



**HAL**  
open science

# Étude de la coopération entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T dans les allergies aux produits chimiques et aux médicaments

Rami Bechara

► **To cite this version:**

Rami Bechara. Étude de la coopération entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T dans les allergies aux produits chimiques et aux médicaments. Immunologie. Université Paris-Saclay, 2017. Français. NNT : 2017SACLS474 . tel-01969318v1

**HAL Id: tel-01969318**

**<https://theses.hal.science/tel-01969318v1>**

Submitted on 4 Jan 2019 (v1), last revised 7 Jan 2019 (v2)

**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.

# Étude de la coopération entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T dans les allergies aux produits chimiques et aux médicaments

Thèse de doctorat de l'Université Saint-Joseph et de l'Université  
Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569 Innovation Thérapeutique, du fondamental à  
l'appliqué  
École doctorale Sciences et Santé

Spécialité de doctorat : Immunologie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 15 Décembre 2017, par

**Rami Bechara**

Composition du Jury :

Bernard Maillère Directeur de Recherche, CEA-Saclay	Président
Marc Karam Professeur associé, Université de Balamand	Rapporteur
Marc Vocanson Chargé de recherche, Inserm UMR1111	Rapporteur
Pascal Demoly PU-PH, Université de Montpellier, Inserm UMR454	Examineur
Stefan Martin Professeur des Universités, Université de Freiburg	Examineur
Richard Weaver Directeur de Recherche associé, Biologie Servier	Examineur
Marc Pallardy Professeur des Universités, Université Paris-Sud, Inserm UMR996	Directeur de thèse
Hayat Azouri Professeur des Universités, Université Saint-Joseph	Co-Directeur de thèse



*“Ce n’est pas la force, ni la chance, mais  
la persévérance, qui fait les grandes  
oeuvres”*

Adapté de  
Samuel JOHNSON (1709-1784)



*A vous Marie, Joseph, Fady et Rudy  
Merci de m'avoir accompagné avec amour pendant ce long parcours  
A la mémoire de Jad, parti si vite, en ce jour...*



Je souhaite remercier le Dr *Marc Karam* et le Dr *Marc Vocanson* de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail. Je tiens également à remercier le Pr *Pascal Demofy*, le Dr *Bernard Maillère*, le Pr *Stefan Martin* et le Dr *Richard Weaver* d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Merci infiniment aux Pr *Hayat Azouri* et Pr *Marc Pallardy*, mes directeurs de thèse. Merci pour la confiance et la liberté que vous m'aviez accordées tout au long de ma thèse. Pr *Hayat*, merci d'avoir cru en mes capacités. Merci pour vos précieux conseils, vos encouragements, votre générosité et votre sérénité. *Marc*, merci d'être un exemple ! J'ai bénéficié tout au long de ce travail de ta grande compétence, ta rigueur intellectuelle, ton humour et ton esprit *manager* qui m'ont toujours impressionné. Merci de m'avoir transmis la passion pour la recherche et un peu moins pour le PSG.

Un grand merci à *Diane* et *Marie-Éliane*. Vous m'aviez appris au labo presque tout ce que je sais. Merci d'avoir été là pour moi, toujours à l'écoute. *MEA*, merci de m'avoir appris à développer mon odorat pour deviner les frites en approchant du RU. Merci encore de m'avoir conseillé et pour avoir écouté mes lamentations.

Merci à mes chères amies et collègues du bureau 417, *Myriam*, *Chloé* et *Marie Hullo*. Ce fut un grand plaisir de partager avec vous ce bureau, bien chauffé (merci *Cloco* 😂). *Mi*, toujours présente à mes côtés, merci pour TOUT ! Je te dois beaucoup. Plus particulièrement merci d'avoir pris le relai pour écouter mes lamentations:p et merci aussi pour l'amour partagé pour le « social music 🎵 » (dédicace *MEA*), les sushi cheese:p et un peu moins le Jurançon. Je te souhaite plein de bonnes choses :). *Ma* merci pour ce gain de folie et cette bonne ambiance que tu as apportée avec *Mi*, un vrai complot ! *Cloco*, ptite chou, le footing, à ta droite :p, va certainement me manquer mais aussi les moments de délire. Merci d'avoir accepté de financer mes futurs projets de recherche 😊. Je profite pour remercier *Casper*...que va-t-il faire sans nous deux ?! Je remercie aussi mon ami la rose, *Doumet Georges*. Merci de nous avoir initié aux rangements des échantillons dans le -80°C ! bob ou débob ?! on n'a jamais bien compris 😞! Je te remercie aussi pour les échanges scientifiques sur les neutro mais aussi sur les planètes et toute la galaxie 🌌! Je remercie également les

doctorantes *Elodie* et *Vanessa*. *Elo*, moi ma Majesté 😭, ai beaucoup apprécié le travail avec toi :)  
*Vanessa*, merci de m'avoir fait découvrir la richesse de la langue française !

Merci aux anciens combattants et présents docteurs : *Zeina el Ali*, *Yann Gallais*, *Marie de Bourayne* et *Romain Genard*. Merci de m'avoir transmis toutes vos connaissances. Je vous souhaite la bonne continuation dans vos carrières. *Zeina*, merci pour ta gentillesse et ton aide sans failles. Dr *Gallais* merci pour les discussions si enrichissantes, les poches de sang amenées à faire ensemble, dans la bonne ambiance, et partagées nিকেlement :p. *Marie*, merci pour ta sympathie. *Romain*, merci pour ton optimisme:), tes encouragements et de m'avoir fait découvrir l'ADIT !

Merci à toute l'équipe de l'INSERM UMR-996 et du laboratoire de Toxicologie de l'Université Saint-Joseph. Ce fut un grand plaisir de venir travailler tous les jours à vos côtés ! Vous allez tous me manquer ! Plus spécialement, je remercie *Isabelle T.*, *Armelle* et *Saadia* pour leur regard bienveillant et leur soutien tant scientifique que personnel. *Isabelle*, merci pour les chocolats :) je te dois mes deux kilos en plus. *Natacha*, *Benoit*, *Kim* et *Marie-Hélène* pour leur aide dans les manip et les discussions de tout et de rien. *MHD*, la Louiselle va certainement me manquer ! *Luc*, pour les échanges scientifiques et le partage d'articles. *Sylvie* pour ses conseils, sa générosité et pour les bons moments passés à Malaga et à Reims. *Aude* pour sa gentillesse et les petits échanges que nous avons pu avoir dans les couloirs ou à la coulée verte:). *Muriel*, *Isabelle B.* et *Sophie* pour leur sympathie et leur aide au quotidien de tous genres ! Il est difficile d'imaginer le labo sans vous, et le facebook sans *Mumu* 😭. Je remercie également *Viviana*, *Roseline* et *Vanessa Marrani* pour leur gentillesse et leur bonne humeur. Merci à *Cynthia* et *Diana* pour leur aide dans les manip au Liban. J'espère que vos futurs projets se réaliseront. Je remercie également *Georgette*, *Siham*, *Amal* et *Charbel* pour leur gentillesse, leur bienveillance et les discussions autour de la table au sein du laboratoire de Toxicologie de l'USJ.

Je souhaite aussi remercier nos collaborateurs qui nous ont fait bénéficier de leurs compétences. *Sabrina* et Dr. *Niek de Vries* thank you for your help and the positive energy. Pr *Delphine Joseph*, Pr *Anna-Maria Papini*, *Chiara* et *Elodie J.*, merci d'avoir contribué au projet sur les peptides hapténisés. Ce fut un grand plaisir de collaborer avec vous et de travailler sur ce projet si passionnant !

Dr *Bernard Maillère*, merci pour vos conseils et pour les discussions scientifiques que j'ai appréciés énormément. Je profite aussi pour remercier Biologie Servier, Programme Cèdre et le CNRS-L pour avoir financé ce projet et mes déplacements en missions sans lesquels cette étude n'aurait pas été possible.

Merci à mes collègues de l'UE18 et de l'UL225 que j'ai eu la chance de côtoyer pendant ces trois dernières années. Plus particulièrement, *Armelle, Saadia, François, Paul, Catherine B., Catherine L., Danielle, Rim, Sana, Constance* et *Soumaya*. C'était un plaisir de travailler avec vous. Je remercie également les étudiants de 3<sup>ème</sup> année de Pharmacie de Châtenay et les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer : *Marta, Sofia, Guillaume* et *Arthur*. Grâce à vous j'ai découvert ma passion pour l'enseignement ! Je profite pour te remercier *Marc* pour cette opportunité.

Merci à mes amis Clamartois pour leur accueil chaleureux lors de nos réunions dans le sous-sol de Clamart dans une atmosphère *cosy* appuyée par des lampadaires et inspirée de nos soirées dansantes du Café-oz, du Tout-le monde en parle.... C'était quoi le nom du dernier bar ?!

Les ADITIENS ! Merci pour votre sympathie, vous allez tous me manquer ! *Julie*, je t'attends toujours pour finaliser la collaboration :p

*Jaqueline*, je ne vous oublie pas ! Merci pour les repas au RU, les fruits pour « Mr » de temps en temps ! et surtout le Bon Weekend avec votre sourire me marquera pour toujours !

Enfin, ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner ma famille *Bechara* et *Ghanem* mais aussi mes amis en France, au Liban et aux US (Hâte de vous revoir *Natalie* et *Tom*). Vous n'avez, pour la plupart, pas toujours compris le *Job* d'un doctorant;p ni sur quoi je travaillais (dédicace *Fadi* :p) ou pourquoi je suis au labo un WE... mais vous avez été toujours là, à mon écoute. C'est grâce à vos encouragements, que je n'ai jamais pu cesser d'avancer malgré les moments de frustrations et de doute. Merci pour les bons moments passés ensemble et à bientôt pour de nouvelles aventures.



# Table des matières

LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES TABLEAUX.....	16
LISTE DES ABREVIATIONS .....	17
AVANT-PROPOS.....	21
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>25</b>
<b>CHAPITRE 1 : LES ALLERGIES AUX PRODUITS CHIMIQUES ET AUX MEDICAMENTS..</b>	<b>27</b>
<b>I. HISTORIQUE DE L'ALLERGIE .....</b>	<b>27</b>
1. <i>Origine et évolution du mot « Allergie ».....</i>	<i>27</i>
2. <i>L'allergie au 21<sup>ème</sup> siècle.....</i>	<i>28</i>
<b>II. CLASSIFICATION DES REACTIONS ALLERGIQUES .....</b>	<b>29</b>
1. <i>Clinique .....</i>	<i>31</i>
1.1. Les réactions allergiques immédiates .....	31
1.2. Les réactions allergiques retardées.....	32
1.3. Limites de cette classification .....	34
2. <i>Mécanismes des réactions allergiques.....</i>	<i>35</i>
2.1. Réaction médiée par les IgE (Type I) .....	36
2.2. Réaction médiée par les IgG (Type II et III).....	37
2.3. Réaction médiée par les lymphocytes T (Type IV).....	37
<b>III. EPIDEMIOLOGIE DES REACTIONS ALLERGIQUES .....</b>	<b>40</b>
<b>IV. DIAGNOSTIC DES REACTIONS ALLERGIQUES .....</b>	<b>42</b>
1. <i>Tests in vivo .....</i>	<i>43</i>
2. <i>Tests in vitro .....</i>	<i>43</i>
2.1. Caractérisation de la phase aiguë de la maladie.....	44
2.2. Identification de la molécule allergisante.....	44
3. <i>Recommandations internationales .....</i>	<i>46</i>
<b>CHAPITRE 2 : MOLECULES ETUDIEES : LES METAUX (NICKEL ET COBALT) ET LES ANTIBIOTIQUES DE LA FAMILLE DES <math>\beta</math>-LACTAMINES.....</b>	<b>47</b>
<b>I. LES METAUX.....</b>	<b>47</b>
1. <i>Historique.....</i>	<i>47</i>
2. <i>Utilisation et modes d'exposition .....</i>	<i>48</i>
3. <i>Devenir dans l'organisme .....</i>	<i>49</i>
4. <i>Toxicité .....</i>	<i>49</i>
<b>II. ANTIBIOTIQUES DE LA FAMILLE DES <math>\beta</math>-LACTAMINES .....</b>	<b>50</b>
1. <i>Historique.....</i>	<i>50</i>
2. <i>Mécanisme d'action des antibiotiques de la famille des <math>\beta</math>-lactamines .....</i>	<i>51</i>
3. <i>Classification et structure chimique .....</i>	<i>52</i>
3.1. Les pénicillines.....	53
3.1.1. Les pénicillines naturelles.....	53
3.1.2. Les pénicillines hémisynthétiques.....	53
3.1.3. Propriétés pharmacocinétiques.....	54
3.2. Les autres antibiotiques de la famille des $\beta$ -lactamines.....	54
4. <i>Réactivité croisée et allergie, au sein de la famille des <math>\beta</math>-lactamines .....</i>	<i>56</i>

## CHAPITRE 3 : LES ETAPES CLES DECLENCHANT UNE REPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE CONTRE LES PRODUITS CHIMIQUES ET LES MEDICAMENTS..... 58

I. LA PRESENCE D'UN ANTIGENE : LA THEORIE DE L'HAPTENE .....	59
1. <i>Définition</i> .....	59
2. <i>Exemples de substances chimiques</i> .....	60
3. <i>Exemples de molécules médicamenteuses</i> .....	61
3.1. Déterminants antigéniques des $\beta$ -lactamines.....	61
3.2. Protéines porteuses candidates pour les $\beta$ -lactamines .....	64
4. <i>Les pro-haptènes</i> .....	67
5. <i>Les pré-haptènes</i> .....	68
6. <i>Les haptènes non-classiques</i> .....	69
II. CAPTURE ET PRESENTATION DE L'ANTIGENE : IMPLICATION DES CELLULES DENDRITIQUES. ....	72
1. <i>Les cellules dendritiques</i> .....	72
1.1. Diversité des cellules dendritiques .....	72
1.2. Origine des cellules dendritiques .....	75
1.3. Rôle des cellules dendritiques.....	76
2. <i>Les voies de présentation de l'antigène par les cellules dendritiques</i> .....	78
2.1. Capture de l'antigène par les cellules dendritiques.....	78
2.2. Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).....	79
2.3. Apprêtement de l'antigène et présentation par les molécules du CMH de classe I .....	81
2.4. Apprêtement de l'antigène et présentation par les molécules du CMH de classe II.....	83
2.5. Mécanismes de la présentation croisée .....	84
III. PRESENTATION DE L'ANTIGENE AUX LYMPHOCYTES T : ROLE DES SIGNAUX DE DANGER. ....	86
1. <i>La théorie du « signal de danger »</i> .....	86
1.1. Les récepteurs des signaux de danger .....	87
1.1.1. Les récepteurs Toll-like (TLR).....	87
1.1.2. Les autres récepteurs des signaux de danger .....	88
1.2. Les conséquences de la reconnaissance des signaux de danger : maturation des cellules dendritiques.....	91
2. <i>Les molécules chimiques et médicamenteuses sont-elles capables d'induire des signaux de danger reconnus par les cellules dendritiques ?</i> .....	93
2.1. Activation directe des cellules dendritiques .....	93
2.1.1. Modifications du phénotype des cellules dendritiques .....	93
2.1.2. Activation de voies de signalisations spécifiques dans les cellules dendritiques.....	95
2.1.3. Mécanismes d'activation des voies de signalisations intracellulaires.....	99
2.2. Activation indirecte des cellules dendritiques : modification de l'épimérisme .....	103
3. <i>Le concept de l'immunité innée hétérologue</i> .....	107
IV. PRESENCE D'UN REPERTOIRE DE LYMPHOCYTES T RECONNAISSANT L'ANTIGENE .....	109
1. <i>Développement du répertoire des lymphocytes T</i> .....	109
2. <i>Structure du récepteur de l'antigène des lymphocytes T (TCR)</i> .....	110
3. <i>Mécanismes de reconnaissance de l'antigène et d'activation des lymphocytes T</i> .....	112
3.1. La théorie de l'haptène .....	112
3.2. Pi-concept .....	118
3.3. Altération du répertoire peptidique du soi .....	121
3.4. Cas particulier des haptènes métalliques .....	122
3.5. Immunité adaptative hétérologue .....	127
4. <i>Activation et polarisation des lymphocytes T</i> .....	127
4.1. La synapse immunologique .....	127
4.2. La polarisation lymphocytaire .....	130
4.2.1. Les lymphocytes Th17.....	131
4.2.2. Différents sous-types de lymphocyte T dans les allergies aux produits chimiques et aux médicaments .....	133

4.2.3.	Rôle des cytokines membres de la famille de l'IL-12 .....	134
4.2.4.	Régulation des cytokines membres de la famille de l'IL-12.....	138
V.	FACTEURS DEPENDANTS DE L'INDIVIDU.....	141
1.	<i>Facteurs génétiques et polymorphismes</i> .....	141
2.	<i>Maladies associées, microbiomes et inflammation</i> .....	144
3.	<i>Mécanismes de tolérance</i> .....	145
<b><u>PRESENTATION DU TRAVAIL</u></b> .....		<b>151</b>
<b><u>RESULTATS</u></b> .....		<b>159</b>
<b>PARTIE I : EFFETS DES METAUX : NICKEL ET COBALT SUR LA SYNTHÈSE ET LA RÉGULATION DES CYTOKINES MEMBRES DE LA FAMILLE DE L'IL-12 DANS LES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES</b> .....		<b>161</b>
<b>ARTICLE 1 : LE NICKEL INDUIT LA PRODUCTION D'IL-23 PAR LES CELLULES DENDRITIQUES ET FAVORISE LE DÉVELOPPEMENT DES LT TH17 : IMPLICATION DES VOIES DU TLR4 ET DE JAK-STAT NICKEL SULFATE PROMOTES IL-17A PRODUCING CD4+ T-CELLS BY AN IL-23-DEPENDENT MECHANISM REGULATED BY TLR4 AND JAK-STAT PATHWAYS</b> .....		<b>163</b>
<b>RESULTATS COMPLÉMENTAIRES 1 : MÉCANISMES RESPONSABLES DE L'INHIBITION DE LA PRODUCTION DE L'IL-23 ET DE L'IL-12P40 PAR LA VOIE JAK-STAT DANS LES CELLULES DENDRITIQUES TRAITÉES PAR LE NICKEL</b> .....		<b>179</b>
1.	<i>Introduction</i> .....	179
2.	<i>Matériels et Méthodes</i> .....	179
2.1.	Modèle cellulaire : cellules dendritiques dérivées de monocytes humains.....	179
2.2.	Traitement des MoDC.....	180
2.3.	Analyse protéique par Western blot.....	180
3.	<i>Résultats</i> .....	181
3.1.	L'inhibition de la voie Jak-STAT n'interfère pas avec la phosphorylation de p38 MAPK et de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B.....	181
3.2.	Le nickel induit l'expression de NFIL-3 dans les MoDC <i>via</i> la voie Jak-STAT .....	182
<b>RESULTATS COMPLÉMENTAIRES 2 : EFFETS COMPARÉS DU NICKEL ET DU COBALT SUR LA PRODUCTION DES CYTOKINES MEMBRES DE LA FAMILLE DE L'IL-12 DANS LES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES</b> .....		<b>184</b>
1.	<i>Introduction</i> .....	184
2.	<i>Matériels et Méthodes</i> .....	185
2.1.	Modèle cellulaire : cellules dendritiques dérivées de monocytes humains.....	185
2.2.	Traitement des MoDC.....	186
2.3.	Analyse protéique par western blot .....	186
2.4.	Évaluation de la production des espèces réactives par cytométrie en flux .....	187
2.5.	Quantification de la production de l'IL-12p40 et de l'IL-23 par ELISA.....	187
3.	<i>Résultats</i> .....	188
3.1.	Le nickel et le cobalt induisent l'expression d'IRF-1 dans les MoDC .....	188
3.2.	Le cobalt est un fort inducteur de l'expression de NFIL-3 dans les MoDC.....	188
3.3.	L'induction de NFIL-3 par le nickel et le cobalt est indépendante du TLR4 .....	189
3.4.	Identification des voies de signalisation impliquées dans l'expression de NFIL-3 induite par le nickel et le cobalt.....	191
<b>RESULTATS COMPLÉMENTAIRES 3 : EFFET DU NICKEL ET DES AUTRES METAUX ALLERGISANTS SUR LA PRODUCTION DE L'IL-27 PAR LES CELLULES DENDRITIQUES</b> .....		<b>195</b>

1. <i>Introduction</i> .....	195
2. <i>Matériels et Méthodes</i> .....	196
2.1. Modèle cellulaire : cellules dendritiques dérivées de monocytes humains.....	196
2.2. Traitement des MoDC.....	196
2.3. Quantification de la production de l'IL-27 par ELISA .....	197
2.4. Isolement des ARN, transcription inverse et PCR en temps-réel (RT-qPCR) .....	197
3. <i>Résultats</i> .....	198
3.1. Le nickel induit la production de l'IL-27 et l'expression de ses sous-unités dans les MoDC .....	198
3.2. L'addition de l'IFN- $\gamma$ à une stimulation par du nickel régule différemment l'expression des sous-unités de l'IL-27.....	200
3.3. Implication des voies de signalisation dans la production de l'IL-27 .....	201
<b>PARTIE II : RECONNAISSANCE DES HAPTENES PAR LES LYMPHOCYTES T : APPLICATION AU NICKEL ET A LA BENZYL PENICILLINE .....</b>	<b>205</b>
<b>ARTICLE 2 : IDENTIFICATION ET CARACTERISATION D'UN REPERTOIRE DE LT NAÏFS RECONNAISSANT LE NICKEL .....</b>	<b>207</b>
<b>RESULTATS COMPLEMENTAIRES : ETUDE DES MECANISMES DE L'IMMUNISATION CONTRE LA BENZYL PENICILLINE : IDENTIFICATION D'UN REPERTOIRE DE LT NAÏFS CD8+ SPECIFIQUES DE LA BENZYL PENICILLINE .....</b>	<b>241</b>
1. <i>Introduction</i> .....	241
2. <i>Matériels et Méthodes</i> .....	242
2.1. Synthèse et caractérisation du bioconjugué HSA-BP .....	242
2.2. Modèle cellulaire : co-culture autologue cellule dendritique/ lymphocyte T .....	243
2.3. Elispot IFN- $\gamma$ .....	244
2.4. Détection des protéines hapténisées par la BP par western-blot .....	245
3. <i>Résultats</i> .....	245
3.1. Mise au point du modèle de co-culture DC/LT.....	245
3.2. Caractérisation du bioconjugué HSA-BP .....	249
3.3. Détection d'un répertoire de LT naïfs CD8+ spécifiques de la HSA-BP .....	251
3.4. Détection d'un répertoire de LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP .....	251
3.5. Etude des mécanismes impliqués dans l'activation des LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP.....	255
<b><u>DISCUSSION</u>.....</b>	<b>259</b>
<b>I. ETUDE IN VITRO DES EFFETS DES HAPTENES METALLIQUES SUR LA FONCTION DES DC HUMAINES : REGULATION DES CYTOKINES MEMBRES DE LA FAMILLE DE L'IL-12... 261</b>	
<b>II. ETUDE DES MECANISMES DE L'IMMUNISATION CONTRE LE NICKEL ET LA BP : IDENTIFICATION D'UN REPERTOIRE DE LT NAÏFS SPECIFIQUES DU NICKEL ET DE LA BP DANS LA POPULATION GENERALE..... 270</b>	
<b><u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>.....</b>	<b>277</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>283</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>321</b>

