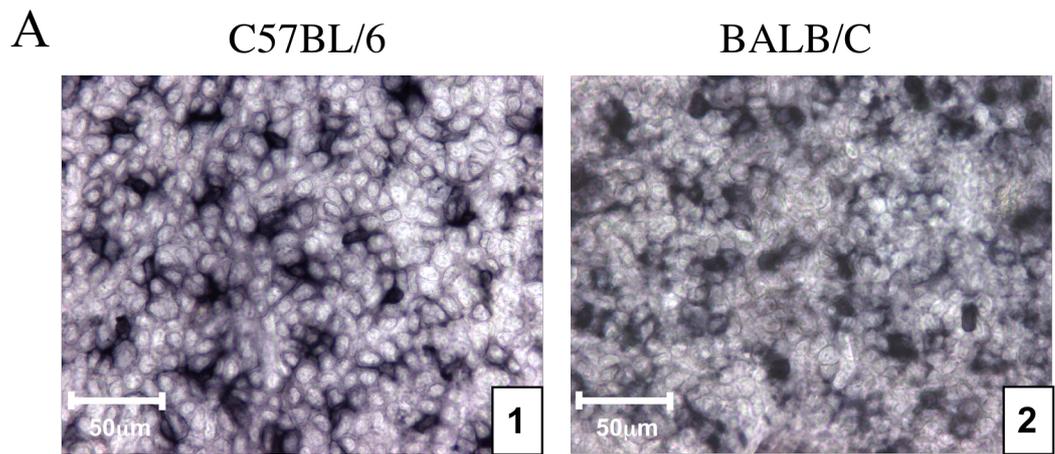


Figure 4

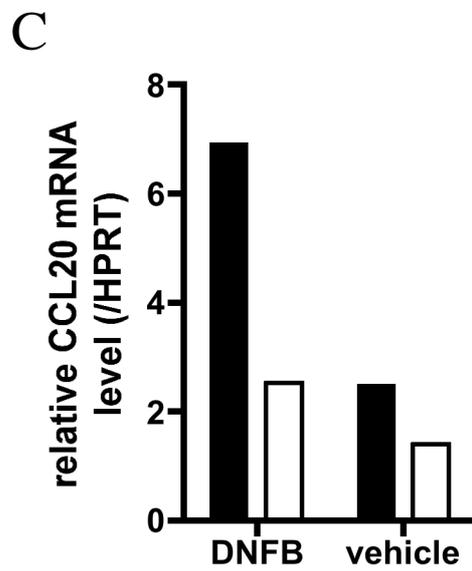
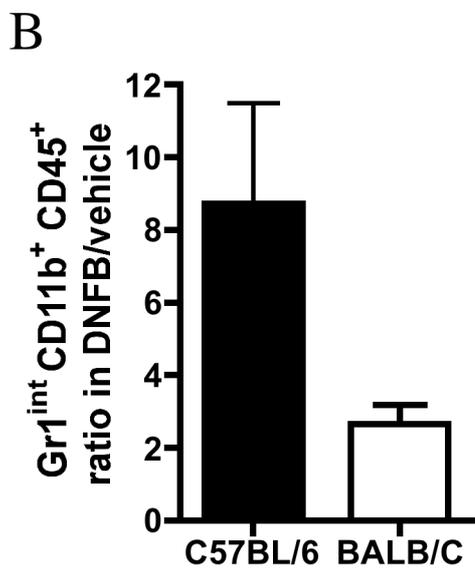
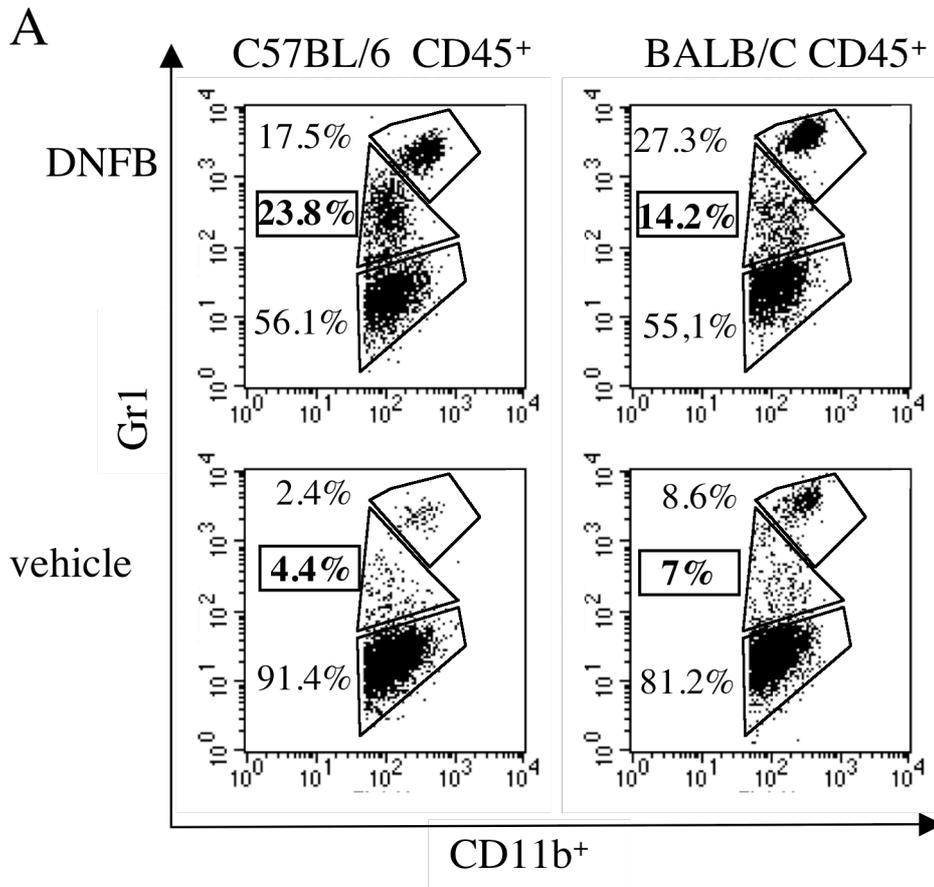


Figure 5

Résultats supplémentaires de l'article n°2 :

Nous avons montré dans l'article n°2 que le recrutement de précurseurs de CD dans la peau et la migration des CD cutanées au ganglion sont corrélés à l'intensité de la réponse spécifique d'HSRC au DNFB dans les souris C57BL/6 et BALB/c, qui présentent respectivement une inflammation forte et modérée. Nous avons voulu vérifier ces résultats suite à l'application de doses croissantes de DNFB chez une même souche, C57BL/6. La Figure 1 montre que le recrutement de précurseurs de CD (CD11b⁺ Gr1^{int}) dans la peau (Figure 1A) et la migration de CD cutanée dans les ganglions drainants (Figure 1B) sont proportionnels à la dose de DNFB appliquée chez les souris C57BL/6. Donc l'intensité du signal de danger qui dépend de la dose d'haptène utilisée et de la sensibilité cutanée individuelle détermine les nombres de précurseurs de CD recrutés dans la peau et de CD qui migrent dans les ganglions drainants.

Par ailleurs, indépendamment de l'application d'un toxique pro-inflammatoire, nous sommes intéressés aux différences intrinsèques de migration des CD dans ces deux souches de souris. Nous avons ainsi réalisé des expériences de capacité migratoire de CD générées *in vitro* (BMDC), activées par hapténisation au DNBS et injectées dans les coussinets plantaires des souris C57BL/6 ou BALB/c. Ces BMDC issues de C57BL/6, marquées au CFSE et injectées dans des souris C57BL/6 sont retrouvées 24 heures après l'injection en plus grand nombre dans les ganglions poplités drainants par rapport aux BMDC CFSE⁺ issues de souris BALB/c et injectées dans souris BALB/c (Figure 2). Ce résultat suggère une capacité migratoire des CD de souris C57BL/6 plus rapide que celles des souris BALB/c dans un contexte non-proinflammatoire. Cette hypothèse pourrait expliquer une activation lymphocytaire dans les ganglions plus importante chez les souris C57BL/6 par rapport aux souris BALB/c (cf. Article n°2).

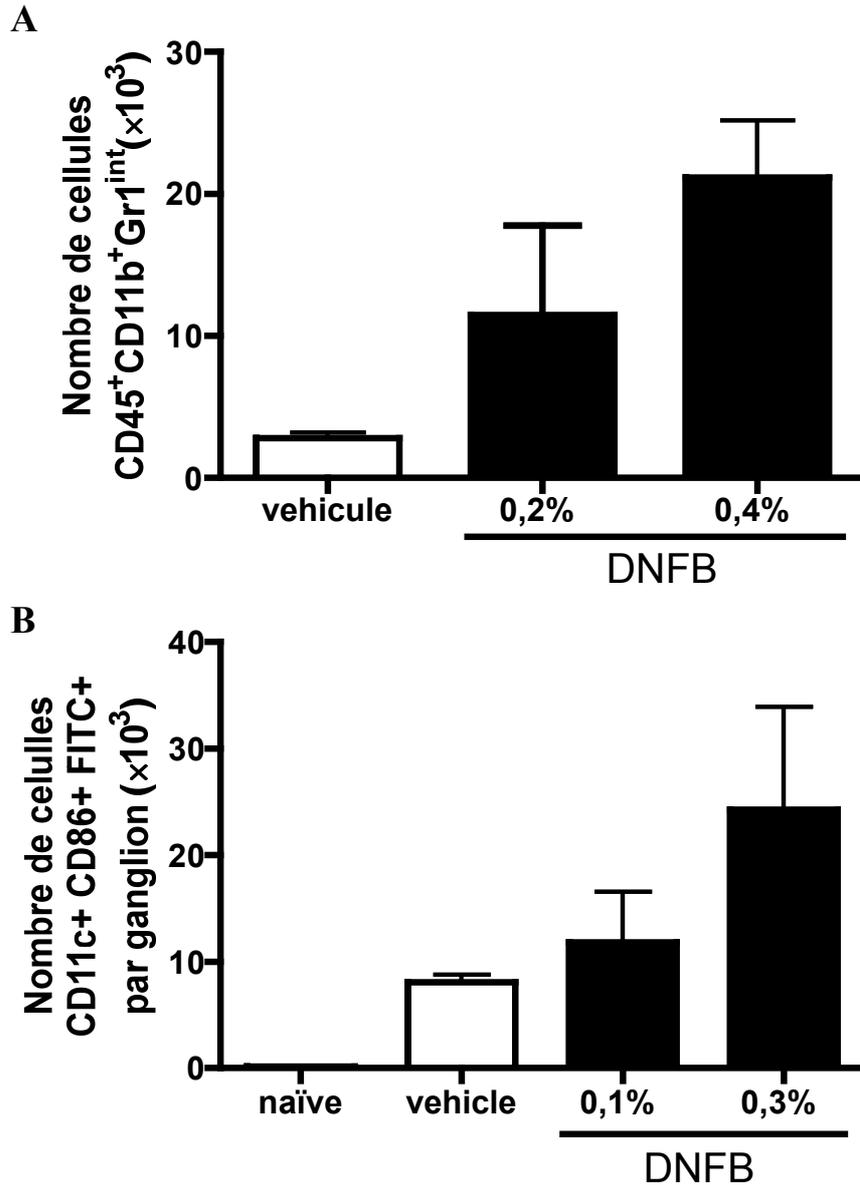


Figure 1. Le recrutement de cellules précurseurs de CD (CD11b⁺ Gr1^{int}) dans la peau et la migration des CD dans les ganglions drainants dépendent de la dose de DNFB. **(A)** Des souris C57BL/6 sont sensibilisées à différentes doses de DNFB (barres noires) ou avec le véhicule seul (barre blanche). Puis 6 heures après l'application le nombre de cellules CD45⁺ CD11b⁺ Gr1^{int} par oreille est déterminé par une analyse en cytométrie en flux. **(B)** Des souris C57BL/6 sont sensibilisées à la fois par des différentes doses de DNFB (barres noires) ou le véhicule seul (barre blanche) et 1% de FITC, puis à 24 heures le nombre de cellules CD11c⁺ CD86⁺ FITC⁺ par ganglion drainant la peau est déterminé par une analyse en cytométrie en flux (cf. Article n°2 pour le protocole détaillé).

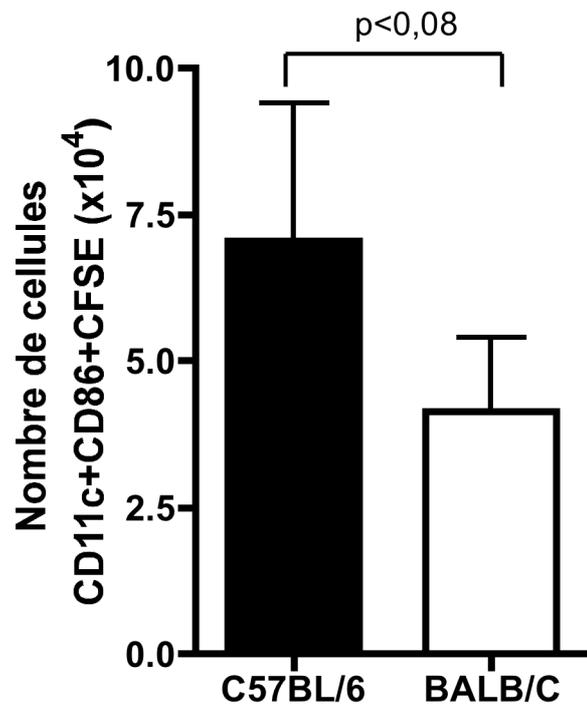


Figure 2. Les capacités migratoires des CD de souris C57BL/6 sont plus fortes que celles des souris BALB/c. 10^6 BMDC hapténisées au DNBS et marquées au CFSE sont injectées dans le coussinet plantaires de souris C57BL/6 et BALB/c naïves. Après 24 heures les ganglions poplités drainants sont prélevés afin d’analyser après double marquage CD11c et CD86, le nombre CD CFSE ayant migrées par ganglion (CD11c⁺ CD86⁺ CFSE) (cf. Saint-Mézard *et al.*, 2003 pour le protocoles détaillé). La différence n’est pas statistiquement significative à cause de l’hétérogénéité des résultats, mais cette différence est reproductible dans 4 expériences indépendantes.

Article n°3 : Manuscrit en préparation

Impact of Toll-like receptor-2 signaling pathway on the development of contact hypersensitivity to haptens

M. Bonneville, M. Vocanson, A. Hennino, C. Chavagnac, J. Benetiere, I. Pernet, A. Denis, S. Akira, P. Musette and JF Nicolas.

Résumé

Les récepteurs Toll-like (TLR) sont une dizaine de récepteurs de signaux de danger que représentent les microorganismes mais aussi les traumatismes et certains chimiques. La liaison ligands/TLR conduit à l'activation de l'immunité innée. Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle de DAC, l'hypersensibilité retardée de contact (HSRC) chez des souris génétiquement déficientes en TLR-2 (TLR-2^{-/-}), afin d'étudier l'impact de l'engagement du TLR-2 dans le développement de l'HSRC aux haptènes.

Les souris TLR-2^{-/-} développent une DAC au DNFB d'intensité augmentée par rapport aux souris contrôle TLR-2^{+/+} et aux souris sauvages C57BL/6. De plus, les haptènes faibles tels que l'HCA sont capables d'induire une DAC chez les souris TLR-2^{-/-} uniquement, alors que les souris TLR-2^{+/+} et C57BL/6 sont tolérantes à l'HCA (Figure 1). L'augmentation d'intensité de DAC au DNFB chez la souris TLR-2^{-/-} est secondaire à l'augmentation drastique du nombre de LT CD8⁺ spécifiques induits au niveau des ganglions drainants lors de la sensibilisation puis recrutés au site d'exposition cutané au DNFB lors de la phase d'élicitation (Figure 2). L'augmentation d'intensité de l'immunisation T CD8⁺ et de la réponse d'HSRC chez la souris TLR-2^{-/-} ne s'explique pas par une plus grande sensibilité à l'irritation cutanée puisque les souris TLR-2^{-/-} répondent au signaux inflammatoires du DNFB avec la même amplitude que les souris C57BL/6 : i) même réponse d'irritation cutanée (Figure 3), ii) mêmes capacités migratoires des CD cutanées (Figure 4, A et B), iii) capacité identique des CD à induire une réponse immunitaire LT CD8⁺ (Figure 4, C et D). Par contre les souris TLR-2^{-/-} ont un nombre de LT régulateurs CD4⁺ CD25⁺ diminué par rapport aux souris C57BL/6 (Figure 5) suggérant que ce déficit quantitatif puisse être à l'origine de l'expansion optimale des LT CD8⁺ effecteurs chez ces souris. Le travail en cours vise à étudier la fonction suppressive des LT CD4⁺ CD25⁺ des deux types de souris. En conclusion, nos résultats montrent que la voie TLR-2 est régulatrice de l'HSRC et suggèrent que les

ligands de TLR-2 puissent représenter d'excellents anti-inflammatoires dans le traitement des eczémas.

Résultats et discussion

La majorité des matériels et des méthodes utilisés dans cette étude a déjà été décrite dans les articles n°1 et 2. Pour ce travail, afin d'avoir des souris contrôles issues de la même lignée de souris (« littermate »), nous avons générés des souris TLR-2^{+/+}, TLR-2^{+/-} et TLR-2^{-/-} issues du croisement de souris TLR-2^{+/-} entre elles qui, elles même, ont été obtenues à partir du croisement C57BL/6 et TLR-2^{-/-}.

1. Les souris TLR-2^{-/-} développent une HSRC augmentée.

L'HSRC au DNFB dans les souris C57BL/6 et TLR-2^{-/-} a été réalisée en utilisant le protocole standard : les animaux sont sensibilisés par 0,5 % de DNFB (25 µL) appliqué sur la peau de l'abdomen à jour 0, puis ils sont révélés à jour 5 par 0,15% de DNFB sur l'oreille (5 µL par face). Les souris C57BL/6 et TLR-2^{+/+} développent une réponse d'HSRC classique, qui atteint son maximum à 48 heures (**Figure 1, A et B**), et progressivement diminue les jours suivants (résultat non montré). Au contraire, les souris TLR-2^{-/-} présentent une réaction inflammatoire d'HSRC au DNFB exacerbée (**Figure 1, A et B**), qui diminue progressivement (résultat non montré). La réponse d'HSRC des animaux TLR-2^{+/-} est intermédiaire entre les souris TLR-2^{+/+} et TLR-2^{-/-} (**Figure 1B**). Ensuite, nous voulu savoir si la résultats obtenus avec le DNFB pouvaient être reproduits avec d'autres haptènes forts (oxazolone) et faible (α -hexylcinnamaldehyde, HCA). De façon similaire au DNFB, l'oxazolone et l'HCA induisent une réaction inflammatoire augmentée chez les souris TLR-2^{-/-} (**Figure 1, C et D**) par rapport à celle observée chez les C57BL/6. Ces résultats montrent que les souris déficientes en TLR-2 sont plus sensibles au pouvoir allergisant des haptènes forts et faibles suggérant que TLR-2 est impliqué dans la régulation de l'inflammation de l'HSRC.

2. L'augmentation de l'HSRC chez la souris TLR-2^{-/-} est due à l'augmentation du nombre de LT CD8⁺ spécifiques induits dans les ganglions par l'immunisation et recrutés dans la peau lors de l'élicitation.

Afin d'expliquer la forte réponse d'HSRC observée dans les souris TLR-2^{-/-}, nous avons analysé deux évènements majeurs responsables de l'induction et de l'établissement de

l'HSRC : i) l'activation *in vivo* des LT spécifiques producteurs d'IFN- γ dans les ganglions drainants pendant la sensibilisation et, ii) leur recrutement dans la peau dans les heures qui suivent la révélation.

Des analyses histologiques et de RT-PCR semi-quantitative, sur des oreilles de souris 24 heures après la révélation au DNFB, montrent que l'augmentation de l'HSRC observée chez la souris TLR-2^{-/-} est corrélée à une infiltration cellulaire, un œdème du derme et une vasodilatation plus importants (**Figure 2A**), ainsi qu'à une augmentation d'un facteur deux des transcrits CD8 et IFN- γ (**Figure 2B**) qui sont le témoin de l'infiltration des LT CD8⁺ effecteurs (Akiba et al., 2002; Kehren et al., 1999).

Nous avons ensuite déterminé la fréquence de LT spécifiques dans les ganglions drainants par ELISPOT IFN- γ après restimulation *in vitro* par du DNBS (forme soluble du DNFB) (Akiba et al., 2002; Desvignes et al., 1998; Kehren et al., 1999). Les souris TLR-2^{-/-} et TLR-2^{+/-} sensibilisées présentent presque 3 fois plus de cellules productrices d'IFN- γ par rapport aux souris TLR-2^{+/+} (**Figure 2C**). L'activation des LT producteurs d'IFN- γ est spécifique de l'haptène parce qu'aucun spot n'a été détecté dans les cellules ganglionnaires restimulées *in vitro* par du TNBS, un haptène sans réactivité croisée avec le DNBS. De la même façon, l'HSRC à l'HCA dans les souris TLR-2^{-/-} est aussi associée à une activation significative des LT producteurs d'IFN- γ 5 jours après la sensibilisation (résultat non montré). Ces résultats montrent que l'augmentation de l'HSRC chez les souris TLR-2^{-/-} est secondaire à l'induction d'une réponse immunitaire spécifique d'haptène optimale par rapport aux souris C57BL/6.

Deux possibilités peuvent expliquer l'augmentation de l'efficacité de sensibilisation des précurseurs de LT CD8⁺ spécifiques chez la souris TLR-2^{-/-} : i) une majoration des capacités de migration des cellules dendritiques de la peau au ganglion, permettant d'augmenter les chances de contact entre CD et LT ; ii) une altération quantitative et/ou fonctionnelle des LT CD4⁺ régulateurs qui sont responsable de la limitation de l'expansion des LT CD8⁺ effecteurs.

3. L'irritation cutanée ainsi que les capacités migratoires et fonctionnelles des CD sont similaires chez les souris TLR-2^{-/-} et C57BL/6.

Comme décrit précédemment, l'intensité de l'HSRC dépend de l'intensité de la réaction inflammatoire non spécifique, du taux de migration des CD pendant la sensibilisation et des fonctions de présentation antigénique des CD (cf. Articles n°1 et 2).

Nous savons donc voulu vérifier si les souris TLR-2^{-/-} étaient plus sensibles que les C57BL/6 à l'effet adjuvant du DNFB ce qui pourrait induire une mobilisation plus forte des CD cutanées vers le ganglion drainant. Contrairement à notre hypothèse, nos résultats montrent que les souris TLR-2^{-/-} développent une irritation cutanée identique aux souris C57BL/6 (**Figure 3A**). Elles produisent des quantités d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF- α équivalentes à celles produites par les souris C57BL/6 (**Figure 3, B et C**).

Afin d'évaluer les capacités de migration des CD, le FITC a été appliqué sur la face ventrale de souris C57BL/6 et TLR-2^{-/-} et le nombre de CD migrant de la peau au ganglion a été analysé à 24 heures. Les résultats montrent que les capacités de migration des CD des 2 souches de souris sont identiques. Après 24 heures, aucune différence significative n'a pu être mise évidence entre C57BL/6 et TLR-2^{-/-}, que ce soit dans le pourcentage (**Figure 4A**) ou dans le nombre de cellules CD86⁺ FITC⁺ parmi les cellules CD11c⁺ dans les ganglions lymphatiques drainants (**Figure 4B**).

Ensuite, nous nous sommes intéressés à la fonctionnalité des CPA des deux souches de souris. Dans une première série d'expériences, les fonctions de présentation d'antigène des CPA de la rate ont été testées par leur capacité à induire une réponse proliférative secondaire des LT CD8⁺ ganglionnaires de souris C57BL/6 sensibilisées. Les résultats montrent que les CPA des deux souches de souris, hapténisées par le DNBS, présentent les mêmes capacités de stimulation des LT spécifiques (**Figure 4C**). Dans une deuxième série d'expérience nous avons testé le potentiel immunogène des CD issues de précurseurs médullaires (BMDC) des deux types de souris. Nous montrons que l'injection de BMDC hapténisées provenant d'animaux TLR-2^{-/-} et C57BL/6 à des receveuses C57BL/6 sont capables d'induire l'immunisation des receveuses qui développent une HSRC suite à l'application de DNFB sur l'oreille 5 jours plus tard. L'intensité de l'HSRC est identique que les souris aient reçues les BMDC de TLR-2^{-/-} ou de C57BL/6 confirmant que les propriétés fonctionnelles des CD des deux types d'animaux sont similaires.

L'ensemble de ces résultats montre que l'intensité augmentée de l'HSRC chez les souris TLR-2^{-/-} n'est pas due à une migration plus importante ni à des capacités de présentation antigénique plus fortes des CD cutanées.

4. Diminution du nombre des LT CD4⁺ CD25⁺ chez les souris TLR-2^{-/-} versus C57BL/6.

Les résultats ci-dessus suggèrent que la réponse immunitaire T CD8⁺ spécifique et l'HSRC au DNFB augmentée chez les souris TLR-2^{-/-} sont liées à une altération quantitative et/ou fonctionnelle de la population régulatrice de l'HSRC : les LT CD4⁺ CD25⁺.

L'analyse des sous-populations lymphocytaires des organes lymphoïdes des souris C57BL/6 et TLR-2^{-/-} montre que les deux types de souris comprennent des nombres similaires de LT CD4⁺ et CD8⁺ (**Figure 5A** et (Takeuchi et al., 1999)). Par contre le nombre de LT CD4⁺ CD25⁺ est très diminué chez les souris TLR-2^{-/-} par rapport aux souris C57BL/6, ce qui confirme les travaux de Netea *et al.* (Netea et al., 2004) et suggère que cette altération pourrait être à l'origine de l'expansion optimale des LT CD8⁺ spécifiques de DNFB au cours de l'immunisation.

Des expériences sont en cours pour tester cette hypothèse. Nous souhaitons vérifier l'importance du statut régulateur de la souris TLR-2^{-/-} par un ensemble d'expériences :

- Analyse des sous-populations de LT régulateurs Foxp3 et CTLA-4
- Transfert à des TLR-2^{-/-} naïves (et à des souris C57BL/6 naïves) des LT CD8⁺ provenant de souris C57BL/6 sensibilisées par le DNFB.
- Déplétion des LT CD4⁺ par traitement par AcM anti-CD4 des deux types de souris
- Etude de la fonctionnalité des LT CD4⁺ CD25⁺ des deux types de souris à l'homéostasie et après sensibilisation au DNFB.