# Liste des figures

Figure 1: Symptômes liés à l'anaphylaxie.....	32
Figure 2: Différentes formes cliniques d'atteinte cutanée allergique .....	33
Figure 3: Chronologie des réactions allergiques .....	35
Figure 4: Classification générale des réactions indésirables aux produits chimiques .....	39
Figure 5: Aperçu des tests <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> permettant de poser le diagnostic des réactions allergiques.....	45
Figure 6: Mécanisme d'action des antibiotiques de la famille des $\beta$ -lactamines .....	51
Figure 7: Structure chimique des antibiotiques de la famille des $\beta$ -lactamines.....	52
Figure 8: Classification et structures chimiques de quelques antibiotiques de la famille des $\beta$ -lactamines.....	55
Figure 9: Chaîne latérale commune entre aminopénicillines et céphalosporines .....	57
Figure 10: Aperçu général des étapes clés nécessaires pour déclencher une réponse immunitaire adaptative ...	58
Figure 11: Exemple d'haptène classique : le DNCB .....	61
Figure 12: Déterminants majeurs et mineurs de la benzylpénicilline.....	62
Figure 13: Déterminant antigénique des céphalosporines.....	63
Figure 14: Hapténisation des protéines intracellulaires par l'amoxicilline.....	66
Figure 15: Exemples de liaisons de coordination effectuées par les métaux.....	70
Figure 16: La présence d'un antigène: étape clé du déclenchement de la réponse immunitaire .....	71
Figure 17: Les différentes sous-populations de cellules dendritiques humaines et murines .....	74
Figure 18: L'origine des cellules dendritiques .....	75
Figure 19: Les voies d'internalisation de l'antigène dans les cellules dendritiques.....	79
Figure 20: La structure des molécules du CMH de classe I et II .....	81
Figure 21: Mécanismes cellulaires de l'apprêtement des protéines antigéniques dans la cellule dendritique.....	83
Figure 22: Mécanismes cellulaires de la présentation croisée .....	85
Figure 23: Exemple de signalisation intracellulaire induite par les TLR humains .....	90
Figure 24: Schéma général des voies de signalisations activées par les molécules allergisantes dans la cellule dendritique .....	93
Figure 25: Activation de la voie Jak-STAT et signalisation intracellulaire .....	97
Figure 26: Modèle d'activation du TLR4 humain par le nickel .....	101
Figure 27: Schéma général des voies de signalisations activées par le nickel dans les cellules dendritiques .....	103
Figure 28: Activation directe ou indirecte des cellules dendritiques par les molécules allergisantes .....	108
Figure 29: Le complexe TCR/CD3 et la reconnaissance de l'antigène.....	112
Figure 30: Différentes hypothèses d'activation des lymphocytes T.....	122

Figure 31: Liste des molécules de co-stimulation, co-inhibition et d'adhésion impliquées dans la synapse immunologique .....	129
Figure 32: La polarisation des lymphocytes T .....	130
Figure 33: Caractéristiques et ciblage thérapeutique de la voie Th17 .....	132
Figure 34: Les cytokines membres de la famille de l'IL-12 .....	135
Figure 35: Régulation transcriptionnelle de l'IL-12p70, de l'IL-23 et de l'IL-27 par un agoniste TLR4 : cas du LPS .....	139
Figure 36: Aperçu général des étapes clés pour déclencher une réponse immunitaire adaptative .....	148
Figure 37: Identification de lignées lymphocytaires spécifiques de l'antigène .....	154
Figure 38: Résumé général des objectifs du travail .....	157
Figure 39: L'inhibition de la voie Jak-STAT n'augmente pas la phosphorylation de la p38MAPK et de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B .....	182
Figure 40: Le nickel induit l'expression de NFIL-3 dans les MoDC <i>via</i> la voie Jak-STAT .....	183
Figure 41: Le nickel et le cobalt induisent l'expression d'IRF-1 dans les MoDC .....	188
Figure 42: Le cobalt est un fort inducteur de l'expression de NFIL-3 dans les MoDC .....	189
Figure 43: L'induction de l'expression de NFIL-3 par le nickel et le cobalt est indépendante du TLR-4 .....	190
Figure 44: L'induction de l'expression de NFIL-3 par le cobalt est dépendante de la voie Jak-STAT .....	191
Figure 45: L'inhibition de la voie Jak-STAT entraîne une augmentation de la production de l'IL-12p40 dans les MoDC traitées par du cobalt .....	192
Figure 46: L'induction de l'expression de NFIL-3 est dépendante du stress oxydatif généré dans les MoDC ..	193
Figure 47: Le cobalt induit la formation des espèces réactives dans les MoDC .....	194
Figure 48: Effet des métaux allergisants sur la production de l'IL-27 et l'expression de l'il-27p28 et de l'ebi3.	199
Figure 49: Modulation de la production de l'IL-27 par l'IFN- $\gamma$ dans les MoDC traitées par du nickel .....	200
Figure 50: La production de l'IL-27 dans les MoDC traitées par du nickel est médiée par le TLR4 .....	201
Figure 51: Modulation de l'expression des sous-unités de l'IL-27 et de sa production par les voies de p38 MAPK et de NF- $\kappa$ B .....	202
Figure 52: Le rôle de la voie Jak-STAT dans la production de l'IL-27 par les MoDC activées par du nickel ..	203
Figure 53: Détection de LT naïfs CD8+ spécifiques de la KLH .....	246
Figure 54: Implication des molécules du CMH de classe I dans l'activation des LT naïfs CD8+ spécifiques de la KLH .....	247
Figure 55: Implication du protéasome dans l'activation des LT naïfs CD8+ spécifiques de la KLH .....	248
Figure 56: Implication de l'endosome dans l'activation des LT naïfs CD4+ spécifiques de la KLH .....	249
Figure 57: Spectre de masse et de déconvolution du bioconjugué HSA-BP .....	250
Figure 58: Identification d'un répertoire de LT naïfs CD8+ spécifiques de la HSA-BP .....	251

<b>Figure 59: Etudes des protéines hapténisées par la BP par western-blot .....</b>	<b>252</b>
<b>Figure 60: Fréquence de LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP .....</b>	<b>253</b>
<b>Figure 61: Détection de LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP .....</b>	<b>254</b>
<b>Figure 62: Caractérisation de la réponse des LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP du donneur PR41 .....</b>	<b>255</b>
<b>Figure 63: Implication des molécules du CMH de classe I dans l'activation des LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP .....</b>	<b>256</b>
<b>Figure 64: Implication du protéasome dans l'activation des LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP .....</b>	<b>257</b>
<b>Figure 65: Modulation de l'expression des sous-unités de l'IL-23, de l'IL-12p70 et de l'IL-27 .....</b>	<b>263</b>
<b>Figure 66: Schéma général de la régulation de l'IL-23, de l'IL-12p70 et de l'IL-27 par le nickel dans les cellules dendritiques .....</b>	<b>281</b>
<b>Figure 67: Activation des LT naïfs CD4+ et CD8+ spécifiques de la BP .....</b>	<b>282</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1: Exemples de quelques réactions allergiques .....	30
Tableau 2: Résidus lysines modifiés par les $\beta$ -lactamines au niveau de l'albumine sérique humaine.....	65
Tableau 3: Liste de quelques ligands de la voie Jak-STAT .....	98
Tableau 4: Résumé général de quelques études <i>in vitro</i> mettant en relief l'activation des LT suivant la théorie de l'haptène.....	115
Tableau 5: Mécanismes d'activation des lymphocytes T spécifiques du nickel .....	124
Tableau 6: Résumé général de quelques études <i>in vitro</i> mettant en relief l'activation des LT par le nickel chez des donneurs sains .....	126
Tableau 7: Résumé de la modulation des cytokines membres de la famille de l'IL-12 et de leurs sous-unités dans les MoDC.....	267

## Liste des abréviations

<b>A</b>		cSMAC	Central-SupraMolecular Activation Complex
ABC	Abacavir	cTEC	Cellules Corticales Epithéliales
ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity	CYP	Cytochrome P 450
ADH	Alcool Déshydrogénase	<b>D</b>	
ADR	Adverse Drug Reactions	DALI	Drug-Allergic Liver Injury
AGEP	Pustulose Exanthématique Aiguë Généralisée	DAMP	Damage-Associated Molecular Patterns
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor	DC	Cellules Dendritiques
ALDH	Aldéhyde Déshydrogénase	DDC	Cellules Dendritiques Dermales
AP-1	Activated Protein 1	DILI	Drug-Induced Liver Injury
ATF	Activating Transcription Factor	DIN	Drug-Induced Nephritis
<b>B</b>		DNCB	Dinitrochlorobenzène
BATF-3	Basic Leucine Zipper Transcription Factor ATF-like 3	DNFB	Dinitrofluorobenzène
BB	Base de Brandowski	DNP	Dinitrophényl
Be	Béryllium	DR1	Downregulator of Transcription 1
BL	$\beta$ -lactamines	DRESS	Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms
Blimp1	B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein-1	DT	Toxine Diphtérique
BMDC	Bone Marrow-derived Dendritic Cells	<b>E</b>	
BMDM	Bone marrow-derived macrophages	EAACI	European Academy of Allergy and Clinical Immunology
BP	Benzylpénicilline	EAC	Eczéma Allergique de Contact
bZIP	Basic Leucine Zipper	EBI3	Epstein Barr Virus Induced Gene 3
<b>C</b>		EF	Elongation factor
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domains	Elispot	Enzyme-Linked Immunospot assay
CBZ	Carbamzépine	EMP	Exanthème Maculo-Papuleux
cDC	Cellules Dendritiques Conventionnelles	ERAD	ER-associated degradation
CDP	Common DC Progenitors	ERGIC	Compartment Intermédiaire RE-Golgi
cFLIP	FLICE-like Inhibitory Protein	ES	Effets Secondaires
CinA	Cinnamaldéhyde	<b>F</b>	
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer	FAS-L	FAS Ligand
CK2	Casein Kinase 2	FITC	Fluorescein Isothiocyanate
CLA	Cutaneous Leukocyte Antigen	FLU	Flucloxacilline
CLIP	Class II Associated Invariant Chain Peptides	<b>G</b>	
CLR	C-lectin Receptors	GCLC	Glutamate-Cystéine Ligase
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	GST	Glutathion S-Transférases
CMP	Common Myeloid Progenitor	<b>H</b>	
Co	Cobalt	HIF-1 $\alpha$	Transcription Factor Hypoxia-Inducible Factor 1
CNAS	Cytosolic Nucleic Acid Sensors	HLA	Human Leukocyte Antigen

HMGB1	High-Mobility Group Box	NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor Kappa B
HSA	Albumine Sérique Humaine	Ni	Nickel
HSC	Hypersensibilité de Contact	NKT	Natural Killer T
HSP	Heat Shock Protein	NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
HSR	Hypersensibilité	NLR	Nod-like Receptors
		NOD	Nucleotide-Binding Oligomerization
<b>I</b>		NRF-2	Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor
IDR	Injections Intradermiques	NSAID	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
IFN- $\gamma$	Interféron-gamma	NVP	Névirapine
Ikk	Inhibitor of Nuclear Factor- $\kappa$ B Kinase	<b>P</b>	
IL	Interleukine	PAF	Platlet-Activation Factor
ILC	Innate Lymphoid Cells	PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
IRF	Interféron Regulatory Factor	PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif	pCMH	Complexe peptide-CMH
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif	pDC	Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes
		PD-L	Program Death Ligand
<b>J</b>		PFR	Peptide Flanking Region
Jak	Janus Kinase	PGN	Peptidoglycane
		PIAS	Protein Inhibitor of Activated STAT
<b>K</b>		Pi-concept	Pharmacological Interaction with Immune Receptors
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin	PIP	Pipéracilline
		PKC	Protein Kinase C
<b>L</b>		PLL	Pencilloyl-polylysine
LB	Lymphocyte B	PLP	Protéines de Liaisons des Pénicillines
LC	Cellules de Langerhans	PPD	Para-phénylènediamine
LPS	Lipopolysaccharide	PRR	Pathogen Recognition Receptors
LRR	Leucine-Rich Repeat		
LT	Lymphocyte T	<b>R</b>	
LTT	Lymphocyte Transformation Test	RE	Réticulum Endoplasmique
		RLR	RIG-like Receptors
<b>M</b>		ROR- $\gamma$ t	RAR-related Orphan Receptor gamma
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases	ROS	Espèces Réactives de l'oxygène
MAVS	Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein	<b>S</b>	
MDP	Monocyte and DC Progenitor	SCAR	Severe Cutaneous Adverse Reactions
MIT	Méthylisothiazolinone	SI	Système Immunitaire
MLP	Multipotent Lymphoid Progenitor	SJS	Stevens-Johnson Syndrom
MoDC	Monocyte-derived Dendritic Cells	SMX	Sulfaméthoxazole
mTEC	Cellules Corticales Médullaires	SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
MWHA	Molecular-Weight Hyaluronic Acid	STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88		
<b>N</b>			
NAC	N-Acétylcystéine		
NFIL-3	Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated		

SVF    Sérum de Veau Fœtale  
Syk    Spleen Tyrosine Kinase

**T**

TAP    Transporter Associated with  
Antigen Processing

TCR    T-cell Receptor

TEN    Toxic Epidermal Necrolysis

Th    T-helper

TIR    Toll IL-1 Receptor

TLR    Toll-like Receptor

TNF    Tumor Necrosis Factor

TNBS    Acide trinitrobenzènesulfonique

TNCB    Trinitrochlorobenzène

TRAIL    Tumor Necrosis Factor Related  
Apoptosis Inducing Ligand

Treg    Lymphocyte T régulateur

TRIF    TIR Domain Containing Adapter  
Inducing IFN- $\gamma$

TSLP    Thymic Stromal Lymphopoietin

**U**

UPR    Unfolded Protein Response

**W**

WAO    World Allergy Organization



# **AVANT-PROPOS**



Les allergies représentent un problème majeur de santé publique. L'allergie aux métaux tels que le cobalt et le nickel est répandue surtout dans les pays industrialisés. D'autre part, les réactions allergiques médicamenteuses représentent un problème majeur de sécurité d'emploi du médicament et la majorité est due à des antibiotiques tels que les  $\beta$ -lactamines. Ces réactions allergiques peuvent être immédiates ou retardées et sont médiées respectivement par des IgE ou par des lymphocytes T (LT). Un des points communs à tous ces types de réactions est la nécessité de génération de LT spécifiques des molécules suite à une coopération entre les cellules dendritiques (DC) et les LT. Outre leur capacité à fournir un signal antigénique, la plupart des molécules allergisantes sont capables d'activer des voies de signalisation dans la DC induisant leur maturation. Ceci permettra l'activation des LT spécifiques. Ce sont ces LT qui rendent possible la synthèse des IgE spécifiques par les lymphocytes B dans les mécanismes immédiats, et qui sont responsables de la phase effectrice dans les mécanismes retardés.

Le premier objectif de ce travail a été d'étudier l'effet des métaux allergisants sur la régulation des cytokines membres de la famille de l'IL-12 dans les DC humaines et leur conséquence sur la polarisation des LT. Ce travail a fait l'objet d'une publication (**Partie I-Article 1**) et est complété par des résultats complémentaires (**Partie I-Résultats complémentaires 1-3**). Le second objectif a été d'identifier un répertoire de LT naïfs spécifiques du nickel (**Partie II- Article 2 en préparation**) et de la benzylpénicilline (**Partie II-Résultats complémentaires**) afin de comprendre les mécanismes de l'immunisation contre les produits chimiques et les médicaments.

Parallèlement nous nous sommes intéressés aux kératinocytes et leur activation par le nickel au sein du laboratoire de Toxicologie de l'Université Saint-Joseph (**Annexe 2**).

Par ailleurs, notre travail a été complété par une revue sur le rôle du système immunitaire dans les réactions allergiques (**Annexe 1**) et a fait l'objet de 7 communications orales et de 16 communications affichées dans des congrès nationaux et internationaux (**Annexe 3**).

# **INTRODUCTION**



# Chapitre 1

## Les allergies aux produits chimiques et aux médicaments

### I. Historique de l'allergie

*« Celui qui ne sait pas d'où il vient ne peut savoir où il va car il ne sait pas où il est. En ce sens, le passé est la rampe de lancement vers l'avenir. »*

L'archiduc Otto d'Habsbourg-Lorraine (1912-2011)

#### 1. Origine et évolution du mot « Allergie »

Le mot “Allergie” (grec *allos*, autre, et *ergon*, action) a été introduit pour la première fois en 1906 par Clemens von Pirquet (1874-1929), un pédiatre autrichien suite aux travaux de Louis Pasteur, Paul Ehrlich, Elie Metchnikoff et d'autres qui ont décrit la fonction de défense purement protectrice ou “phylactique” du système immunitaire (Shulman 2016). L'idée développée par von Pirquet, bouleversante à l'époque, consiste à élargir les conséquences de la fonction de défense du système immunitaire pour inclure la notion de “nocivité” (hypersensibilité) en plus de la protection (immunité). Selon von Piquet, hypersensibilité et immunité sont deux conséquences opposées d'un même processus physiologique : la réponse immunitaire. Un changement de réactivité de l'organisme en contact avec un antigène exogène peut entraîner une réponse protectrice ou nocive (Igea 2013; Shulman 2016) .

L'hypothèse de von Piquet et de son étudiant Bela Schick basée essentiellement sur la description d'une complication systémique développée chez des enfants traités par des sérums antitoxines et connue depuis sous le nom de “maladie sérique” fut quelque peu négligée malgré les travaux à quelques années d'intervalle de Paul Potier, Charles Richet et Mauris Arthus sur

l'anaphylaxie (Igea 2013). Cependant, le mot a connu un certain succès dans les années 1950 non seulement dans le domaine médical mais aussi chez le grand public qui a commencé à l'utiliser pour exprimer toute apparence de réaction indésirable à n'importe quel produit ou circonstance.

Bientôt « Allergie » est apparue dans les journaux, les romans et les chansons pour exprimer l'antipathie, le rejet ou l'aversion. Ainsi John Freeman compare « Allergie » à une belle femme et attribue son succès à son charme plus qu'à sa valeur intrinsèque (Igea 2013). Le succès du mot « Allergie » est représenté par la création d'une nouvelle spécialité médicale : l'Allergologie et du journal « *the Journal of Allergy* ». Dans les décennies suivantes, l'utilisation et la définition du mot « Allergie » ont subi de nombreuses modifications et plusieurs tentatives de classification des maladies immunologiques ont été répertoriées dont la plus célèbre serait celle de Philip Gell et Robin Coombs.

## 2. L'allergie au 21<sup>ème</sup> siècle

*« Beaucoup renaîtront, qui ont aujourd'hui disparu, beaucoup tomberont, qui sont actuellement en honneur, si l'exige l'usage, ce maître absolu, légitime, régulier de la langue. »*

Horace (65 av. J.-C.- 8 av. J.-C.)

Au 21<sup>ème</sup> siècle, l'académie européenne d'allergie et d'immunologie clinique (EAACI *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*) a publié un rapport, adopté aussi par l'organisation mondiale de l'allergie WAO (*World Allergy Organization*), pour essayer d'établir une nomenclature dans le domaine de l'allergie. Ainsi l'hypersensibilité est définie comme une manifestation clinique provoquée par l'exposition à un *stimulus* à une dose normalement tolérée par la population générale (Johansson et al. 2001). Ces réactions d'hypersensibilité sont divisées en deux sous-catégories : l'hypersensibilité allergique, si un mécanisme immunologique est

impliqué ou l'hypersensibilité non-allergique par manque de démonstration de l'implication du système immunitaire. L'allergie est donc considérée comme une réaction d'hypersensibilité initiée par une réponse immunitaire non appropriée et à médiation humorale ou cellulaire (Pallardy and Bechara 2017).

Malgré le mésusage du mot « allergie » et son utilisation dans certains cas pour décrire des mécanismes exclusivement médiés par les IgE, Clemens von Pirquet aurait été fier de son « néo-mot ».

## II. Classification des réactions allergiques

Les réactions allergiques sont assez hétérogènes aux niveaux clinique et fonctionnel. Plusieurs classifications basées sur la cinétique d'apparition des symptômes ou les mécanismes impliqués ont été proposées. En ce qui concernent les réactions indésirables dues aux médicaments (*ADR adverse drug reactions*), les réactions d'hypersensibilité, qui peuvent être d'origine allergique ou non, sont pour la plupart imprévisibles et indépendantes du mécanisme pharmacologique du médicament (Type B), à la différence des réactions indésirables prévisibles, communes et liées à l'action pharmacologique (Type A). Les réactions de Type B constituent environ 15-20% des ADR et représentent un problème majeur de santé publique (**Tableau 1**) (Pichler and Hausmann 2016).

**Tableau 1 : Exemples de quelques réactions allergiques d'après (Pichler 2003; Naisbitt et al. 2014; Roujeau et al. 2014).**

*ABC : abacavir ; AGEP : pustulose exanthématique aiguë généralisée ; ATB : antibiotiques ; CBZ : carbamazépine ; DILI drug-induced liver injury ; DIN : drug-induced nephritis ; DRESS : drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms ; EAC : eczéma allergique de contact ; EMP : exanthème maculo-papuleux ; FLU : fluclorxacilline ; HSR : hypersensibilité ; NVP : nevirapine ; SJS : Stevens-Johnson syndrome ; SMX : sulfaméthoxazole ; TEN : toxic epidermal necrolysis ; ND : non déterminée.*

	<b>Délat d'apparition des symptômes</b>	<b>Epidémiologie</b>	<b>Cellules immunitaires les plus impliquées</b>	<b>Symptômes/ types de lésions/caractéristiques</b>	<b>Molécules associées</b>
<b>Anaphylaxie</b>	Quelques minutes à quelques heures	1,5-7,9/100000/an	Mastocytes, basophiles, neutrophiles	Bronchospasme, toux, urticaire, angioœdème, choc anaphylactique	Pénicillines, curares
<b>EMP</b>	4-12 jours	2-4% des patients hospitalisés	LT CD4+ (Th2)	Apparition de macules et papules +/- fièvre	Pénicillines, céphalosporines
<b>AGEP</b>	< 24h (ATB)- 30 jours	~ 10/million/an	LT CD4+ et CD8+ (IL-8 et infiltration des neutrophiles)	Erythèmes œdémateux + éruptions pustuleuses +/- éosinophilie. Mortalité ~ 5%	Pénicillines, terbinafine
<b>SJS/TEN</b>	4-28 jours	1.4-12.7/million/an	LT CD8+, cellules NK	Eruptions bulleuses + décollement de la peau (Fasl, granzyme B) + fièvre + atteinte hépatique. Mortalité ~ 30% pour le TEN	Allopurinol, lamotrigine SMX, CBZ, NVP
<b>DILI</b>	5-90 jours	10-20/million/an (cause allergique ou non)	LT CD4+ et CD8+	Atteinte hépatocellulaire ou cholestatique. Les LT spécifiques de la FLU expriment des chimiokines d'adressage pour le foie.	Allopurinol, SMX, amoxicilline, macrolides, FLU
<b>DIN</b>	2-3 semaines ou plus	ND	LT CD4+ (profils cytokiniques hétérogènes)	Les LT ne secrètent pas des molécules cytotoxiques mais plutôt jouent un rôle dans l'inflammation locale	Pénicillines, céphalosporines
<b>DRESS</b>	2-6 semaines	9/million/an 1/10000 (population à risque)	LT CD4+ et CD8+ (IL-5 et IFN- $\gamma$ )	Eruptions cutanées (pustuleuses)+ fièvre + éosinophilie + atteinte viscérale. Mortalité ~ 10%	CBZ, allopurinol, lamotrigine
<b>EAC</b>	3 jours	15-20%	LT CD4+ et CD8+ (Th1, Th2, Th17)	Erythème, œdème et de vésicules intraépidermiques	Métaux,
<b>ABC HSR</b>	3-14 jours	4.2% des patients traités	LT CD8+	Fièvre, malaise, éruption cutanée. Patients HLA-B*57:01	ABC

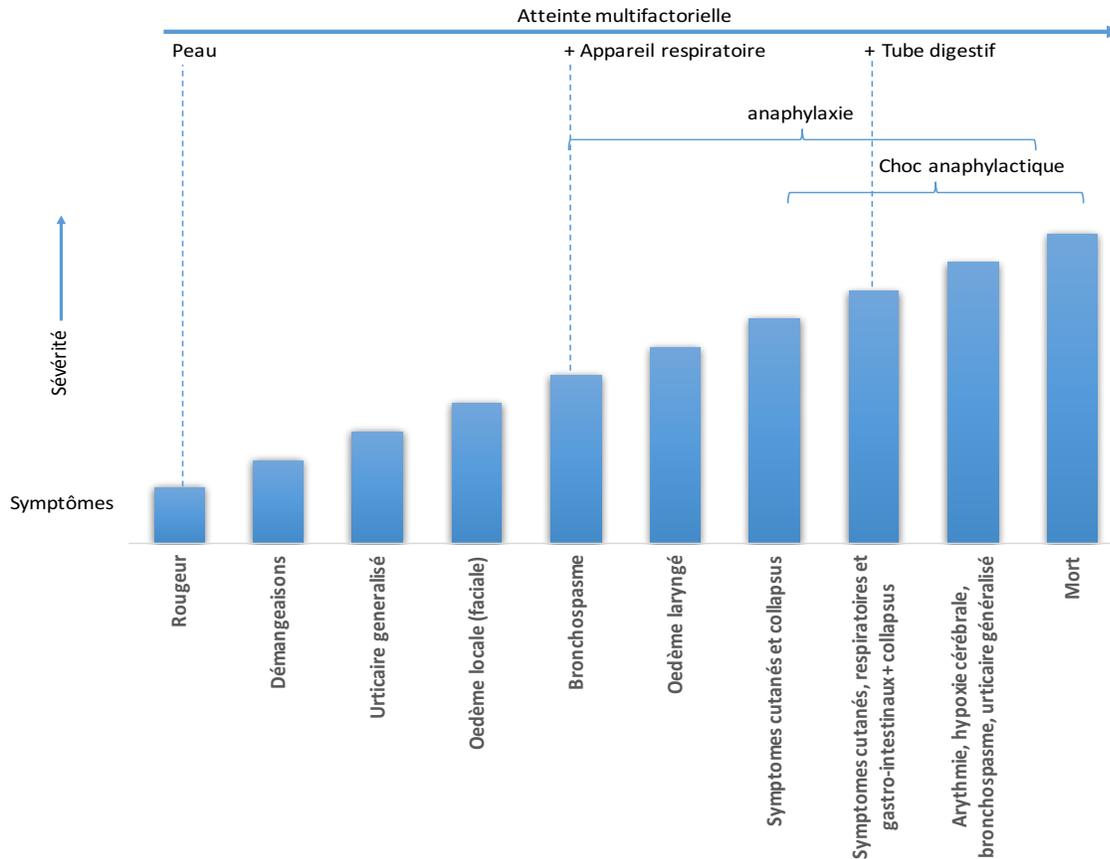
## 1. Clinique

D'un point de vue clinique, les réactions allergiques peuvent être classées en immédiates ou retardées en fonction du délai d'apparition des symptômes. Les manifestations peuvent être systémiques (anaphylaxie, **Figure 1**) et/ou associées à des organes spécifiques comme l'appareil respiratoire (rhinite, asthme, alvéolite), le foie [hépatite médicamenteuse à médiation immunologique [DALI (*drug-allergic liver injury*) : dénomination suggérée pour remplacer DILI (*drug-induced liver injury*) en cas d'implication du système immunitaire (Cerny and Bertoli 2007)] ou la peau [urticaire, exanthème, eczéma allergique de contact (EAC), l'érythème pigmenté fixe, réaction médicamenteuse avec éosinophilie et symptômes systémiques (DRESS : *drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms*), syndrome de Stevens-Johnson (SJS : *Stevens-Johnson syndrom*), nécrolyse épidermique toxique (TEN : *toxic epidermal necrolysis* ou syndrome de Leyll)] (White et al. 2015).

### 1.1. Les réactions allergiques immédiates

Elles surviennent dans l'heure suivant le contact avec la molécule allergisante ou après administration du médicament. Les symptômes typiques sont l'urticaire, l'angioœdème, le bronchospasme, la rhinite et les troubles gastro-intestinaux. Elles peuvent être sévères et aboutir au choc anaphylactique (**Figure 1**). Lors de ces réactions, c'est plutôt un mécanisme IgE-dépendent qui est identifié (Pichler et al. 2010). Néanmoins, dans certaines cas d'anaphylaxie, les IgE spécifiques du médicament ne sont pas détectées (Steenholdt et al. 2012). A titre d'exemple, seulement 25-54% des patients allergiques à la pénicilline (test cutané positif) présentent des IgE spécifiques. Ceci pourrait être dû à un manque de sensibilité des tests de diagnostic disponibles

(Stone et al. 2014) ou bien à une implication des IgG et de leurs récepteurs au niveau des basophiles ou des neutrophiles (Jönsson et al. 2011; Gillis et al. 2017).



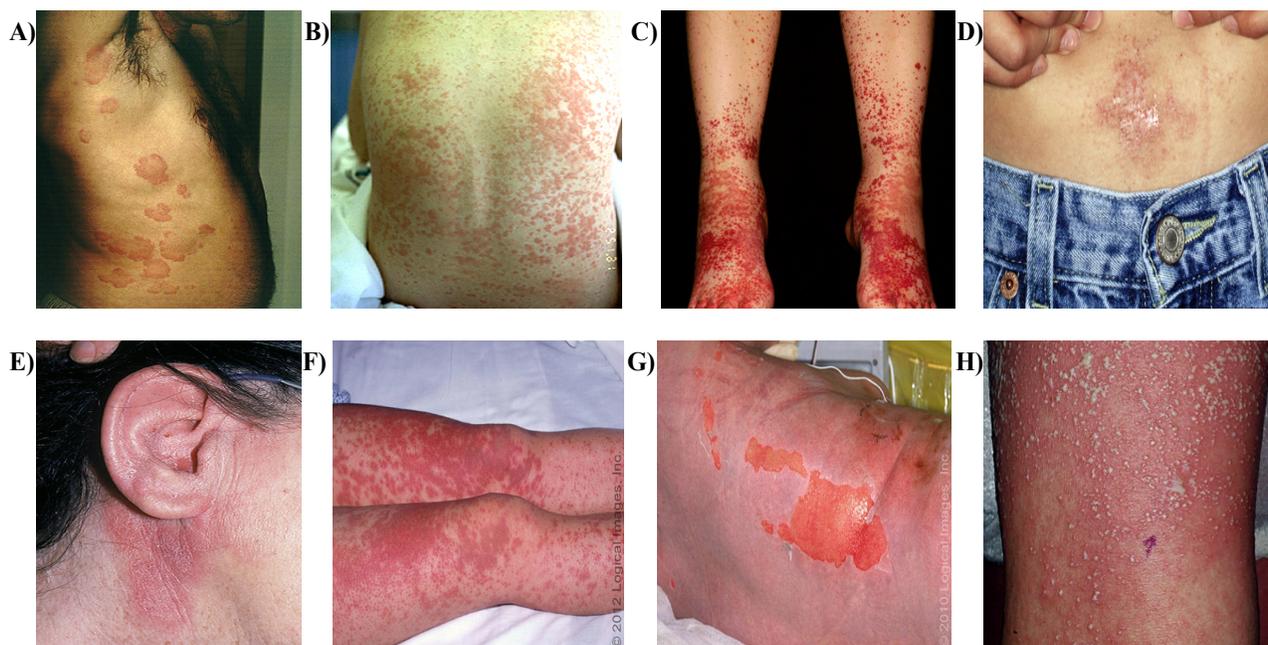
**Figure 1: Symptômes liés à l’anaphylaxie d’après (Pichler et al. 2010)**

*L’anaphylaxie est une réaction d’hypersensibilité sévère, systémique et potentiellement fatale pouvant atteindre plusieurs organes. Les symptômes peuvent inclure une atteinte cutanéomuqueuse et des voies aériennes. La forme la plus grave de l’anaphylaxie serait le choc anaphylactique caractérisé par une atteinte hémodynamique (vasodilatation entraînant une hypovolémie) et est responsable de 1 à 2% de mortalité.*

## 1.2. Les réactions allergiques retardées

Elles surviennent plus tardivement, le plus généralement à partir d’une heure suivant le contact avec la molécule allergisante et dont la symptomatologie la plus courante est une atteinte cutanée (**Figure 2**) particulièrement des exanthèmes maculo-papuleux. Par ailleurs, l’érythème pigmenté

fixe, la seule manifestation cutanée presque exclusivement iatrogène, est caractérisé par des lésions maculeuses, érythémateuses, parfois bulleuses ayant la particularité de se reproduire au même endroit lors d'une prise ultérieure du médicament (Amsler and Soria 2017).



**Figure 2: Différentes formes cliniques d'atteinte cutanée allergique (Pichler 2017)**

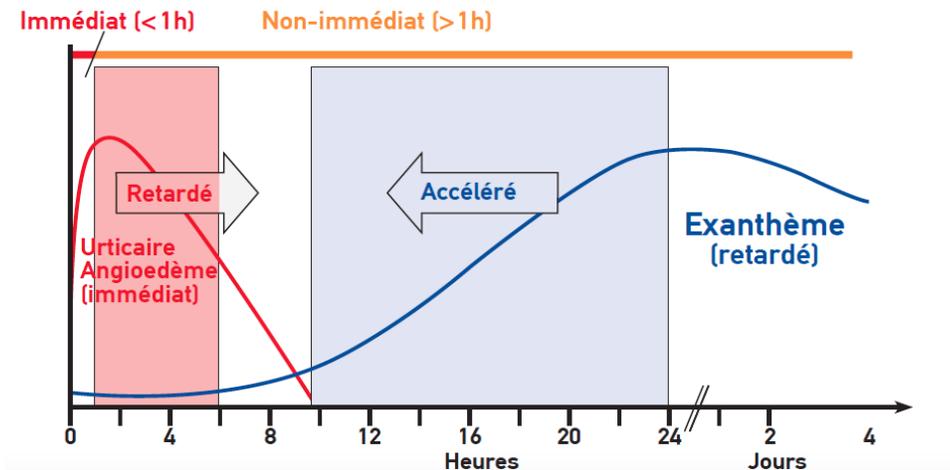
(A) Urticaire ; (B) Exanthème maculo-papuleux ; (C) Vascularite ; (D et E) Eczéma allergique de contact ; (F) DRESS : Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms ; (G) TEN : Toxic epidermal necrolysis ; (H) AGEP : Pustulose exanthématique aiguë généralisée.

D'autre part, les atteintes cutanées sévères (SCAR : *severe cutaneous adverse reactions*) telles que le DRESS, le SJS, le TEN et la pustulose exanthématique aiguë généralisée (AGEP) constituent les formes les plus redoutées. Le DRESS est caractérisé par un rash maculo-papuleux accompagné de signes systémiques tels qu'une fièvre, une éosinophilie, une poly-adénopathie et une augmentation des transaminases hépatiques (Balakirski and Merk 2017; Cho et al. 2017). Le SJS et le TEN impliquent le même processus physiopathologique aboutissant à une nécrose

épidermique mais se distinguent par l'étendue de la surface de l'atteinte cutanée. Elle est au-dessous de 10% dans le cas du SJS et supérieure à 30% dans le cas du TEN (Wheatley et al. 2015). L'AGEP est une éruption disséminée œdémateuse brutale et fébrile qui se couvre rapidement de pustules au niveau du tronc et des grands plis (Sidoroff 2012). Par ailleurs, l'application cutanée d'une molécule allergisante pourrait être aussi à l'origine d'une réaction inflammatoire cutanée retardée (EAC) (Kaplan et al. 2012). Lors de ces réactions, c'est plutôt un mécanisme lymphocyte T (LT)-dépendant qui est identifié (Pichler et al. 2010; Wheatley et al. 2015). A part les atteintes cutanées, d'autres pathologies médiées par les LT peuvent se manifester tardivement comme le DILI ou les atteintes rénales (DIN *drug-induced nephritis*).

### **1.3. Limites de cette classification**

La classification basée sur une période de latence de 1 heure pour différencier les réactions immédiates des réactions retardées est toujours utilisée pour sa facilité lors de la validation des méthodes de diagnostic (Bircher and Scherer Hofmeier 2012; Demoly et al. 2014). Néanmoins, selon le rapport du consensus international sur l'allergie médicamenteuse, cette approche ne reflète pas suffisamment la complexité de leur physiopathologie. A titre d'exemple, certains antibiotiques ou anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAID) déclenchent des réactions d'anaphylaxie dans les minutes après une administration parentérale ou après 1 à 2 heures suite à une prise par voie orale. C'est le cas aussi des inhibiteurs de pompes à protons qui entraînent des réactions d'anaphylaxie après plusieurs heures d'administration (Bircher and Scherer Hofmeier 2012). Ainsi la période de latence pour les réactions immédiates peut durer entre quelques minutes jusqu'à quelques heures (retardées) et dans les réactions retardées, elle peut durer de quelques heures (accélérées) jusqu'à 2 jours généralement (Bircher and Scherer Hofmeier 2012; Demoly et al. 2014) (**Figure 3**).



**Figure 3: Chronologie des réactions allergiques (Demoly et al. 2014)**

*La classification des réactions allergiques basée sur un temps de latence arbitraire fixé à 1 heure ne reflète pas toutes les réactions immédiates qui peuvent survenir jusqu'à 6 heures (retardées) ou les réactions retardées commençant après un délai de 8 à 12 heures (accélérées).*

## 2. Mécanismes des réactions allergiques

En 1968, Gell et Coombs ont proposé de classer les réactions d'hypersensibilité en quatre types (I, II, III et IV) selon le mécanisme d'action et les acteurs clés impliqués (**Figure 4**). Les trois premiers types sont médiés par des anticorps et le quatrième par des LT essentiellement. Ainsi, la classification de Gell et Coombs repose sur les mécanismes physiopathologiques sous-tendant les observations cliniques qui surviennent lors d'un contact ultérieur avec la molécule sensibilisante (Schnyder and Brockow 2015).

Ce système de classification a fait l'objet de modifications et le type IV a été divisé en 4 sous-types (IVa, IVb, IVc et IVd) pour une meilleure prise en compte de l'hétérogénéité des réponses des LT impliquées dans les différentes manifestations cliniques observées (Pichler 2003). Ainsi le type IV pourrait concerner les différentes manifestations cutanées retardées mais aussi des atteintes rénales (Spanou et al. 2006) ou hépatiques (Tailor et al. 2015) médiées par les LT. Cette

classification, considérée comme une simplification des événements complexes *in vivo* et limitée à la dichotomie Th (*T-helper*)1/Th2 (dans le type IV), sert toujours de référence (Demoly et al. 2014).

### **2.1. Réaction médiée par les IgE (Type I)**

Les réactions IgE-dépendantes classiques [ex :  $\beta$ -lactamines (BL), carboplatine] résultent de la production d'IgE par les plasmocytes à partir des lymphocytes B (LB) spécifiques de l'antigène suite à une première phase de sensibilisation et après une coopération LB/LT. Cette coopération aboutit à une polarisation Th2 et à la production d'interleukine (IL)-4 et d'IL-13. Lors d'un contact ultérieur avec la molécule sensibilisante, l'haptène, se fixe spécifiquement sur les IgE présents sur leur récepteur de forte affinité (Fc $\epsilon$ RI) au niveau des mastocytes et basophiles induisant leur agrégation et la libération de plusieurs médiateurs vasoactifs [histamine, tryptase, prostaglandines, leucotriènes, PAF (*platelet-activated factor*)...] (Pichler et al. 2010; Jönsson and Daéron 2012).

A la différence des réactions IgE-dépendantes qui surviennent classiquement après plusieurs contacts avec l'antigène, certaines réactions sont déclenchées dès la première dose administrée (ex cetuximab, curares) (Wheatley et al. 2015). En ce qui concerne le cetuximab, des IgE anti-galactose- $\alpha$ -1,3-galactose, un motif retrouvé au niveau de la partie Fab de cet anticorps monoclonal chimérique, sont présentes chez les patients avant le début de traitement (Chung et al. 2008) ce qui suggère une immunisation préalable par des piqûres de tiques ou la consommation de la viande rouge ayant permis une immunisation contre les motifs  $\alpha$ -gal (Wilson et al. 2017). De même, une sensibilisation croisée secondaire à une exposition à une substance possédant une fonction ammonium quaternaire (pholcodine, détergent) serait à l'origine des IgE spécifiques

identifiées chez des sujets ayant présenté un choc anaphylactique en l'absence d'exposition préalable à un curare (Baldo et al. 2009; Florvaag and Johansson 2009).

## **2.2. Réaction médiée par les IgG (Type II et III)**

Les réactions de type II et III sont basées sur la formation de complexes complément-IgG (IgG1, IgG3). Les IgM sont occasionnellement impliquées. Les deux types diffèrent par l'état de l'antigène (soluble ou pas) et par les conséquences physiopathologiques. Ainsi les réactions de type II dites cytotoxiques sont dues à la reconnaissance, par les anticorps circulants, de l'antigène lié à un composant cellulaire des érythrocytes, leucocytes ou plaquettes. Ceci entraîne une destruction cellulaire suite à l'activation du complément. Les maladies relevant de ce mécanisme sont essentiellement l'anémie hémolytique (pénicilline, céphalosporine) et les thrombocytopenies [sulfaméthoxazole (SMX), quinine, rituximab] (Pichler et al. 2010).

D'autre part, les réactions de type III sont dues à la formation de complexes immuns anticorps-antigène et qui sont en grand nombre pour être éliminés par les mécanismes habituels. Ainsi, ces complexes immuns se déposent au niveau de la paroi vasculaire ou au niveau du glomérule rénal. Ceci entraîne l'activation du complément et le recrutement d'autres cellules inflammatoires (neutrophiles). Les maladies relevant de ce mécanisme sont essentiellement les vascularites (**Figure 2**) (SMX, allopurinol, clozapine, sels d'or) et la maladie sérique (rituximab, infliximab) (Pichler et al. 2010).

## **2.3. Réaction médiée par les lymphocytes T (Type IV)**

Les LT jouent un rôle important dans les mécanismes immunologiques des réactions allergiques : comme des cellules responsables de la coopération avec les LB et inducteurs de leur

différentiation ou bien comme des cellules cytotoxiques responsables des réactions inflammatoires. La classification revisitée de Gell and Coombs prend en compte la fonction et le profil cytokinique des LT. Elle inclut l'activité cytotoxique des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (IVc) avec ou sans implication d'autres effecteurs : monocytes/macrophages (IVa), éosinophiles (IVb) ou neutrophiles (IVd) (Posadas and Pichler 2007; Pichler et al. 2010) (**Figure 4**).

Les réactions type IVa sont médiées par des Th1 et qui, *via* la production d'IFN- $\gamma$  (interféron-gamma) essentiellement, entraînent une activation des macrophages. Ceci pourrait aussi entraîner une activation des LT CD8<sup>+</sup> (combinaison des réactions type IVa et IVc ; EAC) ou bien une production d'anticorps (IgG1, IgG3) (Posadas and Pichler 2007; Pichler et al. 2010).

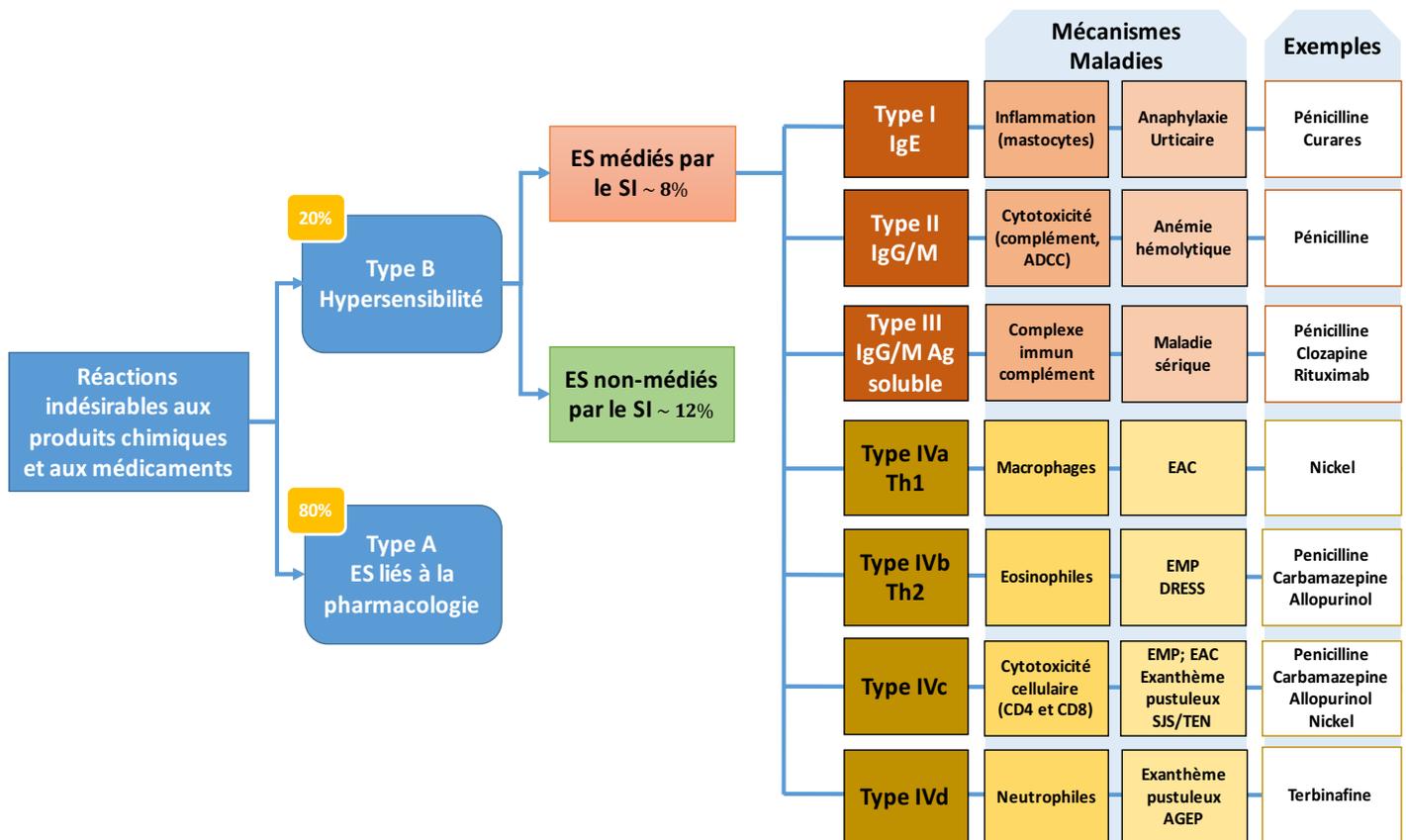
Les réactions type IVb sont médiées par des Th2 et qui, *via* la production d'IL-4, d'IL-13 et d'IL-5, vont permettre la maturation des LB, la production d'IgE et d'IgG4 accompagnée de l'activation des mastocytes et des éosinophiles [exanthèmes maculo-papuleux (pénicilline), DRESS (carbamazépine, allopurinol)] (Posadas and Pichler 2007; Pichler et al. 2010).

Les réactions type IVc sont médiées par les LT effecteurs qui migrent vers les tissus (ex hépatocytes, kératinocytes...) et entraînent une destruction tissulaire *via* un mécanisme dépendant de la perforine, des granzymes et de l'interaction Fas-FasL (Fas-ligand). Les maladies relevant de ce mécanisme sont essentiellement l'EAC (nickel), le SJS/TEN (carbamazépine, allopurinol, nervirapine), le DILI (flucloxacilline) et les exanthèmes maculo-papuleux et bulleux (pénicilline) (Posadas and Pichler 2007; Pichler et al. 2010; Tailor et al. 2015).

Les réactions type IVd sont médiées par la coopération LT et neutrophiles à travers la production de CXCL-8 et de GM-CSF par les LT. CXCL-8 entraîne le recrutement des neutrophiles vers le site inflammatoire alors que le GM-CSF empêche leur apoptose. La maladie

relevant de ce mécanisme est essentiellement l'AGEP (terbinafine, amoxicilline) (Pichler et al. 2010; Eyler et al. 2012).

D'autre part, une même molécule médicamenteuse ou chimique peut induire une symptomatologie différente chez les individus. A titre d'exemple, les pénicillines peuvent être responsables de réactions anaphylactiques, d'anémie hémolytique, de maladie sérique ou d'exanthèmes (Descotes and Choquet-Kastylevsky 2001). De même l'allergie au latex peut être aussi bien immédiate (choc anaphylactique) ou retardée (EAC) (Ibler et al. 2016).



**Figure 4: Classification générale des réactions indésirables aux produits chimiques d'après (Pichler and Hausmann 2016; Böhm and Cascorbi 2016)**

*ADCC* : antibody-dependent cellular cytotoxicity ; *AGEP* : pustulose exanthémateuse aiguë généralisée ; *DRESS* : réaction médicamenteuse avec éosinophilie et symptômes systémiques ; *EAC* : eczéma allergique de contact ; *EMP* : exanthème maculo-papuleux ; *ES* : effets secondaires ; *pi-concept* : pharmacological interaction with immune receptors ; *SI* : système immunitaire ; *SJS* : syndrome de Stevens-Johnson, *TEN* : nécrolyse épidermique toxique.