En effet, bien que des travaux récents montrent que la fonction régulatrice des LT CD4⁺ CD25⁺ soit identique chez les souris TLR-2^{-/-} par rapport aux souris sauvages (Sutmuller et al., 2006a), l'activation de la voie TLR-2 chez des souris normales augmente les fonctions inhibitrices de cette population CD4⁺ CD25⁺ (Dillon et al., 2006; Zanin-Zhorov et al., 2006). De plus, des protéines de stress Hsp et des fragments hyaluroniques pouvant être générés par contact cutané avec des xénobiotiques (Albers et al., 1996; Bartosiewicz et al., 2001; Farzaneh et al., 2005; Termeer et al., 2002) ont été identifiés comme ligands du TLR-2 (Asea et al., 2002; Kirschning and Schumann, 2002). Nous sommes actuellement en train de vérifier cette hypothèse, à savoir si l'haptène est capable, comme les ligands de TLR-2 d'agir sur la fonction des LT CD4⁺ CD25⁺.

En conclusion, la démonstration du rôle « régulateur et anti-inflammatoire » de la voie TLR-2, bien que paradoxale pour des molécules décrites comme impliquées dans l'activation de l'immunité innée, confirme des travaux récents et suggère que les ligands de TLR-2 puissent être de futurs traitements locaux des eczémas.

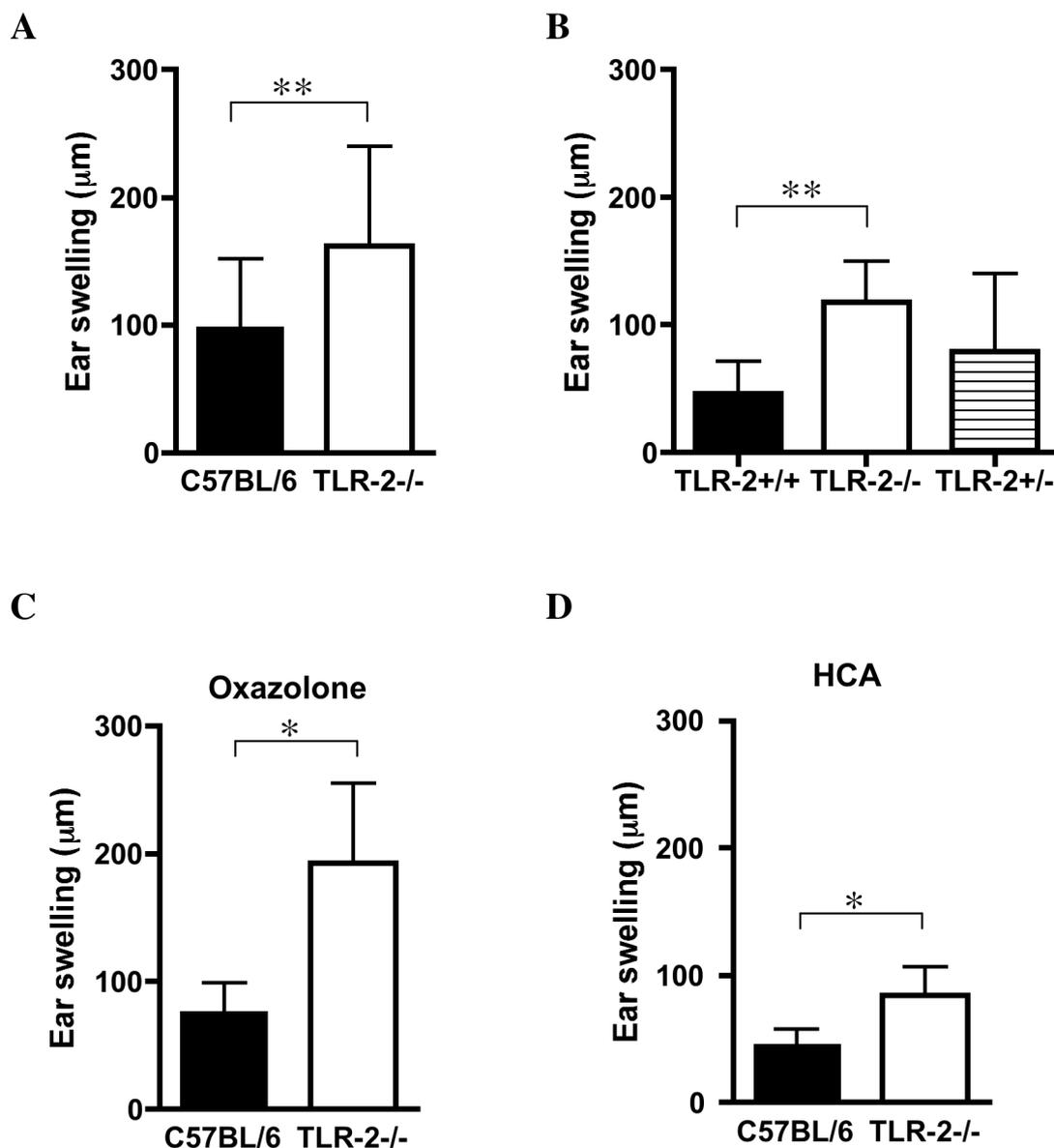


Figure 1. Les réponses d'HSRC aux haptènes forts et faibles sont augmentées dans les souris TLR-2^{-/-} versus C57BL/6. (A/B) La réponse d'HSRC au DNFB. Des souris C57BL/6 (barre noire) (A) ou TLR-2^{+/+} (barre noire), TLR-2^{-/-} (barre blanche) et TLR-2^{+/-} (barre grise) (B) ont été sensibilisées à 0,5% de DNFB sur le ventre au jour 0, puis révélées 5 jours plus tard par 0,15% de DNFB sur l'oreille. (C/D) La réponse d'HSRC à l'oxazolone ou à l'HCA. Des souris C57BL/6 (barres noires) ou TLR-2^{-/-} (barres blanches) ont été sensibilisées par une seule application d'oxazolone à 2% au jour 0 (C), ou par trois applications d'HCA à 50% aux jours -2, -1 et 0 (D), puis révélées respectivement au jour 5 par 0,2% d'oxazolone ou aux jours 5 et 6 par 40% d'HCA. Les résultats sont exprimés en moyenne des œdèmes calculés (\pm écart-type) au jour 7. Les résultats représentent le pool de cinq expériences (A), ou sont représentatifs de trois expériences indépendantes avec 5 animaux par groupe (B-D). ** : $p < 0,01$, * : $p < 0,05$ avec le test de Student.

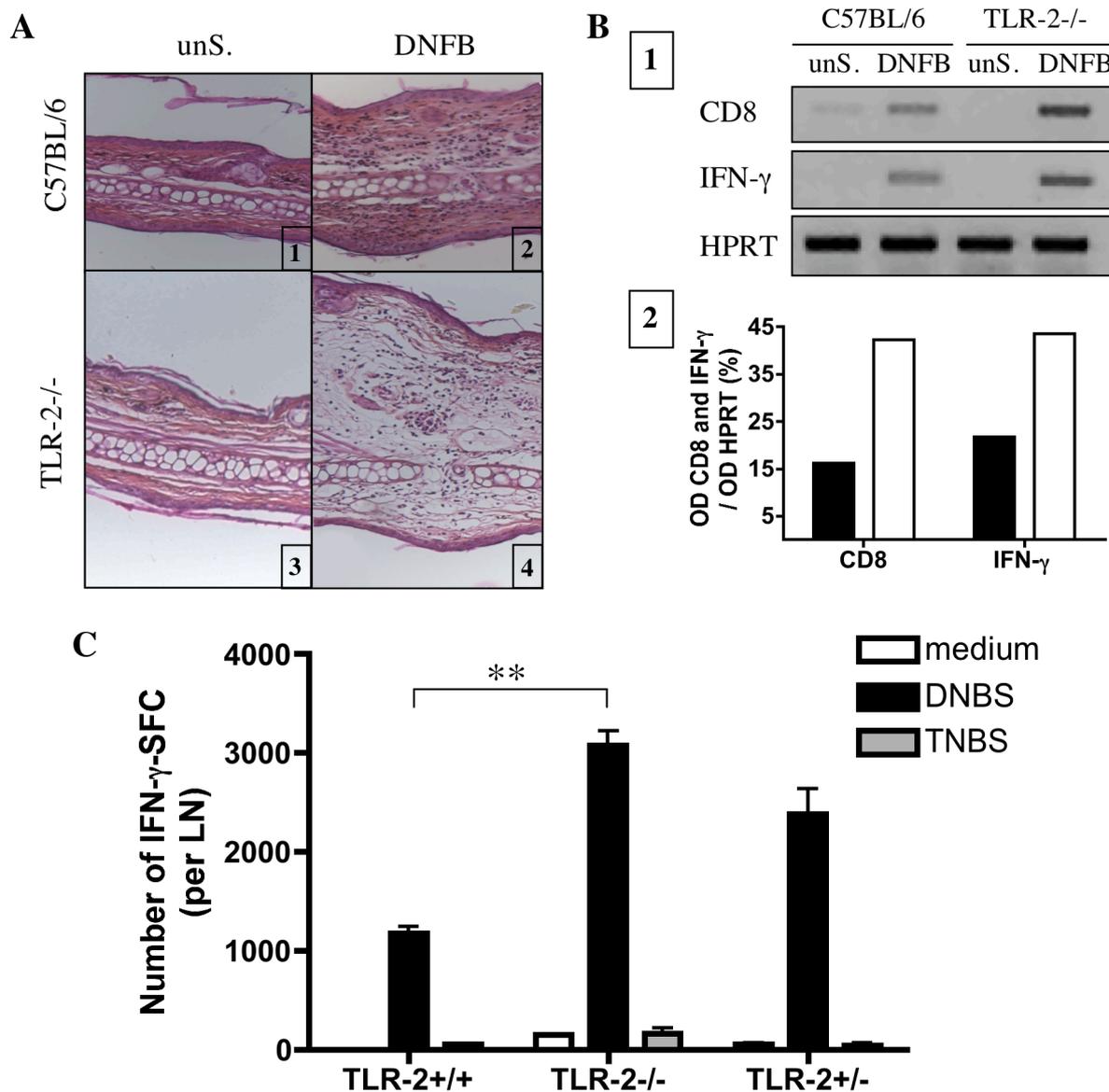


Figure 2. Le recrutement de LT CD8⁺ dans la peau et la réponse T spécifique au DNFB est augmentée chez les souris C57BL/6 versus TLR-2-/- pendant l'HSRC au DNFB. (A) Analyse histologique. Des souris sensibilisées au DNFB (2, 4) ou non (1, 3) à jour 0 sont révélées sur l'oreille à jour 5. Des biopsies d'oreilles de souris C57BL/6 (A-1, A-2) ou de TLR-2-/- (A-3, A-4) sont prélevées 24 h après l'élicitation puis traitées et analysées par hématoxiline et éosine. Agrandissement : x80. **(B)** Détection et quantification des ARNm de CD8 et d'IFN- γ dans l'oreille pendant la phase d'élicitation. **(B-1)** Les ARNm de CD8 et d'IFN- γ sont analysés par RT-PCR semi-quantitative : ils sont obtenus à partir d'oreille de souris sensibilisées et révélées au DNFB, 24 h après l'élicitation. Les contrôles proviennent d'oreilles de souris non sensibilisées mais révélées (unS.). **(B-2)** Représentation en histogramme de la quantité relative des ARNm de CD8 et d'IFN- γ de souris C57BL/6 (barres noires) et TLR-2-/- (barre blanches) sensibilisées et révélées par rapport à l'ARNm de l'HPRT en tant que standard. Chaque bande est analysée par densitométrie et les résultats sont exprimés en ratio de la densité optique par rapport à l'HPRT. **(C)** La réponse T spécifique d'haptène pendant l'HSRC au DNFB est analysée à jour 5 après sensibilisation dans les ganglions drainants de souris TLR-2+/+, TLR-2-/- ou TLR-2+/- . Les cellules spécifiques d'haptène productrices d'IFN- γ sont évaluées par ELISPOT IFN- γ après restimulation *in vitro* pendant 12 h avec du DNBS (barres noires) ou du TNBS (barres grises) ou dans du milieu seul (barres blanches). Les résultats sont exprimés en nombre de spots formés par cellule (SFC) par ganglion et sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. ** : p<0,01 avec le test de Student.

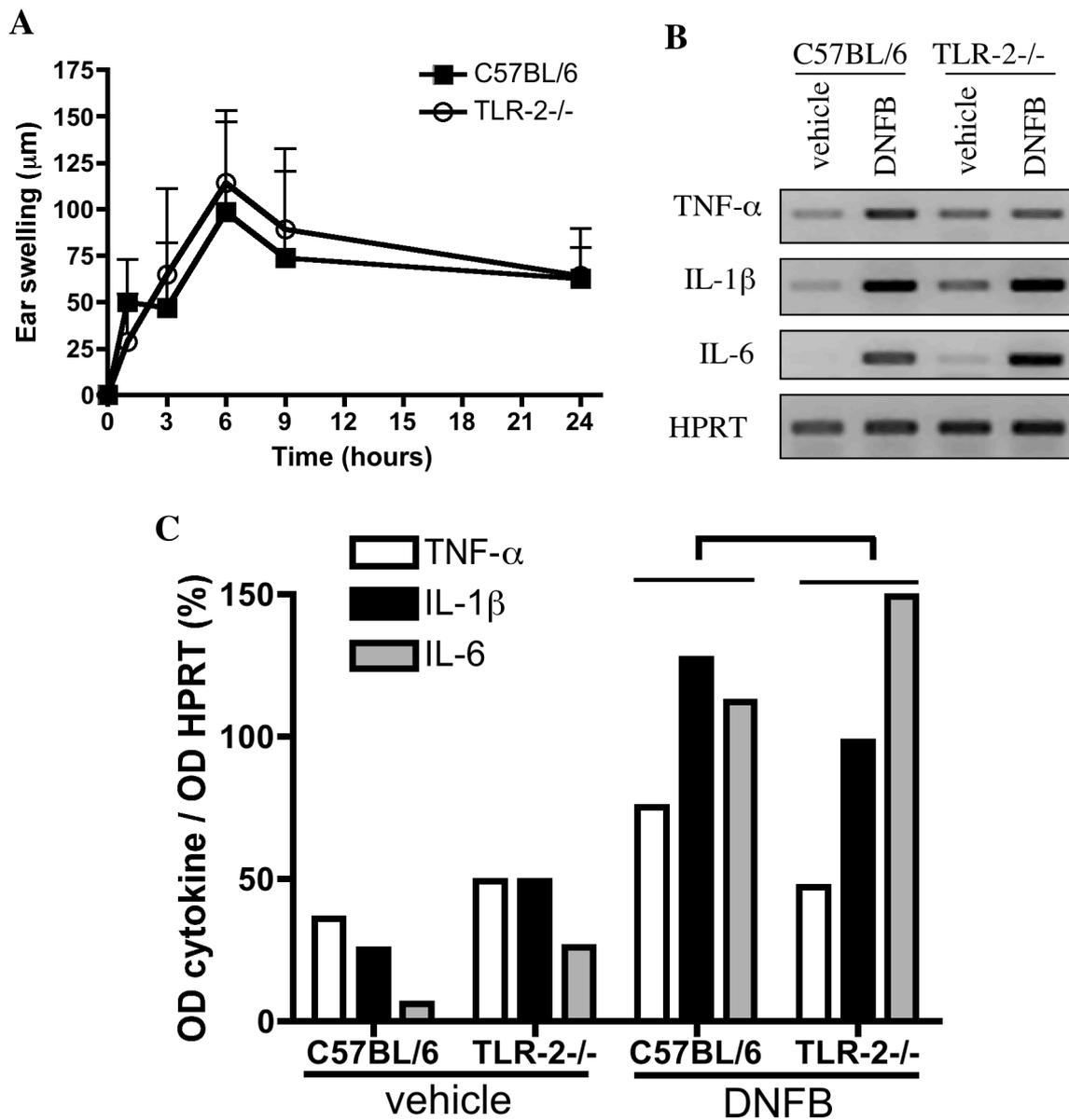


Figure 3 : L'intensité de l'irritation et l'expression des cytokines pro-inflammatoires sont identiques chez les souris TLR-2-/- et C57BL/6.

(A) 0,3% de DNFB a été appliqué sur l'oreille des souris C57BL/6 (■) et TLR-2-/- (□). Les résultats sont exprimés en moyenne en moyenne des œdèmes calculés (\pm écart-type) à un point donné après l'application du DNFB. (B/C) Détection et quantification de l'ARNm des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et IL-6 dans l'oreille pendant la phase de sensibilisation. (B) Les ARNm du TNF- α , IL-1 β et IL-6 ont été analysés par RT-PCR semi-quantitative : les ARNm des oreilles de souris ont été récupérés 3h après l'application du DNFB ou du véhicule. (C) Représentation en histogramme de la quantité relative des ARNm de TNF- α (barres blanches), IL-1 β (barres noires), IL-6 (barres grises) par rapport au gène de ménage HPRT. Chaque bande a été analysée par densitométrie et les résultats ont été exprimés en ratio de la densité optique par rapport à l'HPRT.

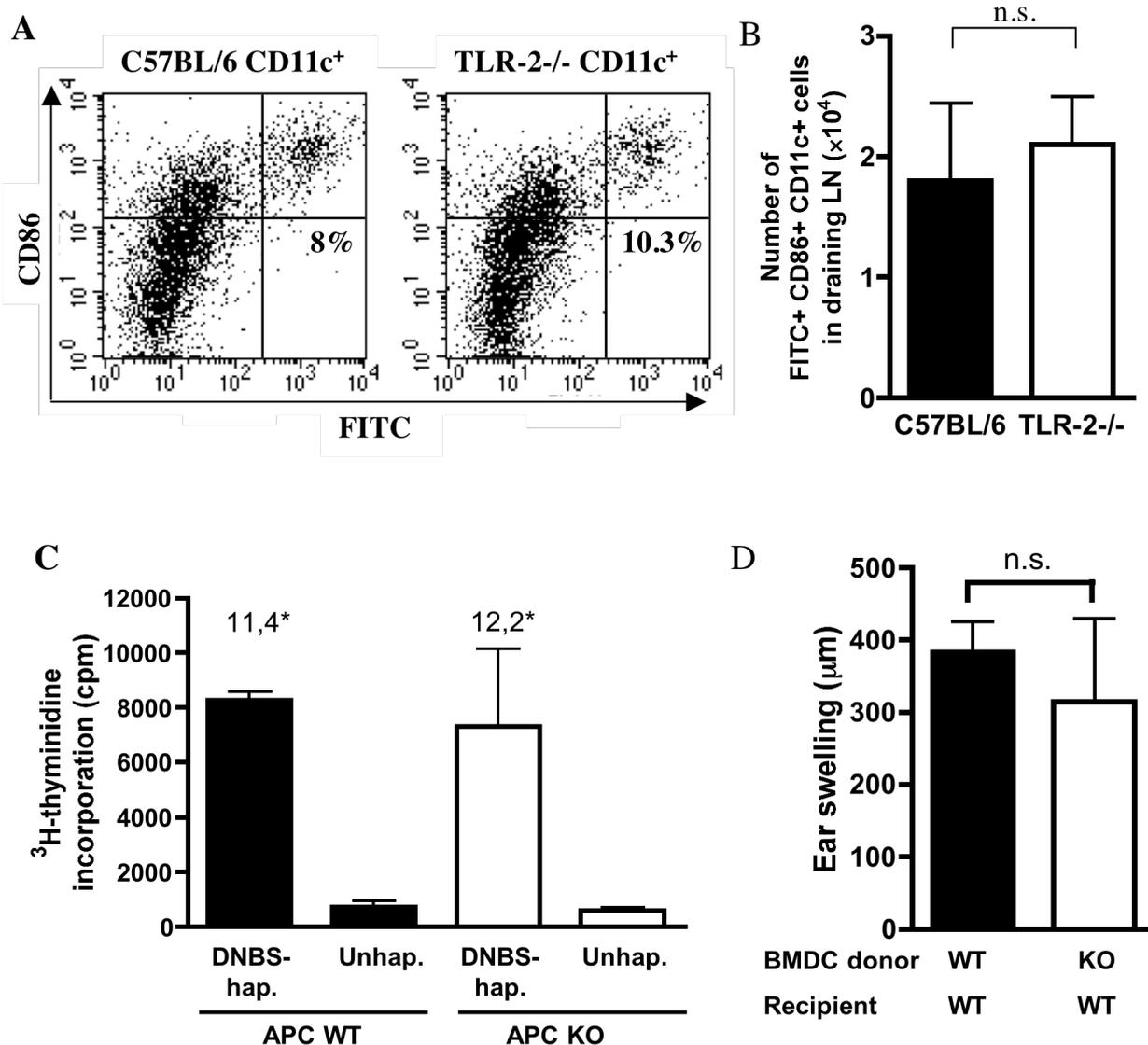


Figure 4 : La migration et la capacité de sensibilisation des CD de souris TLR-2^{-/-} et C57BL/6 sont identiques pendant l'HSRC au DNFB.

(A/B) La migration des CD vers les ganglions drainants a été analysée par FACS 24 h après l'application du FITC. Les résultats de l'analyse sur les souris TLR-2^{-/-} (barres blanches) et C57BL/6 (barres noires) sont exprimés : (A) en pourcentage de cellules CD86⁺ FITC⁺ parmi la population cellulaire CD11c⁺, et (B) en nombre absolu de cellules CD11c⁺ CD86⁺ FITC⁺ par ganglion (moyenne +/- écart-type). La différence entre les deux groupes n'est statistiquement pas significative (test de Student). (C) Réponse T CD8⁺ spécifique d'haptène induite par les splénocytes chez les TLR-2^{-/-} et C57BL/6. Les cellules T CD8⁺ ont été purifiées à partir des ganglions drainants de souris C57BL/6 sensibilisées au DNFB et ont été testées pour sa réponse proliférative en stimulation par le DNBS ou par des splénocytes non hapténisés issus de souris C57BL/6 (WT) ou TLR-2^{-/-} (KO). La réponse proliférative a été analysée après 3 jours de culture avec 8 h d'incorporation de thymidine tritiée. Les résultats sont exprimés en cpm totaux et en index de prolifération. (D) Transferts sous-cutanés de CD générées à partir de souris TLR-2^{-/-} ou sauvages. Des souris naïves C57BL/6 (WT) ont été immunisées par injection sous-cutanée de 2•10⁶ BMDC hapténisés ou au DNBS. Les BMDC ont été générées à partir de souris C57BL/6 (WT) ou TLR-2^{-/-} (KO). Les souris C57BL/6 receveuses sont révélées 5 jours après immunisation avec 0,15% de DNFB. Les résultats sont exprimés en moyenne des œdèmes de l'oreille (± écart-type) 24 h après la révélation.

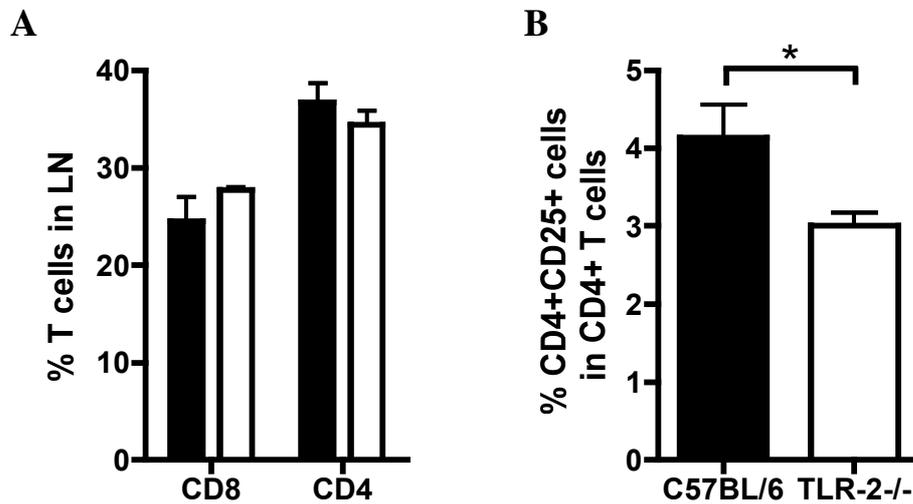


Figure 5. Diminution de la population T CD4⁺ CD25⁺ dans les TLR-2^{-/-} par rapport aux souris C57BL/6.

Pourcentage de LT CD8⁺, CD4⁺ (**A**) ou CD4⁺ CD25⁺ (**B**) dans les ganglions inguinaux de souris naïves C57BL/6 (barres noires) et TLR-2^{-/-} (barres blanches). Les cellules ganglionnaires totales des souris ont été marquées par l'expression à la surface du CD8, CD4 et CD25. Pour les cellules CD4⁺ CD25⁺, les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules CD25⁺ dans la population CD4⁺ des ganglions inguinaux (p<0.05 test de Student).

CONCLUSION-DISCUSSION

I- L'activation de l'immunité innée cutanée par un signal de danger de type haptène

1. Le rôle de l'environnement inflammatoire de l'irritation dans le développement des eczémas

Suite au contact avec un xénobiotique, les cellules de la peau sécrètent de nombreuses cytokines inflammatoires qui ne semblent pas spécifiques de la nature du chimique. Au cours de l'irritation dans le développement des eczémas, nous avons mis en évidence l'importance de l'expression de l'IL-1 β et de l'IL-10. Leur sécrétion dépend de la dose d'haptène impliqué et du fond génétique de l'individu (cf. Article n°1).

La dose d'haptène induisant la sensibilisation influence directement l'intensité de la réponse allergique, en effet plus la dose de sensibilisation est forte, plus la concentration nécessaire pour révéler la réponse d'élicitation est faible (Scott et al., 2002). De même, dans le modèle du PACS, plus la dose d'haptène appliquée est élevée au cours de la sensibilisation, plus la réponse allergique spécifique qui se développe à 6 jours est forte (cf. Article n°1). La dose d'haptène peut être rattachée à l'intensité du signal de danger : plus la concentration est forte, plus le signal de danger associé est fort. A l'inverse une dose faible d'haptène, n'induisant aucun signal irritant (absence de cytokine pro-inflammatoire), n'est pas sensibilisante et peut au contraire induire une tolérance, le signal antigénique étant toujours présenté. En effet, des doses non sensibilisantes d'haptènes génèrent des LT CD8⁺ de type Th2, responsables d'une tolérance spécifique de l'haptène (Steinbrink et al., 1996). Cette induction de tolérance a été confirmée dans plusieurs études (Asherson et al., 1979; Lowney, 1967; Sy et al., 1977). Ainsi, contrairement aux haptènes forts expérimentaux, les haptènes faibles qui sont les plus fréquemment rencontrés dans la vie quotidienne, ne sensibilisent qu'environ 5% de la population. Ce pouvoir sensibilisant plus faible pourrait ainsi s'expliquer par le fait que le signal de danger délivré est insuffisant. Cependant il peut être augmenté avec la fréquence et la durée de contact, et l'environnement extérieur en particulier par la présence de substances irritantes. Chez des patients sensibilisés à un haptène, l'application simultanée de cet haptène faible et d'un irritant lors de l'élicitation, conduit à une diminution du seuil de révélation et une augmentation de la réponse inflammatoire (Agner et al., 2002; McLelland et al., 1991; Pedersen et al., 2004). Ce type d'études est plus représentatif des conditions de la vie courante où l'exposition aux allergènes est souvent combinée à celle des irritants. L'action

de l'irritant peut être de deux ordres : il crée un signal de danger par l'induction de cytokines pro-inflammatoires et facilite la pénétration de l'haptène par l'altération de la peau, c'est le cas des détergents (Fullerton et al., 1994; Leveque et al., 1993). Les études réalisées précédemment portent uniquement sur l'effet irritant pendant la phase de révélation. Il serait intéressant de tester si l'application d'un irritant ne pourrait pas favoriser la phase de sensibilisation. Cependant, une étude montre que les médiateurs pro-inflammatoires sont nécessaires mais ne seraient pas suffisants pour une activation optimale des CD responsables de l'induction d'une réponse spécifique (Sporri and Reis e Sousa, 2005). Ainsi les conditions nécessaires pour induire une sensibilisation semblent plus complexes que pour l'élicitation.