### III. Epidémiologie des réactions allergiques

Les allergies aux produits chimiques et aux médicaments constituent un problème majeur de santé publique vu le nombre de patients atteints et la gravité à laquelle peut aboutir certaines réactions allergiques (Tanno et al. 2016). Elles peuvent être responsables d'affections graves qui peuvent engager le pronostic vital et contraignent à contre-indiquer à vie la molécule responsable, et parfois même toute une famille thérapeutique. En effet, les réactions d'hypersensibilité médicamenteuse représentent 15-20% des effets indésirables aux médicaments et touchent en moyenne plus de 7% de la population générale (Gomes and Demoly 2005). Chez les patients hospitalisés, la fréquence de ces réactions est estimée entre 1.8 et 4.2 réactions/1000 hospitalisations (Thong and Tan 2011), ce qui représenterait en France environ 25000 cas/an (calcul basé sur les 12.5 millions d'hospitalisation en France en 2015 selon des données du programme de médicalisation des systèmes d'information PMSI). Les molécules médicamenteuses impliquées sont surtout les antibiotiques et les curares (Doña et al. 2012). Ainsi, les réactions allergiques aux BL concernent surtout la pénicilline G (BP) et l'amoxicilline (AX). Bien qu'environ 10% de la population générale soit suspectée d'avoir une allergie à la pénicilline, cette dernière n'est confirmée que chez 1 à 2% des patients (Joint Task Force on Practice Parameters et al. 2010). Les réactions cutanées sont les manifestations cliniques les plus fréquentes, et les réactions anaphylactiques peuvent se produire dans 0,2% des cas avec une mortalité de 0.02%, ce qui fait des BL la première cause des chocs d'origine médicamenteuse en France (Chaabane et al. 2009). Par ailleurs, les sulfamides sont plutôt responsables d'allergies retardées qui surviennent chez environ 3 à 8% des patients mais peuvent atteindre les 50% chez des patients atteints par le VIH (Castrejon et al. 2010). D'autres part, les réactions allergiques aux curares myorelaxants

représentent la principale cause des réactions anaphylactiques peropératoires [58% des cas environ (Mertes et al. 2011a)] et touchent environ 350 à 400 patients par an en France, sachant qu'elles sont probablement sous-déclarées (Mertes et al. 2011b). Le suxaméthonium est la molécule la plus fréquemment impliquée (Chiriac and Demoly 2016).

La peau représente l'organe le plus touché par les ADR. Les éruptions cutanées sont observées dans 0.1-1% des patients traités par des médicaments lors des essais cliniques. D'autre part, ces réactions sont aussi détectées chez les patients traités par des pénicillines (5-7%), des sulfamides (3-4%) et des antiépileptiques (5-10%). Dans 2% des cas, l'atteinte est grave (Roujeau 2005). En effet, l'incidence du DRESS est estimée à 1 cas /10000 (Cho et al. 2017) et celle de SJS/TEN à 1.4-12.7 cas/ par million de personnes (Frey et al. 2017). Le taux de mortalité est environ de 30% et dans 50 à 90% des cas, les patients présentent des séquelles à vie (Wheatley et al. 2015).

D'autre part, l'EAC touche 15 à 20% de la population générale avec un taux annuel d'incidence de 0.5 à 1.9% en Europe. Au moins 15% des patients voient leur activité professionnelle affectée (Diepgen et al. 2013, Diepgen et al. 2016). Les molécules sensibilisantes peuvent être inorganiques (nickel, cobalt) ou organique [DNCB (dinitrochlorobenzène), PPD (para-phénylènediamine), MIT(méthylisothiazolinone)] (Kaplan et al. 2012; Diepgen et al. 2016). En Europe, selon l'ESSCA (service de surveillance Européen pour la dermatite de contact), la prévalence de l'EAC causée par les métaux est de 18.1% pour le nickel, 5.9% pour le cobalt et 3% pour le chrome (Uter et al. 2017).

En 1994, des normes européennes ont été mises en place (directive 94/27/CE) pour réglementer la teneur en nickel libérée (exposition limite de 0,5 µg/cm<sup>2</sup> de peau et par semaine) par les objets de grande consommation destinés à être en contact prolongé avec la peau (Garg et al. 2013). Malgré les efforts règlementaires européens pour limiter la libération des métaux comme le nickel

des bijoux et des accessoires vestimentaires et le chromate des produits à base de cuir, les métaux restent la principale cause de l'EAC (Gilissen and Goossens 2016). Contrairement aux médicaments topiques tels que certains antibiotiques, antiseptiques et corticoïdes, l'EAC dû aux cosmétiques, parfums et conservateurs continue aussi à augmenter avec le temps (Gilissen and Goossens 2016; Schwensen et al. 2016).

#### **IV. Diagnostic des réactions allergiques**

Le diagnostic des réactions allergiques est nécessaire pour identifier la molécule impliquée et pour mieux comprendre la physiopathologie de ces réactions afin de mettre en place des mesures préventives (Chiriac and Demoly 2014, Mayorga et al. 2016). Le diagnostic inclut une évaluation de l'historique clinique qui pourrait être dans certains cas non concluante (ex : patients polymédicamentés). De même, des algorithmes de prédictions du risque allergique (cas des BL) basés sur l'historique clinique des patients ne semblent pas bien identifier les patients allergiques. Néanmoins, certains facteurs de risque prédisposant pourraient être identifiés tels que l'anaphylaxie (Chiriac et al. 2017). Par ailleurs, des tests *in vivo* et *in vitro* sont aussi disponibles pour poser le diagnostic (**Figure 5**) (Montañez et al. 2017). Idéalement, un bilan d'allergologie doit être dressé 4 à 6 semaines après la résolution complète des symptômes (Demoly et al. 2014).

## 1. Tests *in vivo*

Lors des réactions immédiates type urticaire ou anaphylaxie, les pricks tests sont recommandés du fait de leur simplicité. Les tests intradermiques (IDR) sont aussi utilisés lorsque les pricks tests sont négatifs (Demoly et al. 2014). Ces tests cutanés doivent être réalisés le plus tôt possible (en respectant le délai de 4-6 semaines) pour éviter la diminution de leur sensibilité avec le temps. Le taux de négativité dépend des médicaments. Il est de 60% pour la dipyrone après 6 mois ou d'environ 47% pour les curares après 4 ans (Montañez et al. 2017). Dans le cas des réactions retardées, c'est plutôt un patch-test ou des test cutanés à lecture retardée qui seraient utilisés (Balakirski and Merk 2017). La sensibilité des patch tests est d'environ 64% pour le DRESS, 58% pour l'AGEP et 24% pour le SJS/TEN (Chiriac and Demoly 2014). Pour la plupart des cas, un test cutané négatif n'exclut pas une allergie causée par la molécule testée (Montañez et al. 2017). Pour cela, un test de provocation, ayant une meilleure sensibilité, peut être réalisé mais seulement quand les autres tests (*in vivo et vitro*) sont négatifs (Chiriac and Demoly 2014). Il est long à réaliser, nécessite une haute surveillance et est contre-indiqué dans les toxidermies cutanées (Mayorga et al. 2016; Huynh et al. 2016).

## 2. Tests *in vitro*

Les tests *in vitro* sont complémentaires et de ceux *in vivo* et permettent d'évaluer les médiateurs et cellules impliqués dans la phase aiguë de la maladie ou d'identifier les molécules impliquées après la résolution de la maladie (Mayorga et al. 2016). Il est important de noter qu'un résultat négatif ne permet pas d'exclure l'imputabilité du médicament incriminé et qu'un résultat positif suggère une certaine sensibilité au médicament mais ne confirme pas une relation causale entre la molécule et l'allergie (Chiriac and Demoly 2014).

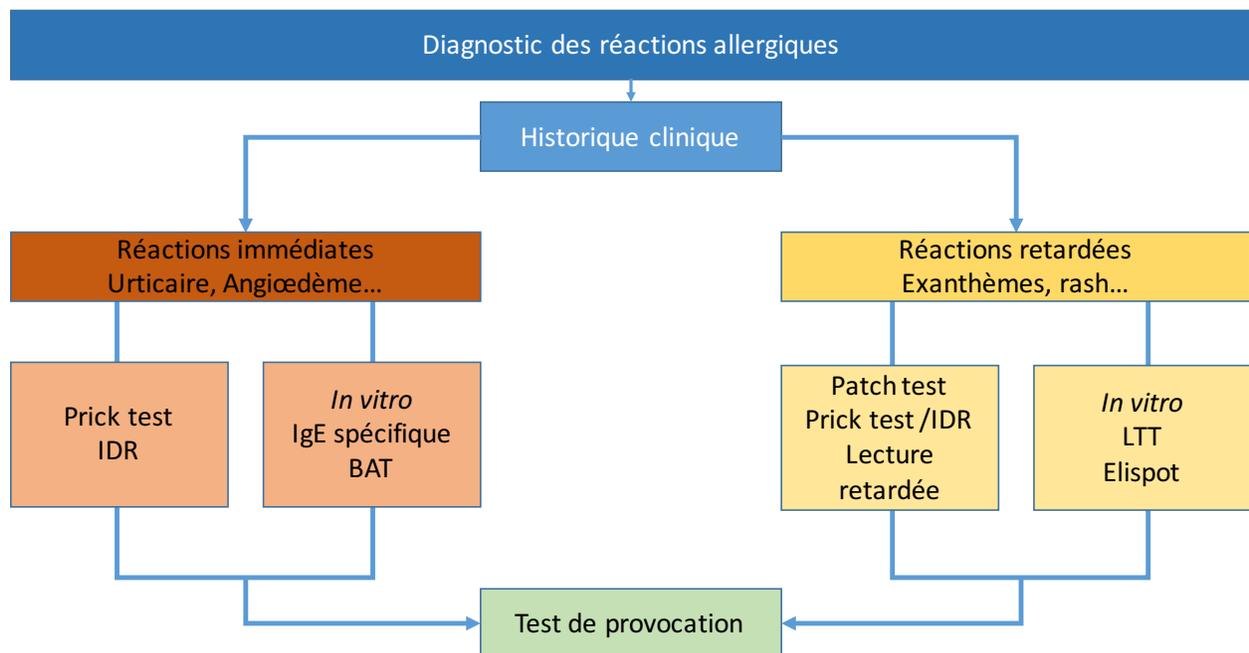
## 2.1. Caractérisation de la phase aiguë de la maladie

Plusieurs médiateurs solubles tels que la tryptase, l'histamine, les prostaglandines, les leucotriènes et les cytokines pro-inflammatoires peuvent être dosés dans le sérum, le plasma ou les urines afin de caractériser la phase aiguë de la maladie. Le dosage de la tryptase et de l'histamine est surtout utilisé lors des réactions immédiates. Il doit être réalisé dans les 60 à 90 min après la réaction (Torres et al. 2017). Dans les autres cas, une analyse de l'infiltrat cellulaire à partir d'une biopsie cutanée par exemple serait favorisée. En effet, dans les exanthèmes maculopapuleux, les LT CD4+ prédominent. Dans l'érythème pigmenté fixe, les LT CD8+ prédominent. Dans l'AGEP, ce sont les neutrophiles qui prédominent. Dans le DRESS, une infiltration par des LT CD4+ et LT CD8+ qui sécrètent de l'IL-5 serait détectée et dans le SJS/TEN ça serait plutôt une infiltration par des LT CD8+ accompagnée d'une nécrose des kératinocytes (Mayorga et al. 2016).

## 2.2. Identification de la molécule allergisante

Le dosage des IgE est assez spécifique mais manque de sensibilité et n'est pas disponible pour la plupart des médicaments. A titre d'exemple, sa sensibilité est faible pour les BL (0-50%), variable pour les curares (44-92%) et élevée pour le cetuximab (68-92%) (Torres et al. 2017). En plus, ce test perd de sensibilité avec le temps et malgré le fait qu'il présente une valeur prédictive positive élevée, un résultat négatif ne permet pas d'exclure une réaction allergique (Joint Task Force on Practice Parameters et al. 2010). Des tests cellulaires sont aussi utilisés et requièrent une stimulation *in vitro* par les molécules soupçonnées être à l'origine des réactions allergiques tels que les tests d'activation (CD69, Elispot *enzyme-linked immunospot assay*) et de prolifération lymphocytaire (LTT *lymphocyte transformation test*, CFSE) ou les tests d'activation des

basophiles (dégranulation et expression de CD63/CD203c et/ou libération d'histamine) (Romano et al. 2011; Mayorga et al. 2016; Decuyper et al. 2017). Dans le cas des BL, la sensibilité du LTT (25-79%) est variable (Moreno et al. 2017) et dépend du type de la réaction allergique, élevée dans le cas des exanthèmes maculo-papuleux ou le DRESS mais faible dans le SJS/TEN. Elle a une spécificité de 85-93%. Le test d'activation des basophiles présente une sensibilité d'environ 22-55% avec une spécificité de 79-96% (Torres et al. 2017).



**Figure 5: Aperçu des tests *in vitro* et *in vivo* permettant de poser le diagnostic des réactions allergiques d'après (Mayorga et al. 2016)**

*BAT* : basophil activation test ; *IDR* : tests intradermiques, *LTT* : test de transformation lymphocytaire, *Elispot* : enzyme-linked immunospot assay.

### 3. Recommandations internationales

Malgré l'existence d'un consensus général sur l'importance des tests cutanés dans l'évaluation des allergies, la concordance entre les directives Européennes et Américaines existe uniquement en ce qui concerne leur utilisation pour le diagnostic des réactions immédiates (Torres et al. 2017). Ainsi, les tests cutanés constituent la première approche pour le diagnostic des réactions immédiates aux BL. Mais en cas de réactions retardées, l'approche aux États-Unis consiste essentiellement à analyser rigoureusement les signes et symptômes cliniques du patient. Par ailleurs, bien que les tests *in vitro* peuvent être utiles en particulier en cas de réactions sévères ou contre-indication aux tests cutanés, ils sont presque exclusivement utilisés en Europe. A noter, que les deux directives sont concordantes sur l'utilité du test de provocation, en cas d'absence de contre-indication, pour exclure un risque de réactions allergiques aux médicaments utilisés (Torres et al. 2017).



## **Chapitre 2**

# **Molécules étudiées : les métaux (nickel et cobalt) et les antibiotiques de la famille des $\beta$ -lactamines**

### **I. Les métaux**

Les métaux sont parmi les molécules allergisantes les plus connues pour induire l'EAC et constituent la première cause de maladie professionnelle liée à la peau (Diepgen et al. 2016). Dans cette partie, nous allons présenter d'une manière générale ces molécules.

#### **1. Historique**

L'allergie induite par un métal a été décrite pour la première fois en 1930 par le dermatologue Stephan Rothman suite à la consultation d'un patient de 42 ans admis pour un rash cutané. Ce dernier était un employé d'une compagnie ferroviaire et chargé de compter des pièces de monnaies. Soupçonnant un lien entre le rash et les pièces de monnaies, Rothman appliqua une pièce de monnaie, contenant du nickel, sur le dos du patient ce qui a engendré une rougeur locale. Après confirmation qu'une solution diluée du sel de métal pourrait susciter la même réponse inflammatoire, Rothman déduit que l'ion métallique lui-même était responsable de cette réaction. De plus, Rothman extrapole et explique que ce sont les ions métalliques solubilisés par la sueur ou autres fluides corporels qui servent de molécules allergisantes. Rothman conclut son étude en mentionnant que le seul traitement efficace de son patient était de changer de travail (Schmidt and Goebeler 2011).

L'historique de l'allergie au chrome remonte en 1908 suite à une description détaillée d'une dermatite induite par le ciment « la gale du ciment » (sans identification du chrome) chez presque

la moitié des employés d'une compagnie ferroviaire parisienne mais il a fallu attendre Jaeger et Pelloni en 1958 pour faire le lien entre cette maladie et le chrome suite à l'introduction des patchs tests à la base de dichromate de potassium (Bregnbak et al. 2015).

## **2. Utilisation et modes d'exposition**

Le nickel est un élément métallique naturellement présent au niveau de la croûte terrestre (3%) et constitue son 24<sup>ème</sup> élément le plus abondant (Rehman et al. 2017). Il est fréquemment associé au cobalt dans les dépôts miniers (Jiménez-Lamana and Szpunar 2017; Rehman et al. 2017). Vu ses propriétés physico-chimiques, le nickel est particulièrement apprécié en industrie. Il est utilisé dans les batteries et en alliages pour la confection de monnaie (Hamann et al. 2013), des bijoux, des ustensiles en acier inoxydable et des implants dentaires et corporels (Dwivedi et al. 2015; Park et al. 2017). En plus de son utilisation dans les industries électriques, le cobalt est également utilisé dans les peintures sur verre et dans l'industrie pharmaceutique pour la production de la vitamine B12 (Leyssens et al. 2017). Quant au chrome, il est surtout utilisé dans le ciment et le tannage du cuivre (Bregnbak et al. 2015). Deux sources d'exposition aux métaux sont distinguées: anthropique liée à l'activité humaine (activité industrielle) et naturelle liée à l'émission des métaux dans l'environnement lors des éruptions volcaniques ou des incendies de forêts. Ainsi, la population générale est principalement exposée par inhalation de l'air ambiant, ingestion d'aliments et d'eau potable contenant des composés métalliques ou par contact cutané (Rehman et al. 2017; Leyssens et al. 2017).

### 3. Devenir dans l'organisme

L'accumulation des métaux dans l'organisme dépend du mode d'exposition, du niveau d'absorption (ex : état de la barrière cutanée), de la distribution tissulaire et de l'excrétion. Le temps de demi-vie du nickel varie entre 17-39 heures dans le plasma et 20-34h dans l'urine après une prise par voie orale (Saito et al. 2016). Plusieurs études *in vitro* ont évalué la pénétration cutanée des métaux (Franken et al. 2015). D'une manière générale, l'ordre de perméabilité cutanée des métaux (à l'exception des nanoparticules) dans les conditions physiologiques est résumé de cette façon : Cuivre >plomb >chrome (chromium hexavalent) >nickel ( $\text{NiCl}_2$ > $\text{NiSO}_4$ ) >cobalt >platine >mercure (Franken et al. 2015). En effet, la constante de diffusion du nickel est d'environ  $10^{-7}$ - $10^{-4}$  cm/h. Pour cela, le nickel s'accumule le plus souvent au niveau de la couche cornée et seulement une petite fraction est capable d'atteindre les couches profondes de l'épiderme où il se trouve en majorité lié aux protéines cutanées (Fullerton and Hoelgaard 1988).

### 4. Toxicité

Bien que certains métaux semblent jouer un rôle physiologique au niveau de l'organisme tel que le cobalt qui est un co-facteur de la cyanocobalamine (vitamine B12) (Leysens et al. 2017), l'exposition à des concentrations plus élevées entraîne une toxicité liée à la voie d'exposition. Ainsi, les métaux sont absorbés chez l'homme par inhalation ou ingestion (Rehman et al. 2017). Une étude sur des patients exposés au nickel a montré son accumulation essentiellement dans les poumons (Rezuke et al. 1987). La toxicité aiguë survient surtout avec un composé du nickel : le tétracarbonylnickel. La symptomatologie immédiate se manifeste par des maux de tête, des nausées et des vomissements suivis d'une phase retardée essentiellement pulmonaire ressemblant à une pneumonie virale.

L'asthme lié au nickel est une pathologie rare retrouvée au milieu professionnel et dont la physiopathologie reste floue. Les symptômes apparaissent le plus souvent moins d'un an après le début de l'exposition. Quand il existe une atteinte cutanée associée, celle-ci semble précéder l'asthme de quelques jours (Spinelli et al. 2005).

Outre l'EAC locale en cas d'exposition cutanée ou l'inflammation diffuse dans certains cas d'implants orthopédiques (Cousen and Gawkrödger 2012), l'exposition chronique au nickel ou au cobalt peut entraîner une fibrose pulmonaire. Par ailleurs, le sulfate de cobalt et les autres sels de cobalt solubles sont classés par le CIRC (centre international de recherche sur le cancer) dans le groupe 2B : substances qui pourraient être cancérigènes pour l'homme alors que les composés du nickel sont classés dans le groupe 1 (cancérigènes pour l'homme) (Rehman et al. 2017).

## **II. Antibiotiques de la famille des $\beta$ -lactamines**

Les antibiotiques forment environ 4% du marché pharmaceutique global (Chiriak et al. 2017). Ceux de la famille BL sont les plus utilisés. En Europe et aux Etats-Unis, la famille BL constitue environ 60% des prescriptions d'antibiotiques (Bush and Bradford 2016; Deshayes et al. 2017). Elles sont les plus fréquemment responsables des réactions allergiques. Dans cette partie, nous allons présenter d'une manière générale ces molécules et en particulier les pénicillines.

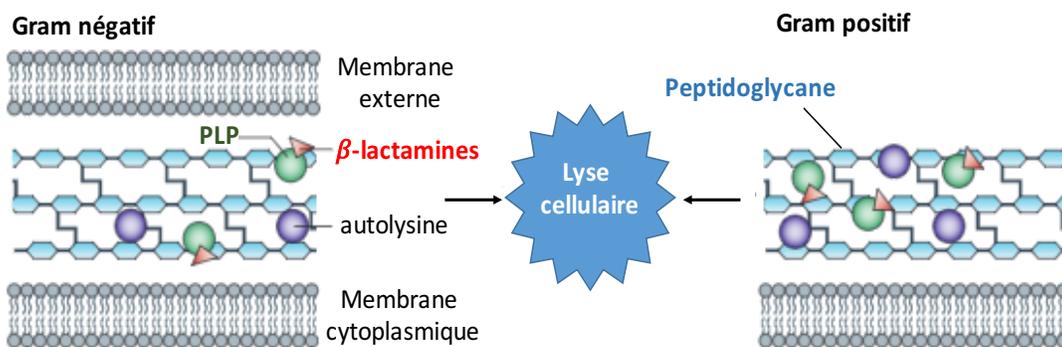
### **1. Historique**

En 1928, Alexander Fleming, un bactériologiste britannique, s'intéressa au lien entre la morphologie des colonies de staphylocoques et leur virulence. De son retour de vacances, il remarqua que plusieurs de ses boîtes de culture, oubliées à la pailasse, étaient contaminées par un champignon autour duquel les colonies de staphylocoques ne poussaient pas. Ainsi, il isola un

extrait du champignon (le *Penicillium notatum*) et identifia la pénicilline. Alors que la découverte de la pénicilline a été faite en 1928, il a fallu attendre les années 1940 pour pouvoir l'utiliser en thérapeutique suite aux multiples essais infructueux pour l'isoler en quantité suffisante. Au cours des quarante années suivantes, un très grand nombre de molécules de la famille des BL, naturelles, synthétiques ou semi-synthétiques ont été utilisées en thérapeutique (Kong et al. 2010).

## 2. Mécanisme d'action des antibiotiques de la famille des $\beta$ -lactamines

Les BL inhibent la croissance des bactéries sensibles en inactivant des enzymes clés, nommées PLP (protéines de liaisons des pénicillines) ou transpeptidases, impliquées dans la synthèse du peptidoglycane (PGN), un constituant essentiel de la paroi bactérienne (**Figure 6**). En effet, le PGN permet la résistance bactérienne à la pression osmotique intracellulaire. Par analogie de structure avec le dipeptide D-alanyl-D-alanine, substrat naturel des PLP, les BL se fixent de manière covalente à ces derniers notamment sur un résidu serine. L'inhibition de l'enzyme empêche la synthèse du PGN et augmente la production d'autolysine entraînant la lyse bactérienne (Kohanski et al. 2010).