L'environnement influence la réponse inflammatoire dont l'intensité dépend déjà de facteurs endogènes de la peau. En effet, le fond génétique détermine la sensibilité intrinsèque de la peau et constitue donc un paramètre important dans l'inflammation. Le polymorphisme génétique permet d'expliquer la différence de sensibilité entre les individus. Deux études proposent que le polymorphisme du gène de TNF- α (TNFA-308) soit impliqué dans l'irritation et la sensibilisation. En effet, une corrélation significative existe entre la sensibilité cutanée des patients aux irritants et aux allergènes, et le type d'allèle de TNF- α (Allen et al., 2000; Westphal et al., 2003). De plus, nous avons montré que les souris C57BL/6 qui présentent une inflammation au DNFB plus forte que les souris BALB/c, ont la capacité de produire plus d'IL-1 β pro-inflammatoire et moins d'IL-10 anti-inflammatoire (cf. Article n°1). Seules les différences du fond génétique entre ces deux souches de souris, soumises aux mêmes conditions environnementales et expérimentales, permettent d'expliquer les résultats obtenus. L'ensemble de ces observations suggère que le signal de danger dépend de facteurs génétiques, comme le polymorphisme des cytokines pro- et anti-inflammatoires pouvant influencer leur sécrétion et leur efficacité. Le fond génétique influence le seuil de sensibilité à la réponse inflammatoire, en déterminant la quantité de médiateurs pro- et anti-inflammatoires stockées dans les cellules cutanées (les KC, les CL, les mastocytes...) à l'homéostasie. Par exemple les mastocytes de souris C57BL/6 stockent plus d'histamine que ceux des souris BALB/c (Hart et al., 1998; Noguchi et al., 2005). L'utilisation d'haptènes faibles chez ces deux souches de souris, présentant une sensibilité de peau différente, serait un modèle d'étude comparable aux conditions de contact entre le chimique et la peau que l'on retrouve dans la vie quotidienne.

2. Le recrutement précoce des précurseurs de CD au cours de la sensibilisation

Les chimiokines qui constituent l'environnement inflammatoire sont responsables du recrutement de nombreuses cellules inflammatoires dont les précurseurs de CD. Nous avons montré que le recrutement de précurseurs de CD dans la peau est proportionnel à la dose de DNFB (cf. résultat complémentaire Figure 1A) et donc à l'intensité de la réponse inflammatoire irritante (cf. Articles n°1 et n°2). On peut envisager que ce recrutement dépende de l'expression des chimiokines induites les heures qui suivent l'application de l'haptène. En effet nous avons mis en évidence une plus forte expression de la chimiokine CCL20 chez les souris C57BL/6 associée à un recrutement plus important de précurseurs de CD par rapport aux souris BALB/c (cf. Article n°2). De plus, les souris C57BL/6 présentent une irritation plus forte au DNFB, corrélée à une expression de cytokines pro-inflammatoires plus importante par rapport aux souris BALB/c (cf. Article n°1). Ceci suggère que la forte expression de la chimiokine CCL20 serait due à l'activation plus importante de l'immunité innée dans les souris C57BL/6, et ainsi responsable d'un recrutement de précurseurs de CD en plus grand nombre. Ces derniers sont nécessaires pour la sensibilisation (Le Borgne et al., 2006), suggérant un rôle important de CCL20 dans l'HSRC. Par ailleurs, des travaux montrent que la sensibilité d'un individu à l'irritation a un impact dans le développement de maladies allergiques (Smith et al., 2002). Le taux de CCL20 pourrait être un marqueur de sensibilité cutanée dans l'allergie. Ainsi une analyse comparative plus large de l'expression de CCL20 dans des peaux de sensibilités différentes permettrait de définir un éventuel rôle central de cette chimiokine sécrétée au cours de l'irritation dans la sensibilisation d'un individu.

D'autres chimiokines sont nécessaires pour le recrutement des précurseurs de CD vers la peau puisque les monocytes circulants n'expriment pas CCR6 (récepteur de CCL20) et ne répondent donc pas à CCL20 dans des expériences de migration *in vitro* (Geissmann et al., 2003; Vanbervliet et al., 2002) et ne commence à l'exprimer que lors de leur entrée dans les tissus. Cela signifie qu'en amont de CCL20 d'autres chimiokines doivent permettre le recrutement. CCR2 pourrait jouer un rôle clef dans le recrutement de monocytes circulants vers les sites d'inflammation (Lu et al., 1998b; Peters et al., 2000; Xu et al., 2005), d'autant plus que parmi les monocytes, seule la population Gr1⁺ exprime CCR2 et migre en réponse à CCL2 (Palframan et al., 2001). Il serait donc possible que l'application du DNFB augmente la production de CCL2 et CCL13 (ligands de CCR2) et que ces chimiokines pourraient recruter des monocytes Gr1⁺ CCR2⁺. Des expériences complémentaires de comparaison d'expression et de délétion des couples récepteurs/ligands CCR6/CCL20 et CCR2/CCL2-CCL13

permettraient éventuellement de déterminer l'importance respective de ces chimiokines dans le recrutement de précurseurs de CD.

Par ailleurs, le taux de CD qui migrent vers les ganglions et l'activation des LT effecteurs qui en résulte sont proportionnels au recrutement de précurseurs de CD dans la peau au site inflammatoire (cf. Article n°2). Il est cependant possible que l'importance des CD néo-recrutées dans l'induction de réponses spécifiques ne soit pas uniquement due à une augmentation du nombre dans les ganglions drainants. Ces CD néo-recrutées pourraient être fonctionnellement différentes des CD résidentes de la peau : ces CD sont peut-être plus efficaces à répondre aux signaux de danger, car contrairement aux CD résidentes, elles ne subissent pas l'influence du microenvironnement tolérogène de la peau riche en cytokines comme l'IL-10 ou le TGF- β (Autschbach et al., 1998; Glick et al., 1993). Les CD recrutées suite à l'application d'un haptène pourraient donc d'une part augmenter le nombre de CD dans les ganglions drainants, mais d'autre part être la source de CD plus aptes à répondre aux signaux de danger. Les CD recrutées pourraient ainsi migrer plus efficacement jusqu'au ganglions drainants. En effet, la migration des CD des souris C57BL/6 (qui recrutent plus de précurseurs de CD) semble plus efficace que celles des BALB/c : après l'injection du même nombre de BMDC CFSE⁺ générées à partir de souris C57BL/6 ou BALB/c et injectées respectivement dans des souris C57BL/6 ou BALB/c, on retrouve plus CD CFSE⁺ dans les ganglions drainants chez les souris C57BL/6 que chez les souris BALB/c à 24 heures (cf. résultats complémentaires Figure 2).

II- Le rôle des TLR dans le développement des eczémas de contact

1. La réponse immunitaire innée induite par les TLR

Peu de travaux portent sur l'étude de l'activation de l'immunité innée via les TLR par les xénobiotiques. Pourtant des ligands endogènes connus de TLR-2 et TLR-4 pourraient être directement induit par les haptènes. C'est le cas des protéines de choc thermique Hsp60 (heat shock protein) et Hsp70 (Asea et al., 2002; Kirschning and Schumann, 2002; Vabulas et al., 2001; Vabulas et al., 2002) qui peuvent être induites en conditions inflammatoires suite à l'application d'haptènes *in vitro* et *in vivo* (Albers et al., 1996; Bartosiewicz et al., 2001; Farzaneh et al., 2005). De plus, dans certaines maladies inflammatoires comme le psoriasis, les protéines Hsp60 et Hsp70 sont retrouvées dans l'épiderme. Et l'expression par les CD et

les fibroblastes du derme du récepteur d'Hsp70, CD91 (Boyman et al., 2005; Curry et al., 2003), montre la possible implication des protéines de stress dans l'inflammation cutanée. Le TLR-4 est aussi activé par des composés de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, l'héparan sulfate et des fragments de l'acide hyaluronique, qui active aussi le TLR-2 *in vitro* et *in vivo* (Okamura et al., 2001; Scheibner et al., 2006; Termeer et al., 2002). Ceci suggère une activation indirecte possible des TLR-2 et TLR-4 par des xénobiotiques qui sont capables d'induire l'expression de protéines Hsp et d'endommager la matrice extracellulaire par leur toxicité (Proksch et al., 2006). Des ligands d'autres TLR pourraient être générés par les xénobiotiques. Il est envisageable que lors d'une mauvaise élimination des corps apoptotiques, des séquences d'ADN contenant des motifs CpG soient libérées en excès et activent le TLR-9. D'autant plus que l'injection intradermique d'ADN plasmidique chez l'homme induit une inflammation associée un recrutement important de monocytes (Sawamura et al., 2005). Et ce dernier est dépendant de TLR-9 puisqu'il est absent chez des souris déficientes en TLR-9 injectées avec cet ADN (Sawamura et al., 2005). De même, l'ARN simple brin, qui peut activer les TLR-7 et TLR-8, pourrait se révéler être un ligand endogène dans des conditions pathologiques et faciliter le développement d'une réponse immunitaire. Par ailleurs, il est concevable que les haptènes puissent se lier directement aux acides aminés de certains TLR, conduisant à leur activation.

Ainsi nous avons cherché à définir l'implication des TLR dans l'irritation et par conséquent dans le développement de l'eczéma. Les TLR sont exprimés par de nombreuses cellules cutanées et leur activation joue un rôle important dans le déclenchement de l'immunité innée cutanée. En effet, en conditions inflammatoires, les KC expriment de nombreux TLR dont l'activation induit l'expression de la cyclooxygénase-2, d'IL-8 et de la synthétase oxydative (impliquée dans le stress oxydatif) (Mempel et al., 2003). Les mastocytes expriment aussi la plupart des TLR qui jouent un rôle crucial dans leur dégranulation. Les mastocytes issus de peau de souris sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6) et des chimiokines (RANTES, MIP-1 α , MIP-2) suite à l'activation des TLR-3, -7 et -9 *in vitro* (Matsushima et al., 2004). L'activation de TLR-3 chez des mastocytes humains inhibe leur adhésion à la fibronectine facilitant leur migration au site d'inflammation et au ganglion drainant (Kulka and Metcalfe, 2006). De plus, des souris déficientes en mastocytes présentent une diminution de 80% du recrutement de neutrophiles suite à l'injection de zymosan (ligand de TLR-2), tout comme les souris déficientes en Myd88. Cette déficience est rétablie dans les deux cas après l'injection de mastocytes dérivés de la moelle osseuse de souris sauvages. Et des souris sauvages prétraitées avec un antagoniste anti-TLR-2 présentent aussi cette

diminution drastique de neutrophiles induite par le zymosan (Takeshita et al., 2003). Donc le signal du TLR-2 est capable d'activer les mastocytes *in vivo*, et de déclencher une réponse inflammatoire (Supajatura et al., 2002). Les neutrophiles activés par les TLR induisent (i) la production d'IL-8 et de ROS, (ii) l'augmentation du taux de phagocytose et (iii) la présentation de L-sélectine (Hayashi et al., 2003) qui participent à la migration des neutrophiles à travers les cellules endothéliales. Par ailleurs, l'ajout d'agonistes de TLR-2 et TLR-4 dans une culture de neutrophiles est capable d'altérer l'expression de leurs récepteurs à chimiokines (Sabroe et al., 2005), le chimiotactisme à l'IL-8 est ainsi réduit (Hayashi et al., 2003). Ce processus permettrait de maintenir les neutrophiles recrutés au site d'inflammation (Reaves et al., 2005). Les macrophages activés par les TLR participent également à l'inflammation cutanée. En effet, les TLR-2 et TLR-4 sont de puissants inducteurs de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- α) et de chimiokines (CCL19, CCL20) par les macrophages. Une étude montre que l'activation au préalable des TLR pourrait rendre les macrophages hautement sensibles à l'induction de l'expression de cytokines pro-inflammatoires par des toxiques de type fongique (Pestka and Zhou, 2006), suggérant un rôle crucial des macrophages dans la sensibilité de la peau à un deuxième signal induit par des toxiques.

Donc les TLR activés sont responsables de l'induction de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, de sélectines et de chimiokines qui régulent la migration des cellules au site de l'inflammation. Ils participent ainsi à l'inflammation du tissu et au recrutement de cellules spécialisées du système immunitaire sur ce site (Hoebe et al., 2004). Cependant dans notre modèle d'irritation aux haptènes chez des souris TLR-2^{-/-}, l'expression de cytokines pro-inflammatoires et la réponse inflammatoire qui en résulte ne semblent pas modifiées (cf. Article n°3 en préparation). La seule mutation de TLR-2 est insuffisante car elle est probablement compensée par d'autres TLR, capables de reconnaître des ligands endogènes générés par l'haptène. Ainsi la redondance des TLR serait telle que l'absence de l'un d'autres eux pourrait être compensée par les autres. Pour cela, il serait intéressant d'utiliser ce modèle d'étude chez des souris déficientes en MyD88 molécule adaptatrice, commune aux voies des TLR (sauf TLR-3) et à l'IL-1.

2. Les TLR : le lien entre les réponses immunitaires innée et adaptative

L'activation des TLR induit la maturation des CD (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Kaisho and Akira, 2001) qui est essentielle pour l'activation efficace des LT naïfs conduisant à la réponse immunitaire spécifique. De plus, la migration des CL serait fortement influencée par l'activation des TLR notamment le TLR-7. En effet, l'application topique d'imiquimode augmente la migration des CL jusqu'au ganglion drainant amplifiant ainsi la réaction d'HSRC chez la souris (Suzuki et al., 2000) et lève même la tolérance induite par les rayons UV dans ce même modèle (Thatcher et al., 2006). Par ailleurs, la nature de l'antigène et le TLR auquel l'antigène se lie, peut déterminer le profil cytokinique de la CD ce qui va influencer la polarité de la réponse T (Mazzoni and Segal, 2004). Enfin, la sécrétion d'IL-6 par les CD activées via les TLR peut rompre la tolérance induite par les Treg, permettant ainsi le développement de la phase effectrice (Pasare and Medzhitov, 2003). Les TLR jouent donc un rôle adjuvant important dans l'activation de la réponse spécifique via les CD. Cependant nos résultats sur la migration des CD et leur capacité à présenter l'haptène sont similaires chez les souris TLR-2^{-/-} par rapport aux souris sauvages, bien que la réponse spécifique soit augmentée chez les souris déficientes (cf. Article n°3). Ceci suggère que le signal TLR-2 est impliqué dans le développement de l'eczéma en réponse aux haptènes, mais son effet ne passe pas par une modification fonctionnelle des CD.

3. La régulation de la réponse spécifique par les TLR

Nous nous sommes particulièrement intéressés au TLR-2 car il a été décrit, avec TLR-4 comme impliqué dans la diminution de réponses inflammatoires comme l'asthme. En effet, l'administration d'agonistes de l'un de ces deux TLR pendant la sensibilisation ou l'élicitation chez des souris, diminue le recrutement des éosinophiles et des LT CD4⁺ dans les poumons suite à l'exposition aux allergènes, ainsi que la prolifération lymphocytaire dans les ganglions drainants (Velasco et al., 2005). D'après Patel *et al.*, les mécanismes mis en jeu dans l'asthme n'impliqueraient pas les Treg, mais seraient dépendants de l'IL-12 (Patel et al., 2005). Ces résultats suggèrent que la diminution de cette réponse allergique de type Th2 serait la conséquence de l'induction d'une réponse Th1. Une autre étude montre qu'un ligand de TLR-2, Pam₃Cys-S4K, est capable d'induire l'apoptose de LT CD4⁺ effecteurs conduisant ainsi à l'inhibition de la conjonctivite allergique chez la souris (Fukushima et al., 2006). D'autres travaux mettent en évidence que des ligands de TLR-2 (zymosan, Pam₃Cys-S4K et Hsp60)

augmentent la fonction suppressive des Treg via l'IL-10 et le TGF- β pouvant conduire à une induction de tolérance *in vivo* (Dillon et al., 2006; Zanin-Zhorov et al., 2006). Donc différents mécanismes de régulation pourraient être impliqués dans l'action de TLR-2 sur les réponses immunitaires.

Cependant ces résultats restent controversés, plusieurs travaux montrent que la présence de ligands de TLR-2 conduit à l'inactivation temporaire de la fonction des Treg permettant par conséquent le déclenchement de la réponse spécifique *in vitro* et *in vivo* (Liu et al., 2006; Pasare and Medzhitov, 2004; Suttmuller et al., 2006a; Suttmuller et al., 2006b). Cette inactivation est associée à la diminution de l'expression de Foxp3 par l'engagement TLR-2 (Liu et al., 2006). Par ailleurs, nous retrouvons chez les souris déficientes en TLR-2 un nombre de Treg diminué (cf. Article n°3 et (Netea et al., 2004). L'administration de ligand de TLR-2 à des souris sauvages conduit à l'augmentation du nombre de Treg (Suttmuller et al., 2006a). Donc le TLR-2 joue un rôle crucial dans la régulation de l'expansion et de la fonction des Treg. L'augmentation de la réponse spécifique observée chez les souris TLR-2^{-/-} (cf. Article n°3) pourrait ainsi être due à une absence d'activation des Treg au cours du développement de la réponse spécifique et/ou une diminution du nombre de la population des Treg. Ces évènements conduisent à une modification de la balance entre les cellules effectrices et régulatrices en faveur d'un nombre plus important d'effecteurs. Des expériences complémentaires permettraient de vérifier cette implication du TLR-2 dans la fonction des LT régulateurs pendant l'HSRC. De plus, l'application d'agonistes du TLR-2 dans notre modèle d'HSRC par analogie aux travaux réalisés sur des maladies allergiques, pourrait éventuellement avoir un effet bénéfique en induisant une régulation sur le développement de l'eczéma.

D'autres TLR pourraient également être impliqués dans la régulation de la réponse spécifique, une étude sur l'hypersensibilité retardée aux antigènes protéiques montre que l'application de ligands de TLR-3, -4 ou -9 pendant la sensibilisation épicutanée inhibe la régulation de la réaction immunitaire (Ptak et al., 2006). L'activation du TLR-5 a aussi été décrite comme augmentant la fonction suppressive des Treg chez l'homme (Crellin et al., 2005). Ainsi des ligands de TLR pourraient être utilisés comme traitements en immunothérapie afin de diminuer les allergies (Horner, 2006).

III- Apports des travaux de thèse sur la compréhension de la physiopathologie de la DAC

Les résultats obtenus au cours de cette thèse permettent de compléter le modèle de physiopathologie de la DAC (cf. Figure 24).

L'application topique à dose optimale d'un haptène permet la pénétration du chimique dans les différentes couches de la peau. Les propriétés toxiques et pro-inflammatoires de l'haptène sont liées à un signal de danger qui déclenche l'activation du système immunitaire inné cutané. De nombreuses cellules résidentes notamment les KC et CL induisent la libération et la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α . L'expression de ces cytokines est corrélée à l'intensité de l'irritation et dépend fortement de facteurs individuels intrinsèques génétiques déterminant une sensibilité plus ou moins forte aux chimiques (cf. Article n°1). Ces cytokines inflammatoires induisent à leur tour l'expression de diverses cytokines, dont les chimiokines qui sont responsables du recrutement dans la peau de nombreuses cellules spécialisées de l'inflammation. En particulier la chimiokine CCL20 dont le gradient de concentration vers le site épidermique permet le recrutement des précurseurs de CD (CD11b⁺ Gr1^{int}). Parallèlement des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, participent à la régulation de l'inflammation notamment en diminuant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Les CD immatures épidermiques (CL), dermiques résidentes mais aussi recrutées sont capables de capter l'haptène en tant qu'antigène. L'activation du système immunitaire inné cutané favorise la maturation et la migration des CD jusqu'aux ganglions drainants. Elles sont alors capables d'activer les LT CD8⁺ spécifiques effectrices dont le nombre corrèle avec la quantité de précurseurs de CD recrutés au cours de l'irritation et avec le nombre de CD ayant migrées jusqu'aux ganglions drainants (cf. Article n°2). Les CD activent aussi les LT CD4⁺ régulateurs spécifiques dont la fonction pourrait être augmentée par l'activation du TLR-2 induit par l'haptène. Ces LT spécifiques vont ensuite circuler en périphérie par voie sanguine.

Lors d'un deuxième contact avec le même haptène, les LT CD8⁺ spécifiques sont recrutés au site de contact et activés. La persistance de l'haptène dans la peau peut être suffisante pour recruter les LT CD8⁺ spécifiques dont le nombre dépend directement de la quantité activée au cours de la sensibilisation (cf. Article n°2). Les LT CD8⁺ cytotoxiques génèrent une inflammation pouvant aboutir à des lésions d'eczéma via la sécrétion d'IFN- γ . Cette réaction inflammatoire est résolue lors de l'arrivée secondaire de LT CD4⁺ régulateurs qui sécrètent des cytokines anti-inflammatoires.

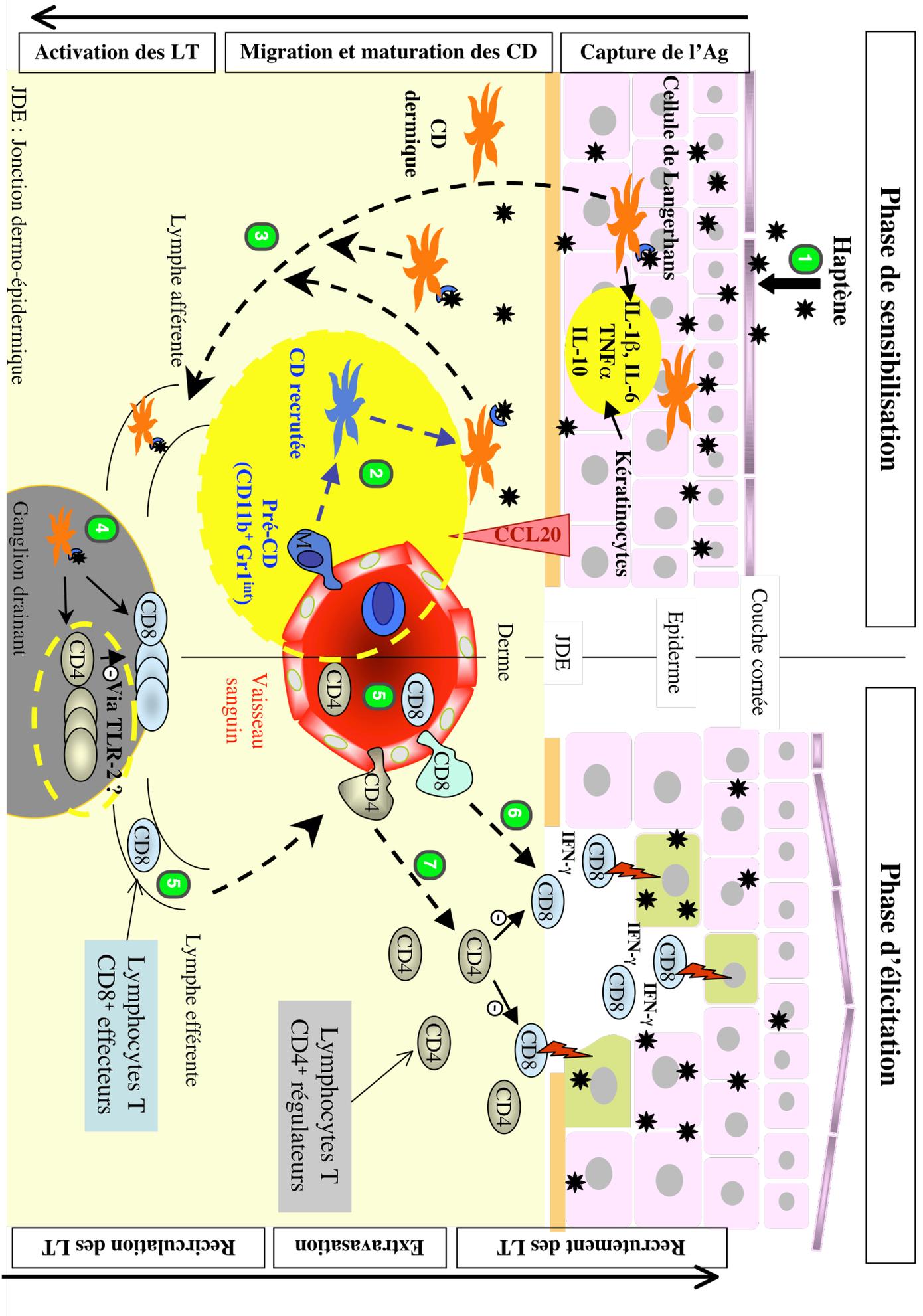


Figure 24. Bilan des travaux de thèse sur le modèle de la physiopathologie de la DAC.

ANNEXES

Annexe 1 :

Laminaria Ochroleuca extract reduces skin inflammation

M. Bonneville, P. Saint-Mezard, J. Benetiere, A. Hennino, I. Pernet, A. Denis
and J-F. Nicolas

Accepté pour publication au Journal of the European Academy of Dermatology and
Venereology (JEADV)

Laminaria Ochroleuca extract reduces skin inflammation

M. Bonneville, P. Saint-Mezard, J. Benetiere, A. Hennino, I. Pernet*, A. Denis* and J.F. Nicolas.

AFFILIATION

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U503, IFR128, BioSciences Lyon-Gerland, Lyon F-69007, France ; CH Lyon-Sud, Department of Clinical Immunology and Allergy, Pierre-Benite, F-69495, France ; UCB Lyon1, Lyon, F-69007, France.

* DIPTA SAS, 505 rue Pierre Berthier, F-13855, Aix-en-Provence, France

CORRESPONDANCE

J-F. NICOLAS, UCBL-INSERM U503, IFR128, 69375 Lyon Cx 07. Fax: 33-478-861-528

E-mail: nicolas@cervi-lyon.inserm.fr

KEY WORDS

Hapten, irritant contact dermatitis, skin inflammation

To the Editor,

Irritant Contact Dermatitis (ICD) is a frequent skin inflammatory condition induced by the skin contact with chemicals responsible for skin disruption, epidermal cellular changes and production of pro-inflammatory cytokines [1, 2]. In the present study, we report on the anti-inflammatory activity of an extract of the sea alga *Laminaria Ochroleuca* (LO) in a murine model of hapten-induced ICD. LO extract is mainly composed of phosphatidylcholine derivatives and has been shown to decrease the production of inflammatory cytokines by epidermal cells in *in vitro* models of skin inflammation [3].

Skin inflammation was induced by the application of DNFB (2,4-dinitrofluorobenzene) onto the ear of naive C57BL/6 mice. Inflammation was scored at 0, 3, 6, 9 and 24 hrs post-DNFB painting, as the increase in ear thickness (ear swelling) of the DNFB-painted right ear vs the vehicle-painted left ear, as previously described [1]. To examine the effect of the LO lipidic extract (Secma Biotechnologies Marines, Pontrioux, France) on the skin inflammation, the ear skin was pretreated for three consecutive days by applying twice a day the LO extract (2% in acetone/olive oil 4:1) or the vehicle alone (Fig. 1A). Figure 1B shows the kinetics of the irritant skin inflammation induced by 0.3% DNFB in mice pretreated with the vehicle (open circles) or with the LO extract (closed squares) in a representative experiments (5 mice per group). DNFB painting in mice receiving the vehicle resulted in a strong ICD reaction which started at 3 hours, was maximal at 6 hours and persisted until 24 hrs. LO pre-treatment potently inhibited the DNFB-induced ICD at all time points. Its anti-inflammatory effect was noted as early as 3 hrs post DNFB painting, was maximal at 6 hrs and was still present at 24 hrs. Figure 1C shows the mean DNFB-induced ear swelling at 6 hrs in vehicle-treated and LO extract-treated mice from 5 independent experiments (5 mice per group). Results show that LO extract significantly reduces the intensity of the irritant skin inflammation ($p < 0,01$).

Previous *in vitro* studies on reconstituted skin subjected to an epidermal trauma have shown that the LO lipidic extract exhibit several biological properties that could account for the *in vivo* anti-inflammatory effect we report here [3]: (i) LO has an inhibitory activity on the release of IL-1 α , IL-6 and PGE2 by epidermal cells, (ii) LO improves the quality of the stratum corneum by reducing the degradation of corneocytes and, (iii) LO increases the lipidic epidermal barrier through the high phosphatidylcholine concentration of the lipidic extract. Therefore, the *in vivo* anti-inflammatory effect of LO observed here may be secondary to a

direct effect of LO on the restoration of the epidermal barrier function. This may lead to a diminished penetration of DNFB and/or to an indirect effect through the decrease in the synthesis of epidermal cytokines.

In conclusion, LO lipidic extract demonstrates *in vivo* skin anti-inflammatory properties and is able to improve ICD. Since ICD promotes the development of T cell-mediated allergic contact dermatitis (ACD)[5], we hypothesize that LO extract could be also used to prevent the evolution of chronic ICD in a more severe form of ACD.

REFERENCES

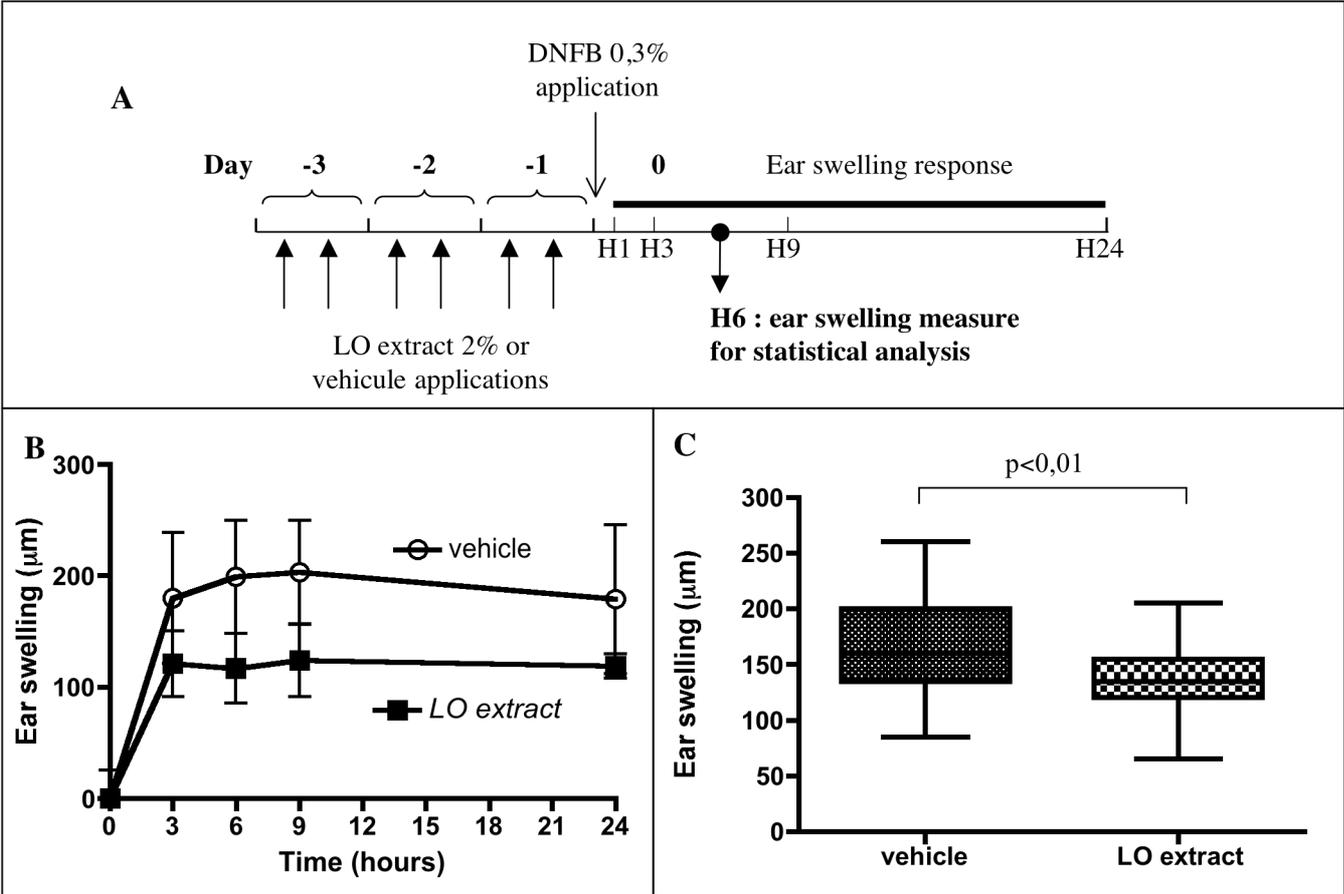
- [1] Saint-Mezard P, Krasteva M, Chavagnac C *et al.* : Afferent and efferent phases of allergic contact dermatitis (ACD) can be induced after a single skin contact with haptens: evidence using a mouse model of primary ACD. *J Invest Dermatol* 120: 641-647, 2003.
- [2] Smith H, Basketter D and McFadden J: Irritant dermatitis, irritancy and its role in allergic contact dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 27: 138-146, 2002.
- [3] Mekideche N, Ennamany R Saboureau D and Messadek J: Antileukine 6, a new weapon against ageing. *Personal Care Magazine* pp. 63-73, January 2002.
- [4] McFadden J and Basketter D: Contact allergy, irritancy and ‘danger’. *Contact Dermatitis* 42: 123-127, 2000.
- [5] Saint-Mezard P, Rosieres A, Krasteva M, Berard F, Dubois B, Kaiserlian D, Nicolas JF : Allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol.* 14 (5): 284-95, 2004.

LEGEND TO FIGURE

Figure 1. Anti-inflammatory effect of *Laminaria Ochroleuca* extract on DNFB-induced skin inflammation. (A) *Experimental protocol.* During three days before DNFB painting (Day -3, Day -2, Day -1), LO extract (2% in acetone/olive oil, 4:1) was applied twice a day onto the left ear (5 μ L per face) of the mice. A control group received the vehicle (acetone/olive oil) following the same protocol. At Day 0, DNFB (0.3% in acetone/olive oil, 4:1) was applied on the left ear, whereas the same volume of vehicle (acetone/olive oil) was applied on the right ear. Evaluation of ear thickness was done for each ear prior to hapten application and repeated hours after DNFB-painting with a spring-loaded micrometer (J15,

Blet SA, Lyon, France). Ear swelling was expressed as the ear thickness at the corresponding time minus the baseline thickness. **(B)** Kinetics of the DNFB-induced ICD and effect of LO-treatment in a typical experiment. Ear thickness was measured at 1, 3, 6, 9 and 24 hrs after DNFB application for LO-treated mice (black squares ■) and vehicle-treated mice (open circles ○). Results are expressed as the mean ear swelling at different time points after DNFB painting (+/-SD). **(C)** Anti-inflammatory effect of LO extract on DNFB-induced ICD. Results showing the mean ear swelling at 6 hours post DNFB painting in vehicle- and LO-treated mice are pooled from 5 independent experiments (5 mice per group in each experiment). The difference between mean values of the vehicle- and LO-treated groups was evaluated with the two-tailed Student's *t* test.

Figure 1



Annexe 2 :

Physiopathologie de la Dermatite Irritante de Contact

M. Bonneville, A. Rozieres, G. Chabeau, P. Saint-Mezard, J-F. Nicolas

Revue dans le cours du Groupe d'Etudes et de Recherches en Dermato-Allergologie
(G.E.R.D.A.) p177-187, Lille 2004

M. Bonneville, A. Rozieres, G. Chabeau*, P. Saint-Mezard, J.-F. Nicolas*

INSERM U503, IFR 128, UCB Lyon I, Lyon

* Immunologie Clinique et Allergologie,
CH Lyon-Sud, UFR Lyon-Sud,
Pierre-Bénite

PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DERMATITE IRRITANTE DE CONTACT

La peau est une barrière biologique contre des agents environnementaux de nature physique, chimique et biologique. Des réactions inflammatoires peuvent être déclenchées par des facteurs exogènes et endogènes. L'irritation cutanée classiquement décrite comme une réaction inflammatoire locale, réversible et non immunologique se caractérise par une inflammation induite après un contact unique ou répété avec une substance chimique sur la peau. On décrit deux types de dermatite irritante de contact (DIC), la DIC aiguë qui est accompagnée d'une inflammation alors que la DIC chronique est associée à une prolifération accrue des kératinocytes et une hyperkératose transitoire. La DIC est une maladie dont le déclenchement peut être influencé par un ensemble de facteurs comme l'âge, le fond génétique, le sexe.

La DIC implique les cellules du système immunitaire cutané inné qui sont des constituants de la peau. L'action de ces cellules immunitaires cutanées est orchestrée par un réseau de médiateurs inflammatoires regroupant les cytokines, les chimiokines, des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion et des dérivés lipidiques. Les cytokines et les chimiokines induisent une réponse inflammatoire et une réponse immune en agissant localement et à distance respectivement. De plus, indépendamment du mécanisme particuliers de l'irritation, la pénétration cutanée du chimique est un élément important modulant la capacité des chimiques à induire une irritation.

CLINIQUE DE LA DIC

On entend par dermatite irritative, une atteinte de l'intégrité de la peau avec des lésions plus ou moins importantes de l'épiderme et une réaction inflammatoire dans le derme sous-jacent.

Cette atteinte cutanée est une réaction non spécifique qui peut être collective ou individuelle. Elle va dépendre :

- de la nature de l'agresseur (agent irritant, corrosif ou caustique) et de sa concentration,
- de la durée et de la fréquence du contact (répétition),
- de l'environnement (température, hygrométrie, occlusion),
- du type de peau (phénotype) et d'une zone du tégument à l'autre,
- de l'état cutané (peau lésée, atopie, âge) et de son pouvoir réparateur. Cette atteinte cutanée va de la simple sécheresse cutanée (xérose) à la lésion caustique, responsable alors d'une lésion majeure : la brûlure.

Les DIC représentent 70 à 80 % des dermatites de contact. Leur expression clinique est très protéiforme. Classiquement, l'on distingue les DIC aiguës et les DIC chroniques, mais il existe des états intermédiaires.

Les DIC aiguës sont d'apparition rapide et ne débordent pas au-delà des zones de contact avec l'agent irritant. Elles sont constituées par des macules ou des papules, par des placards érythémateux, érythémato-œdémateux ou érythémato-squameux, voire de vésicules ou de bulles. Classiquement, il y a absence de prurit, mais sensation de picotements ou de brûlure cuisante.

Les DIC chroniques présentent également des aspects variés : sécheresse cutanée (xérose, rugosité, fine desquamation), dermatite érythémato-squameuse, hyperkératose réactionnelle, aspect fissuraire (crevasses), disparition des empreintes digitales (dermatite d'usure), voire véritable pulpite. Au niveau de la main, il y a une atteinte préférentielle des paumes et la zone atteinte peut être pathognomonique du geste professionnel.

Aucun tableau clinique n'est absolument spécifique des DIC qui peuvent simuler celui d'une DAC lorsque l'agresseur est un haptène fort (ex. : époxy).

L'irritant peut également déclencher ou pérenniser une dysidrose ou une dermatite atopique. Un nouveau contact avec l'irritant peut entraîner une récurrence qui sera d'autant plus rapide du fait d'une rémanence de l'irritabilité cutanée.

ASPECTS PHYSICO-CHIMIQUES DE L'IRRITATION

Les effets irritants des molécules chimiques sont liés à leurs propriétés physico-chimiques ainsi qu'à la concentration appliquée qui influencent la pénétration cutanée. Les irritants comprennent un ensemble de familles chimiques très variées comme des solvants, des agents déshydratants, des agents oxydants ou réducteurs. Devant la grande hétérogénéité des molécules chimiques, il est difficile de discriminer le pouvoir irritant de celles-ci en se basant sur leur structure chimique.

Pénétration cutanée

Les mécanismes de perturbations de la barrière de la peau par les irritants ne sont pas bien connus. Ces derniers semblent induire une augmentation de l'hydratation et une désorganisation de la bicouche lipidique de l'épiderme. De plus, des modifications de la fonction de « barrière » de la peau sont aussi observées dans des maladies inflammatoires comme la dermatite atopique et le psoriasis [1]. La barrière cutanée n'est toutefois pas absolue et la peau est perméable à presque toutes les substances, seul le degré de perméabilité varie en fonction des substances. Il est lié principalement à l'état physiologique de la peau [2], aux propriétés physico-chimiques des composés dont elle est supposée restreindre l'entrée (poids moléculaire, polarité, stade d'ionisation) et à la nature de l'environnement par lequel ces substances sont amenées au contact de la peau. Une fois absorbée, la substance est distribuée dans l'organisme puis après avoir été métabolisée, elle est éliminée. Il faut noter que l'absorption cutanée peut être définie comme étant la somme de deux phénomènes :

- la pénétration des molécules du milieu extérieur au sein de la peau ;
- la résorption depuis le derme par la circulation sanguine ou lymphatique. Cependant la propriété fonctionnelle de certaines molécules chimiques capables d'induire l'activation de l'immunité innée semble être un facteur plus important que leur capacité à pénétrer facilement dans la peau [3].

Principaux effets des irritants

L'effet des molécules chimiques irritantes sur les cellules se caractérise par une perturbation de l'équilibre du fonctionnement des cellules. En effet, l'hétérogénéité des propriétés physico-chimiques des molécules irritantes expliquent la présence d'effets différents sur les cellules en fonction du produit. Les solvants et les détergents modifient les membranes cellulaires et influencent la fluidité membranaire. Les acides et les alcalins modifient le pH membranaire. Et certains chimiques perturbent des échanges cellulaires avec l'extérieur.

Ces modifications sur les cellules induisent des conséquences différentes en fonction du produit chimique et de sa concentration dont les effets se résument à une activation cellulaire ou à une mort cellulaire par apoptose ou par nécrose.

La sensibilité aux molécules chimiques ne dépend pas simplement des propriétés physico-chimiques de celle-ci mais aussi du type cellulaire (kératinocytes, cellules de Langherans, lymphocytes, mastocytes), de la concentration du chimique et de l'individu.

PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DIC

Modèles expérimentaux

Les travaux sur la DIC portent principalement sur des modèles animaux. L'animal le plus utilisé pour prédire le potentiel irritant d'un produit est le lapin albinos avec le test de Draize. Le cochon d'Inde, la souris et le chien de race beagle sont aussi utilisés, mais le lapin albinos reste le modèle le plus sensible aux irritants, encore plus que l'homme. En revanche, en dehors du cadre de test de toxicologie, la majorité des études portant notamment sur les cytokines dans la DIC expérimentale, s'effectue sur le modèle de la souris [4]. En effet, leur système immunitaire est bien connu et ceux sont des animaux plus facilement manipulables.

Les modèles expérimentaux d'irritation les plus utilisés sont ceux induit par des chimiques comme le SLS (Sodium Lauryl Sulphate), le SDS (Sodium Dodecyl Sulphate), l'huile de croton, le NNA (Nonanoic acid), l'oxazolone, le DNC/FB (Dinitrochloro/fluorobenzène). Certaines études utilisent des irritations physiques comme l'exposition aux UV ou le « stripping » qui consiste à appliquer et décoller un scotch plusieurs fois de suite. Dans notre laboratoire, nous utilisons l'haptène fort DNFB appliqué sur l'oreille de la souris, le suivi de l'inflammation se fait alors par la mesure de l'œdème de l'oreille. Une application de DNFB sur l'oreille induit une inflammation les heures suivant cette application, cette réaction correspondant à l'irritation, et cinq jours plus tard une autre inflammation cutanée apparaît mais correspondant cette fois à l'eczéma de contact [5].

Médiateurs et cascade de l'inflammation dans la DIC

La pénétration d'un chimique à travers les différentes couches de la peau, notamment l'épiderme et le derme, entraîne la libération d'un grand nombre de cytokines et de chimiokines par différents types cellulaires [6]. Les kératinocytes représentant 95 % des cellules de l'épiderme sont les principales et les premières cellules sécrétrices de cytokines lors d'un stimulus, leur donnant ainsi un rôle essentiel dans l'initiation et le développement de la réaction inflammatoire cutanée. Le profil d'expression des cytokines varie au cours du temps et aussi en fonction de la nature, de l'environnement et de la dose du chimique [7]. Les médiateurs les plus

fréquemment retrouvés dans la littérature de la DIC sont IL-1 α (Interleukine-1 α), IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), IFN- γ (Interferon- γ), GM-CSF (Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor) et IL-10, cette dernière étant une cytokine anti-inflammatoire (Tableau I). Cependant l'initiation de l'inflammation semble principalement médiée par l'IL-1 α et le TNF- α [7], et par des dérivés de l'acide arachidonique. En effet, l'IL-1 α et le TNF- α sont deux cytokines primaires capables d'induire des médiateurs secondaires (incluant de nombreuses cytokines, des chimiokines, des molécules d'adhésion, des facteurs de croissance) importants pour le recrutement des leucocytes sur le site cutané altéré. Il se déroule ainsi une véritable cascade de production de médiateurs inflammatoires.

IL-1 α et acide arachidonique

L'inflammation cutanée se déclenche rapidement grâce à la présence de médiateurs pro-inflammatoires préstockés dans les cellules cutanées. C'est ainsi qu'une grande quantité d'IL-1 α préformée et biologiquement active est libérée par les kératinocytes [8] (Figure 1) suite à de nombreux stimuli qui entraînent très certainement l'altération de la structure membranaire des kératinocytes [9]. Il en est de même pour l'acide arachidonique qui est métabolisé en composants actifs, les éicosanoïdes (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes...). Ils participent localement et de façon transitoire à la formation de l'œdème, l'invasion leucocytaire, et au niveau cellulaire à la prolifération, la différenciation et l'apoptose [10]. L'IL-1 α a un rôle autocrine favorisant sa propre sécrétion et celle d'autres cytokines (IL-6, IL-8, GM-CSF...) par l'activation de la voie de signalisation du facteur de transcription NF- κ B [11].

L'IL-1 α et l'acide arachidonique permettent la première défense de l'organisme au niveau de la peau, et de façon plus controversée dans la littérature, le TNF- α semble aussi être un médiateur majeur dans l'initiation de l'inflammation cutanée.

TNF- α

Il est stocké dans les mastocytes du derme [12] et lors d'un stimulus il est aussi produit par les kératinocytes et les cellules de Langerhans [13, 14]. L'augmentation de l'expression du TNF- α par les kératinocytes peut être induite, selon l'irritant, soit par la voie de transduction dépendante de la protéine kinase C (PKC), soit par la stabilisation de l'ARNm du TNF- α [15]. Des anticorps anti-TNF- α abolissent de nombreuses réactions inflammatoires cutanées [16]. En effet, le TNF- α est connu pour induire l'expression de molécules d'adhésion cutanées et endothéliales en synergie avec l'IL-1, ce qui permet l'infiltration de leucocytes au niveau de la peau [17], indispensable à la génération de l'inflammation.

Cependant le rôle essentiel du TNF- α reste encore controversé et n'est pas généralisable à tous les cas d'irritation. Ainsi, une inflammation cutanée n'est pas toujours dépendante de la production de TNF- α [4].

Stress oxydatif

Lors de la DIC, la production de nombreux médiateurs pro-inflammatoires va permettre de recruter et d'activer les cellules de

Tableau I. Cytokines épidermiques impliquées dans la DIC.

Cytokines exprimées	Kératinocytes	Cellules de Langerhans
Cytokines primaires		
IL-1 α	+*	+
IL-1b	+	+
TNF- α	+*	+
Chimiokines de type CXC		
IL-8	+	-
Gro	+	+
MIP-2 (souris)	+	+
IP-10	+	-
Chimiokines de type CC		
MCP-1	+	-
MIP-1 α	+	-
RANTES	+	-
Cytokines régulant l'immunité humorale vs. cellulaire		
IL-12	+	+
IL-18	+	+
Cytokines activant les lymphocytes		
IL-6	+*	+
IL-7	+*	-
IL-15	+*	+
Facteurs de croissance hématopoïétiques		
IL-3 (souris)	+	-
G-CSF	+*	-
M-CSF	+	-
GM-SF	+	-
Facteur de croissance autre que pour leucocytes		
TGF- α	+	-
PDGF	+	?
VEGF	+	?
Cytokines immunosuppressives/antagonistes		
IL-1RA	+	?
TGF- β	+*	+
IL-10	+	+
Interféron		
IFN-γ	+	+

IL-1 α cytokines dont l'expression fortement est augmentée dans la DIC.

+* : cytokines synthétisées naturellement par les kératinocytes.

Ces informations proviennent principalement de [1, 27, 28].

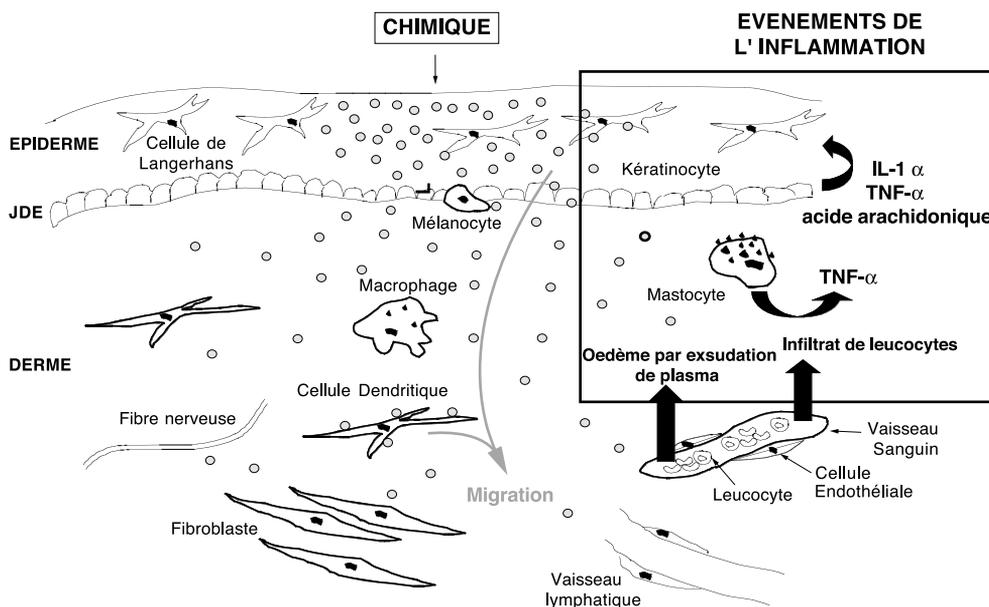


Figure 1. Physiopathologie de la DIC.

La peau est peuplée d'une grande diversité de types cellulaires avec notamment les kératinocytes au niveau de l'épiderme, les fibroblastes du derme séparés par la jonction dermo-épidermique (JDE) et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et lymphatiques qui jouent un rôle prépondérant pour l'infiltration des leucocytes dans la peau. Le système immunitaire inné cutané est principalement composé des cellules de Langerhans, des cellules dendritiques dermiques, des macrophages et des mastocytes.

Lors d'une réaction inflammatoire de type DIC à un chimique, le chimique induit un relargage d'IL-1 α et d'acide arachidonique par les kératinocytes, et induit aussi l'activation des mastocytes qui sécrètent du TNF- α . Cette activation locale est amplifiée par l'infiltration de leucocytes dans la peau.

défense créant ainsi une inflammation. De nombreuses études montrent aussi que certains irritants et allergènes génèrent un stress oxydatif via la libération de ROS (Reactive Oxygen Species) formées par la chaîne de réactions des radicaux libres et suite à l'action de médiateurs inflammatoires. La production excessive de ROS entraîne la peroxydation des lipides des membranes cellulaires et l'altération de protéines et d'ADN. La peau possède une protection efficace grâce à des antioxydants endogènes (glutathion, tocophérol (vitamine E), acide ascorbique (vitamine C) et des enzymes spécifiques. L'analyse des ROS est difficile en raison de leur très courte durée de vie, ainsi la présence de stress oxydatif est démontrée indirectement par l'activité d'enzymes comme la superoxyde dismutase [18] et la glutathion S-transférase [19], ou encore par la présence d'inhibiteurs de ROS [20] ou par la déficience en antioxydants [21] qui conduisent à une diminution de l'œdème.