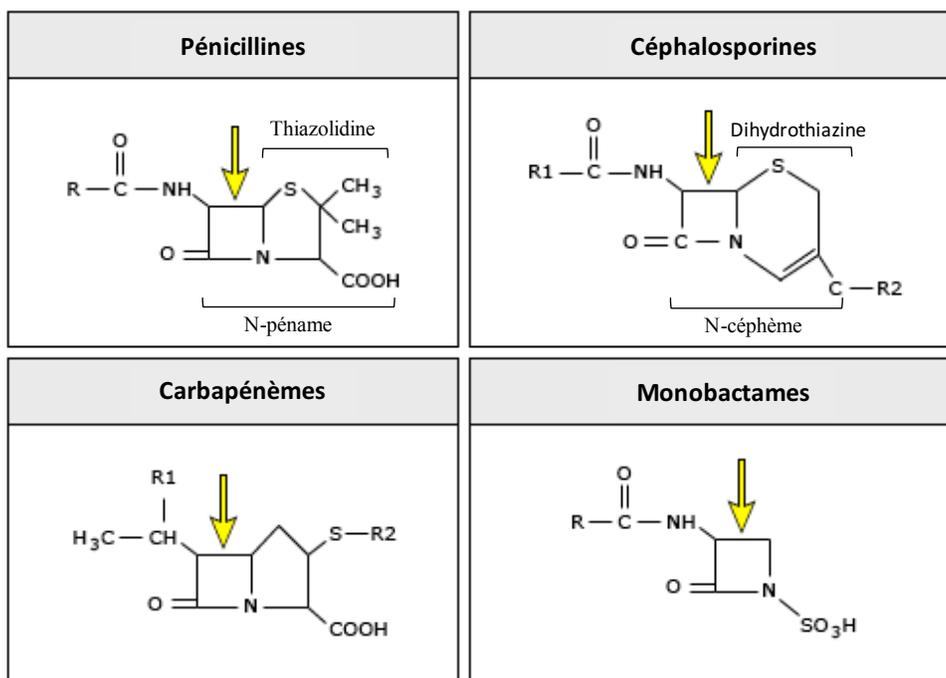


**Figure 6: Mécanisme d'action des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines d'après (Kohanski et al. 2010)**

*Les BL doivent rejoindre l'espace périplasmique pour inhiber la synthèse du peptidoglycane en inhibant les PLP. Bien que ce passage soit direct en cas de bactéries à Gram positif, il nécessite la présence de porines au niveau de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. PLP : protéines de liaisons des pénicillines.*

### 3. Classification et structure chimique

Les BL sont divisés en 4 classes sur la base de leur structure chimique : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames. Elles ont en commun le noyau  $\beta$ -lactame : fonction amide incluse dans un cycle carbone tétragonal essentiel pour l'activité biologique. Elles diffèrent par la nature du cycle associé au noyau  $\beta$ -lactame, à l'exception des monobactames où le noyau est isolé (**Figure 7**). Il s'agit d'une thiazolidine pour les pénicillines (bicycle pénème), d'une dihydrothiazine pour les céphalosporines (bicycle céphème). Quant aux carbapénèmes, elles se distinguent par le remplacement de l'atome de soufre du cycle thiazolidine par un atome de carbone. Par ailleurs, les chaînes latérales (R, R1, R2) permettent de distinguer les différentes molécules à l'intérieur de la même classe mais peuvent être similaires entre les différentes classes d'antibiotiques (Amsler and Soria 2017).



**Figure 7: Structure chimique des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines d'après (Blumenthal and Solensky 2017)**

*Le point commun aux BL est la présence d'un motif  $\beta$ -lactame (flèche jaune). A l'exception des monobactames, ce noyau est associé à un autre cycle propre à chaque classe d'antibiotiques.*

### **3.1. Les pénicillines**

Il existe deux grandes familles des pénicillines : naturelles et hémisynthétiques. Les pénicillines de chaque famille sont divisées en plusieurs groupes selon leur spectre d'action et la chaîne latérale liée au noyau  $\beta$ -lactame (Bush and Bradford 2016) (**Figure 8**).

#### **3.1.1. Les pénicillines naturelles**

Cette famille est constituée par deux pénicillines naturelles : la BP ou benzylpénicilline et la pénicilline V ou phénoxy méthylpénicilline. Les deux molécules ont en commun un spectre d'activité étroit surtout contre les bactéries cocci Gram positif et négatif aérobies (Streptocoque, Listeria, Neisseria). Outre leur distinction par leur chaîne latérale (benzyle pour la BP et phénoxy méthyle pour la pénicilline V), les deux molécules se différencient par leur voie d'administration. En effet, la BP est sensible à l'acidité gastrique et est donc administrée par voie parentérale alors que la pénicilline V est administrée par voie orale (Bush and Bradford 2016).

#### **3.1.2. Les pénicillines hémisynthétiques**

Vu les spectres étroits des pénicillines naturelles et leur sensibilité aux pénicillinases, des pénicillines hémisynthétiques ont été développées. Les pénicillines M (mécicilline, oxacilline et cloxacilline) sont des pénicillines résistantes aux pénicillinases, grâce à un encombrement important de leur chaîne latérale (noyau isoxazoline) empêchant l'ouverture du noyau  $\beta$ -lactame par les pénicillinases. De ce fait, elles sont surtout utilisées en cas d'infection à staphylocoques. Ensuite, ce sont les pénicillines A ou aminopénicillines dont le spectre s'étend aux bactéries à Gram négatif qui ont été développées. Deux aminopénicillines sont actuellement commercialisées : l'ampicilline et l'AX. Elles sont caractérisées par l'ajout d'un groupement

amine sur la fonction carboxamide de la BP, ce qui renforce sa stabilité en milieu acide. Alors que l'introduction d'un groupement hydroxyle pour l'amoxicilline (vs ampicilline) (**Figure 8**) améliore ses paramètres pharmacocinétiques. La dernière génération des pénicillines est formée par les carboxypénicillines (ticarcilline) et les uréidopénicillines (pipéracilline) présentant un spectre d'action élargi sur *Pseudomonas aeruginosa* (Bush and Bradford 2016).

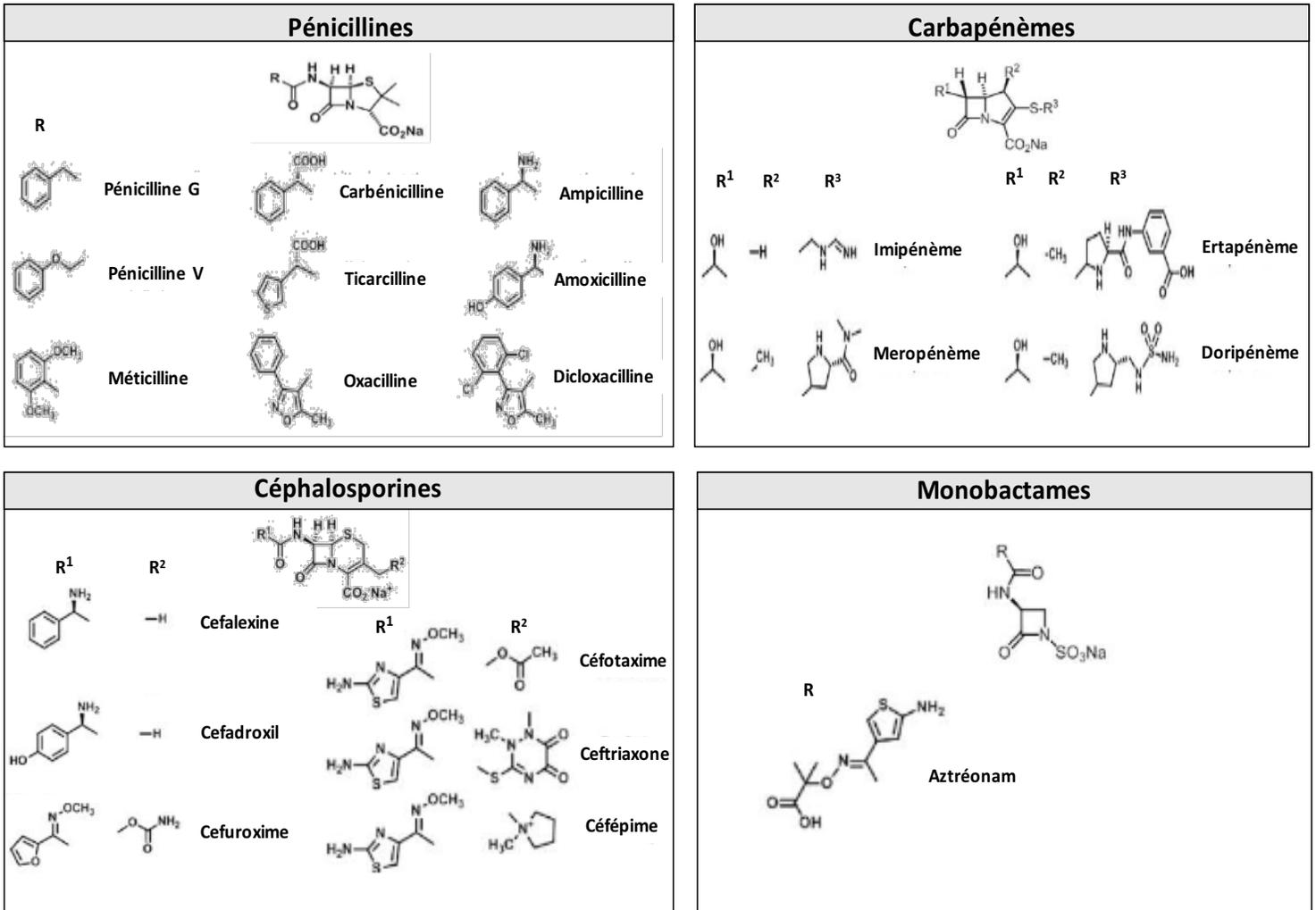
### 3.1.3. Propriétés pharmacocinétiques

La biodisponibilité des pénicillines par voie orale est variable et influencée par le repas. Elle est d'environ 50% pour les pénicillines M et V et nettement augmentée avec l'AX (70%). Cependant la BP, les carboxypénicillines et les uréidopénicillines ne sont pas administrées par voie orale. Par ailleurs, l'AX présente la meilleure distribution tissulaire. La fixation aux protéines plasmatiques est faible avec l'AX (18%), modérée avec la BP (55%) et élevée avec les pénicillines M. Les pénicillines sont peu métabolisées et sont éliminées par voie rénale sous forme inchangée. A titre d'exemple, juste environ 10 à 25% de l'AX seraient éliminés sous forme inactive (acide pénicilloïque) (Yılmaz and Özcengiz 2017).

## 3.2. Les autres antibiotiques de la famille des $\beta$ -lactamines

Les céphalosporines actuellement présentes sur le marché sont des dérivés d'hémisynthèse de la céphalosporine C. Selon leurs spectres d'actions, les céphalosporines sont divisées en 5 générations. D'une génération à l'autre, le spectre d'activité des céphalosporines s'étend vers les bactéries Gram négatif (Bush and Bradford 2016). Quant aux carbapénèmes (meropénème, imipénème, ertapénème), elles possèdent un très large spectre (Gram négatif, positif et anaérobie) et une résistance à la dégradation par les  $\beta$ -lactamases (El-Gamal et al. 2017). Les monobactames

(aztreonam) sont des BL à cycle unique, très actifs contre les bactéries Gram négatif aérobies. Par ailleurs, les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam) n'ont pas d'activité antibactérienne intrinsèque. Leur combinaison avec d'autres BL (AX, pipéracilline, ceftazidime..) permet l'inhibition des  $\beta$ -lactamases et élargit le spectre d'activité de ces molécules (Bush and Bradford 2016).



**Figure 8: Classification et structures chimiques de quelques antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines d'après (Ariza et al. 2015)**

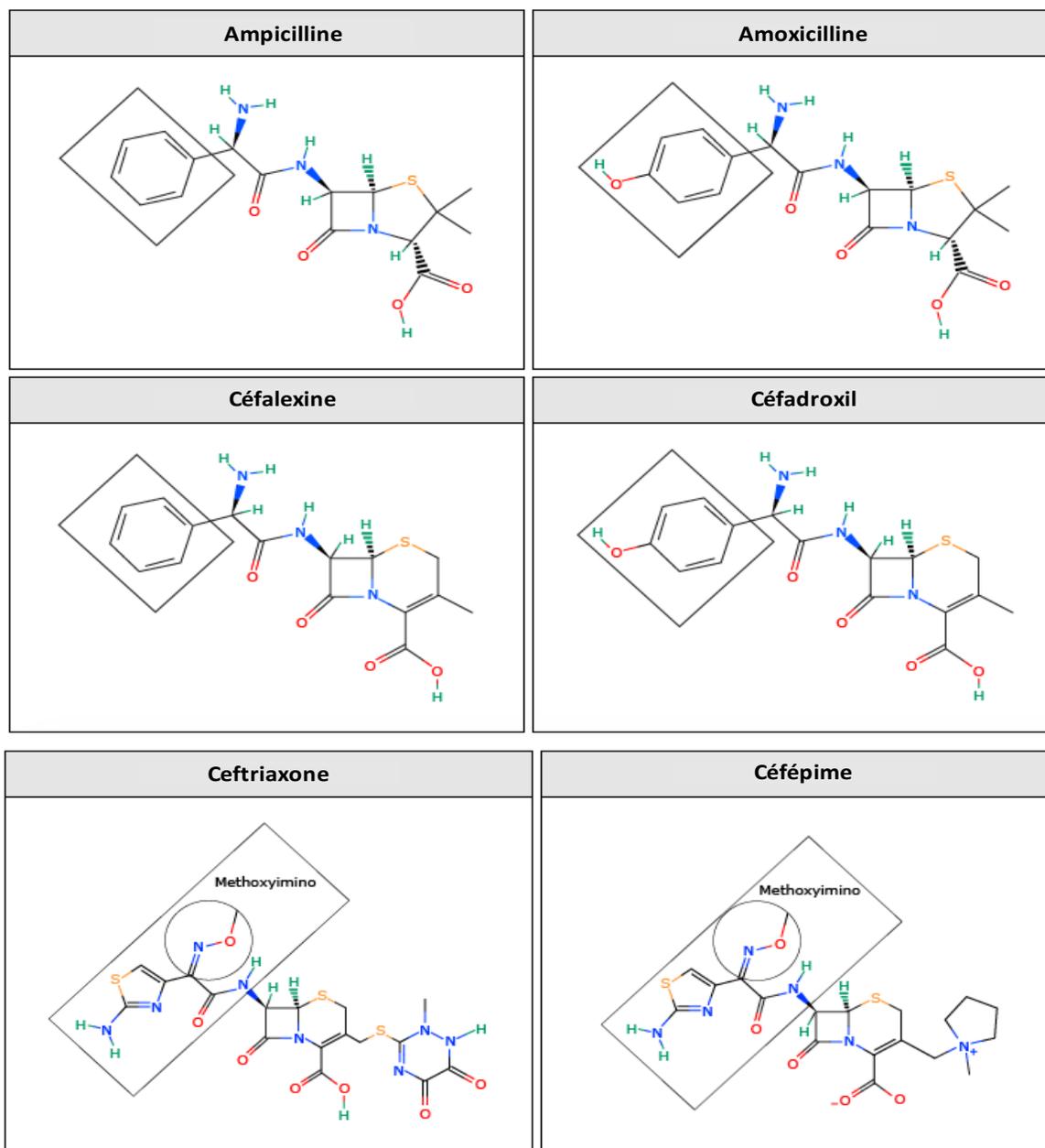
*Le point commun aux BL est la présence d'un noyau  $\beta$ -lactame. Les chaînes latérales (R, R1, R2), permettent de distinguer les différentes molécules à l'intérieur de la même classe.*

#### 4. Réactivité croisée et allergie, au sein de la famille des $\beta$ -lactamines

La réactivité croisée entre les différentes molécules des BL est assez variable et constitue un pilier essentiel de la prise en charge thérapeutique du patient (Bush and Bradford 2016). En effet, l'évitement du traitement par les pénicillines chez les patients qui déclarent une allergie est associé à un risque élevé d'évènements indésirables tels qu'une réadmission pour la même infection, une insuffisance rénale aiguë ou une infection à *Clostridium difficile* (MacFadden et al. 2016).

La réactivité croisée résulte d'une sensibilisation croisée au niveau du noyau  $\beta$ -lactame ou plutôt de la chaîne latérale commune (ex : l'AX et la cefadroxil ou la ceftriaxone et la céfépime) (**Figure 9**) (Mayorga et al. 1995; Romano et al. 2016). En effet, il a été démontré en utilisant un panel d'anticorps anti-AX que la chaîne latérale jouait un rôle important dans la reconnaissance antigénique mais que la structure complète (avec le noyau BL) était nécessaire pour une reconnaissance optimale (Mayorga et al. 1995). Cependant au sein des céphalosporines, la réactivité croisée est surtout attribuée à la chaîne latérale R1 (**Figure 9**) (Romano et al. 2015).

Lors des réactions immédiates, le taux de réactivité croisée est relativement élevé dans le groupe des pénicillines hémisynthétiques surtout les aminopénicillines (qui ont en commun le groupe amine sur leur chaîne latérale) et entre les pénicillines hémisynthétiques et la BP (Romano et al. 2016). D'une manière générale, environ 40 à 80% des patients allergiques à l'AX tolèrent la BP (Moreno et al. 2017). La réactivité croisée entre les pénicillines et les céphalosporines peut aller jusqu'à 10% (surtout pour les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération) mais semble être négligeable pour les céphalosporines de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération. La réactivité croisée pénicillines vs carbapénèmes ou monobactames est aussi négligeable (Romano et al. 2016). Un cas de réactivité croisée entre la ceftazidime et l'aztréonam a été rapporté. En effet, les deux molécules présentent une chaîne latérale identique (Pérez Pimiento et al. 1998).



**Figure 9: Chaîne latérale commune entre aminopénicillines et céphalosporines d'après (Romano et al. 2015)**

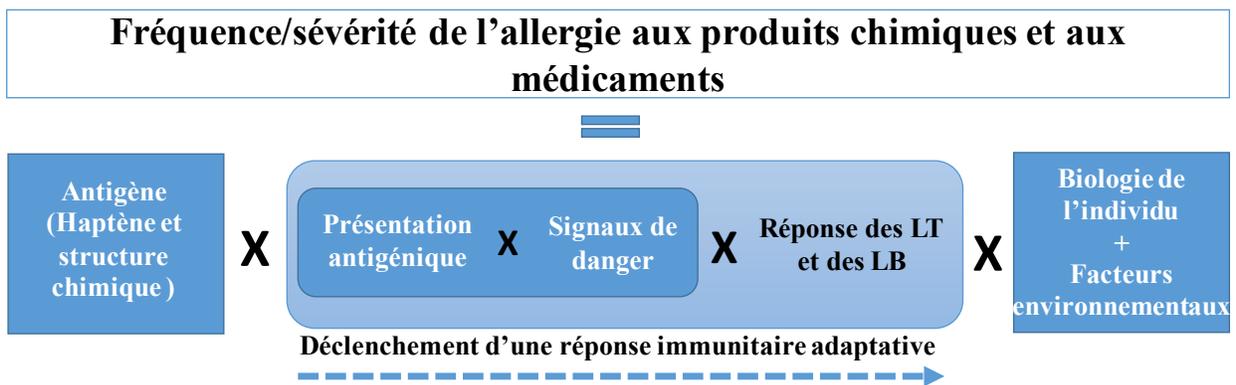
*Certaines pénicillines et cephalosporines présentent des chaînes latérales similaires entraînant une réaction croisée possible entre ces molécules. Par exemple, l'ampicilline présente la même chaîne latérale que la céfalexine et le céfador. L'amoxicilline présente la même chaîne latérale que le céfadroxil. D'autre part, les céphalosporines peuvent présenter des similitudes entre-elles au niveau de la chaîne latérale : groupement méthoxyimine commun au céftriaxone, céfuroxime, céfotaxime et céfépime.*



## Chapitre 3

# Les étapes clés déclenchant une réponse immunitaire adaptative contre les produits chimiques et les médicaments

Le déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative contre les substances chimiques et médicamenteuses nécessite la présence de plusieurs facteurs en plus de l'antigène lui-même telle qu'une présentation efficace de l'antigène aux LT en présence des signaux de danger (Pichler et al. 2011). Dans la plupart des fois, et malgré l'existence de ces facteurs, une réponse immunitaire adaptative peut ne pas donner des manifestations cliniques ; ceci serait dû à des facteurs propres pour chaque individu (**Figure 10**). Dans ce chapitre, nous exposons les différents points clés essentiels pour déclencher une réponse immunitaire adaptative contre les produits chimiques et les médicaments. Si un de ces facteurs manque, la probabilité d'engendrer une réponse immunitaire adaptative efficace est diminuée.



**Figure 10: Aperçu général des étapes clés nécessaires pour déclencher une réponse immunitaire adaptative d'après (Rouse and Sehrawat 2010)**

*Le déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative contre les produits chimiques et médicamenteuses nécessite la présence d'un antigène et sa présentation aux lymphocytes T (LT) ou lymphocytes B (LB) spécifiques par les cellules dendritiques et en présence des signaux de danger.*

## I. La présence d'un antigène : la théorie de l'haptène

Le concept d'haptène a été décrit pour la première fois en 1935 par Landsteiner et Jacobs qui ont identifié une relation entre la réactivité des molécules chimiques envers les protéines et leur pouvoir sensibilisant cutané (Landsteiner and Jacobs 1935). En effet, les composés chimiques et médicamenteux sont des molécules de faible poids moléculaire (<1000D) (Bos and Meinardi 2000) et qui pour la plupart ne peuvent pas être reconnus par le système immunitaire et donc ne peuvent pas déclencher une réponse immunitaire. Ainsi pour devenir immunogène, elles doivent, pour la plupart, se lier aux protéines circulantes ou cellulaires. La molécule capable de se fixer aux protéines est donc nommée haptène (dérivé du grec *haptô*: accrocher) (Cho and Utrecht 2017). Il existe quatre types d'haptènes : les haptènes classiques, les pré-haptènes, les pro-haptènes et les haptènes non-classiques.

Par ailleurs, même si une molécule semble être, du point de vue chimique, très réactive vis-à-vis des protéines, il suffit qu'elle dispose d'une mauvaise biodisponibilité orale ou d'une faible pénétration cutanée pour ne pas pouvoir former un haptène *in vivo*. Ainsi, la pénétration des haptènes à travers la peau est facilitée par leur petite taille, leur lipophilie et par la présence d'une barrière cutanée défectueuse comme dans le cas des mutations de la filaggrine, une protéine cutanée qui permet l'arrangement des filaments de kératine et qui participe à la formation de l'enveloppe cellulaire de la couche cornée (Kaplan et al. 2012).

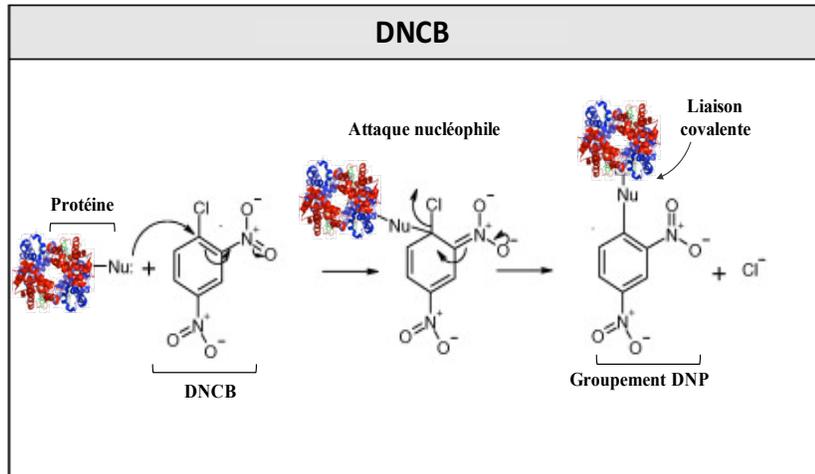
### 1. Définition

Les haptènes sont des molécules intrinsèquement réactives. Ils sont suffisamment électrophiles pour pouvoir entamer des liaisons covalentes avec les résidus nucléophiles des protéines circulantes. Les acides aminés nucléophiles les plus réactifs sont la lysine (Lys), la cystéine (Cys)

et l'histidine (His). Cependant l'électrophilicité des composés et leur degré d'ionisation dépendent du pH et du microenvironnement (Karlberg et al. 2008; Kaplan et al. 2012).

## 2. Exemples de substances chimiques

Le pouvoir sensibilisant des molécules allergisantes est généralement corrélé avec leur capacité à réagir avec les protéines pour former des complexes immunogènes. A titre d'exemple, l'héxylcinnamaldéhyde et les dinitrohalobenzènes [DNCB (2,4-dinitrochlorobenzène); DNFB (2,4-dinitrofluorobenzène)] sont directement réactifs (Basketter et al. 1997; Karlberg et al. 2008). Le DNCB, un sensibilisant cutané fort utilisé dans l'industrie pneumatique, est capable de se lier *via* des liaisons covalentes avec des résidus nucléophiles spécifiques des protéines cutanées (albumine, cytokeratin 14, cofilin) par une substitution nucléophile de son noyau aromatique (**Figure 11**). Ceci aboutit à des adduits dinitrophénols (DNP) stables (Aleksic et al. 2008; Dietz et al. 2010). Il est intéressant de noter qu'environ 41% de l'albumine extravasculaire se trouve au niveau de la peau (Aleksic et al. 2007). Plus particulièrement une modification de la Cys-34 a été détectée au niveau de l'albumine (Dietz et al. 2010), mais aussi des modifications des résidus Lys, tyrosine (Tyr) et His en fonction des conditions expérimentales (Aleksic et al. 2007; Aleksic et al. 2008). Par ailleurs, le DNCB et son dérivé hydrosoluble le DNBS (2,4-dinitrobenzènesulfone) sont aussi capables d'hapténiser des protéines intracellulaires (Pickard et al. 2007; Megherbi et al. 2009; Dietz et al. 2010).