Les cellules de l'immunité innée et de la DIC

La physiopathologie de DIC est encore mal connue, ceci s'explique par le fait que la majorité des études qui ont été faites dans le domaine ont été réalisées à partir de modèle *in vitro* d'épiderme ou de peau reconstruites [22]. Ces modèles ont l'inconvénient d'occulter les cellules du système immunitaire cutané. La peau est en effet peuplée d'une grande diversité de cellules comme les cellules de Langerhans dans l'épiderme, les mastocytes, les cellules dendritiques épidermiques et dermiques, les macrophages, l'ensemble constituant l'immunité cutanée innée (Figure 1). Ces cellules ont un rôle de sentinelle afin de détecter les signaux de danger [23] pouvant ainsi conduire à une activation du système immunitaire. Les lymphocytes T sont retrouvés au niveau du derme dans les zones périvasculaires. Ils constituent une population de cellules qui recirculent en permanence entre le sang, la peau et les ganglions. L'ensemble de ce réseau de cellules résidentes au niveau de la peau peut être activé lors de la rencontre avec une substance chimique irritante, et ceci pouvant moduler alors la réponse inflammatoire.

L'importance de l'immunité innée dans le développement des réactions inflammatoires a été notamment mise en évidence avec un modèle de souris déficientes pour le Fc γ R. Ces récepteurs sont exprimés sur les cellules épithéliales et les cellules présentatrices d'antigène. La sous-unité γ est nécessaire à l'expression à la surface cellulaire du récepteur ainsi que pour la transduction du signal par ce récepteur. Ces souris déficientes pour ce récepteur ne développent pas d'inflammation avec des doses irritantes d'oxazolone et d'huile de croton. Ceci s'explique par l'absence d'activation dans ces souris de l'immunité innée [24]. L'analyse de l'inflammation cellulaire et plus particulièrement le rôle de l'immunité cutanée innée doit donc être faite en prenant en compte la coopération entre les différents types cellulaires.

Le rôle des cellules de Langerhans (CL) dans l'induction d'une réponse spécifique a été clairement défini mais leur contribution dans le développement de la DIC est beaucoup moins claire. De nombreuses études ont été réalisées notamment sur des épidermes reconstruits montrant une modifications de morphologie des CL après application épicutanée d'un irritant comme le SLS [25]. La portée physiologique de ces données est encore mal définie.

Parmi les différentes sous-populations cellulaires du système immunitaire cutané inné, le mastocyte semble être un candidat intéressant dans le développement de la DIC. Les mastocytes sont présents dans le derme à proximité des vaisseaux et sont les seules cellules présentes dans la peau contenant du TNF- α pré-formé et bioactif [12]. De plus une étude récente dans un modèle d'hypersensibilité de contact au para-phénylènediamine, met en évidence un défaut d'irritation chez les animaux déficients en mastocytes. Ces données sont favorables à un rôle important des mastocytes dans la DIC [26], l'application d'un chimique irritant sur la peau induirait l'activation des mastocytes.

CONCLUSION

Les études de la physiopathologie de la DIC ont maintenant clairement montré le rôle des cytokines de la famille de l'IL-1, du TNF- α et des dérivés de l'acide arachidonique synthétisés notamment par les kératinocytes. Le stress oxydatif avec la libération de ROS contribue également au développement de l'inflammation non spécifique. Par contre, la contribution des cellules de l'immunité innée dans la DIC est beaucoup moins bien caractérisée. Les mastocytes apparaissent, avec les travaux réalisés sur des animaux déficients, comme un candidat intéressant dans le développement de la DIC.

Actuellement de nombreux travaux portent sur l'étude des cytokines de la DIC et de la DAC (Dermatite Allergique de Contact) afin de caractériser des marqueurs spécifiques de chaque type de dermatites. Cependant les différences observées ne semblent pas généralisables à tous les irritants, suggérant que l'environnement inflammatoire est très similaire. Ainsi l'étude plus approfondie des cellules impliquées dans la DIC, permettrait aussi une meilleure compréhension des mécanismes différenciant la DIC de la DAC.

RÉFÉRENCES

1. Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J Invest Dermatol* 2003 ; 121 : 231-41.
2. Altemus M, Rao B, Dhabhar FS, et al. Stress-induced changes in skin barrier function in healthy women. *J Invest Dermatol* 2001 ; 117 : 309-17.
3. Berard F, Marty JP, Nicolas JF, et al. Allergen penetration through the skin. *Eur J Dermatol* 2003 ; 13 : 324-30.
4. Holliday MR, Corsini E, Smith S, et al. Differential induction of cutaneous TNF-alpha and IL-6 by topically applied chemicals. *Am J Contact Dermat* 1997 ; 8 : 158-64.
5. Saint-Mézard P, Krasteva M, Chavagnac C et al. 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* 2003 ; 120 : 641-7.
6. Corsini E, Galli CL. Epidermal cytokines in experimental contact dermatitis. *Toxicology* 2000 ; 142 : 203-11.
7. Grangsjö A, Leijon-Kuligowski A, Torma H, et al. Different pathways in irritant contact eczema? Early differences in the epidermal elemental content and expression of cytokines after application of 2 different irritants. *Contact Dermatitis* 1996 ; 35 : 355-60.
8. Williams IR, Kupper TS. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci* 1996 ; 58 : 1485-507.

9. Corradi A, Franzl AT, Rubartelli A, et al. Synthesis and secretion of interleukin-1 alpha and interleukin-1 receptor antagonist during differentiation of cultured keratinocytes. *Exp Cell Res* 1995 ; 217 : 355-62.
10. Kupper TS. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and speculations. *J Clin Invest* 1990 ; 86 : 1783-9.
11. Marks F, Furstemberger G, Muller-Decker K. Arachidonic acid metabolism as a reporter of skin irritancy and target of cancer chemoprevention. *Toxicol Lett* 1998 ; 96-97 : 111-8.
12. Corsini E, Viviani B, Marinovich M, et al. Cyclosporin A exacerbates skin irritation induced by tributyltin by increasing nuclear factor kappa B activation. *J Invest Dermatol* 2001 ; 117 : 1627-34.
13. Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 1990 ; 346 : 274-6.
14. Kock A, Schwarz T, Kirnbauer R, et al. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med* 1990 ; 172 : 1609-14.
15. Larrick JW, Morhenn V, Chiang YL, et al. Activated Langerhans cells release tumor necrosis factor. *J Leukoc Biol* 1989 ; 45 : 429-33.
16. Lisby S, Muller KM, Jongeneel CV, et al. Nickel and skin irritants up-regulate tumor necrosis factor-alpha mRNA in keratinocytes by different but potentially synergistic mechanisms. *Int Immunol* 1995 ; 7 : 343-52.
17. Piguet PF, Grau GE, Hauser C, et al. Tumor necrosis factor is a critical mediator in hapten induced irritant and contact hypersensitivity reactions. *J Exp Med* 1991 ; 173 : 673-9.
18. Groves RW, Ross E, Barker JN, et al. Effect of in vivo interleukin-1 on adhesion molecule expression in normal human skin. *J Invest Dermatol* 1992 ; 98 : 384-7.
19. Camera E, Lisby S, Dell'Anna ML, et al. Levels of enzymatic antioxidants activities in mononuclear cells and skin reactivity to sodium dodecyl sulphate. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2003 ; 16 : 49-54.
20. Willis CM, Britton LE, Reiche L, et al. Reduced levels of glutathione S-transferases in patch test reactions to dithranol and sodium lauryl sulphate as demonstrated by quantitative immunocytochemistry: evidence for oxidative stress in acute irritant contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 2001 ; 11 : 99-104.
21. Fuchs J, Milbradt R. Antioxidant inhibition of skin inflammation induced by reactive oxidants: evaluation of the redox couple dihydrolipoate/lipoate. *Skin Pharmacol* 1994 ; 7 : 278-84.
22. Modriansky M, Tyurina YY, Tyurin VA, et al. Anti-/pro-oxidant effects of phenolic compounds in cells: are colchicine metabolites chain-breaking antioxidants? *Toxicology* 2002 ; 177 : 105-17.
23. Norlen L, Al-Amoudi A, Dubochet J, et al. A cryotransmission electron microscopy study of skin barrier formation. *J Invest Dermatol* 2003 ; 120 : 555-60.
24. Kupper TS, Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol* 2004 ; 4 : 211-22.
25. Zhang L, Tinkle SS. Chemical activation of innate and specific immunity in contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 2000 ; 115 : 168-76.
26. Facy V, Flouret V, Regnier M, et al. Langerhans cells integrated into human reconstructed epidermis respond to known sensitizers and ultraviolet exposure. *J Invest Dermatol* 2004 ; 122 : 552-3.

27. Yokozeki H, Wu MH, Sumi K, et al. Th2 cytokines, IgE and mast cells play a crucial role in the induction of para-phenylenediamine-induced contact hypersensitivity in mice. *Clin Exp Immunol* 2003 ; 132 : 385-92.
28. *Skin Immune System*, 2^e ed., JD Bos Ed.r, CRC Press, 1997.
29. *Textbook of Contact Dermatitis*, Rycroft RJG, Menné T, Frosch PJ, Lepoittevin JP, eds, 3rd Edition, 2001.

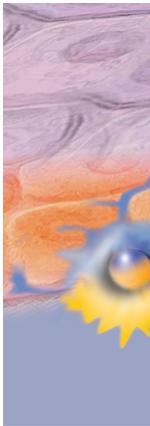
Annexe 3 :

Tolérance cutanée

M. Bonneville, N. Saad, A. Nosbaum, J-F Nicolas, F. Bérard

« Immunologie Cutanée » Tome 4 p33-41, 2004

EJD Book Series. John Libbey Eurotext



Tolérance cutanée

Marlène Bonneville¹, Nathalie Saad², Audrey Nosbaum²,
Jean-François Nicolas^{1,2}, Frédéric Bérard^{1,2}

¹ Inserm U503 « Immunologie Fondamentale et clinique », Lyon

² Unité d'Immunologie clinique, Centre hospitalier Lyon Sud, Pierre Bénite

Notre système immunitaire (SI) s'organise en deux grands compartiments : un compartiment effecteur qui nous protège contre les agressions (principalement infectieuses et tumorales) *via* le développement d'une réponse inflammatoire (innée ou spécifique d'antigène) et un compartiment régulateur anti-inflammatoire dont la finalité est de limiter la durée de la réponse effectrice tout en maintenant un état de tolérance aux antigènes du soi. La tolérance cutanée est donc indissociable du contrôle de la réponse inflammatoire et s'organise à deux niveaux :

- un niveau **central** où les lymphocytes autoréactifs (c'est-à-dire capables de reconnaître puis de développer une réponse effectrice contre les antigènes du soi) se « suicident » par apoptose (ou « mort cellulaire programmée ») lors de leur différenciation dans les organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse pour les cellules B, et thymus pour les cellules T),
- un niveau **périphérique** qui met en jeu des sous-populations lymphocytaires **T régulatrices** (ou « suppressives ») aujourd'hui considérées comme les **acteurs clefs** impliqués dans le maintien de la **tolérance** et le contrôle des réponses inflammatoires cutanées.

L'existence de **mécanismes régulateurs périphériques** est **essentielle** dans le maintien de la tolérance cutanée, ceci pour deux raisons :

- limiter la réponse inflammatoire physiologique dans le temps,
- inhiber l'action d'éventuelles cellules effectrices auto-réactives qui auraient échappé à la phase de sélection dans les organes lymphoïdes primaires. Les maladies inflammatoires par **rupture de tolérance cutanée** représentent ainsi un vaste ensemble de pathologies (dermatite atopique, psoriasis, maladies bulleuses auto-immunes, etc.) caractérisées par un mécanisme pathologique commun : l'activation chronique des effecteurs du SI adaptatif, associée à un défaut de contrôle des mécanismes anti-inflammatoires naturels ou acquis.

Le contrôle de la tolérance cutanée passe par les cellules T régulatrices

Nous avons vu dans le précédent chapitre que si les cellules Th1 et Th2 sont capables de générer une inflammation, le contrôle de cette inflammation est indispensable au maintien de l'homéostasie. Initialement introduit dans les années 50, le concept de suppression active et de cellules « suppressives » fut un temps abandonné, pour cause de complexité et d'absence de mécanisme physiopathologique clairement identifié. Des cellules régulatrices possédant la capacité d'inhiber le développement d'une réponse immunitaire potentiellement dangereuse ont été depuis décrites dans une multitude de modèles, et il semble exister une composante régulatrice au sein de presque **toutes les populations lymphocytaires** (avec des mécanismes de régulation divers et discutés). En particulier, certaines sous-population de cellules T CD4+, regroupées sous le terme générique de « **cellules régulatrices** » ont été très étudiées dans les dernières années car elles présentent de puissantes propriétés anti-inflammatoires. L'action suppressive de ces cellules régulatrices est en grande partie due à leur capacité de sécrétion de cytokines immunosuppressives, principalement l'**IL-10** et le **TGF- β** .

Les cellules Tr1

L'interleukine-10 induit une anergie de longue durée dans les cellules T CD4+ et CD8+ (1) *via* la différenciation d'une sous-population de cellules T CD4+ (appelées *T regulatory cells 1* ou Tr1) présentant un profil de sécrétion de cytokines différent de celui des cellules Th1 et Th2. Les Tr1 ne sécrètent ni IL-2, ni IL-4, mais de l'IL-5 et de l'IFN- γ et surtout de très grandes quantités d'**IL-10** ainsi que du **TGF- β** . Ceci explique leur capacité à inhiber la prolifération des cellules environnantes (dans des systèmes de co-cultures *in vitro*, les facteurs solubles sécrétés par les cellules Tr1 sont capables d'inhiber la prolifération des cellules effectrices voisines). Par ailleurs, les Tr1 ne produisent pas de facteurs de croissance, ce qui explique leur faible capacité proliférante et la nécessité d'utiliser de fortes doses d'antigènes pour induire leur prolifération. Chez la souris, l'injection de Tr1 puis leur activation par des peptides spécifiques de leur récepteur à l'antigène (TCR) permet le contrôle de la réaction inflammatoire d'hypersensibilité retardée (HSR) spécifique d'haptène. Dans un autre modèle de souris développant une réponse allergique immédiate de type IgE spécifique d'ovalbumine, l'injection de Tr1 spécifiques de l'ovalbumine permet d'inhiber totalement la synthèse d'IgE et de la réponse allergique lors de la réintroduction de la protéine. Cette activité inhibitrice disparaît en présence d'anticorps monoclonaux anti-IL-10 ou anti-TGF- β . Chez l'homme, la stimulation répétitive de cellules T CD4+ *in vitro* par leur antigène en présence d'IL-10 permet la différenciation de cellules de type Tr1 *via* la modification des cellules présentatrices de l'antigène. Il semble en effet que la nature de la cellule présentatrice d'an-

tigène soit un facteur déterminant dans la différenciation des cellules régulatrices. Ainsi, la stimulation répétée de lymphocytes T CD4+ par des **cellules dendritiques (DC) immatures** conduit à l'émergence de cellules régulatrices, productrices d'IL-10 et apparentées aux Tr1. Il a été démontré par exemple *in vivo* que la tolérance induite par administration d'un antigène dans les voies respiratoires était dépendante de DC pulmonaires, *via* l'induction de cellules Tr1 [2]. En revanche, les DC impliquées dans l'induction de cette tolérance présentent – contre toute attente – un phénotype mature, mais produisent de l'IL-10 qui semble dans ce cas bien plus important que le statut « mature » de la DC. Enfin, Akdis a récemment montré que la désensibilisation de patients au venin d'hyménoptères était associée à une augmentation de sécrétion d'IL-10 par des clones T de phénotype Tr1 exprimant CLA+ (antigène permettant la domiciliation des cellules T dans la peau, voir chapitre de C. Robert dans le tome 1) [3].

L'IL-10 est une cytokine ubiquitaire produite par de nombreux types cellulaires (lymphocytes T CD4+ et CD8+, kératinocytes, mastocytes, etc.), qui possède une puissante action **anti-inflammatoire**. L'IL-10 inhibe en effet la production de nombreuses cytokines (IL-1, IL-6, TNF, IL-12, IL-18, GM-CSF, et enfin l'IL-10 elle-même), mais aussi celle de **PGE2** (inhibe la cycloxygénase de type 2), participant ainsi au contrôle de la réponse inflammatoire innée précoce. L'IL-10 induit également la différenciation des lymphocytes T en cellules « régulatrices » aux propriétés puissamment anti-inflammatoires.

Le **TGF- β** , également produit par plusieurs sous-populations T régulatrices, possède de nombreux points d'impacts sur l'induction d'une tolérance ou d'une immunosuppression. En particulier, le TGF- β est un puissant facteur de différenciation des cellules Treg CD4+CD25+, mais joue aussi sur l'immunité innée en altérant par exemple la production d'IL-5 par les éosinophiles et en induisant leur apoptose. La sécrétion de TGF- β , n'est par ailleurs pas diminuée par l'IL-10. Au sein des maladies inflammatoires chroniques cutanées, une diminution de synthèse du TGF- β par mutation de son gène a été associée, entre autres, à la dermatite atopique [4]. Enfin, une production de TGF- β par les cellules cancéreuses, leur permettant de maintenir un état de tolérance contre les effecteurs immunitaires, a été observée dans différents types de tumeurs.

Les cellules T CD4+CD25+

Les cellules **T CD4+CD25+** régulatrices naturelles (Treg) ont récemment été proposées pour jouer un rôle déterminant dans la régulation et le contrôle des maladies inflammatoires chroniques ou auto-immunes *in vivo* [5]. Identifiées chez les rongeurs et chez l'homme, ces cellules d'origine thymique sont présentes chez l'individu sain et sont capables d'inhiber la réponse inflammatoire. Ces cellules interviennent ainsi dans la régulation des réactions d'HSR aux haptènes, ainsi que dans l'inhibition de cette ré-

Immunologie cutanée • Immunité cutanée acquise

ponse consécutive à l'administration intragastrique de l'haptène (tolérance orale) [6]. Parmi les facteurs impliqués dans le développement et les fonctions des Treg, on citera le TGF- β [7] et le facteur de transcription Fox-P3.

Les cellules CD4+CD25+ représentent 5 à 15% des lymphocytes T CD4+ périphériques d'un individu sain. Ces cellules expriment constitutivement le récepteur de haute affinité pour l'interleukine-2 (CD25) et présentent un phénotype de lymphocytes T à mémoire (CD45RB^{low}, voir chapitre de F. Halary dans ce tome). Ces cellules sont continuellement produites dans le thymus et leur rôle dans la tolérance périphérique a été clairement illustré dans des expériences de transfert de lymphocytes T chez des souris athymiques. Chez ces animaux, le transfert de lymphocytes T déplétés en cellules régulatrices CD4+CD25+ conduit à l'apparition de manifestations auto-immunes multiples. De nombreux travaux ont également démontrés que les cellules Treg jouaient un rôle majeur dans le contrôle de la survenue de différentes manifestations auto-immunes (diabète auto-immun, encéphalopathie auto-immune expérimentale (EAE), gastrite auto-immune, thyroïdite auto-immune, maladies inflammatoires chroniques du tube digestif,...) [5, 8]. Les Treg sont également impliquées dans l'inhibition du rejet de greffe et de manière plus générale dans le contrôle de l'activation des lymphocytes T et de la taille du contingent de cellules effectrices. Il a été par exemple récemment montré, dans un modèle de cancer chez l'animal, que la déplétion en Treg pouvait s'accompagner d'une réponse immunitaire protectrice spontanée contre la tumeur [9].

Activation/expansion des cellules CD4+CD25+

Les cellules CD4+CD25+, tout comme les Tr1, se caractérisent par leur faible réponse à une stimulation *via* leur TCR et une incapacité à produire de l'IL-2, ces deux propriétés étant corrélées à leur fonction suppressive. Cette anergie peut être en partie levée lorsqu'une stimulation *via* le TCR est combinée à l'IL-2 ou à un signal *via* CD28, ce qui déclenche l'expansion des cellules CD4+CD25+ avec maintien, voire augmentation, de leur fonction suppressive. Cet état d'anergie et la possibilité d'expansion des cellules Treg a été également démontré *in vivo* chez des animaux lymphopéniques.

Il est probable que certaines conditions d'immunisation aboutissent à l'expansion quantitative sélective du contingent de cellules Treg, voire à une stimulation de leur fonction suppressive, conduisant à une régulation accrue. Ainsi, certaines voies d'administration de l'antigène – la voie **intraveineuse** et la voie **orale** en particulier – favorisent l'expansion du contingent de cellules Treg et stimulent leur activité suppressive [10, 11]. Il semble, comme pour la différenciation des Tr1 que **la nature de la cellule présentatrice d'antigène** puisse représenter dans certains cas un facteur déterminant dans la différenciation des Treg. Ainsi, les **DC immatures** seraient plus à même de provoquer la différenciation de ce contingent, même si cette règle n'est pas – à nouveau comme dans le cas des Tr1 – absolue. Il a par exemple été démontré, dans un modèle d'HSR aux haptènes chez la souris, que des cellules de **Langerhans ma-**

tures était capable d'induire le développement de cellules T CD4+ régulatrices contrôlant l'intensité et la durée de l'inflammation [12]. Le mécanisme d'induction de cellules régulatrices par les DC pourrait donc également impliquer le recrutement de **sous-populations de DC particulières** et/ou un conditionnement fonctionnel de la cellule dendritique par le micro environnement au site de pénétration de l'antigène. Ainsi, la production de cytokines, mais aussi de chimiokines par les DC contribuerait au recrutement sélectif de Treg comme l'illustre l'apparition de manifestations auto-immunes chez des souris déplétées en CCL4 [13].

Les cellules Treg sont capables de réguler la prolifération et la différenciation des **lymphocytes T CD4+**, CD8+, **cellules NK** [14], **NKT** [15] et des **lymphocytes B**. La majorité des études publiées à ce jour suggèrent que les Treg pourraient affecter l'activation des lymphocytes, leur expansion et leur différenciation en cellules effectrices, probablement lors de leur rencontre avec l'antigène dans les organes lymphoïdes secondaires. Les Treg pourraient également réguler des réponses effectrices plus en aval, dans les tissus périphériques. Ainsi, le transfert de cellules CD4+CD25+ permet d'inhiber le développement de cellules effectrices dans des modèles de maladies auto-immunes chez la souris, mais également de prévenir la pathologie induite par le transfert de cellules autoréactives clonées à des souris athymiques [8]. Dans des systèmes de coculture *in vitro*, l'effet suppressif des cellules Treg est dû essentiellement à un effet direct sur les lymphocytes cibles et peut être observé en absence de cellules présentatrices d'antigène. La molécule **CTLA-4**, exprimée de manière **constitutive** par les cellules T **CD4+CD25+**, pourrait jouer un rôle clé dans leur efficacité suppressive. En particulier, le groupe de Grohmann a montré que CTLA-4 induit une modification du métabolisme du tryptophane (stimulation de l'indole amine 2-3 dioxygénase ou IDO) à l'origine de son **puissant effet tolérogène** [16]. L'administration de 1 méthyl tryptophane (inhibiteur de IDO) inhibe l'action de CTLA-4 sur la survie des îlots de Langerhans dans un modèle animal de diabète auto-immun [17]. L'administration d'anticorps anti-CTLA-4 conduit également au développement de manifestations auto-immunes chez des souris normales [18], et inhibe l'effet protecteur des cellules CD4+CD25+ sur la colite expérimentale dans un modèle de souris [19]. Toutefois, des cellules CD4+CD25+ isolés d'une souris CTLA-4/- conservent une activité suppressive, bien que celle-ci soit diminuée par rapport à celle de cellules normales [18].

Après activation, les cellules CD4+CD25+ sont également capables de produire des **cytokines** à activité immunosuppressives telles que IL-10 et TGF- β et dans une moindre mesure IL-4. L'utilisation de fortes doses d'anti-TGF- β (les Treg produisent du TGF- β soluble mais aussi membranaire) ou l'addition de récepteurs solubles (pour IL-10 et TGF- β) inhibe la suppression induite par les Treg [20, 21]. Enfin, le **microenvironnement** ou s'exerce la régulation par les Treg pourrait déterminer la prédominance d'une voie ou l'autre (nécessité d'un contact membranaire ou cytokines solubles) comme le montre le rôle critique du TGF- β et de l'IL-10 dans la régulation de la colite expérimentale [19, 22], tandis que ces deux cytokines ne semblent pas impliquées dans un modèle de gastrite auto-immune [23, 24].

Les cellules Treg jouent un rôle primordial dans le contrôle de la réaction lymphocytaire T spécifique d'antigène : exemple de la réaction d'HSR cutanée aux haptènes

Dans la réaction d'HSR cutanée (HSRC) aux haptènes, il existe une dichotomie fonctionnelle claire entre les lymphocytes T CD4+ et CD8+ [25, 26]. Les cellules CD8+ sont effectrices et peuvent se développer en absence de cellules CD4+, tandis que les lymphocytes T CD4+ ont un rôle régulateur et permettent le contrôle et la résolution de l'inflammation. Les cellules CD4+ interviennent vraisemblablement au cours des deux phases de l'HSRC (afférente et efférente, voir chapitre précédent). Dans les organes lymphoïdes secondaires, suite à la sensibilisation, les cellules CD4+ limitent la taille du contingent de cellules CD8+ effectrices ou modifient leurs propriétés fonctionnelles. Après migration au site de révélation, les cellules CD4+ contribuent probablement au contrôle de l'inflammation et à sa résolution. En effet, malgré la persistance des cellules T CD8, et surtout de l'haptène sur le site d'application pendant au moins deux semaines, la réaction inflammatoire prend fin dès la migration des cellules CD4 *in situ* [27]. Ainsi, l'élaboration d'une réponse CTL spécifique d'haptène efficace *in vivo* ne peut s'exprimer que pendant une courte **fenêtre de temps**, avant que les cellules T régulatrices ne prennent le pas et inhibent l'inflammation. En l'absence de cellules CD4+, les souris développent une inflammation plus intense et persistante voire chronique. Il a été récemment démontré que l'inflammation pouvait être totalement prévenue *in vivo* lorsque l'haptène était délivré par voie intragastrique (phénomène de tolérance orale) quelques jours avant la phase de sensibilisation [6]. Cette induction de tolérance orale est dépendante des lymphocytes T CD4+ qui inhibent l'activation/expansion des lymphocytes T CD8+ dans les organes lymphoïdes secondaires.

Les cellules TH3

Les cellules TH3, décrites par Weiner [28] pourraient jouer un rôle dans le contrôle de la tolérance orale aux antigènes de l'environnement, *via* la sécrétion de TGF- β .