**Figure 11: Exemple d'haptène classique : le DNCB d'après (Aleksic et al. 2007)**

*DNCB* : 2,4-dinitrochlorobenzène ; *DNP* : radical dinitrophényl ; *P* : protéine ; *Nu* : résidu nucléophile.

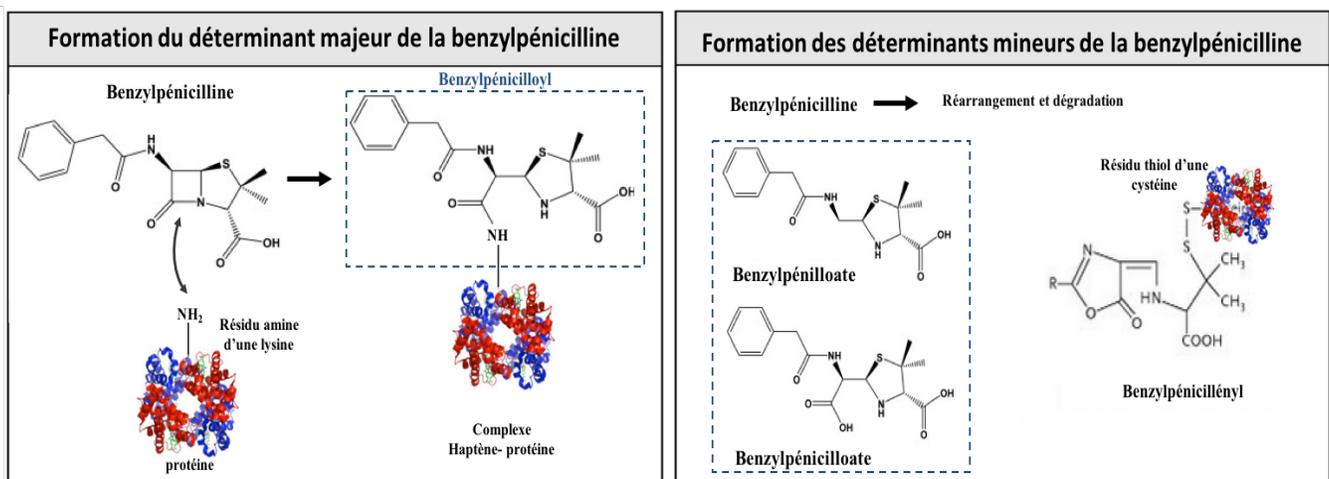
### 3. Exemples de molécules médicamenteuses

Certaines molécules médicamenteuses présentent aussi une réactivité intrinsèque leur permettant de se lier par des liaisons de covalence aux protéines cellulaires ou circulantes.

#### 3.1. Déterminants antigéniques des $\beta$ -lactamines

Les antibiotiques de la famille des BL constituent des haptènes classiques. Les pénicillines entament des liaisons de covalence avec des résidus nucléophiles spécifiques, plutôt des Lys, sur les protéines circulantes *via* une attaque nucléophile de leur noyau BL et forment ainsi des dérivés penicilloyl (fonction amide) (**Figure 12**). Ces derniers sont connus pour être des déterminants antigéniques majoritairement formés et reconnus par les LT (*cf. chapitre 3 partie IV-3.1*) et les anticorps. Cependant, les pénicillines suite au processus de dégradation, peuvent aussi former d'autres déterminants mineurs tels que des dérivés pénicillanyl ou les acides pénicillénique et pénicilloïques. Ceux-ci, peuvent former des ponts disulfures avec les résidus Cys des protéines et

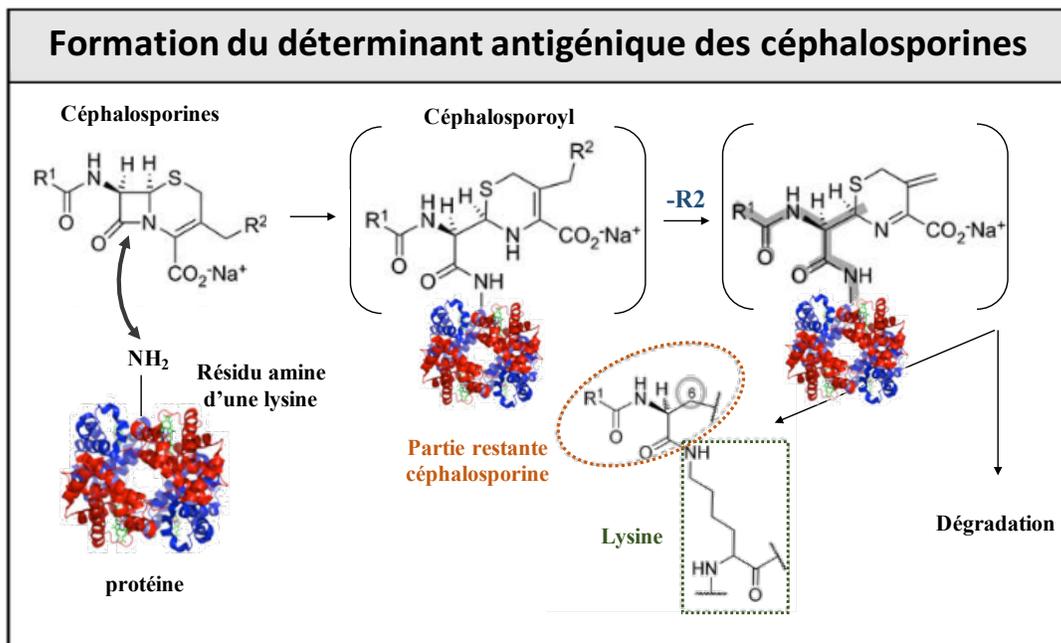
constituent respectivement des conjugués pénicillényl et pénicillamine (Stone et al. 2014). Ainsi, les tests cutanés utilisés en Europe et aux Etats-Unis sont constitués par le déterminant majeur PLL (pénicilloyl-polylysine) et les déterminants mineurs (essentiellement pénicilloate et pénilloate car ils sont plus stables) (**Figure 12**) (Ariza et al. 2015). Malgré leur présence en faible quantité, les déterminants mineurs peuvent aussi contribuer aux réactions allergiques. En effet, l'acide benzylpénicillénique est capable de stimuler les LT de patients allergiques à la pénicilline d'une manière plus intense que la BP (Meng et al. 2011). Cependant, les déterminants mineurs de l'AX tels que l'acide amoxicilloïque (produit par hydrolyse) ou le dikétopipérazine (produit par auto-aminolyse) ne semblent pas jouer un rôle dans son immunogénicité (Torres et al. 2010).



**Figure 12: Déterminants majeurs et mineurs de la benzylpénicilline d'après (Ariza et al. 2015)**

*Le déterminant antigénique majeur est dérivé du groupement benzylpénicilloyl. Les déterminants mineurs sont les produits de dégradation de la pénicilline (liste non exhaustive) dont certains peuvent entamer des liaisons avec le groupement thiol de la cystéine de la protéine porteuse. Les tests cutanés sont constitués de la pénicilloyl-polylysine, de la BP et des déterminants pénilloate et pénicilloate (encadré bleu).*

La situation est plus complexe avec les céphalosporines parce qu'elles forment plusieurs générations de structures chimiques différentes et peuvent donner plusieurs produits de dégradation. L'ouverture de leur noyau BL suite à une attaque nucléophile produit des déterminants céphalosporoyl instables résultant en une perte de la chaîne latérale R2. La dégradation du noyau dihydrothiazine et la perte de la chaîne R2 font que seule la chaîne latérale R1 et une partie du noyau BL restent liées à la protéine porteuse et constituent la base du déterminant antigénique (**Figure 13**) (Perez-Inestrosa et al. 2005; Ariza et al. 2015).



**Figure 13: Déterminant antigénique des céphalosporines d'après (Montannez et al. 2011; Ariza et al. 2015)**

*Le déterminant antigénique des céphalosporines est formé par la chaîne latérale R1 et une partie du noyau BL.*

### 3.2. Protéines porteuses candidates pour les $\beta$ -lactamines

L'albumine sérique humaine (HSA) est la protéine majoritairement impliquée dans le processus d'hapténisation des médicaments puisqu'elle est très abondante dans le sérum (35 à 50 g/L). Sous forme monomérique, la HSA est un polypeptide, d'environ 66 KD, formé de 585 acides aminés contenant 17 ponts disulfures (Meloun et al. 1975; Ghuman et al. 2005). Elle est organisée en trois domaines hélicoïdaux homologues (I à III) dont chacun est divisé en deux sous-domaines A et B (Ghuman et al. 2005). Des adduits formés entre la HSA et la BP (Yvon et al. 1989; Yvon et al. 1990; Meng et al. 2011; Scornet et al. 2016), la flucloxacilline (FLU) (Jenkins et al. 2009), la piperacilline (PIP) (Whitaker et al. 2011; El-Ghaiesh et al. 2012; Jenkins et al. 2013), l'AX (Ariza et al. 2012; Garzon et al. 2014), le méropénème et l'aztréonam (Jenkins et al. 2013) ont été détectés dans le sérum des patients allergiques et dans les conjugués synthétisés *in vitro* (**Tableau 2**).

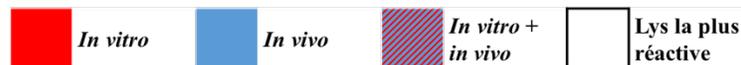
A de faibles concentrations, l'interaction des BL avec les résidus Lys de la HSA se fait, au début, par des liaisons non covalentes. Ceci permet le positionnement des médicaments dans des orientations favorables au niveau de la HSA, facilitant ainsi les liaisons de covalence. A des concentrations plus élevées, et après des durées d'incubation plus prolongées, une multitude de résidus Lys seraient hapténisés (Faulkner et al. 2014).

Le pourcentage d'hapténisation de la HSA *in vitro* dépend des conditions expérimentales, de la concentration du médicament et du temps d'incubation. A titre d'exemple, au pH physiologique, et à la différence des Lys190 et Lys199, la plupart des résidus Lys sont protonés et ne sont pas propices aux attaques nucléophiles. Ainsi, 21 résidus Lys semblent être hapténisés *in vitro* par la BP au pH physiologique alors que 51 le seront à un pH basique (Scornet et al. 2016).

Malgré que la fixation des BL aux protéines constitue une étape essentielle pour déclencher une réponse immunitaire, il est important de noter que ces conjugués sont aussi détectés dans le sérum de patients non-allergiques traités par les BL (Jenkins et al. 2009; Meng et al. 2017). En effet, le pourcentage minimal de modification de la Lys 541 par la PIP (2.6%) et induisant une activation *in vitro* des LT est détecté aussi bien chez des patients allergiques ou non traités par ce médicament (Meng et al. 2017). Ceci suggère qu'à part la formation de l'haptène, d'autres facteurs seraient aussi nécessaires pour déclencher une réponse immunitaire aboutissant à une immunopathologie (**Figure 10**).

**Tableau 2: Résidus lysines modifiés par les β-lactamines au niveau de l'albumine sérique humaine.**

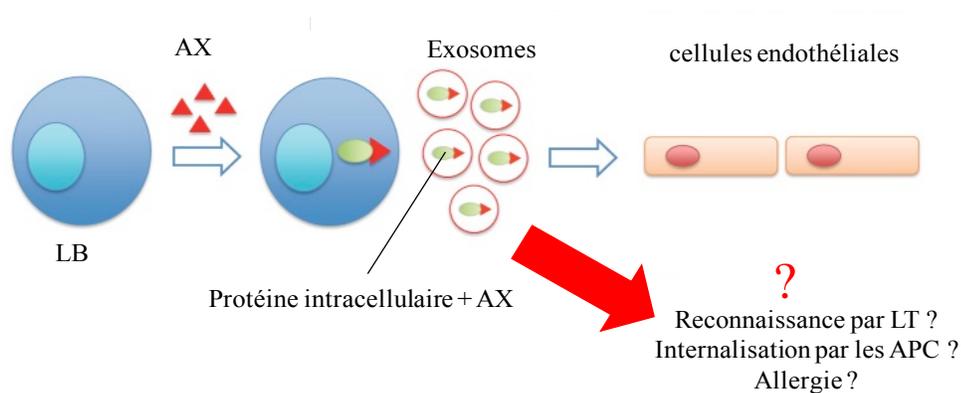
	References	Lys 4	Lys 12	Lys 20	Lys 73	Lys 137	Lys 159	Lys 162	Lys 190	Lys 195	Lys 199	Lys 212	Lys 351	Lys 359	Lys 372	Lys 402	Lys 414	Lys 432	Lys 436	Lys 439	Lys 475	Lys 519	Lys 525	Lys 541	Lys 545
BP	Yvone M <i>et al.</i> , 1989, 1990								■	■	■							■						■	■
	Meng X <i>et al.</i> , 2011		■	■		■	■		■	■	■	■	■		■			■	■					■	■
	Scornet <i>et al.</i> , 2016		■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
AX	Ariza A <i>et al.</i> , 2012								■		■		■											■	■
	Garzon D <i>et al.</i> , 2014								■																
FLU	Jenkins RE <i>et al.</i> , 2009					■		■	■	■	■	■	■					■					■	■	■
PIP	Whitaker P <i>et al.</i> , 2011	■	■			■		■	■	■	■	■	■					■					■	■	■
	El-Ghaiesh S <i>et al.</i> , 2012								■	■	■	■	■						■					■	■
	Jenkins RE <i>et al.</i> , 2013		■			■			■	■	■	■	■						■					■	■
ME	Jenkins RE <i>et al.</i> , 2013		■					■		■		■													
AZ	Jenkins RE <i>et al.</i> , 2013					■		■										■						■	



BP : benzylpénicilline ; AX : amoxicilline ; FLU : flucloxacilline ; PIP : pipéracilline ; ME : mérépénème ; AZ : aztréoname.

Les LB peuvent aussi hapténiser d'autres protéines sériques tels que la transferrine [ampicilline (Magi et al. 1995) et AX (Ariza et al. 2012)] et les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines IgG (AX) (Ariza et al. 2012; Ariza et al. 2014). Toutefois leur implication dans le développement des réactions allergiques est peu documentée.

Des techniques d'immunomarquages ont permis aussi de détecter des protéines intracellulaires hapténisées par la BP dans les LB (Sánchez-Gómez et al. 2017). Cependant, les études avec l'AX sont plus poussées. Grâce à l'utilisation de l'AX biotinylée couplée à des techniques d'immunoprécipitations et de microscopie confocale, il a été montré que l'AX peut hapténiser des protéines intracellulaires au niveau des monocytes, des macrophages et des LB d'une manière différente selon le type cellulaire impliqué (Ariza et al. 2014). Au niveau des LB, il s'agit essentiellement de l'EF-2 (*Elongation factor*), de l'HSP70 (*Heat shock protein*), de la  $\beta$ -actine et de l' $\alpha$ -enolase (Sánchez-Gómez et al. 2017). De plus, il a été démontré que les LB peuvent libérer dans le milieu extracellulaire les protéines hapténisées par l'AX sous forme d'exosomes. Ces derniers peuvent être internalisés au niveau des cellules endothéliales (Sánchez-Gómez et al. 2017).



**Figure 14: Hapténisation des protéines intracellulaires par l'amoxicilline d'après (Raimondo 2017)**

*LB : lymphocyte B ; AX : amoxicilline ; LT : lymphocyte T ; APC : cellules présentatrices de l'antigène.*

#### 4. Les pro-haptènes

Les pro-haptènes sont des molécules qui nécessitent une métabolisation *in vivo* pour former des intermédiaires électrophiles réactifs capables de se lier aux protéines. Une multitude d'enzymes peuvent participer à l'activation des pro-haptènes telles que les enzymes de phase I [cytochrome P 450 (CYP), l'alcool ou l'aldéhyde déshydrogénase (ADH ou ALDH), les monoamines oxydases...] ou celles de phases II [glutathion S-transférases (GST), sulphotransférases...] (Kaplan et al. 2012). A titre d'exemple, l'alcool cinnamique, composant de la cannelle utilisé en parfumerie, est métabolisé au niveau de la peau par l'ADH ou le CYP 2E1 en un composé réactif : le cinnamaldéhyde (CinA) (Smith et al. 2000; Smith Pease et al. 2003). Certains des patients sensibilisés par l'alcool cinnamique, ne présentent pas un patch test positif au CinA évoquant un mécanisme alternatif de métabolisation de l'alcool cinnamique. Ainsi en utilisant un modèle de peau humaine reconstruite, il a été démontré que l'alcool cinnamique peut être aussi métabolisé en des dérivés électrophiles époxy-alcool et sulfate-allylique (Moss et al. 2016).

Plusieurs médicaments se comportent aussi comme des pro-haptènes. En effet, le SMX est métabolisé (oxydation) au niveau du foie (CYP), de la peau et des cellules immunitaires (rôle de la myéloperoxydase) en hydroxylamine. Ce dernier subit une oxydation spontanée en nitroso-SMX (SMX-NO) qui est réactif vis à vis des résidus Cys des protéines sériques ou cellulaires (Naisbitt et al. 1999; Manchanda et al. 2002; Naisbitt et al. 2002; Callan et al. 2009; Ogese et al. 2015). Bien que les LT de patients atteints de mucoviscidose et allergiques au SMX, reconnaissent exclusivement le SMX-NO *in vitro* (Elsheikh et al. 2011), ce dernier peut ne pas être le seul déterminant antigénique du SMX. En effet, les LT des patients allergiques peuvent aussi être activés directement par le SMX (pi-concept) (*cf. chapitre 3 partie IV-3.2*) (Schnyder et al. 2000;

Castrejon et al. 2010). Par ailleurs, la métabolisation des molécules médicamenteuses à cycle aromatique [CBZ (carbamazépine) et NVP (névirapine)] peut aussi aboutir à des métabolites époxydes et arènes oxydes réactifs avec des résidus Cys et His. En effet des adduits entre les dérivés de ces molécules et les protéines ont été détectés *in vitro* (HSA, GST protéine) et *in vivo* [HSA (CBZ et NVP) et hémoglobine (Hb) (NVP)] (Caixas et al. 2012; Meng et al. 2013; Yip et al. 2017). Il est intéressant de noter que le métabolite 12-hydroxy-NVP produit sous l'action du CYP hépatique (3A4 et 2B6) et ensuite sulfaté au niveau cutané sous l'action des sulfotransférases, semble être responsable du rash cutané induit par la NVP chez l'homme (Sharma et al. 2013a; Sharma et al. 2013b). D'autre part, l'ABC est métabolisé par l'ADH en des intermédiaires aldéhydes réactifs qui peuvent réagir avec des résidus Lys, His et Cys de la HSA (Meng et al. 2014).

Toutefois l'implication de ces métabolites comme déterminants antigéniques dans le développement des réactions allergiques est peu documentée. Ainsi, comme le SMX, la CBZ et la NVP peuvent induire une activation directe de LT issus de patients allergiques (CBZ, NPV) (Naisbitt et al. 2003; Wu et al. 2007) ou d'un modèle de souris présentant un rash cutané induit par la NVP (Chen et al. 2009). Quant à l'ABC, le mécanisme d'activation des LT est aussi particulier (*cf. chapitre 3 partie IV-3.3*).

## 5. Les pré-haptènes

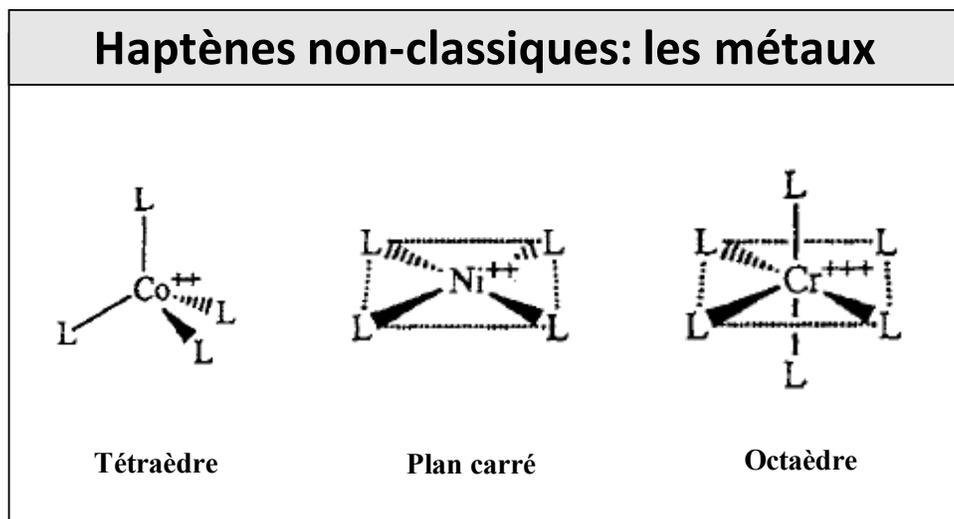
Les pré-haptènes sont des molécules qui nécessitent une transformation chimique et non pas un système enzymatique spécifique pour devenir réactives (Lepoittevin 2006; Kaplan et al. 2012). A titre d'exemple, de nombreux terpènes non-sensibilisants tels que le d-limonène peuvent être oxydés par l'air et donner des hydroperoxydes allergisants (Divkovic et al. 2005; Karlberg et al.

2008). Un autre exemple plus complexe est la PPD utilisée dans les teintures et colorants pour cheveux (Pot et al. 2013). La PPD peut subir une auto-oxydation au niveau de la peau ou dans une solution aqueuse pour produire des intermédiaires quinonediimine électrophiles. Ces derniers peuvent aussi subir des réactions d'oxydo-conjugaison aboutissant à la base de Brandowski (BB) (dérivés à base de trois molécules de PPD). Ces intermédiaires réactifs sont capables de se lier essentiellement aux résidus Cys des protéines (HSA, GST protéines, Hb) (Jenkinson et al. 2010; Faulkner et al. 2014). Cependant les LT de patients non allergiques à la PPD réagissent avec la BB suggérant que la BB, seule, ne semble pas être responsable de l'allergie (Coulter et al. 2010; Gibson et al. 2015).

## 6. Les haptènes non-classiques

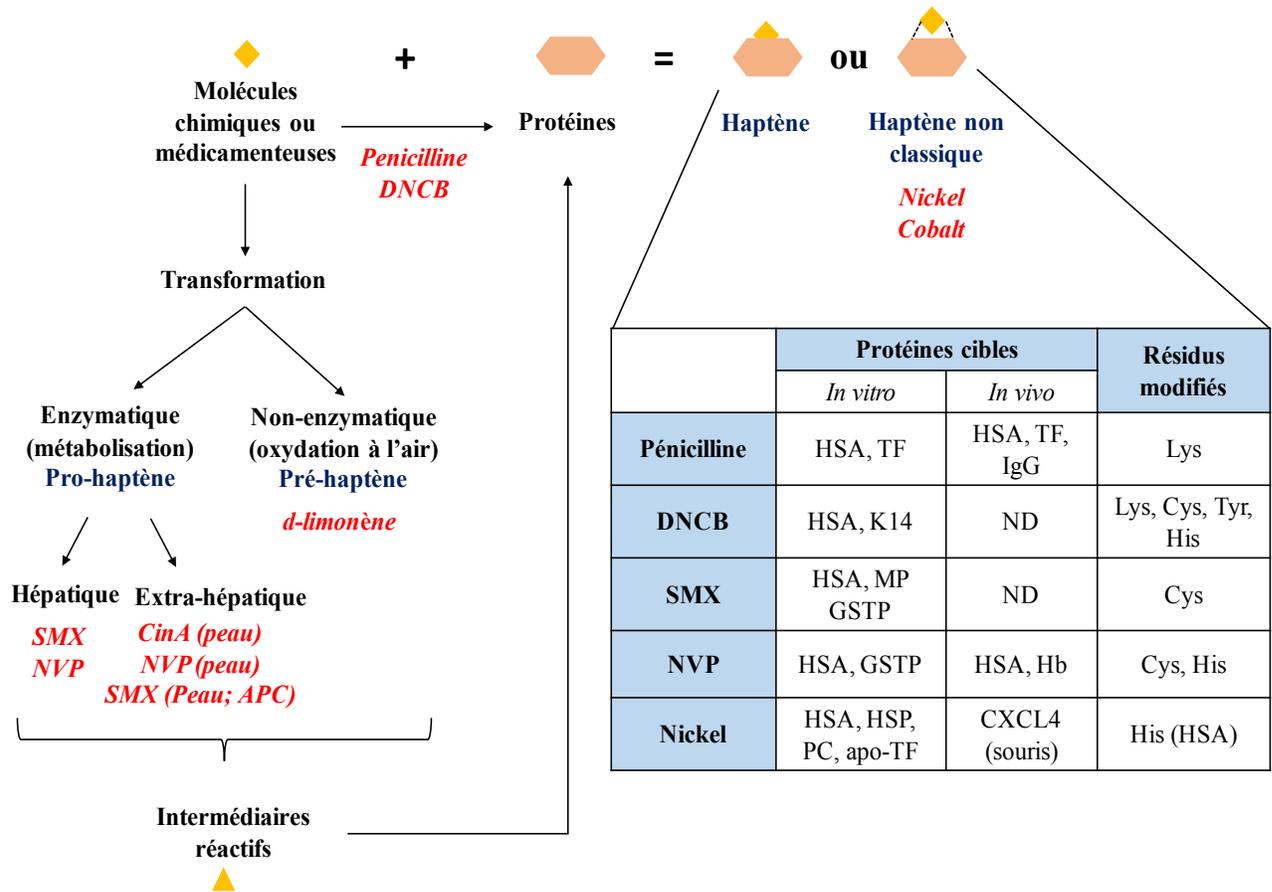
Les métaux diffèrent des haptènes classiques puisqu'ils sont incapables d'effectuer des liaisons de covalence avec les protéines (Thierse et al. 2005). En revanche, ils effectuent des liaisons de coordination avec 4 ou 6 atomes donneurs d'électrons tels que l'oxygène ou l'azote des acides aminés de la chaîne latérale des protéines. Ainsi les métaux (Ni, Co, Cr, Be...) peuvent adopter des configurations particulières et bien spécifiques avec les protéines (**Figure 15**) (Zhang and Wilcox 2002). Bien que le nickel soit capable de se lier aux protéines circulantes [HSA (Lucassen and Sarkar 1979; Scott and Bradwell 1983; Zhang and Wilcox 2002) ou CXCL4 (chez la souris) (Kuroishi et al. 2017)] ou cellulaires [protéines du cytosquelette ou HSP (Heiss et al. 2005; Martin et al. 2006)], l'implication de ces conjugués comme déterminants antigéniques est peu documentée. En effet, bien que le complexe HSA-nickel soit capable d'activer les LT *in vitro*, il n'est pas appréhendé dans les APC en épitope reconnu par les LT (Thierse et al. 2004).

Il est intéressant de noter que certains métaux nécessitent une étape d'oxydation pour devenir réactif. En effet, le chrome trivalent Cr (III) présente une faible perméabilité membranaire et il est donc peu sensibilisant. En revanche, son oxydation en chrome hexavalent Cr (VI) lui permet de franchir plus facilement la barrière cutanée pour ensuite être réduit en Cr (III) afin de constituer l'haptène (Franken et al. 2015; Buters and Biedermann 2017). Par ailleurs, le nickel, en contact de la peau, est sous forme métal et n'est pas sensibilisant. En revanche, la corrosion du métal par l'air entraîne la formation d'ions  $Ni^{2+}$  responsables des réactions allergiques et le pouvoir sensibilisant du nickel est augmenté avec son degré d'oxydation (Artik et al. 1999; Franken et al. 2015).



**Figure 15: Exemples de liaisons de coordination effectuées par les métaux d'après (Basketter et al. 1995)**

*Le cobalt ( $Co^{2+}$ ) forme un tétraèdre, le nickel ( $Ni^{2+}$ ) un complexe plan carré et le chrome ( $Cr^{3+}$ ) forme un octaèdre.*



**Figure 16: La présence d'un antigène: étape clé du déclenchement de la réponse immunitaire**

*ABC* : abacavir ; *APC* : cellules présentatrices d'antigène ; *DNCB* : dinitrochlorobenzène ; *GSTP* : glutathion S-transférases protéines ; *HSA* : albumine humaine sérique ; *Hb* : hémoglobine ; *HSP* : heat shock protein ; *IgG* : immunoglobuline ; *K14* : kératine 14 ; *MP* : myéloperoxydase ; *NVP* : névirapine ; *PC* : protéine du cytosquelette ; *TF* : transferrine ; *ND* : non déterminée.

## II. Capture et présentation de l'antigène : implication des cellules dendritiques

Le déclenchement d'une réponse adaptative avec activation des LT nécessite une étape de présentation de l'antigène aux LT *via* les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des cellules présentatrices de l'antigène telles que les macrophages, les LB et les cellules dendritiques (DC). Dans cette partie, nous allons détailler le rôle des DC dans l'apprêtement de l'haptène ainsi formé et les voies de présentation de l'antigène aux LT. Il est intéressant de noter que pour certaines molécules (SMX, CBZ, ABC, nickel), un apprêtement au niveau des DC n'est pas requis pour induire une activation des LT (*cf. chapitre 3 partie IV-3*).

### 1. Les cellules dendritiques

En 1973, Ralph Steinman et Zanvil Cohn décrivent pour la première fois les DC mais il fallait attendre plusieurs années après pour élucider leur rôle au niveau du système immunitaire (Rowley and Fitch 2012). D'une manière générale, les DC sont définies par leur capacité à capturer les antigènes dans les tissus périphériques où elles résident, de les transporter de la périphérie vers les organes lymphoïdes secondaires et de les présenter aux LT naïfs (Kaplan et al. 2012).

#### 1.1. Diversité des cellules dendritiques

À l'état d'équilibre et à part les DC plasmacytoïdes (pDC), deux grandes populations de DC ont été décrites chez la souris et l'homme : les DC migratoires présentes dans les tissus périphériques et qui migrent vers les organes lymphatiques et les DC résidentes dans les organes lymphoïdes (la rate, le thymus et les ganglions lymphatiques). Les deux populations forment le groupe des DC conventionnelles (cDC). Les DC inflammatoires forment un 3<sup>ème</sup> type de DC

retrouvées dans un état inflammatoire ou infectieux (**Figure 17**) (Guilliams et al. 2010; Satpathy et al. 2012; Merad et al. 2013).

La distinction entre les différentes sous-populations de DC et leur équivalence entre l'homme et la souris est assez complexe et reste sujet à discussion. Dans les tissus périphériques, les DC migratoires sont divisées en deux sous-populations chez la souris et l'homme : les DC CD103<sup>+</sup> (ou DC CD14<sup>+</sup> chez l'homme) et les DC CD11b<sup>+</sup> (ou DC CD1a<sup>+</sup> chez l'homme) (**Figure 17**). Chez la souris, cinq sous-populations de DC migratoires ont été décrites au niveau cutané : les cellules de Langerhans (LC) dans l'épiderme et quatre catégories de DC dermales (DDC). Les LC représentent 3 à 5% des cellules épidermiques cutanées mais sont présentes aussi au niveau de l'épithélium intestinal et des voies respiratoires. Elles sont caractérisées par la présence d'organites cytoplasmiques particuliers, les granules de Birbeck et par l'expression de la langérine (CD207), une lectine de type II qui participe à l'endocytose des antigènes dans l'épiderme (*cf. chapitre 3 partie II-2*). D'autre part, la sous-population majeure des DDC est formée par les DDC CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> par contre les DDC CD207<sup>-</sup> CD103<sup>+</sup>, les DDC CD207<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> et les DDC CD207<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> sont moins abondantes. À noter que les DDC CD207<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> présentes dans le derme correspondraient aux LC migrant vers le ganglion lymphatique.

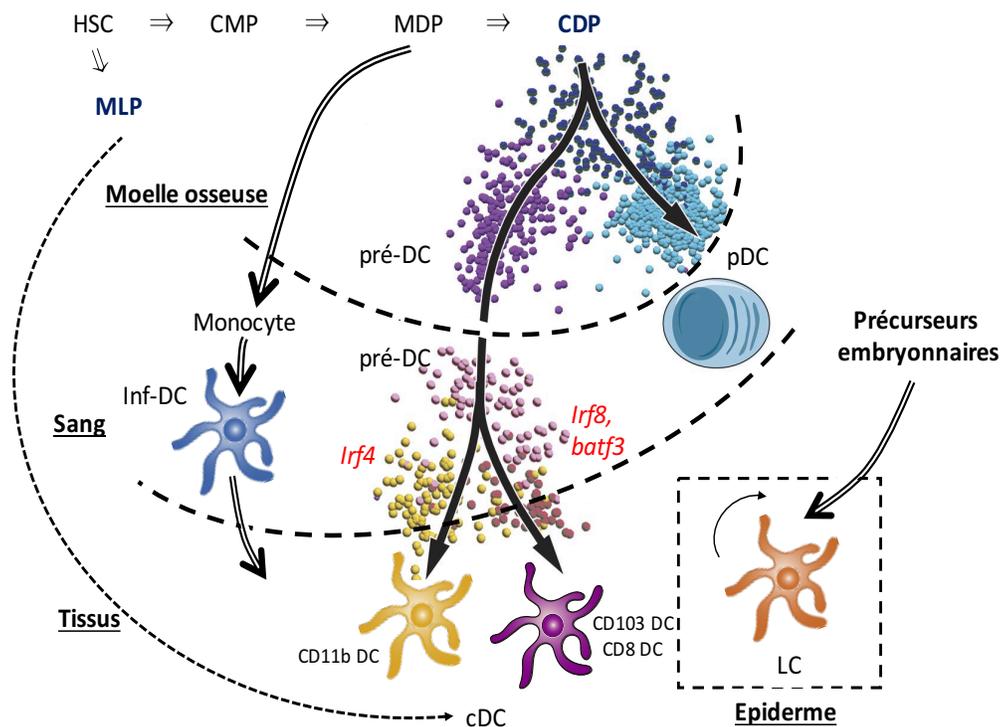
Les DC résidentes dans les tissus lymphoïdes sont aussi divisées en deux sous-populations chez la souris et l'homme : les DC CD8α<sup>+</sup> (ou DC BDCA3<sup>+</sup> chez l'homme) et les DC CD8α<sup>-</sup> (ou DC BDCA1<sup>+</sup> chez l'homme) (Guilliams et al. 2010; Satpathy et al. 2012; Merad et al. 2013; Malissen et al. 2014).

Contrairement aux cDC, les DC inflammatoires (inf-DC) sont recrutées en réponse à des *stimuli* microbiens ou inflammatoires (**Figure 17**). Elles sont produites à partir des monocytes et disparaissent lorsque l'inflammation est résolue.



## 1.2. Origine des cellules dendritiques

Les DC dérivent d'un progéniteur hématopoïétique commun (CDP) dans la moelle osseuse. Il est à la base des pDC et du précurseur des cDC (pré-cDC). Ce dernier est capable de migrer de la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes ou les tissus pour constituer les différents sous-types de cDC (Merad et al. 2013; Breton 2015; See et al. 2017). Tout comme chez la souris, il a été montré récemment que des progéniteurs lymphoïdes multipotents (MLP) humains peuvent aussi aboutir à des cDC (Helft et al. 2017). A la différence des cDC qui ont une durée de vie courte, les LC sont dotées d'une capacité d'auto-renouvellement continu. Elles ne dérivent pas des progéniteurs du sang ou de la moelle osseuse mais plutôt de précurseurs localisés dans l'épiderme très tôt après la naissance (Merad et al. 2013).



**Figure 18: L'origine des cellules dendritiques d'après (Merad et al. 2013; Helft et al. 2017; See et al. 2017) .**

*HSC: hematopoietic stem cells; CMP: common myeloid progenitor; MDP: monocyte and DC progenitor, CDP: common DC progenitors; MLP: multipotent lymphoid progenitor.*

### 1.3. Rôle des cellules dendritiques

Au niveau des tissus périphériques, les DC capturent les antigènes endogènes ou exogènes et migrent d'une manière CCR7-dépendante aux ganglions lymphatiques drainants où elles présentent l'antigène aux LT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Ainsi elles déclenchent une réponse tolérogène ou inflammatoire en fonction de leur état d'activation et du micro-environnement. Certaines sous-populations de DC : les DC CD8<sup>+</sup> (ou DC BDCA3<sup>+</sup> chez l'homme) et les DC CD103<sup>+</sup> (ou DC CD14<sup>+</sup> chez l'homme) sont plus efficaces pour la présentation croisée (*cf. chapitre 3 partie II-2.5*), leur permettant ainsi de présenter les antigènes exogènes aux LT CD8<sup>+</sup> *via* les molécules du CMH de classe I (Kaplan et al. 2012; Merad et al. 2013).

Au niveau du thymus, les DC CD8<sup>+</sup> et DC CD11b<sup>+</sup> contribuent aux mécanismes de tolérance centrale *via* la sélection négative durant le développement des thymocytes (*cf. chapitre 3 partie IV-1*). Quant à la périphérie, les DC CD8<sup>+</sup> et CD103<sup>+</sup> contribuent dans certains cas aux mécanismes de tolérance vis-à-vis des LT auto-réactifs (Merad et al. 2013). D'autre part, les DC peuvent induire l'expression des molécules d'adressage sur les LT, permettant leur domiciliation vers les tissus altérés :  $\alpha 4\beta 7$  et de CCR9 pour l'intestin (ex : allergie alimentaire), CLA (*cutaneous leukocyte antigen*) pour la peau (ex : EAC) (Islam and Luster 2012).

Les LC ont été considérées, pendant longtemps, comme étant les cellules centrales dans le développement de l'EAC. Récemment, un rôle crucial pour les DDC langérine<sup>+</sup> a été démontré grâce aux modèles de souris transgéniques avec déplétion spécifique des sous-populations de DC, testés par MEST (*Mouse Ear Swelling Test*). L'haptène est appliqué sur l'abdomen rasé d'une souris pour une durée de 1 à 2 jours (phase de sensibilisation). Après 5 à 7 jours, la phase d'élicitation est induite en appliquant le même haptène sur l'oreille de la souris sensibilisée.

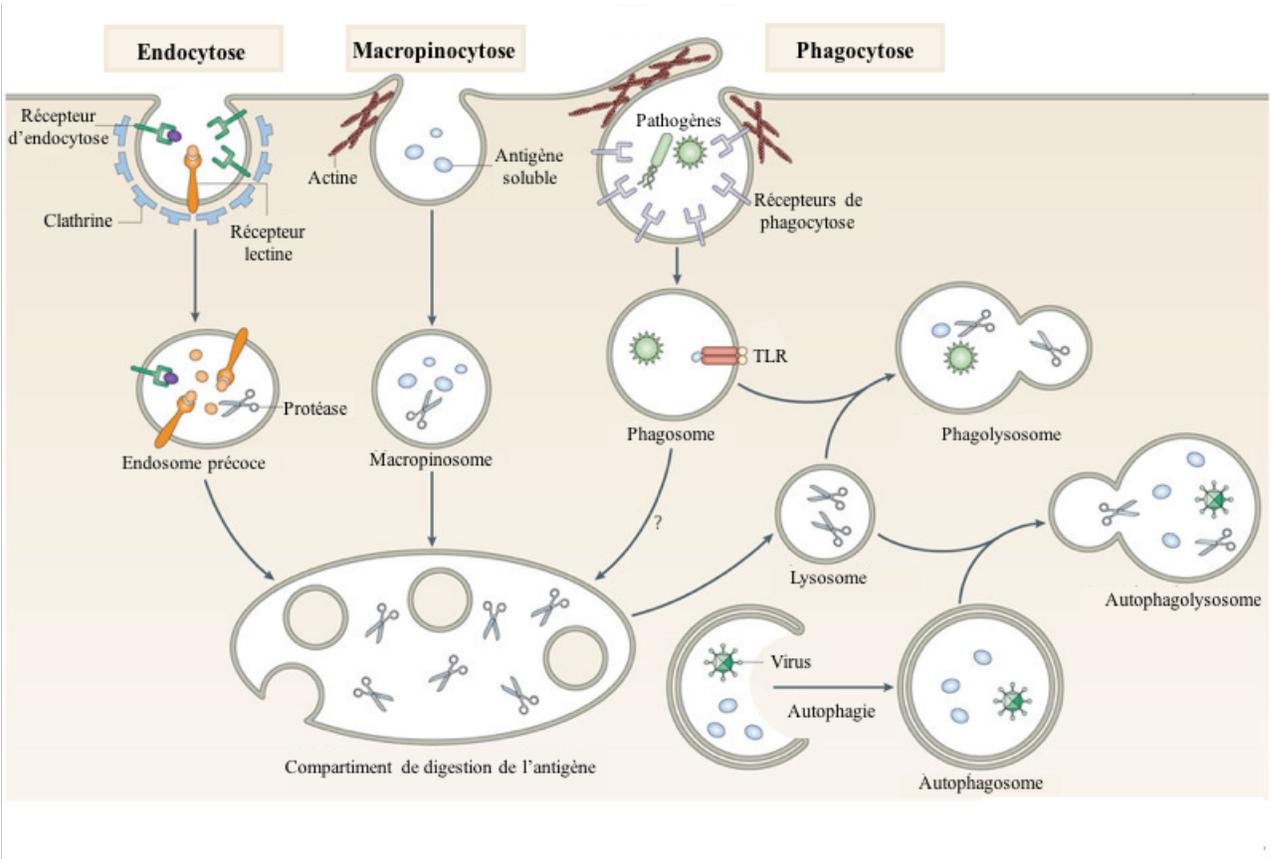
L'intensité de l'hypersensibilité de contact (HSC) est évaluée par le gonflement de l'oreille reflétant l'inflammation cutanée (Honda et al. 2013).

Dans un de ces modèles de souris transgéniques MuLangerin-DTR exprimant le récepteur de la toxine diphtérique (DTR) sous le contrôle du promoteur murin de la langérine, il a été observé une diminution de l'intensité de l'HSC suite à l'administration de la toxine diphtérique (DT) (Bennett et al. 2005). Cependant, ce modèle ne permet pas d'identifier la sous-population de DC cutanée impliquée dans l'EAC puisque l'injection de la DT aboutit à une absence inductible des LC et des DDC langérine<sup>+</sup> (Noordegraaf et al. 2010). Par contre, dans les modèles de souris transgéniques HuLangerin-DTR exprimant le DTR sous le contrôle du promoteur humain de la langérine seules les LC sont dépletées et il a été observé une augmentation de l'intensité de l'HSC suite à l'administration de la DT (Bobr et al. 2010). Il est intéressant de noter que d'autres modèles d'inhibition constitutive des LC ont été aussi testés [Hu-Langerin-DTA (sous-unité active de la DT)] et ont abouti aux mêmes observations (Kaplan et al. 2005). Par conséquent, les LC semblent jouer un rôle modulateur dans l'EAC. Cette conclusion n'est vraie qu'en présence des DDC langerine<sup>+</sup> puisque chez les souris invalidées pour *Batf3* (*Basic leucine zipper transcription factor ATF-like 3*), caractérisées par une absence constitutive des DDC langérine<sup>+</sup>, l'HSC est maintenue par les LC (Edelson et al. 2010). Ainsi, il semble que les deux sous-populations de DC de la peau joueraient un rôle compensatoire dans le déclenchement de l'EAC. Par ailleurs, une étude récente met en relief la plasticité immunogène vs tolérogène des LC. Grâce à un modèle de souris transgénique où l'expression d'antigène (ovalbumine) a été induite spécifiquement dans les LC, il a été montré que les LC induisent le développement et le recrutement cutané des LT régulateurs (Treg). Cependant l'activation des LC engendre une forte réponse CD8<sup>+</sup> (Strandt et al. 2017).

## 2. Les voies de présentation de l'antigène par les cellules dendritiques

### 2.1. Capture de l'antigène par les cellules dendritiques

Les DC peuvent capturer les antigènes selon trois mécanismes : la macropinocytose, la phagocytose et l'endocytose médiée par les récepteurs (**Figure 19**). En effet, la macropinocytose permet aux DC de capturer d'une manière non spécifique du fluide extracellulaire contenant de diverses molécules dont l'antigène soluble. C'est un processus dépendant de l'actine et nécessite l'implication de plusieurs molécules intracellulaires dont les GTPases. D'autre part, la phagocytose permet aux DC d'internaliser des antigènes particulaires plus larges, des cellules apoptotiques et des pathogènes opsonisés. Ce processus peut être déclenché après activation de molécules de surfaces [récepteurs Fc, récepteurs scavenger (MARCO, CD36)]. Cependant, il est aussi bien connu qu'une phagocytose indépendante d'un récepteur peut être déclenchée. Quant à l'endocytose médiée par les récepteurs, elle permet l'endocytose d'antigènes solubles dans de petites vésicules. On distingue plusieurs récepteurs impliqués tels que les récepteurs à lectine de type C liant les carbohydrates [CLR comme les récepteurs aux mannose (DEC-205), la langérine, DC-SIGN (CD209), BDCA-2] et les récepteurs Fc $\gamma$  (CD32, CD64) (Watts and Amigorena 2000; Roche and Furuta 2015). A titre d'exemple, la macropinocytose semble être le mécanisme le plus impliqué dans l'internalisation des allergènes du pollen (Bet v 1 et Phl p 1) (Noirey et al. 2000), alors que le récepteur au mannose semble jouer un rôle dans l'internalisation de l'allergène majeur d'acarien, Der p 1. Il est intéressant de noter que les DC issus de patients allergiques au Der p 1 expriment plus fortement le récepteur au mannose que les DC de sujets sains (Deslée et al. 2002).



**Figure 19: Les voies d'internalisation de l'antigène dans les cellules dendritiques (Roche and Furuta 2015)**

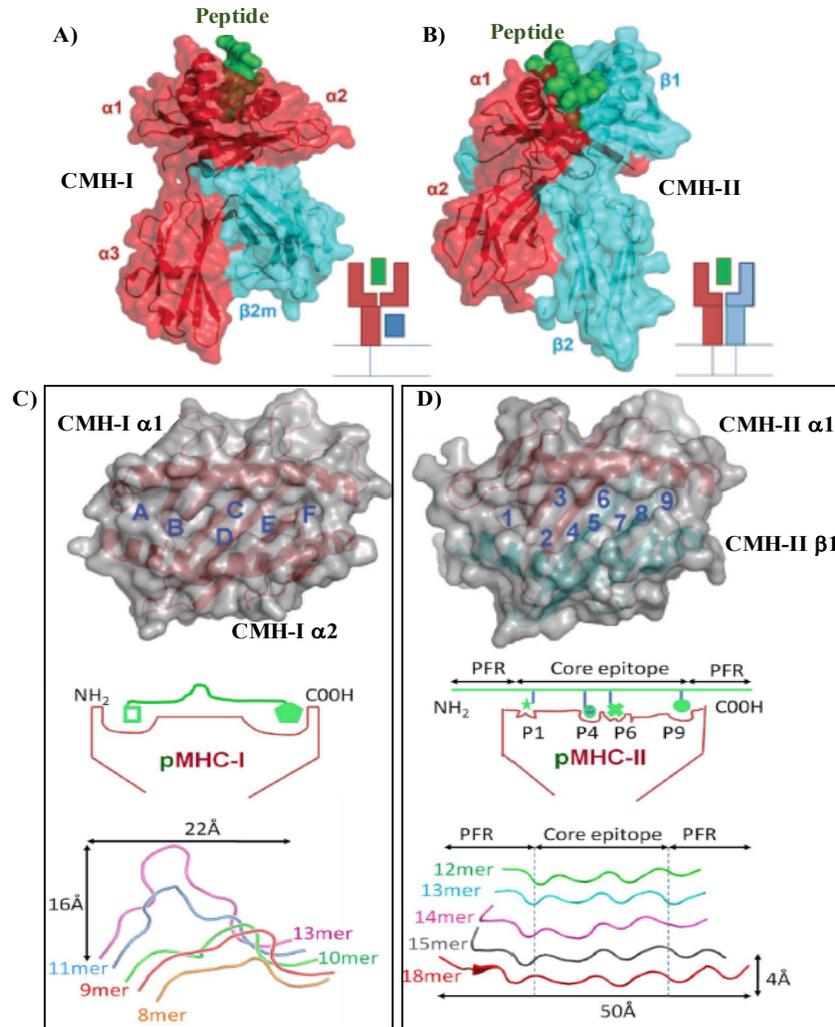
Les DC sont dotées de capacités de macropinocytose, de phagocytose ou d'endocytose de molécules exogènes afin d'être apprêtées et présentées par les molécules du CMH.