Des perturbations des cellules T régulatrices sont associées à l'expression de plusieurs maladies chez l'homme

Perturbations par défaut : exemple des maladies atopiques

Plusieurs études récentes suggèrent l'existence d'un déficit fonctionnel des cellules TCD4+CD25+ chez les individus atopiques. Ou et coll. rapportent ainsi qu'un super-

antigène staphylococcique (SEB) peut inhiber l'action suppressive des cellules TCD4+CD25+ foxP3+ (capacités fonctionnelles normales en l'absence de SEB) de patients porteurs de dermatite atopique [29]. Ling et coll. montrent également une diminution spontanée des capacités fonctionnelles inhibitrices des cellules T CD4+CD25+ de sujets porteurs de rhinite allergique (comparaison des Treg de sujets non atopiques) sur les fonctions des effecteurs de la réponse allergique. Les auteurs de ce travail montrent par ailleurs que les capacités régulatrices des cellules T CD4+CD25+ de ces sujets sont encore diminuées si le prélèvement a lieu au printemps, lors de l'exposition aux pollens, en comparaison des Treg des mêmes patients mais prélevés en dehors de la saison pollinique [30]. Ainsi, les pneumallergènes pourraient en déclencher la survenue des manifestations cliniques par au moins deux mécanismes :

- la **stimulation** spécifique des lymphocytes T mémoires **effecteurs** de l'inflammation,
- l'**inhibition** des lymphocytes T **régulateurs** sur un fond génétique « atopique ».

Ces travaux contribuent à étayer l'hypothèse **hygiéniste** qui postule que les modifications de notre environnement dans le dernier demi siècle représentent un facteur majeur dans l'augmentation de l'incidence des maladies inflammatoires chroniques par rupture de tolérance cutanée [31]. En particulier, l'**altération de la flore saprophyte épithéliale** (favorisée par les détergents, vaccins, antibiotiques, etc.) aurait deux conséquences :

- une **levée de l'inhibition** naturelle contre la réponse inflammatoire (la flore saprophyte stimule en permanence nos compartiments régulateurs d'où l'absence « physiologique » d'inflammation cutanée – ou plus largement épithéliale – contre cette flore),
- la **colonisation** de notre peau par des bactéries **pathogènes** (exemple du staphylocoque doré qui colonise la peau de 90% des patients atteints de dermatite atopique), dont le développement est normalement contrôlé par les saprophytes (le staphylocoque doré colonise 5% des peaux non atopiques).

Des études menées chez l'homme par plusieurs groupes (dans le psoriasis, le lupus, et d'autres maladies inflammatoires chroniques à expression cutanée) sont en cours et devraient permettre de confirmer et d'affiner nos connaissances dans les années à venir sur le rôle des cellules T régulatrices dans les maladies inflammatoires chroniques par rupture de tolérance cutanée.

Perturbations par excès : échappement tumoral au contrôle du SI

Dans la relation hôte-tumeur, les cellules tumorales sont capables de polariser la réponse vers la tolérance en adressant des signaux « tolérogènes » comme le TGF β , le MCSF, le VEGF, ou l'IL-10 qui peut également être sécrétée par les précurseurs de DC sous l'influence des cellules tumorales [32]. L'IL-10 est, comme nous l'avons vu, capable d'inhiber la réponse innée ou adaptative antitumorale mais également de favoriser la différenciation de cellules T régulatrices.

Immunologie cutanée • Immunité cutanée acquise

Plusieurs groupes ont ainsi récemment rapporté l'existence d'un **excès de cellules Treg** CD4+CD25+ dans le sang et / ou dans les tumeurs de malades atteints de mélanome, de cancer du sein, du pancréas, et de plusieurs autres types de cancers épithéliaux [14, 33, 34]. En particulier, Wolf et col. ont montré que les cellules régulatrices issues du sang périphérique de ces malades sont capables d'inhiber l'activité NK antitumorale *in vitro*. La dualité fonctionnelle des DC dans la capacité d'induction d'une réponse immunogène « et/ou/puis » tolérogène [35] (bénéfique dans le contexte de l'HSR aux haptènes), peut faire craindre dans le contexte de la réponse antitumorale, que des DC a priori très immunogènes *in vitro* ne conduisent en réalité *in vivo* à une **induction de tolérance** vis à vis de la tumeur, même si des CTL sont induits dans un premier – ou dans le même – temps.

Le rôle néfaste des Treg sur la réponse CTL *in vivo* peut également expliquer en partie l'efficacité thérapeutique de drogues inhibant l'activité T régulatrice (soit par blocage fonctionnel soit par déplétion) permettant l'obtention – ou la potentialisation – de réponses immunitaires biologiques et /ou cliniques antitumorales chez la souris [9, 36, 37] et chez l'homme [38-39].

Conclusion

Les cellules T régulatrices jouent un rôle primordial dans le contrôle de l'inflammation et dans le maintien de la tolérance cutanée aux auto-antigènes et aux substances de l'environnement. Des perturbations quantitatives ou qualitatives en cellules T régulatrices ont été identifiées dans des maladies inflammatoires chroniques (par défaut), mais également dans certains cancers chez l'homme (par excès). L'évolution des connaissances sur les compartiments régulateurs devraient permettre de définir dans les années à venir de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur ces cibles encore mal connues, dans des problématiques aussi variées que les maladies inflammatoires chroniques (allergiques ou auto-immunes), les cancers et bien sur la prévention et le contrôle du rejet de greffe. ●

Références

1. Groux H. An overview of regulatory T cells. *Microbes Infect* 2001;3(11):883-9.
2. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001;2(8):725-31.
3. Akdis M, Klunker S, Schliz M, Blaser K, Akdis CA. Expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen on human CD4(+) and CD8(+) Th2 cells. *Eur J Immunol* 2000;30(12):3533-41.
4. Arkwright PD, Chase JM, Babbage S, Pravica V, David TJ, Hutchinson IV. Atopic dermatitis is associated with a low-producer transforming growth factor beta(1) cytokine genotype. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108(2):281-4.
5. Dubois B, Chapat L, Goubier A, Kaiserlian D. CD4+CD25+ T cells as key regulators of immune responses. *Eur J Dermatol* 2003 a;13(2):111-6.
6. Dubois B, Chapat L, Goubier A, Papiernik M, Nicolas JF, Kaiserlian D. Innate CD4+CD25+ regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8+ T cells mediating skin inflammation. *Blood* 2003 b;102(9):3295-301.
7. Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 2001;166:7282-7289.
8. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 1998;160(3):1212-8.
9. Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 2004;34(2):336-44.
10. Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 2002;3(1):33-41.
11. Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol* 2001;167(8):4245-53.
12. Krasteva M, Kehren J, Horand F, Akiba H, Choquet G, Ducluzeau MT, et al. Dual role of dendritic cells in the induction and down-regulation of antigen-specific cutaneous inflammation. *J Immunol* 1998;160(3):1181-90.
13. Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol* 2001;2(12):1126-32.
14. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9(2):606-12.
15. Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T, Hirai H. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res* 2003;63(15):4516-20.
16. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 2002;3(11):1097-101.
17. Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* 2003;24(5):242-8.
18. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000;192(2):303-10.
19. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000;192(2):295-302.
20. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000;192(9):1213-22.
21. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001;194(5):629-44.

Immunologie cutanée • Immunité cutanée acquise

22. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999;190(7):995-1004.
23. Suri-Payer E, Cantor H. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells. *J Autoimmun* 2001;16(2):115-23.
24. Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev* 2001;182:58-67.
25. Saint-Mezard P, Berard F, Dubois B, Kaiserlian D, Nicolas JF. The role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 2004;14(3):131-8.
26. Cavani A, Sebastiani S, Nasorri F, Ottaviani C, Girolomoni G. Allergie au nickel : physiopathologie et implications cliniques. *Ann Dermatol Venerol* 2004;131(6-7 Pt 1):588-90.
27. Saint-Mezard P, Krasteva M, Chavagnac C, Bosset S, Akiba H, Kehren J, et al. 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* 2003;120(4):641-7.
28. Weiner HL. Oral tolerance : immune mechanisms and the generation of TH3-type TGF-beta secreting regulatory cells. *Microbes and Infection* 2001;3:947-954.
29. Ou LS, Goleva E, Hall C, Leung DY. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(4):756-63.
30. Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004;363(9409):608-15.
31. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002;347(12):911-20.
32. Menetrier-Caux C, Bain C, Favrot MC, Duc A, Blay JY. Renal cell carcinoma induces interleukin 10 and prostaglandin E2 production by monocytes. *Br J Cancer* 1999;79(1):119-30.
33. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002;169(5):2756-61.
34. Gray CP, Arosio P, Hersey P. Association of increased levels of heavy-chain ferritin with increased CD4+ CD25+ regulatory T-cell levels in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 2003;9(7):2551-9.
35. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 2000;1(4):311-6.
36. Jones E, Dahm-Vicker M, Simon AK, Green A, Powrie F, Cerundolo V, et al. Depletion of CD25+ regulatory cells results in suppression of melanoma growth and induction of autoreactivity in mice. *Cancer Immunol* 2002;2:1.
37. Sojka DK, Felnerova D, Mokyry MB. Anti-metastatic activity of hapten-modified autologous tumor cell vaccine in an animal tumor model. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51(4):200-8.
38. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002;298(5594):850-4.
39. Berd D, Sato T, Maguire H, Kairys J, Mastrangelo M. Immunopharmacologic analysis of an autologous, hapten-modified human melanoma vaccine. *J Clin Oncol* 2004;22(3):403-15.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agner, T., Johansen, J. D., Overgaard, L., Volund, A., Basketter, D., and Menne, T. (2002). Combined effects of irritants and allergens. Synergistic effects of nickel and sodium lauryl sulfate in nickel-sensitized individuals. *Contact Dermatitis* 47, 21-26.
- 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.
- Akira, S., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993). Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 54, 1-78.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499-511.
- Albanesi, C., Scarponi, C., Sebastiani, S., Cavani, A., Federici, M., Sozzani, S., and Girolomoni, G. (2001). A cytokine-to-chemokine axis between T lymphocytes and keratinocytes can favor Th1 cell accumulation in chronic inflammatory skin diseases. *J Leukoc Biol* 70, 617-623.
- Albers, R., van der Pijl, A., Bol, M., Seinen, W., and Pieters, R. (1996). Stress proteins (HSP) and chemical-induced autoimmunity. *Toxicol Appl Pharmacol* 140, 70-76.
- Allen, M. H., Wakelin, S. H., Holloway, D., Lisby, S., Baadsgaard, O., Barker, J. N., and McFadden, J. P. (2000). Association of TNFA gene polymorphism at position -308 with susceptibility to irritant contact dermatitis. *Immunogenetics* 51, 201-205.
- Andersen, F., Hedegaard, K., Petersen, T. K., Bindslev-Jensen, C., Fullerton, A., and Andersen, K. E. (2006). The hairless guinea-pig as a model for treatment of cumulative irritation in humans. *Skin Res Technol* 12, 60-67.
- Artik, S., Haarhuis, K., Wu, X., Begerow, J., and Gleichmann, E. (2001). Tolerance to nickel: oral nickel administration induces a high frequency of anergic T cells with persistent suppressor activity. *J Immunol* 167, 6794-6803.
- Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J. A., Bare, O., Auron, P. E., Stevenson, M. A., and Calderwood, S. K. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277, 15028-15034.
- Asherson, G. L., Perera, M. A., and Thomas, W. R. (1979). Contact sensitivity and the DNA response in mice to high and low doses of oxazolone: low dose unresponsiveness following painting and feeding and its prevention by pretreatment with cyclophosphamide. *Immunology* 36, 449-459.
- Autschbach, F., Braunstein, J., Helmke, B., Zuna, I., Schurmann, G., Niemir, Z. I., Wallich, R., Otto, H. F., and Meuer, S. C. (1998). In situ expression of interleukin-10 in noninflamed human gut and in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 153, 121-130.
- Baker, B. S., Ovigne, J. M., Powles, A. V., Corcoran, S., and Fry, L. (2003). Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 148, 670-679.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.
- Banno, T., Gazel, A., and Blumenberg, M. (2004). Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J Biol Chem* 279, 32633-32642.
- Barratt, M. D. (1995). Quantitative structure activity relationships for skin corrosivity of organic acids, bases and phenols. *Toxicol Lett* 75, 169-176.

- Barratt, M. D. (2000). Prediction of toxicity from chemical structure. *Cell Biol Toxicol* 16, 1-13.
- Bartosiewicz, M., Penn, S., and Buckpitt, A. (2001). Applications of gene arrays in environmental toxicology: fingerprints of gene regulation associated with cadmium chloride, benzo(a)pyrene, and trichloroethylene. *Environ Health Perspect* 109, 71-74.
- Basketter, D. A. (1992). Skin sensitization to cinnamic alcohol: the role of skin metabolism. *Acta Derm Venereol* 72, 264-265.
- Basketter, D. A. (1998). Chemistry of contact allergens and irritants. *Am J Contact Dermat* 9, 119-124.
- Basketter, D. A., Balikie, L., Dearman, R. J., Kimber, I., Ryan, C. A., Gerberick, G. F., Harvey, P., Evans, P., White, I. R., and Rycroft, R. J. (2000). Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42, 344-348.
- Basketter, D. A., Chamberlain, M., Griffiths, H. A., Rowson, M., Whittle, E., and York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. *Food Chem Toxicol* 35, 845-852.
- Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I., and Loveless, S. E. (1996). The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. *Food Chem Toxicol* 34, 985-997.
- Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I., and Willis, C. M. (1999). Toxicology of contact dermatitis. Allergy, irritancy and urticaria, Vol 1, JOHN WILEY & SONS edn, Nutrition and Chemical Toxicity).
- Belsito, D. V. (2005). Occupational contact dermatitis: etiology, prevalence, and resultant impairment/disability. *J Am Acad Dermatol* 53, 303-313.
- Bennett, C. L., van Rijn, E., Jung, S., Inaba, K., Steinman, R. M., Kapsenberg, M. L., and Clausen, B. E. (2005). Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol* 169, 569-576.
- Berard, F., Marty, J. P., and Nicolas, J. F. (2003). Allergen penetration through the skin. *Eur J Dermatol* 13, 324-330.
- Berg, D. J., Leach, M. W., Kuhn, R., Rajewsky, K., Muller, W., Davidson, N. J., and Rennick, D. (1995). Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *J Exp Med* 182, 99-108.
- Berg, E. L., Yoshino, T., Rott, L. S., Robinson, M. K., Warnock, R. A., Kishimoto, T. K., Picker, L. J., and Butcher, E. C. (1991). The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med* 174, 1461-1466.
- Bergtold, A., Desai, D. D., Gavhane, A., and Clynes, R. (2005). Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity* 23, 503-514.
- Bhushan, M., Cumberbatch, M., Dearman, R. J., Andrew, S. M., Kimber, I., and Griffiths, C. E. (2002). Tumour necrosis factor-alpha-induced migration of human Langerhans cells: the influence of ageing. *Br J Dermatol* 146, 32-40.
- Biedermann, T., Kneilling, M., Mailhammer, R., Maier, K., Sander, C. A., Kollias, G., Kunkel, S. L., Hultner, L., and Rocken, M. (2000). Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J Exp Med* 192, 1441-1452.
- Blaha, M., Bowers, W., Jr., Kohl, J., DuBose, D., Walker, J., Alkhyat, A., and Wong, G. (2000). Effects of CEES on inflammatory mediators, heat shock protein 70A,

- histology and ultrastructure in two skin models. *J Appl Toxicol* 20 *Suppl 1*, S101-108.
- Bochner, B. S., and Schleimer, R. P. (1994). The role of adhesion molecules in human eosinophil and basophil recruitment. *J Allergy Clin Immunol* 94, 427-438; quiz 439.
- Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T., and Thompson, C. B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3, 87-98.
- Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P. P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P. A., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187, 129-134.
- Borges, E., Tietz, W., Steegmaier, M., Moll, T., Hallmann, R., Hamann, A., and Vestweber, D. (1997). P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 cells binds to P-selectin and supports migration into inflamed skin. *J Exp Med* 185, 573-578.
- Borkowski, T. A., Letterio, J. J., Farr, A. G., and Udey, M. C. (1996). A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 184, 2417-2422.
- Borkowski, T. A., Letterio, J. J., Mackall, C. L., Saitoh, A., Wang, X. J., Roop, D. R., Gress, R. E., and Udey, M. C. (1997). A role for TGFbeta1 in langerhans cell biology. Further characterization of the epidermal Langerhans cell defect in TGFbeta1 null mice. *J Clin Invest* 100, 575-581.
- Borkowski, T. A., Van Dyke, B. J., Schwarzenberger, K., McFarland, V. W., Farr, A. G., and Udey, M. C. (1994). Expression of E-cadherin by murine dendritic cells: E-cadherin as a dendritic cell differentiation antigen characteristic of epidermal Langerhans cells and related cells. *Eur J Immunol* 24, 2767-2774.
- Bos, J. D. (2004). Skin immune system. *Cutaneous immunology and clinical immunodermatology*, 3rd ed. edn).
- Bos, J. D., de Boer, O. J., Tibosch, E., Das, P. K., and Pals, S. T. (1993). Skin-homing T lymphocytes: detection of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) by HECA-452 in normal human skin. *Arch Dermatol Res* 285, 179-183.
- Bos, J. D., Zonneveld, I., Das, P. K., Krieg, S. R., van der Loos, C. M., and Kapsenberg, M. L. (1987). The skin immune system (SIS): distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin. *J Invest Dermatol* 88, 569-573.
- Botham, P. A. (2004). The validation of in vitro methods for skin irritation. *Toxicol Lett* 149, 387-390.
- Bour, H., Peyron, E., Gaucherand, M., Garrigue, J. L., Desvignes, C., Kaiserlian, D., Revillard, J. P., and Nicolas, J. F. (1995). Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol* 25, 3006-3010.
- Bowman, J. P., Berger, R. S., Mills, O. H., Kligman, A. M., and Stoudemayer, T. (2003). The 21-day human cumulative irritation test can be reduced to 14 days without loss of sensitivity. *J Cosmet Sci* 54, 443-449.
- Boxman, I., Lowik, C., Aarden, L., and Ponc, M. (1993). Modulation of IL-6 production and IL-1 activity by keratinocyte-fibroblast interaction. *J Invest Dermatol* 101, 316-324.

- Boyman, O., Conrad, C., Dudli, C., Kielhorn, E., Nickoloff, B. J., and Nestle, F. O. (2005). Activation of dendritic antigen-presenting cells expressing common heat shock protein receptor CD91 during induction of psoriasis. *Br J Dermatol* *152*, 1211-1218.
- Brand, C. U., Hunziker, T., Limat, A., and Braathen, L. R. (1993). Large increase of Langerhans cells in human skin lymph derived from irritant contact dermatitis. *Br J Dermatol* *128*, 184-188.
- Camera, E., Lisby, S., Dell'Anna, M. L., Santucci, B., Paganelli, R., Baadsgaard, O., and Picardo, M. (2003). Levels of enzymatic antioxidants activities in mononuclear cells and skin reactivity to sodium dodecyl sulphate. *Int J Immunopathol Pharmacol* *16*, 49-54.
- Camhi, S. L., Lee, P., and Choi, A. M. (1995). The oxidative stress response. *New Horiz* *3*, 170-182.
- Camp, R., Fincham, N., Ross, J., Bird, C., and Gearing, A. (1990). Potent inflammatory properties in human skin of interleukin-1 alpha-like material isolated from normal skin. *J Invest Dermatol* *94*, 735-741.
- Campbell, J. J., Haraldsen, G., Pan, J., Rottman, J., Qin, S., Ponath, P., Andrew, D. P., Warnke, R., Ruffing, N., Kassam, N., *et al.* (1999). The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* *400*, 776-780.
- 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.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., and Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* *180*, 1263-1272.
- Cavani, A., Albanesi, C., Traidl, C., Sebastiani, S., and Girolomoni, G. (2001). Effector and regulatory T cells in allergic contact dermatitis. *Trends Immunol* *22*, 118-120.
- Cavani, A., Mei, D., Guerra, E., Corinti, S., Giani, M., Pirrotta, L., Puddu, P., and Girolomoni, G. (1998). Patients with allergic contact dermatitis to nickel and nonallergic individuals display different nickel-specific T cell responses. Evidence for the presence of effector CD8⁺ and regulatory CD4⁺ T cells. *J Invest Dermatol* *111*, 621-628.
- Cavani, A., Nasorri, F., Ottaviani, C., Sebastiani, S., De Pita, O., and Girolomoni, G. (2003). Human CD25⁺ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals. *J Immunol* *171*, 5760-5768.
- Cavani, A., Nasorri, F., Prezzi, C., Sebastiani, S., Albanesi, C., and Girolomoni, G. (2000). Human CD4⁺ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J Invest Dermatol* *114*, 295-302.
- Cerio, R., Griffiths, C. E., Cooper, K. D., Nickoloff, B. J., and Headington, J. T. (1989). Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br J Dermatol* *121*, 421-431.
- Church, M. K., and Levi-Schaffer, F. (1997). The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol* *99*, 155-160.
- Corradi, A., Franzi, A. T., and Rubartelli, A. (1995). Synthesis and secretion of interleukin-1 alpha and interleukin-1 receptor antagonist during differentiation of cultured keratinocytes. *Exp Cell Res* *217*, 355-362.
- Corsini, E., and Galli, C. L. (2000). Epidermal cytokines in experimental contact dermatitis. *Toxicology* *142*, 203-211.

- Crellin, N. K., Garcia, R. V., Hadisfar, O., Allan, S. E., Steiner, T. S., and Levings, M. K. (2005). Human CD4⁺ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J Immunol* *175*, 8051-8059.
- Cresswell, P., Ackerman, A. L., Giodini, A., Peaper, D. R., and Wearsch, P. A. (2005). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev* *207*, 145-157.
- Cumberbatch, M., Dearman, R. J., Antonopoulos, C., Groves, R. W., and Kimber, I. (2001). Interleukin (IL)-18 induces Langerhans cell migration by a tumour necrosis factor- α - and IL-1 β -dependent mechanism. *Immunology* *102*, 323-330.
- Cumberbatch, M., Dearman, R. J., and Kimber, I. (1997). Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor- α and interleukin-1 β for migration. *Immunology* *92*, 388-395.
- Cumberbatch, M., Dearman, R. J., and Kimber, I. (2002). Influence of ageing on Langerhans cell migration in mice: identification of a putative deficiency of epidermal interleukin-1 β . *Immunology* *105*, 466-477.
- Cumberbatch, M., and Kimber, I. (1992). Dermal tumour necrosis factor- α induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration. *Immunology* *75*, 257-263.
- Curry, J. L., Qin, J. Z., Bonish, B., Carrick, R., Bacon, P., Panella, J., Robinson, J., and Nickoloff, B. J. (2003). Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Arch Pathol Lab Med* *127*, 178-186.
- Cyster, J. G. (1999). Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *J Exp Med* *189*, 447-450.
- Davis, A. L., McKenzie, J. L., and Hart, D. N. (1988). HLA-DR-positive leucocyte subpopulations in human skin include dendritic cells, macrophages, and CD7-negative T cells. *Immunology* *65*, 573-581.
- de Brugerolle de, F., Picarles, V., Chibout, S., Kolopp, M., Medina, J., Burtin, P., Ebelin, M. E., Osborne, S., Mayer, F. K., Spake, A., *et al.* (1999). Predictivity of an in vitro model for acute and chronic skin irritation (SkinEthic) applied to the testing of topical vehicles. *Cell Biol Toxicol* *15*, 121-135.
- de Kossodo, S., Cruz, P. D., Jr., Dougherty, I., Thompson, P., Silva-Valdez, M., and Beutler, B. (1995). Expression of the tumor necrosis factor gene by dermal fibroblasts in response to ultraviolet irradiation or lipopolysaccharide. *J Invest Dermatol* *104*, 318-322.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., and de Vries, J. E. (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* *174*, 1209-1220.
- Dearman, R. J., and Kimber, I. (2000). Role of CD4(+) T helper 2-type cells in cutaneous inflammatory responses induced by fluorescein isothiocyanate. *Immunology* *101*, 442-451.
- Desvignes, C., Esteves, F., Etchart, N., Bella, C., Czerkinsky, C., and Kaiserlian, D. (1998). The murine buccal mucosa is an inductive site for priming class I-restricted CD8⁺ effector T cells in vivo. *Clin Exp Immunol* *113*, 386-393.
- Desvignes, C., Etchart, N., Kehren, J., Akiba, I., Nicolas, J. F., and Kaiserlian, D. (2000). Oral administration of hapten inhibits in vivo induction of specific cytotoxic CD8⁺ T cells mediating tissue inflammation: a role for regulatory CD4⁺ T cells. *J Immunol* *164*, 2515-2522.
- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-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.
- Dieu-Nosjean, M. C., Massacrier, C., Homey, B., Vanbervliet, B., Pin, J. J., Vicari, A., Lebecque, S., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Zlotnik, A., and Caux, C. (2000). Macrophage inflammatory protein 3 α is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med* 192, 705-718.
- Dieu-Nosjean, M. C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Fridman, W. H., and Caux, C. (2001). IL-10 induces CCR6 expression during Langerhans cell development while IL-4 and IFN- γ suppress it. *J Immunol* 167, 5594-5602.
- DiIulio, N. A., Xu, H., and Fairchild, R. L. (1996). Diversion of CD4⁺ T cell development from regulatory T helper to effector T helper cells alters the contact hypersensitivity response. *Eur J Immunol* 26, 2606-2612.
- Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T. L., Oswald-Richter, K., Kasprovicz, D. J., Kellar, K., Pare, J., van Dyke, T., *et al.* (2006). Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest* 116, 916-928.
- Dinarello, C. A. (1998). Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 16, 457-499.
- Ding, L., Linsley, P. S., Huang, L. Y., Germain, R. N., and Shevach, E. M. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* 151, 1224-1234.
- Dubois, B., Chapat, L., Goubier, A., and Kaiserlian, D. (2003a). CD4⁺CD25⁺ T cells as key regulators of immune responses. *Eur J Dermatol* 13, 111-116.
- Dubois, B., Chapat, L., Goubier, A., Papiernik, M., Nicolas, J. F., and Kaiserlian, D. (2003b). Innate CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8⁺ T cells mediating skin inflammation. *Blood* 102, 3295-3301.
- Dufour, J. H., Dziejman, M., Liu, M. T., Leung, J. H., Lane, T. E., and Luster, A. D. (2002). IFN- γ -inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol* 168, 3195-3204.
- Duijvestijn, A. M., Horst, E., Pals, S. T., Rouse, B. N., Steere, A. C., Picker, L. J., Meijer, C. J., and Butcher, E. C. (1988). High endothelial differentiation in human lymphoid and inflammatory tissues defined by monoclonal antibody HECA-452. *Am J Pathol* 130, 147-155.
- Dupuis, G. (1982). Nature of hapten-protein interactions. Chemically reactive functions in haptens and proteins, in allergic contact dermatitis to simple chemicals. A molecular approach., Ed Marcel Dekker edn (New York).
- Duraiswamy, N., Tse, Y., Hammerberg, C., Kang, S., and Cooper, K. D. (1994). Distinction of class II MHC⁺ Langerhans cell-like interstitial dendritic antigen-presenting cells in murine dermis from dermal macrophages. *J Invest Dermatol* 103, 678-683.
- 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.
- Effendy, I., Loffler, H., and Maibach, H. I. (2000). Epidermal cytokines in murine cutaneous irritant responses. *J Appl Toxicol* 20, 335-341.
- Engeman, T., Gorbachev, A. V., Kish, D. D., and Fairchild, R. L. (2004). The intensity of neutrophil infiltration controls the number of antigen-primed CD8 T cells recruited into cutaneous antigen challenge sites. *J Leukoc Biol* 76, 941-949.

- 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.
- Enk, A. H., Angeloni, V. L., Udey, M. C., and Katz, S. I. (1993a). An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 beta in the initiation of primary immune responses in skin. *J Immunol* *150*, 3698-3704.
- Enk, A. H., Angeloni, V. L., Udey, M. C., and Katz, S. I. (1993b). Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol* *151*, 2390-2398.
- Enk, A. H., and Katz, S. I. (1992a). Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 1398-1402.
- Enk, A. H., and Katz, S. I. (1992b). Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol* *149*, 92-95.
- Enk, A. H., Saloga, J., Becker, D., M, B. P. m., and Knop, J. (1994). Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 in vivo. *J Exp Med* *179*, 1397-1402.
- Erdmann, I., Scheidegger, E. P., Koch, F. K., Heinzerling, L., Odermatt, B., Burg, G., Lowe, J. B., and Kundig, T. M. (2002). Fucosyltransferase VII-deficient mice with defective E-, P-, and L-selectin ligands show impaired CD4+ and CD8+ T cell migration into the skin, but normal extravasation into visceral organs. *J Immunol* *168*, 2139-2146.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A., and Henson, P. M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* *405*, 85-90.
- Farzaneh, P., Allameh, A., Pratt, S., Moore, N., Travis, L., Gottschalg, E., Kind, C., and Fry, J. (2005). Increased heat shock protein 70 expression following toxicant-mediated cytotoxicity: a ubiquitous marker of toxicant exposure? *Altern Lab Anim* *33*, 105-110.
- Ferguson, T. A., Dube, P., and Griffith, T. S. (1994). Regulation of contact hypersensitivity by interleukin 10. *J Exp Med* *179*, 1597-1604.
- Fletcher, S. T., Baker, V. A., Fentem, J. H., Basketter, D. A., and Kelsell, D. P. (2001). Gene expression analysis of EpiDerm following exposure to SLS using cDNA microarrays. *Toxicol In Vitro* *15*, 393-398.
- Flier, J., Boorsma, D. M., Bruynzeel, D. P., Van Beek, P. J., Stoof, T. J., Scheper, R. J., Willemze, R., and Tensen, C. P. (1999). The CXCR3 activating chemokines IP-10, Mig, and IP-9 are expressed in allergic but not in irritant patch test reactions. *J Invest Dermatol* *113*, 574-578.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* *4*, 330-336.
- Foster, C. A., Yokozeki, H., Rappersberger, K., Koning, F., Volc-Platzer, B., Rieger, A., Coligan, J. E., Wolff, K., and Stingl, G. (1990). Human epidermal T cells predominantly belong to the lineage expressing alpha/beta T cell receptor. *J Exp Med* *171*, 997-1013.
- Frankild, S., Basketter, D. A., and Andersen, K. E. (1996). The value and limitations of rechallenge in the guinea pig maximization test. *Contact Dermatitis* *35*, 135-140.
- Fraser, J. D., Irving, B. A., Crabtree, G. R., and Weiss, A. (1991). Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* *251*, 313-316.
- Frosch, P. J., and Kligman, A. M. (1976). The chamber-scratification test for irritancy. *Contact Dermatitis* *2*, 314-324.

- Fuchs, J., and Milbradt, R. (1994). Antioxidant inhibition of skin inflammation induced by reactive oxidants: evaluation of the redox couple dihydrolipoate/lipoate. *Skin Pharmacol* 7, 278-284.
- Fukushima, A., Yamaguchi, T., Ishida, W., Fukata, K., and Ueno, H. (2006). TLR2 agonist ameliorates murine experimental allergic conjunctivitis by inducing CD4 positive T-cell apoptosis rather than by affecting the Th1/Th2 balance. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 1048-1055.
- Fullerton, A., Broby-Johansen, U., and Agner, T. (1994). Sodium lauryl sulphate penetration in an in vitro model using human skin. *Contact Dermatitis* 30, 222-225.
- Gad, S. C., Dunn, B. J., Dobbs, D. W., Reilly, C., and Walsh, R. D. (1986). Development and validation of an alternative dermal sensitization test: the mouse ear swelling test (MEST). *Toxicol Appl Pharmacol* 84, 93-114.
- Garcia, K. C., Degano, M., Stanfield, R. L., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Teyton, L., and Wilson, I. A. (1996). An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274, 209-219.
- 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.
- Gawkrodger, D. J., Carr, M. M., McVittie, E., Guy, K., and Hunter, J. A. (1987). Keratinocyte expression of MHC class II antigens in allergic sensitization and challenge reactions and in irritant contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 88, 11-16.
- Geissmann, F., Dieu-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.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D. R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71-82.
- Geissmann, F., Launay, P., Pasquier, B., Lepelletier, Y., Leborgne, M., Lehuen, A., Brousse, N., and Monteiro, R. C. (2001). A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon cross-linking by IgA complexes. *J Immunol* 166, 346-352.
- Geissmann, F., Revy, P., Regnault, A., Lepelletier, Y., Dy, M., Brousse, N., Amigorena, S., Hermine, O., and Durandy, A. (1999). TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol* 162, 4567-4575.
- Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kern, P. S., Dearman, R. J., Kimber, I., Patlewicz, G. Y., and Basketter, D. A. (2004). A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis* 50, 274-288.
- 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*.
- Ginhoux, F., Tacke, F., Angeli, V., Bogunovic, M., Loubeau, M., Dai, X. M., Stanley, E. R., Randolph, G. J., and Merad, M. (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 7, 265-273.
- Girolomoni, G., Sebastiani, S., Albanesi, C., and Cavani, A. (2001). T-cell subpopulations in the development of atopic and contact allergy. *Curr Opin Immunol* 13, 733-737.
- Glick, A. B., Kulkarni, A. B., Tennenbaum, T., Hennings, H., Flanders, K. C., O'Reilly, M., Sporn, M. B., Karlsson, S., and Yuspa, S. H. (1993). Loss of expression of transforming growth factor beta in skin and skin tumors is associated with

- hyperproliferation and a high risk for malignant conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 6076-6080.
- Goebeler, M., Trautmann, A., Voss, A., Brocker, E. V., Toksoy, A., and Gillitzer, R. (2001). Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Am J Pathol* *158*, 431-440.
- Gorbachev, A. V., and Fairchild, R. L. (2001). Regulatory role of CD4+ T cells during the development of contact hypersensitivity responses. *Immunol Res* *24*, 69-77.
- Gorbachev, A. V., Heeger, P. S., and Fairchild, R. L. (2001). CD4+ and CD8+ T cell priming for contact hypersensitivity occurs independently of CD40-CD154 interactions. *J Immunol* *166*, 2323-2332.
- Gordon, J. R., and Galli, S. J. (1990). Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* *346*, 274-276.
- Grabbe, S., Steinert, M., Mahnke, K., Schwartz, A., Luger, T. A., and Schwarz, T. (1996). Dissection of antigenic and irritative effects of epicutaneously applied haptens in mice. Evidence that not the antigenic component but nonspecific proinflammatory effects of haptens determine the concentration-dependent elicitation of allergic contact dermatitis. *J Clin Invest* *98*, 1158-1164.
- Granstein, R. D., Margolis, R., Mizel, S. B., and Sauder, D. N. (1986). In vivo inflammatory activity of epidermal cell-derived thymocyte activating factor and recombinant interleukin 1 in the mouse. *J Clin Invest* *77*, 1020-1027.
- Griem, P., Wulferink, M., Sachs, B., Gonzalez, J. B., and Gleichmann, E. (1998). Allergic and autoimmune reactions to xenobiotics: how do they arise? *Immunol Today* *19*, 133-141.
- Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D. P., May, L. T., Kupper, T. S., Sehgal, P. B., and Gottlieb, A. B. (1989). Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 6367-6371.
- Groves, R. W., Allen, M. H., Ross, E. L., Barker, J. N., and MacDonald, D. M. (1995a). Tumour necrosis factor alpha is pro-inflammatory in normal human skin and modulates cutaneous adhesion molecule expression. *Br J Dermatol* *132*, 345-352.
- Groves, R. W., Mizutani, H., Kieffer, J. D., and Kupper, T. S. (1995b). Inflammatory skin disease in transgenic mice that express high levels of interleukin 1 alpha in basal epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 11874-11878.
- Groves, R. W., Ross, E., Barker, J. N., Ross, J. S., Camp, R. D., and MacDonald, D. M. (1992). Effect of in vivo interleukin-1 on adhesion molecule expression in normal human skin. *J Invest Dermatol* *98*, 384-387.
- 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.
- Han, Y. P., Tuan, T. L., Hughes, M., Wu, H., and Garner, W. L. (2001). Transforming growth factor-beta - and tumor necrosis factor-alpha -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J Biol Chem* *276*, 22341-22350.
- Hancock, G. E., Kaplan, G., and Cohn, Z. A. (1988). Keratinocyte growth regulation by the products of immune cells. *J Exp Med* *168*, 1395-1402.
- Harada, A., Sekido, N., Akahoshi, T., Wada, T., Mukaida, N., and Matsushima, K. (1994). Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* *56*, 559-564.
- Hart, P. H., Grimbaldston, M. A., Swift, G. J., Jaksic, A., Noonan, F. P., and Finlay-Jones, J. J. (1998). Dermal mast cells determine susceptibility to ultraviolet B-induced

- systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice. *J Exp Med* *187*, 2045-2053.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L., and Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* *52*, 269-279.
- Hayashi, F., Means, T. K., and Luster, A. D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* *102*, 2660-2669.
- Helle, M., Brakenhoff, J. P., De Groot, E. R., and Aarden, L. A. (1988). Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. *Eur J Immunol* *18*, 957-959.
- Hemmi, H., Yoshino, M., Yamazaki, H., Naito, M., Iyoda, T., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Letterio, J. J., Nakabayashi, T., Tagaya, H., *et al.* (2001). Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells. *Int Immunol* *13*, 695-704.
- Henderson, W. R., Jr. (1991). Eicosanoids and platelet-activating factor in allergic respiratory diseases. *Am Rev Respir Dis* *143*, S86-90.
- Heufler, C., Topar, G., Koch, F., Trockenbacher, B., Kampgen, E., Romani, N., and Schuler, G. (1992). Cytokine gene expression in murine epidermal cell suspensions: interleukin 1 beta and macrophage inflammatory protein 1 alpha are selectively expressed in Langerhans cells but are differentially regulated in culture. *J Exp Med* *176*, 1221-1226.
- Hoebe, K., Janssen, E., and Beutler, B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* *5*, 971-974.
- Holliday, M. R., Corsini, E., Smith, S., Basketter, D. A., Dearman, R. J., and Kimber, I. (1997). Differential induction of cutaneous TNF-alpha and IL-6 by topically applied chemicals. *Am J Contact Dermat* *8*, 158-164.
- Homey, B., Alenius, H., Muller, A., Soto, H., Bowman, E. P., Yuan, W., McEvoy, L., Lauerma, A. I., Assmann, T., Bunemann, E., *et al.* (2002). CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med* *8*, 157-165.
- Homey, B., Wang, W., Soto, H., Buchanan, M. E., Wiesenborn, A., Catron, D., Muller, A., McClanahan, T. K., Dieu-Nosjean, M. C., Orozco, R., *et al.* (2000). Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC). *J Immunol* *164*, 3465-3470.
- Horner, A. A. (2006). Update on toll-like receptor ligands and allergy: implications for immunotherapy. *Curr Allergy Asthma Rep* *6*, 395-401.
- Huppa, J. B., Gleimer, M., Sumen, C., and Davis, M. M. (2003). Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nat Immunol* *4*, 749-755.
- Hurez, V., Saporov, A., Tousson, A., Fuller, M. J., Kubo, T., Oliver, J., Weaver, B. T., and Weaver, C. T. (2003). Restricted clonal expression of IL-2 by naive T cells reflects differential dynamic interactions with dendritic cells. *J Exp Med* *198*, 123-132.
- Iellem, A., Mariani, M., Lang, R., Recalde, H., Panina-Bordignon, P., Sinigaglia, F., and D'Ambrosio, D. (2001). Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* *194*, 847-853.
- Inaba, K., Inaba, M., Deguchi, M., Hagi, K., Yasumizu, R., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R. M. (1993). Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 3038-3042.

- Itano, A. A., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., Ehst, B. D., Ingulli, E., Rudensky, A. Y., and Jenkins, M. K. (2003). Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* *19*, 47-57.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* *5*, 987-995.
- Jacobs, J. J., Lehe, C. L., Hasegawa, H., Elliott, G. R., and Das, P. K. (2006). Skin irritants and contact sensitizers induce Langerhans cell migration and maturation at irritant concentration. *Exp Dermatol* *15*, 432-440.
- Jawdat, D. M., Albert, E. J., Rowden, G., Haidl, I. D., and Marshall, J. S. (2004). IgE-mediated mast cell activation induces Langerhans cell migration in vivo. *J Immunol* *173*, 5275-5282.
- 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.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A. H. (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* *192*, 1213-1222.
- Kaisho, T., and Akira, S. (2001). Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol* *22*, 78-83.
- Kaisho, T., and Akira, S. (2004). Pleiotropic function of Toll-like receptors. *Microbes Infect* *6*, 1388-1394.
- 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.
- Kandarova, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D., and Spielmann, H. (2005). The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests--an assessment of the performance of the optimised test. *Altern Lab Anim* *33*, 351-367.
- Kaplan, D. H., Jenison, M. C., Saeland, S., Shlomchik, W. D., and Shlomchik, M. J. (2005). Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* *23*, 611-620.
- Kaplan, G., Luster, A. D., Hancock, G., and Cohn, Z. A. (1987). The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J Exp Med* *166*, 1098-1108.
- Kaplan, G., Walsh, G., Guido, L. S., Meyn, P., Burkhardt, R. A., Abalos, R. M., Barker, J., Frindt, P. A., Fajardo, T. T., Celona, R., and et al. (1992). Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing. *J Exp Med* *175*, 1717-1728.
- 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.
- Kimber, I., Basketter, D. A., Berthold, K., Butler, M., Garrigue, J. L., Lea, L., Newsome, C., Roggeband, R., Steiling, W., Stropp, G., et al. (2001). Skin sensitization testing in potency and risk assessment. *Toxicol Sci* *59*, 198-208.
- Kimber, I., Pichowski, J. S., Basketter, D. A., and Dearman, R. J. (1999). Immune responses to contact allergens: novel approaches to hazard evaluation. *Toxicol Lett* *106*, 237-246.

- Kirschning, C. J., and Schumann, R. R. (2002). TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. *Curr Top Microbiol Immunol* 270, 121-144.
- Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhe, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C. H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D., *et al.* (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.
- Kligman, A. M., and Basketter, D. A. (1995). A critical commentary and updating of the guinea pig maximization test. *Contact Dermatitis* 32, 129-134.
- 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.
- Koch, A. E., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Harlow, L. A., DiPietro, L. A., Elner, V. M., Elner, S. G., and Strieter, R. M. (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258, 1798-1801.
- Kock, A., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J. C., and Luger, T. A. (1990). Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med* 172, 1609-1614.
- Kollisch, G., Kalali, B. N., Voelcker, V., Wallich, R., Behrendt, H., Ring, J., Bauer, S., Jakob, T., Mempel, M., and Ollert, M. (2005). Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology* 114, 531-541.
- 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.
- 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.
- Kondo, S., and Sauder, D. N. (1997). Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNF-alpha-induced skin inflammation. *Eur J Immunol* 27, 1713-1718.
- Kono, T., Kondo, S., Pastore, S., Shivji, G. M., Tomai, M. A., McKenzie, R. C., and Sauder, D. N. (1994). Effects of a novel topical immunomodulator, imiquimod, on keratinocyte cytokine gene expression. *Lymphokine Cytokine Res* 13, 71-76.
- Krasteva, M., Kehren, J., Ducluzeau, M. T., Sayag, M., Cacciapuoti, M., Akiba, H., Descotes, J., and Nicolas, J. F. (1999a). Contact dermatitis I. Pathophysiology of contact sensitivity. *Eur J Dermatol* 9, 65-77.
- Krasteva, M., Kehren, J., Sayag, M., Ducluzeau, M. T., Dupuis, M., Kanitakis, J., and Nicolas, J. F. (1999b). Contact dermatitis II. Clinical aspects and diagnosis. *Eur J Dermatol* 9, 144-159.
- 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.
- Kristensen, M. S., Paludan, K., Larsen, C. G., Zachariae, C. O., Deleuran, B. W., Jensen, P. K., Jorgensen, P., and Thestrup-Pedersen, K. (1991). Quantitative determination of IL-1 alpha-induced IL-8 mRNA levels in cultured human keratinocytes, dermal fibroblasts, endothelial cells, and monocytes. *J Invest Dermatol* 97, 506-510.

- Krummel, M. F., and Allison, J. P. (1996). CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med* 183, 2533-2540.
- Krummel, M. F., Sjaastad, M. D., Wulfig, C., and Davis, M. M. (2000). Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science* 289, 1349-1352.
- Kubes, P., and Kanwar, S. (1994). Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event. *J Immunol* 152, 3570-3577.
- Kuhns, D. B., DeCarlo, E., Hawk, D. M., and Gallin, J. I. (1992). Dynamics of the cellular and humoral components of the inflammatory response elicited in skin blisters in humans. *J Clin Invest* 89, 1734-1740.
- Kulka, M., and Metcalfe, D. D. (2006). TLR3 activation inhibits human mast cell attachment to fibronectin and vitronectin. *Mol Immunol* 43, 1579-1586.
- Kupper, T. S. (1990). Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and speculations. *J Clin Invest* 86, 1783-1789.
- Kupper, T. S., and Groves, R. W. (1995). The interleukin-1 axis and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 105, 62S-66S.
- Kupper, T. S., Lee, F., Coleman, D., Chodakewitz, J., Flood, P., and Horowitz, M. (1988). Keratinocyte derived T-cell growth factor (KTGF) is identical to granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). *J Invest Dermatol* 91, 185-188.
- Lampert, I. A. (1984). Expression of HLA-DR (Ia like) antigen on epidermal keratinocytes in human dermatoses. *Clin Exp Immunol* 57, 93-100.
- Larregina, A. T., Morelli, A. E., Spencer, L. A., Logar, A. J., Watkins, S. C., Thomson, A. W., and Faló, L. D., Jr. (2001). Dermal-resident CD14⁺ cells differentiate into Langerhans cells. *Nat Immunol* 2, 1151-1158.
- Larrick, J. W., Morhenn, V., Chiang, Y. L., and Shi, T. (1989). Activated Langerhans cells release tumor necrosis factor. *J Leukoc Biol* 45, 429-433.
- Larsen, C. G., Anderson, A. O., Oppenheim, J. J., and Matsushima, K. (1989). Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology* 68, 31-36.
- Lazarus, G. S., and Barrett, A. J. (1974). Neutral proteinase of rabbit skin: an enzyme capable of degrading skin protein and inducing an inflammatory response. *Biochim Biophys Acta* 350, 1-12.
- Le Borgne, M., Etchart, N., Goubier, A., Lira, S. A., Sirard, J. C., van Rooijen, N., Caux, C., Ait-Yahia, S., Vicari, A., Kaiserlian, D., and Dubois, B. (2006). Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8⁺ T cell crosspriming in vivo. *Immunity* 24, 191-201.
- Lee, S. C., Brummet, M. E., Shahabuddin, S., Woodworth, T. G., Georas, S. N., Leiferman, K. M., Gilman, S. C., Stellato, C., Gladue, R. P., Schleimer, R. P., and Beck, L. A. (2000). Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 alpha induces significant recruitment of neutrophils and monocytes. *J Immunol* 164, 3392-3401.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
- Leveque, J. L., de Rigal, J., Saint-Leger, D., and Billy, D. (1993). How does sodium lauryl sulfate alter the skin barrier function in man? A multiparametric approach. *Skin Pharmacol* 6, 111-115.
- Li, A. G., Wang, D., Feng, X. H., and Wang, X. J. (2004). Latent TGFbeta1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder. *Embo J* 23, 1770-1781.

- Lisby, S., Muller, K. M., Jongeneel, C. V., Saurat, J. H., and Hauser, C. (1995). Nickel and skin irritants up-regulate tumor necrosis factor-alpha mRNA in keratinocytes by different but potentially synergistic mechanisms. *Int Immunol* 7, 343-352.
- Liu, H., Komai-Koma, M., Xu, D., and Liew, F. Y. (2006). Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7048-7053.
- Liu, L., Zhou, X., Shi, J., Xie, X., and Yuan, Z. (2003). Toll-like receptor-9 induced by physical trauma mediates release of cytokines following exposure to CpG motif in mouse skin. *Immunology* 110, 341-347.
- Lotteau, V., Teyton, L., Peleraux, A., Nilsson, T., Karlsson, L., Schmid, S. L., Quaranta, V., and Peterson, P. A. (1990). Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 348, 600-605.
- 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.
- Lowney, E. D. (1967). Simultaneous development of unresponsiveness and of sensitivity following topical exposure to contact sensitizers. *J Invest Dermatol* 48, 391-398.
- Lu, B., Ebensperger, C., Dembic, Z., Wang, Y., Kvatyuk, M., Lu, T., Coffman, R. L., Pestka, S., and Rothman, P. B. (1998a). Targeted disruption of the interferon-gamma receptor 2 gene results in severe immune defects in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8233-8238.
- Lu, B., Rutledge, B. J., Gu, L., Fiorillo, J., Lukacs, N. W., Kunkel, S. L., North, R., Gerard, C., and Rollins, B. J. (1998b). Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med* 187, 601-608.
- Lu, Q., and Lemke, G. (2001). Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science* 293, 306-311.
- Luther, S. A., and Cyster, J. G. (2001). Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2, 102-107.
- 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.
- 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.
- 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.
- Marks, F., Furstenberger, G., and Muller-Decker, K. (1998). Arachidonic acid metabolism as a reporter of skin irritancy and target of cancer chemoprevention. *Toxicol Lett* 96-97, 111-118.
- Martin-Fontecha, A., Sebastiani, S., Hopken, U. E., Uguccioni, M., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2003). Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 198, 615-621.
- Matsushima, H., Yamada, N., Matsue, H., and Shimada, S. (2004). TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* 173, 531-541.

- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045.
- Matzinger, P. (1998). An innate sense of danger. *Semin Immunol* 10, 399-415.
- Maurer, D., Fiebiger, E., Reininger, B., Ebner, C., Petzelbauer, P., Shi, G. P., Chapman, H. A., and Stingl, G. (1998). Fc epsilon receptor I on dendritic cells delivers IgE-bound multivalent antigens into a cathepsin S-dependent pathway of MHC class II presentation. *J Immunol* 161, 2731-2739.
- Mazzoni, A., and Segal, D. M. (2004). Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc Biol* 75, 721-730.
- McEver, R. P., Beckstead, J. H., Moore, K. L., Marshall-Carlson, L., and Bainton, D. F. (1989). GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 84, 92-99.
- McKenzie, R. C., and Sauder, D. N. (1990). The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity. *J Invest Dermatol* 95, 105S-107S.
- McLelland, J., Shuster, S., and Matthews, J. N. (1991). 'Irritants' increase the response to an allergen in allergic contact dermatitis. *Arch Dermatol* 127, 1016-1019.
- Mempel, M., Voelcker, V., Kollisch, G., Plank, C., Rad, R., Gerhard, M., Schnopp, C., Fraunberger, P., Walli, A. K., Ring, J., *et al.* (2003). Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor kappaB controlled gene activation by *Staphylococcus aureus* is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. *J Invest Dermatol* 121, 1389-1396.
- Merad, M., Manz, M. G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I. L., Cyster, J. G., and Engleman, E. G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 3, 1135-1141.
- Mintern, J. D., Davey, G. M., Belz, G. T., Carbone, F. R., and Heath, W. R. (2002). Cutting edge: precursor frequency affects the helper dependence of cytotoxic T cells. *J Immunol* 168, 977-980.
- Mizutani, H., Black, R., and Kupper, T. S. (1991). Human keratinocytes produce but do not process pro-interleukin-1 (IL-1) beta. Different strategies of IL-1 production and processing in monocytes and keratinocytes. *J Clin Invest* 87, 1066-1071.
- 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.
- Momburg, F., Roelse, J., Hammerling, G. J., and Neefjes, J. J. (1994). Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J Exp Med* 179, 1613-1623.
- Montelius, J., Wahlkvist, H., Boman, A., Fernstrom, P., Grabergs, L., and Wahlberg, J. E. (1994). Experience with the murine local lymph node assay: inability to discriminate between allergens and irritants. *Acta Derm Venereol* 74, 22-27.
- Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P., and Mosmann, T. R. (1993). Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11, 165-190.
- Moser, B., Wolf, M., Walz, A., and Loetscher, P. (2004). Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25, 75-84.
- Muller, G., Knop, J., and Enk, A. H. (1996). Is cytokine expression responsible for differences between allergens and irritants? *Am J Contact Dermat* 7, 177-184.
- Muller, G., Saloga, J., Germann, T., Bellinghausen, I., Mohamadzadeh, M., Knop, J., and Enk, A. H. (1994). Identification and induction of human keratinocyte-derived IL-12. *J Clin Invest* 94, 1799-1805.

- Murphy, J. E., Robert, C., and Kupper, T. S. (2000). Interleukin-1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity. *J Invest Dermatol* *114*, 602-608.
- Muzio, M., Sironi, M., Polentarutti, N., Mantovani, A., and Colotta, F. (1994). Induction by transforming growth factor-beta 1 of the interleukin-1 receptor antagonist and of its intracellular form in human polymorphonuclear cells. *Eur J Immunol* *24*, 3194-3198.
- Nakae, S., Naruse-Nakajima, C., Sudo, K., Horai, R., Asano, M., and Iwakura, Y. (2001). IL-1 alpha, but not IL-1 beta, is required for contact-allergen-specific T cell activation during the sensitization phase in contact hypersensitivity. *Int Immunol* *13*, 1471-1478.
- Nakamura, K., Williams, I. R., and Kupper, T. S. (1995). Keratinocyte-derived monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1): analysis in a transgenic model demonstrates MCP-1 can recruit dendritic and Langerhans cells to skin. *J Invest Dermatol* *105*, 635-643.
- Nestle, F. O., Zheng, X. G., Thompson, C. B., Turka, L. A., and Nickoloff, B. J. (1993). Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol* *151*, 6535-6545.
- Netea, M. G., Suttmuller, R., Hermann, C., Van der Graaf, C. A., Van der Meer, J. W., van Krieken, J. H., Hartung, T., Adema, G., and Kullberg, B. J. (2004). Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* *172*, 3712-3718.
- Netzlaff, F., Lehr, C. M., Wertz, P. W., and Schaefer, U. F. (2005). The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur J Pharm Biopharm* *60*, 167-178.
- Newby, C. S., Barr, R. M., Greaves, M. W., and Mallet, A. I. (2000). Cytokine release and cytotoxicity in human keratinocytes and fibroblasts induced by phenols and sodium dodecyl sulfate. *J Invest Dermatol* *115*, 292-298.
- Ngo, V. N., Korner, H., Gunn, M. D., Schmidt, K. N., Riminton, D. S., Cooper, M. D., Browning, J. L., Sedgwick, J. D., and Cyster, J. G. (1999). Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen. *J Exp Med* *189*, 403-412.
- Nickoloff, B. J., and Naidu, Y. (1994). Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *J Am Acad Dermatol* *30*, 535-546.
- Noguchi, J., Kuroda, E., and Yamashita, U. (2005). Strain difference of murine bone marrow-derived mast cell functions. *J Leukoc Biol* *78*, 605-611.
- O'Garra, A. (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* *8*, 275-283.
- O'Leary, J. G., Goodarzi, M., Drayton, D. L., and von Andrian, U. H. (2006). T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* *7*, 507-516.
- Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E. S., Young, D. W., Ishizaka, S. T., Rose, J., Chow, J. C., and Strauss, J. F., 3rd (2001). The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* *276*, 10229-10233.
- Palframan, R. T., Jung, S., Cheng, G., Weninger, W., Luo, Y., Dorf, M., Littman, D. R., Rollins, B. J., Zweerink, H., Rot, A., and von Andrian, U. H. (2001). Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for

- monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med* *194*, 1361-1373.
- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* *299*, 1033-1036.
- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2004). Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity* *21*, 733-741.
- Patel, M., Xu, D., Kewin, P., Choo-Kang, B., McSharry, C., Thomson, N. C., and Liew, F. Y. (2005). TLR2 agonist ameliorates established allergic airway inflammation by promoting Th1 response and not via regulatory T cells. *J Immunol* *174*, 7558-7563.
- Pedersen, L. K., Haslund, P., Johansen, J. D., Held, E., Volund, A., and Agner, T. (2004). Influence of a detergent on skin response to methylidibromo glutaronitrile in sensitized individuals. *Contact Dermatitis* *50*, 1-5.
- Pennie, W. D., and Kimber, I. (2002). Toxicogenomics; transcript profiling and potential application to chemical allergy. *Toxicol In Vitro* *16*, 319-326.
- Pestka, J., and Zhou, H. R. (2006). Toll-like receptor priming sensitizes macrophages to proinflammatory cytokine gene induction by deoxynivalenol and other toxicants. *Toxicol Sci* *92*, 445-455.
- Peters, W., Dupuis, M., and Charo, I. F. (2000). A mechanism for the impaired IFN- γ production in C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout mice: role of CCR2 in linking the innate and adaptive immune responses. *J Immunol* *165*, 7072-7077.
- 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.
- Pierre, P., and Mellman, I. (1998). Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* *93*, 1135-1145.
- Piguet, P. F., Grau, G. E., Hauser, C., and Vassalli, P. (1991). Tumor necrosis factor is a critical mediator in hapten induced irritant and contact hypersensitivity reactions. *J Exp Med* *173*, 673-679.
- Pober, J. S., Collins, T., Gimbrone, M. A., Jr., Libby, P., and Reiss, C. S. (1986). Inducible expression of class II major histocompatibility complex antigens and the immunogenicity of vascular endothelium. *Transplantation* *41*, 141-146.
- Proksch, E., Folster-Holst, R., and Jensen, J. M. (2006). Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J Dermatol Sci* *43*, 159-169.
- Ptak, W., Bryniarski, K., Ptak, M., Majewska, M., Gamian, A., Lobo, F. M., and Szczepanik, M. (2006). Toll-like receptor ligands reverse suppression of contact hypersensitivity reactions induced by epicutaneous immunization with protein antigen. *Int Arch Allergy Immunol* *139*, 188-200.
- Qu, C., Edwards, E. W., Tacke, F., Angeli, V., Llodra, J., Sanchez-Schmitz, G., Garin, A., Haque, N. S., Peters, W., van Rooijen, N., *et al.* (2004). Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. *J Exp Med* *200*, 1231-1241.
- Randolph, G. J., and Furie, M. B. (1995). A soluble gradient of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 promotes the transendothelial migration of monocytes in vitro. *J Immunol* *155*, 3610-3618.
- Randolph, G. J., Inaba, K., Robbiani, D. F., Steinman, R. M., and Muller, W. A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* *11*, 753-761.

- 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.
- Reaves, T. A., Chin, A. C., and Parkos, C. A. (2005). Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* *100 Suppl 1*, 191-198.
- Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., They, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* *189*, 371-380.
- 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.
- Reiss, Y., Proudfoot, A. E., Power, C. A., Campbell, J. J., and Butcher, E. C. (2001). CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med* *194*, 1541-1547.
- Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C. L., Gold, M. R., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1998). Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* *188*, 2175-2180.
- Revillard, J.-P. (2001). Immunologie, 4e edition edn, De Boeck & Larcier).
- Ridge, J. P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* *393*, 474-478.
- Roake, J. A., Rao, A. S., Morris, P. J., Larsen, C. P., Hankins, D. F., and Austyn, J. M. (1995). Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J Exp Med* *181*, 2237-2247.
- Roche, P. A., and Cresswell, P. (1990). Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* *345*, 615-618.
- Roggeband, R., Scailteur, V., and Basketter, D. A. (1999). Human volunteer studies; a consumer products company view. *Hum Exp Toxicol* *18*, 591-593.
- Roitt, I., Brostoff, J., and Male, D. (1997). Immunology 4th edition edn).
- Romagnani, S. (2006). Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders? *Allergy* *61*, 3-14.
- Ronchetti, S., Zollo, O., Bruscoli, S., Agostini, M., Bianchini, R., Nocentini, G., Ayroldi, E., and Riccardi, C. (2004). GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol* *34*, 613-622.
- Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* *18*, 217-242.
- Ruedl, C., Koebel, P., and Karjalainen, K. (2001). In vivo-matured Langerhans cells continue to take up and process native proteins unlike in vitro-matured counterparts. *J Immunol* *166*, 7178-7182.
- Sabroe, I., Jones, E. C., Whyte, M. K., and Dower, S. K. (2005). Regulation of human neutrophil chemokine receptor expression and function by activation of Toll-like receptors 2 and 4. *Immunology* *115*, 90-98.

- Saint-Mezard, P., Bosset, S., Cousin, F., Ionesco, M. A., and Nicolas, J. F. (2002). Mast cells and the skin. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 42, 193-198.
- Saint-Mezard, P., Chavagnac, C., Bosset, S., Ionescu, M., Peyron, E., Kaiserlian, D., Nicolas, J. F., and Berard, F. (2003a). Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo. *J Immunol* 171, 4073-4080.
- Saint-Mezard, P., Krasteva, M., Chavagnac, C., Bosset, S., Akiba, H., Kehren, J., Kanitakis, J., Kaiserlian, D., Nicolas, J. F., and Berard, F. (2003b). 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.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., and Takahashi, T. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182, 18-32.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182, 389-400.
- Sallusto, F., Kremmer, E., Palermo, B., Hoy, A., Ponath, P., Qin, S., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999a). Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *Eur J Immunol* 29, 2037-2045.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999b). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.
- 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.
- Santamaria, L. F., Perez Soler, M. T., Hauser, C., and Blaser, K. (1995). Allergen specificity and endothelial transmigration of T cells in allergic contact dermatitis and atopic dermatitis are associated with the cutaneous lymphocyte antigen. *Int Arch Allergy Immunol* 107, 359-362.
- Saulnier, M., Huang, S., Aguet, M., and Ryffel, B. (1995). Role of interferon-gamma in contact hypersensitivity assessed in interferon-gamma receptor-deficient mice. *Toxicology* 102, 301-312.
- Savill, J., and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788.
- Sawamura, D., Abe, R., Goto, M., Akiyama, M., Hemmi, H., Akira, S., and Shimizu, H. (2005). Direct injection of plasmid DNA into the skin induces dermatitis by activation of monocytes through toll-like receptor 9. *J Gene Med* 7, 664-671.
- Scheibner, K. A., Lutz, M. A., Boodoo, S., Fenton, M. J., Powell, J. D., and Horton, M. R. (2006). Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol* 177, 1272-1281.
- Schroder, J. M. (1995). Cytokine networks in the skin. *J Invest Dermatol* 105, 20S-24S.
- Schuurhuis, D. H., Laban, S., Toes, R. E., Ricciardi-Castagnoli, P., Kleijmeer, M. J., van der Voort, E. I., Rea, D., Offringa, R., Geuze, H. J., Melief, C. J., and Ossendorp, F.

- (2000). Immature dendritic cells acquire CD8(+) cytotoxic T lymphocyte priming capacity upon activation by T helper cell-independent or -dependent stimuli. *J Exp Med* 192, 145-150.
- Schwarz, T. (1995). Interleukin-12 and its role in cutaneous sensitization. *Res Immunol* 146, 494-499.
- 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.
- Scott, A. E., Kashon, M. L., Yucesoy, B., Luster, M. I., and Tinkle, S. S. (2002). Insights into the quantitative relationship between sensitization and challenge for allergic contact dermatitis reactions. *Toxicol Appl Pharmacol* 183, 66-70.
- Sebastiani, S., Albanesi, C., Nasorri, F., Girolomoni, G., and Cavani, A. (2002). Nickel-specific CD4(+) and CD8(+) T cells display distinct migratory responses to chemokines produced during allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 118, 1052-1058.
- Sebastiani, S., Allavena, P., Albanesi, C., Nasorri, F., Bianchi, G., Traidl, C., Sozzani, S., Girolomoni, G., and Cavani, A. (2001). Chemokine receptor expression and function in CD4+ T lymphocytes with regulatory activity. *J Immunol* 166, 996-1002.
- Seino, K., Azuma, M., Bashuda, H., Fukao, K., Yagita, H., and Okumura, K. (1995). CD86 (B70/B7-2) on endothelial cells co-stimulates allogeneic CD4+ T cells. *Int Immunol* 7, 1331-1337.
- Sellheyer, K., Bickenbach, J. R., Rothnagel, J. A., Bundman, D., Longley, M. A., Krieg, T., Roche, N. S., Roberts, A. B., and Roop, D. R. (1993). Inhibition of skin development by overexpression of transforming growth factor beta 1 in the epidermis of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5237-5241.
- Sherry, B., and Cerami, A. (1991). Small cytokine superfamily. *Curr Opin Immunol* 3, 56-60.
- Shevach, E. M. (2002). CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2, 389-400.
- Shornick, L. P., De Togni, P., Mariathasan, S., Goellner, J., Strauss-Schoenberger, J., Karr, R. W., Ferguson, T. A., and Chaplin, D. D. (1996). Mice deficient in IL-1beta manifest impaired contact hypersensitivity to trinitrochlorobenzene. *J Exp Med* 183, 1427-1436.
- Silberberg, I., Baer, R. L., and Rosenthal, S. A. (1976). The role of Langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pigs. *J Invest Dermatol* 66, 210-217.
- Sille, F. C., Visser, A., and Boes, M. (2005). T cell priming by tissue-derived dendritic cells: new insights from recent murine studies. *Cell Immunol* 237, 77-85.
- Sironi, M., Breviario, F., Proserpio, P., Biondi, A., Vecchi, A., Van Damme, J., Dejana, E., and Mantovani, A. (1989). IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J Immunol* 142, 549-553.
- Sloan, V. S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., and Zaller, D. M. (1995). Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 375, 802-806.
- Smith, C. K., Moore, C. A., Elahi, E. N., Smart, A. T., and Hotchkiss, S. A. (2000). Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde, and cinnamic alcohol. *Toxicol Appl Pharmacol* 168, 189-199.
- Smith, H. R., Kelly, D. A., Young, A. R., Basketter, D. B., and McFadden, J. P. (2002). Relationship between 2,4-dinitrochlorobenzene elicitation responses and individual irritant threshold. *Contact Dermatitis* 46, 97-100.

- Smith, H. R., Orchard, G. E., Calonje, E., Basketter, D. A., and McFadden, J. P. (2004). Irritant threshold and histological response of epidermis to irritant application. *Contact Dermatitis* 51, 227-230.
- Song, P. I., Park, Y. M., Abraham, T., Harten, B., Zivony, A., Neparidze, N., Armstrong, C. A., and Ansel, J. C. (2002). Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol* 119, 424-432.
- Sporri, R., and Reis e Sousa, C. (2005). Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4⁺ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol* 6, 163-170.
- St Louis, J. D., Lederer, J. A., and Lichtman, A. H. (1993). Costimulator deficient antigen presentation by an endothelial cell line induces a nonproliferative T cell activation response without anergy. *J Exp Med* 178, 1597-1605.
- Steinbrink, K., Sorg, C., and Macher, E. (1996). Low zone tolerance to contact allergens in mice: a functional role for CD8⁺ T helper type 2 cells. *J Exp Med* 183, 759-768.
- Stoitzner, P., Holzmann, S., McLellan, A. D., Ivarsson, L., Stossel, H., Kapp, M., Kammerer, U., Douillard, P., Kampgen, E., Koch, F., *et al.* (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.
- Stoitzner, P., Pfaller, K., Stossel, H., and Romani, N. (2002). A close-up view of migrating Langerhans cells in the skin. *J Invest Dermatol* 118, 117-125.
- Stoitzner, P., Zanella, M., Ortner, U., Lukas, M., Tagwerker, A., Janke, K., Lutz, M. B., Schuler, G., Echtenacher, B., Ryffel, B., *et al.* (1999). Migration of langerhans cells and dermal dendritic cells in skin organ cultures: augmentation by TNF-alpha and IL-1beta. *J Leukoc Biol* 66, 462-470.
- 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.
- Stumbles, P. A., Strickland, D. H., Pimm, C. L., Proksch, S. F., Marsh, A. M., McWilliam, A. S., Bosco, A., Tobagus, I., Thomas, J. A., Napoli, S., *et al.* (2001). Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus. *J Immunol* 167, 228-234.
- Sunderkotter, C., Nikolic, T., Dillon, M. J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D. A., and Leenen, P. J. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172, 4410-4417.
- Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Akira, S., Okumura, K., Ra, C., and Ogawa, H. (2002). Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest* 109, 1351-1359.
- Sutmuller, R. P., den Brok, M. H., Kramer, M., Bennink, E. J., Toonen, L. W., Kullberg, B. J., Joosten, L. A., Akira, S., Netea, M. G., and Adema, G. J. (2006a). Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* 116, 485-494.
- Sutmuller, R. P., Morgan, M. E., Netea, M. G., Grauer, O., and Adema, G. J. (2006b). Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol* 27, 387-393.
- Suzuki, H., Wang, B., Shivji, G. M., Toto, P., Amerio, P., Tomai, M. A., Miller, R. L., and Sauder, D. N. (2000). Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 114, 135-141.

- Sy, M. S., Miller, S. D., and Claman, H. N. (1977). Immune suppression with supraoptimal doses of antigen in contact sensitivity. I. Demonstration of suppressor cells and their sensitivity to cyclophosphamide. *J Immunol* *119*, 240-244.
- Symington, F. W., Brady, W., and Linsley, P. S. (1993). Expression and function of B7 on human epidermal Langerhans cells. *J Immunol* *150*, 1286-1295.
- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., *et al.* (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 3516-3521.
- Tagami, H. (1992). The role of complement-derived mediators in inflammatory skin diseases. *Arch Dermatol Res* *284 Suppl 1*, S2-9.
- Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R., and Ravetch, J. V. (1994). FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* *76*, 519-529.
- Takeshita, K., Sakai, K., Bacon, K. B., and Gantner, F. (2003). Critical role of histamine H4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* *307*, 1072-1078.
- Takeuchi, J., Watari, E., Shinya, E., Norose, Y., Matsumoto, M., Seya, T., Sugita, M., Kawana, S., and Takahashi, H. (2003). Down-regulation of Toll-like receptor expression in monocyte-derived Langerhans cell-like cells: implications of low-responsiveness to bacterial components in the epidermal Langerhans cells. *Biochem Biophys Res Commun* *306*, 674-679.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* *11*, 443-451.
- Tang, H. L., and Cyster, J. G. (1999). Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* *284*, 819-822.
- Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C., and Simon, J. C. (2002). Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* *195*, 99-111.
- Thatcher, T. H., Luzina, I., Fischelevich, R., Tomai, M. A., Miller, R. L., and Gaspari, A. A. (2006). Topical imiquimod treatment prevents UV-light induced loss of contact hypersensitivity and immune tolerance. *J Invest Dermatol* *126*, 821-831.
- Thornton, A. M., and Shevach, E. M. (2000). Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* *164*, 183-190.
- Toews, G. B., Bergstresser, P. R., and Streilein, J. W. (1980). Langerhans cells: sentinels of skin associated lymphoid tissue. *J Invest Dermatol* *75*, 78-82.
- Traidl, C., Sebastiani, S., Albanesi, C., Merk, H. F., Puddu, P., Girolomoni, G., and Cavani, A. (2000). Disparate cytotoxic activity of nickel-specific CD8+ and CD4+ T cell subsets against keratinocytes. *J Immunol* *165*, 3058-3064.
- Trautmann, A., Akdis, M., Schmid-Grendelmeier, P., Disch, R., Brocker, E. B., Blaser, K., and Akdis, C. A. (2001). Targeting keratinocyte apoptosis in the treatment of atopic dermatitis and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* *108*, 839-846.
- Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C. J., Hacker, H., and Wagner, H. (2001). Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* *276*, 31332-31339.

- Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., Ghose, S., Kirschning, C. J., Issels, R. D., and Wagner, H. (2002). HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 277, 15107-15112.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., *et al.* (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.
- van den Oord, J. J., and de Wolf-Peeters, C. (1994). Epithelium-lining macrophages in psoriasis. *Br J Dermatol* 130, 589-594.
- Van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P. G., Ploegh, H. L., and Tonegawa, S. (1992). TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell* 71, 1205-1214.
- Vanbervliet, B., Homey, B., Durand, I., Massacrier, C., Ait-Yahia, S., de Bouteiller, O., Vicari, A., and Caux, C. (2002). Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *Eur J Immunol* 32, 231-242.
- Vane, J., and Botting, R. (1987). Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Faseb J* 1, 89-96.
- Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M., and Bolen, J. B. (1988). The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 55, 301-308.
- Velasco, G., Campo, M., Manrique, O. J., Bellou, A., He, H., Arestides, R. S., Schaub, B., Perkins, D. L., and Finn, P. W. (2005). Toll-like receptor 4 or 2 agonists decrease allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32, 218-224.
- Vocanson, M., Hennino, A., Cluzel-Tailhardat, M., Saint-Mezard, P., Benetiere, J., Chavagnac, C., Berard, F., Kaiserlian, D., and Nicolas, J. F. (2006). CD8+ T cells are effector cells of contact dermatitis to common skin allergens in mice. *J Invest Dermatol* 126, 815-820.
- Waelti, E. R., Inaebnit, S. P., Rast, H. P., Hunziker, T., Limat, A., Braathen, L. R., and Wiesmann, U. (1992). Co-culture of human keratinocytes on post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells: production of large amounts of interleukin 6. *J Invest Dermatol* 98, 805-808.
- Wahl, S. M., McCartney-Francis, N., and Mergenhagen, S. E. (1989). Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF-beta. *Immunol Today* 10, 258-261.
- Wahlberg, J. E. (1993). Measurement of skin-fold thickness in the guinea pig. Assessment of edema-inducing capacity of cutting fluids, acids, alkalis, formalin and dimethyl sulfoxide. *Contact Dermatitis* 28, 141-145.
- Waksman, B. H. (1978). Cellular hypersensitivity immunity : inflammation and cytotoxicity., Saunders edn (Philadelphia).
- Walsh, L. J., Trinchieri, G., Waldorf, H. A., Whitaker, D., and Murphy, G. F. (1991). Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4220-4224.
- Wang, B., Feliciani, C., Howell, B. G., Freed, I., Cai, Q., Watanabe, H., and Sauder, D. N. (2002). Contribution of Langerhans cell-derived IL-18 to contact hypersensitivity. *J Immunol* 168, 3303-3308.
- Wang, B., Fujisawa, H., Zhuang, L., Kondo, S., Shivji, G. M., Kim, C. S., Mak, T. W., and Sauder, D. N. (1997). Depressed Langerhans cell migration and reduced contact hypersensitivity response in mice lacking TNF receptor p75. *J Immunol* 159, 6148-6155.

- Wang, B., Kondo, S., Shivji, G. M., Fujisawa, H., Mak, T. W., and Sauder, D. N. (1996). Tumour necrosis factor receptor II (p75) signalling is required for the migration of Langerhans' cells. *Immunology* 88, 284-288.
- Wang, B., Zhuang, L., Fujisawa, H., Shinder, G. A., Feliciani, C., Shivji, G. M., Suzuki, H., Amerio, P., Toto, P., and Sauder, D. N. (1999). Enhanced epidermal Langerhans cell migration in IL-10 knockout mice. *J Immunol* 162, 277-283.
- Wang, H. W., Tedla, N., Lloyd, A. R., Wakefield, D., and McNeil, P. H. (1998). Mast cell activation and migration to lymph nodes during induction of an immune response in mice. *J Clin Invest* 102, 1617-1626.
- Wang, S., Bajorath, J., Flies, D. B., Dong, H., Honjo, T., and Chen, L. (2003). Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J Exp Med* 197, 1083-1091.
- Wang, Y., and Thorlacius, H. (2005). Mast cell-derived tumour necrosis factor- α mediates macrophage inflammatory protein-2-induced recruitment of neutrophils in mice. *Br J Pharmacol* 145, 1062-1068.
- Welss, T., Basketter, D. A., and Schroder, K. R. (2004). In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol In Vitro* 18, 231-243.
- Westphal, G. A., Schnuch, A., Moessner, R., Konig, I. R., Kranke, B., Hallier, E., Ziegler, A., and Reich, K. (2003). Cytokine gene polymorphisms in allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 48, 93-98.
- Williams, I. R., and Kupper, T. S. (1996). Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci* 58, 1485-1507.
- Willis, C. M., Britton, L. E., Reiche, L., and Wilkinson, J. D. (2001). Reduced levels of glutathione S-transferases in patch test reactions to dithranol and sodium lauryl sulphate as demonstrated by quantitative immunocytochemistry: evidence for oxidative stress in acute irritant contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 11, 99-104.
- Willis, C. M., Reiche, L., and Wilkinson, J. D. (1998). Immunocytochemical demonstration of reduced Cu,Zn-superoxide dismutase levels following topical application of dithranol and sodium lauryl sulphate: an indication of the role of oxidative stress in acute irritant contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 8, 8-12.
- Willis, C. M., Stephens, C. J., and Wilkinson, J. D. (1989). Epidermal damage induced by irritants in man: a light and electron microscopic study. *J Invest Dermatol* 93, 695-699.
- Willis, C. M., Stephens, C. J., and Wilkinson, J. D. (1990). Differential effects of structurally unrelated chemical irritants on the density and morphology of epidermal CD1+ cells. *J Invest Dermatol* 95, 711-716.
- Wilmer, J. L., Burlison, F. G., Kayama, F., Kanno, J., and Luster, M. I. (1994). Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. *J Invest Dermatol* 102, 915-922.
- Witmer-Pack, M. D., Olivier, W., Valinsky, J., Schuler, G., and Steinman, R. M. (1987). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 166, 1484-1498.
- Wolpe, S. D., Davatelis, G., Sherry, B., Beutler, B., Hesse, D. G., Nguyen, H. T., Moldawer, L. L., Nathan, C. F., Lowry, S. F., and Cerami, A. (1988). Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med* 167, 570-581.

- Wolpe, S. D., Sherry, B., Juers, D., Davatelis, G., Yurt, R. W., and Cerami, A. (1989). Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 612-616.
- Wood, L. C., Jackson, S. M., Elias, P. M., Grunfeld, C., and Feingold, K. R. (1992). Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. *J Clin Invest* *90*, 482-487.
- Xu, H., DiIulio, 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.
- 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.
- Xu, H., Manivannan, A., Dawson, R., Crane, I. J., Mack, M., Sharp, P., and Liversidge, J. (2005). Differentiation to the CCR2⁺ inflammatory phenotype in vivo is a constitutive, time-limited property of blood monocytes and is independent of local inflammatory mediators. *J Immunol* *175*, 6915-6923.
- Yang, D., Howard, O. M., Chen, Q., and Oppenheim, J. J. (1999). Cutting edge: immature dendritic cells generated from monocytes in the presence of TGF-beta 1 express functional C-C chemokine receptor 6. *J Immunol* *163*, 1737-1741.
- Yokozeki, H., Wu, M. H., Sumi, K., Igawa, K., Miyazaki, Y., Katayama, I., Takeda, K., Akira, S., and Nishioka, K. (2003). Th2 cytokines, IgE and mast cells play a crucial role in the induction of para-phenylenediamine-induced contact hypersensitivity in mice. *Clin Exp Immunol* *132*, 385-392.
- Zanin-Zhorov, A., Cahalon, L., Tal, G., Margalit, R., Lider, O., and Cohen, I. R. (2006). Heat shock protein 60 enhances CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest* *116*, 2022-2032.
- Zhang, L., and Tinkle, S. S. (2000). Chemical activation of innate and specific immunity in contact dermatitis. *J Invest Dermatol* *115*, 168-176.
- Zheng, H., Fletcher, D., Kozak, W., Jiang, M., Hofmann, K. J., Conn, C. A., Soszynski, D., Grabiec, C., Trumbauer, M. E., Shaw, A., and et al. (1995). Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 beta-deficient mice. *Immunity* *3*, 9-19.
- Zinkernagel, R. M., and Doherty, P. C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* *248*, 701-702.
- Zucali, J. R., Dinarello, C. A., Oblon, D. J., Gross, M. A., Anderson, L., and Weiner, R. S. (1986). Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2. *J Clin Invest* *77*, 1857-1863.