## 2.2. Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Les molécules du CMH (ou HLA pour *Human Leukocyte Antigen*) sont des glycoprotéines membranaires qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Elles comprennent trois classes de gènes : classes I, II et III mais ce sont les molécules du CMH « classiques » de classe I (HLA A, B, C) et de classe II (HLA DP, DQ, DR) qui présentent les peptides antigéniques respectivement aux LT CD8+ et CD4+. Elles sont assez polymorphes et nous distinguons 12544 allèles pour les molécules du CMH de classe I et 4622 allèles pour les molécules du CMH de classe II. La nomenclature des gènes du CMH classique est bien définie internationalement. Elle inclut

le nom du gène (ex : DRB1=locus HLA ; gène qui code pour la chaîne  $\beta$  d'une molécule DR) séparé par "\*" des numéros de la famille allélique et de l'allèle dans cette famille. Exemple : HLA-DRB1\*0101. Les deux classes se distinguent par leur structure, leur mode de liaisons aux peptides et leur distribution histologique. En effet, les molécules du CMH de classe I sont formées par une chaîne lourde  $\alpha$  qui possède trois domaines extracellulaires.  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  forment un sillon fermé dans lequel se trouve le peptide antigénique de 9 acides aminés (aa) en moyenne (8-13 aa) puisque ses deux extrémités seront bloquées au niveau du sillon. Le domaine  $\alpha 3$  s'associe à une chaîne légère invariante  $\beta 2$ -microglobuline ( $\beta 2m$ ) (**Figure 20 A et C**). Quant aux molécules du CMH de classe II, elles sont formées par deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  comportant chacune deux domaines extracellulaires. Les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  délimitent le sillon de présentation qui est plutôt ouvert et présente des peptides antigéniques d'environ 15 aa (12-20 aa) (**Figure 20 B et D**). Par différence aux molécules du CMH de classe I qui sont ubiquitaires et présentes sur toutes les cellules nucléées, les molécules du CMH de classe II sont plutôt exprimées au niveau des APC professionnelles (Holland et al. 2013).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que des molécules proches du CMH peuvent aussi jouer un rôle dans les mécanismes allergiques. A titre d'exemple, les molécules CD1 sont des glycoprotéines membranaires structurellement proches des molécules du CMH. Elles sont spécialisées dans la présentation des antigènes lipidiques et récemment il a été montré que l'expression de CD1a sur les LC jouerait un rôle important dans le déclenchement de l'EAC à l'urushiol (molécule trouvée dans les plantes de la famille des *Anacardiaceae*) (Kim et al. 2016).



**Figure 20: La structure des molécules du CMH de classe I et II (Holland et al. 2013)**

(A-B) structure générale des molécules du CMH de classe I et II. (C-D) structure des poches des peptides. Dans le cas des molécules du CMH de classe I, les résidus directement impliqués dans l'interaction avec le TCR sont positionnés au centre de la séquence peptidique. Plus la taille du peptide augmente et plus la poche, de nature fermée, pousse les résidus centraux à l'extérieur du sillon. Par contre, la poche des molécules du CMH de classe II est ouverte aux extrémités, et les peptides présentés possèdent une conformation linéaire indépendante de leur taille. PFR : peptide flanking region.

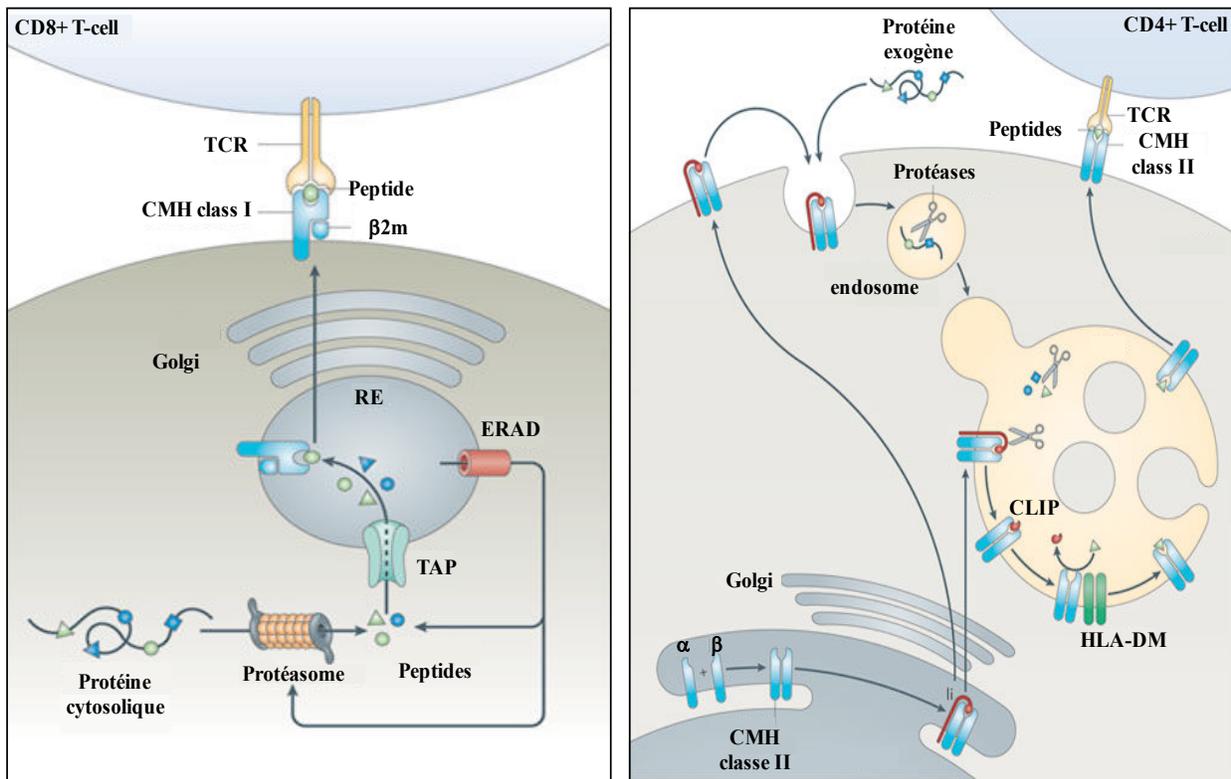
### 2.3. Apprêtement de l'antigène et présentation par les molécules du CMH de classe I

Les antigènes cytoplasmiques ou nucléaires (du soi défectueux ou du non-soi) sont dégradés en peptides par le protéasome, avant d'être transportés jusqu'au réticulum endoplasmique (RE) par le transporteur TAP (*Transporter Associated with Antigen Processing*) où ils vont s'associer

aux molécules du CMH de classe I. Après digestion par le protéasome, les peptides peuvent être aussi digérés par des aminopeptidases cytoplasmiques ou du RE en peptide de taille adéquate. Initialement les chaînes  $\alpha$  du CMH de classe I sont liées à une protéine chaperonne (la calnexine) pour se fixer ensuite à la  $\beta 2m$ . Le complexe ainsi formé se libère de la calnexine, lie d'autres protéines chaperonnes (calréticuline et Erp57) et s'associe à TAP *via* la tapasine. Le peptide compatible pourra alors se positionner dans la poche du CMH de classe I. Le complexe peptide/CMH se libère de la TAP et il est ensuite adressé vers la surface de la cellule en passant par l'appareil de Golgi (Neefjes et al. 2011) (**Figure 21**).

Le protéasome, à l'état basal, est un complexe multiprotéique constitué de deux parties : la partie catalytique 20S portant l'activité peptidase et la partie régulatrice 19S permettant la reconnaissance spécifique des protéines ubiquitinyllées. Le protéasome 20S comporte 28 sous-unités arrangées en 4 anneaux empilés. Les 2 anneaux périphériques contiennent les sous-unités  $\alpha$  tandis que les anneaux internes sont composés des sous-unités  $\beta$  dont trois constituent les sites actifs du protéasome ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 5$ ). En cas d'infection et suite à la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- $\gamma$ , l'activité du protéasome est altérée dans le but de produire des peptides antigéniques. Les sous-unités actives  $\beta$  seront remplacées respectivement par des "immuno-sous-unités" : LMP2 ( $\beta 1i$ ), MECL1 ( $\beta 2i$ ) et LMP7 ( $\beta 5i$ ), aboutissant ainsi à l'immunoprotéasome. Il est intéressant de noter que le protéasome peut aussi dégrader des protéines luminales ou membranaires extraites du RE (ERAD *ER-associated degradation*). Des études *in vitro* ont montré l'efficacité de l'immunoprotéasome dans la génération de peptides viraux antigéniques (Kloetzel and Ossendorp 2004). Par ailleurs, les souris LMP2 et LMP7 KO possède un répertoire de LT CD8+ altéré (de Verteuil et al. 2010). Le rôle du protéasome dans les mécanismes allergiques est moins bien documenté. L'inhibition du protéasome dans les APC altère

la prolifération *in vitro* des LT spécifiques de l'AX isolés des patients ayant développé un DILI suite au traitement par l'association AX + acide clavulanique (Kim et al. 2015). Théoriquement, ceci est plutôt le cas des molécules chimiques ou médicamenteuses qui se comportent comme des haptènes et où l'apprêtement de l'antigène jouerait un rôle important dans l'activation des LT spécifiques (*cf. chapitre 3 partie IV-3.1*).



**Figure 21: Mécanismes cellulaires de l'apprêtement des protéines antigéniques dans la cellule dendritique d'après (Neeffes et al. 2011)**

*TAP : Transporter Associated with Antigen Processing ; ERAD : ER-associated degradation ; CLIP : class II associated invariant chain peptides ; RE : réticulum endoplasmique*

#### 2.4. Apprêtement de l'antigène et présentation par les molécules du CMH de classe II

Les antigènes exogènes, après leur internalisation, sont fragmentés par des protéases dans l'endosome. La voie endocytaire comporte un réseau de plusieurs compartiments et que au fur et

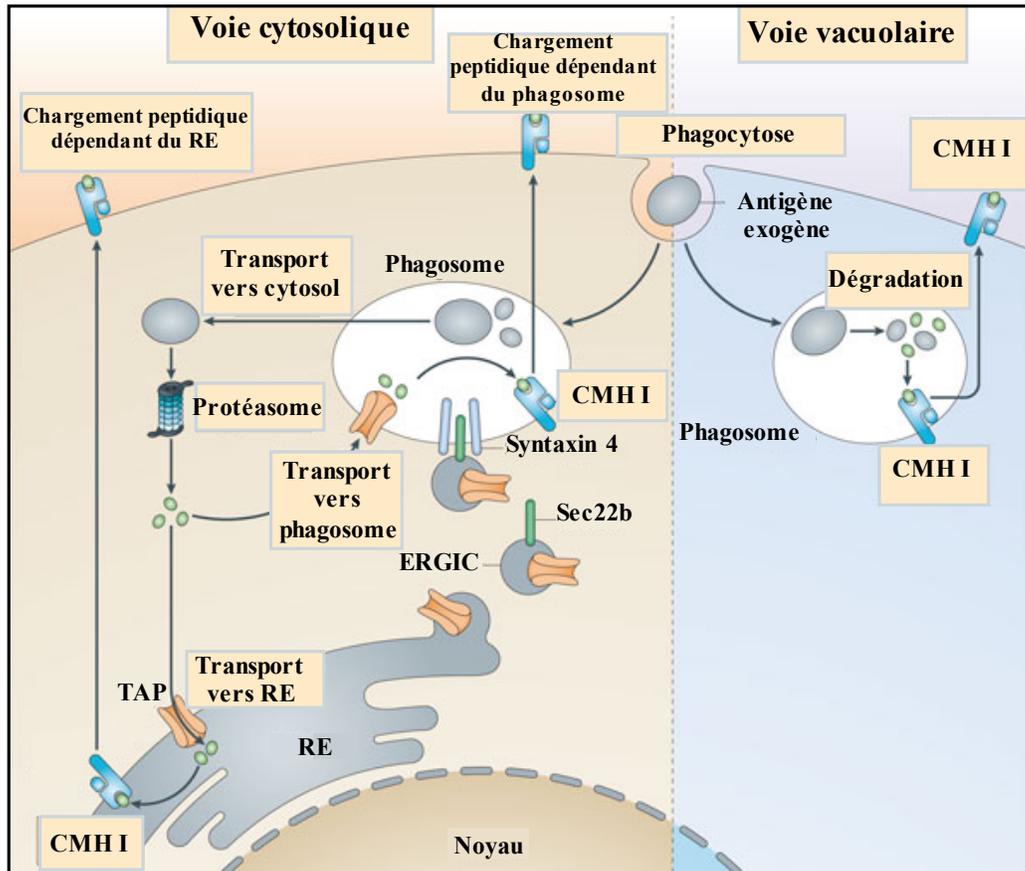
à mesure que la protéine passe d'un compartiment à l'autre, avec un pH de plus en plus acide, elle est sujette à une activité protéolytique plus intense. Les molécules du CMH de classe II sont synthétisées dans le RE et sont associées à la chaîne invariante "Ii" qui aide la molécule à se replier correctement. La poche du CMH de classe II est par ailleurs bloquée par CLIP (*class II associated invariant chain peptides*). La chaîne invariante déroute le complexe vers les compartiments de la voie endocytaire où elle sera dégradée puis le fragment CLIP est échangé avec un peptide compatible grâce à une molécule échangeuse HLA-DM. Le complexe CMH-II/peptide sera ensuite dirigé vers la membrane plasmique (Neefjes et al. 2011) (**Figure 21**).

### 2.5. Mécanismes de la présentation croisée

La présentation croisée ou « *cross-presentation* » permet la présentation d'antigènes exogènes par les molécules du CMH de classe I, ou bien la présentation d'antigènes cytoplasmiques par les molécules du CMH de classe II (rôle de l'autophagie) (Veerappan Ganesan and Eisenlohr 2017) (**Figure 19**).

Il existe deux voies de présentation croisée aux LT CD8+ (**Figure 22**). La voie vacuolaire où l'antigène endocyté sera dégradé au sein du compartiment endocytaire d'une manière indépendante du protéasome mais sensible aux protéases lysosomiales et à la cathepsine-S. Par contre, la voie cytosolique, elle, est dépendante du protéasome et de la protéine TAP. En effet, l'antigène internalisé dans le phagosome, par exemple, doit gagner le cytosol pour être digéré par le protéasome. Ceci est possible *via* la protéine Sec61. Les peptides produits peuvent rejoindre la voie classique de présentation par les molécules du CMH de classe I (transport dans le RE *via* la TAP) ou bien l'assemblage pourrait se faire au niveau du compartiment endocytaire. En effet, la protéine Sec22b localisée au niveau du compartiment intermédiaire RE-golgi (ERGIC) interagit

avec la syntaxin 4 au niveau de l'endo/phagosome et permet le recrutement des différents composants du RE dont la TAP (Joffre et al. 2012; Alloatti et al. 2016).



**Figure 22: Mécanismes cellulaires de la présentation croisée d'après (Joffre et al. 2012).**

*TAP : Transporter Associated with Antigen Processing ; ERGIC : compartiment intermédiaire RE-golgi.*

### **III. Présentation de l'antigène aux lymphocytes T : rôle des signaux de danger**

En plus de la présentation antigénique (complexe CMH/peptide) par les DC aux LT (signal 1) que nous venons de présenter dans la partie II, l'activation des LT nécessite la présence de molécules de co-stimulation (signal 2) et des cytokines sécrétées par les DC (signal 3). Plus concrètement, nous allons détailler, dans cette partie, le rôle des molécules chimiques et médicamenteuses dans le déclenchement du processus de maturation des DC aboutissant à l'activation des LT.

#### **1. La théorie du « signal de danger »**

Etant donné que notre système immunitaire est exposé d'une manière continue à des molécules endogènes ou exogènes, il est important qu'il puisse détecter les antigènes qui présentent un danger pour l'organisme indépendamment de leur origine (antigène du soi ou du non-soi). Ainsi, en 1994, Polly Matzinger introduit la théorie du "signal de danger" qui correspond aux signaux qui vont déterminer si la reconnaissance de l'antigène conduira à une réponse immunitaire adaptative ou à la tolérance (Matzinger 1994). Ces signaux de danger sont essentiels pour les DC pour qu'elles puissent reconnaître un environnement cellulaire altéré, créé par l'antigène, et produire une réponse immunitaire efficace pour éliminer le danger. Par conséquent, les DC acquièrent un phénotype effecteur à la place de celui tolérogène. Ce dernier sera adopté par les DC en absence de signaux de danger (Matzinger 1994; Matzinger 2002; Matzinger 2012).

Les signaux de danger peuvent être des molécules exogènes PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) [LPS (lipopolysaccharide), PGN (peptidoglycane)] ou endogènes DAMP (*Damage-Associated Molecular Patterns*) constitutives ou inductibles, intracellulaires [HSP, acide

urique, HMGB1 (*High-Mobility Group Box*), ATP (adénosine triphosphate), ROS (espèces réactives de l'oxygène)] ou extracellulaires [Low-MWHA (acide hyaluronique de faible poids moléculaire)] (Schaefer 2014). D'autres signaux de danger incluent les cytokines pro-inflammatoires [TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor*) ; IL-1 $\beta$ ] (Ryan et al. 2007).

### 1.1. Les récepteurs des signaux de danger

Les DC, et la plupart des cellules de l'immunité innée, sont équipées de nombreux récepteurs PRR (*patterns recognition receptors*) capables de détecter les PAMP et DAMP. Ces récepteurs peuvent être exprimés à la surface cellulaire [les récepteurs Toll-like (TLR), les récepteurs aux lectines de type C (CLR)] ou intracellulaires [TLR ; les récepteurs Nod-like (NLR), l'inflammasome et les récepteurs RIG-like (RLR)] (Schaefer 2014).

#### 1.1.1. Les récepteurs Toll-like (TLR)

Les TLR constituent une famille de protéines transmembranaires homologues de la protéine Toll initialement identifiée chez la drosophile. 10 TLR humains et 13 TLR murins ont été identifiés. Bien que les cDC expriment la plupart des TLR, les pDC expriment principalement les TLR7 et 9. La plupart des TLR sont exprimés au niveau de la membrane plasmique à l'exception des TLR 3, 7, 8 et 9 qui sont localisés au niveau de la membrane endosomale (**Figure 23**). En fonction du ligand qu'ils reconnaissent, les TLR peuvent être subdivisés en plusieurs familles : les TLR qui reconnaissent les lipides et les lipopeptides (TLR1, 2, 4 et 6 qui reconnaissent des lipopeptides tri ou diacycle), les protéines (TLR5 qui reconnaît la flagelline) ou les acides nucléiques (TLR3, 7, 8 et 9). Après fixation du ligand, la signalisation intracellulaire sera déclenchée grâce au domaine intracytoplasmique des TLR, le domaine TIR (*Toll IL-1 Receptor*).

Ainsi les TLR (sauf TLR3) activent une voie de signalisation dépendante de l'adaptateur MyD88 (*Myeloid Differentiation Factor 88*) et qui aboutit à une activation des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) et des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa B*) et AP-1 (*Activated Protein-1*). En revanche, le TLR3 active une voie MyD88 indépendante (passant par l'adaptateur TRIF : *TIR Domain Containing Adapter Inducing IFN- $\beta$* ) et qui aboutit *in fine* à l'activation des IRF (*Interferon Regulatory Factor*) (IRF3 essentiellement) et la production de l'IFN de type I. Le TLR4 a la particularité de pouvoir activer les 2 voies (Yu et al. 2010; Schaefer 2014; De Nardo 2015) (**Figure 23**).

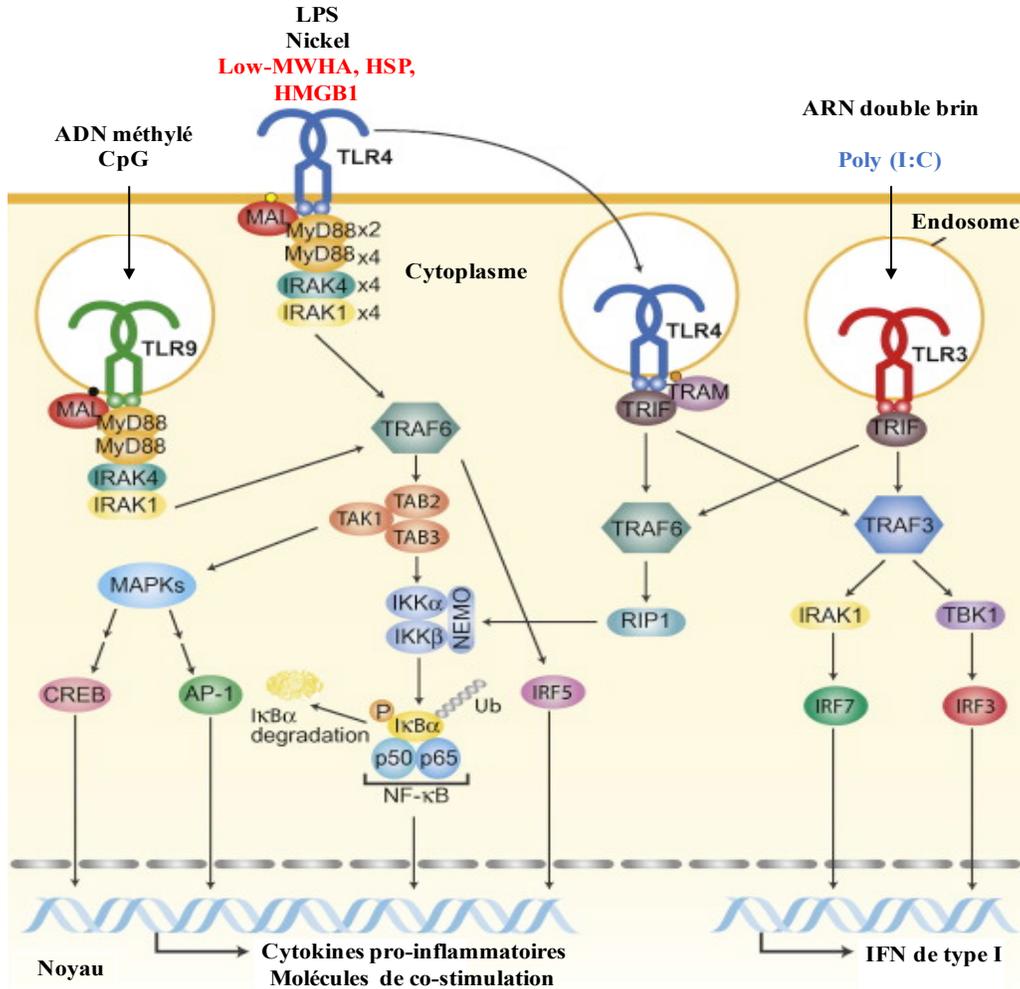
### 1.1.2. Les autres récepteurs des signaux de danger

En plus de leur rôle dans l'internalisation de l'antigène, les CLR peuvent déclencher des signalisations intracellulaires qui ont des points communs avec celles déclenchées par les TLR. Une des particularités de cette famille réside par le fait que certains membres présentent un motif ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) capables d'induire des kinases comme Syk (*Spleen tyrosine kinase*). D'autres membres, dépourvus de motifs ITAM dans leur partie intracellulaire, se lie au Fc $\gamma$ R (ex Dectin 2) ou à DAP12 (ex CLEC5A) qui transmet le signal *via* son motif ITAM. A noter que certains récepteurs comme le CLEC12B possèdent des motifs ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*) qui inhibent la signalisation en aval et d'autres comme les récepteurs au mannose (CD206) et DEC 205 n'activent pas une signalisation ITAM-dépendante (Hoving et al. 2014).

Les NLR sont des récepteurs intracellulaires de PAMP (PGN) et DAMP (ATP, acide urique) comportant plusieurs membres dont NOD1 (*Nucleotide-Binding Oligomerization*), NOD2 et NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*). Elles sont caractérisées par un

domaine LRR (*Leucine-Rich Repeat*) en partie C-terminale, un domaine central d'oligomérisation et une partie N-terminale comportant un domaine de recrutement des caspases (CARD) pour les NOD et un domaine pyrine pour les NLRP. Une fois activées, NOD1 et 2 activent les voies de MAPK et NF- $\kappa$ B alors que les protéines NLRP s'oligomérisent et s'associent avec la pro-caspase 1 et un adaptateur ASC (*adaptor protein apoptosis speck protein with caspase recruitment*) formant ainsi un complexe multiprotéique appelé inflammasome. Ce dernier est impliqué dans l'activation de la caspase 1 qui pourra alors cliver la pro-IL-1 $\beta$  et la pro-IL-18 (Franchi et al. 2012).

Les RLR (RIG-I, MDA5) sont aussi des récepteurs cytosoliques mais spécialisés dans la reconnaissance de génome viraux et qui utilisent des adaptateurs MAVS (*Mitochondrial antiviral-signaling protein*) pour induire une signalisation intracellulaire *via* les facteurs de transcription IRF et NF- $\kappa$ B. Il est intéressant de noter que d'autres récepteurs participent aussi à la reconnaissance d'acides nucléiques dans le cytosol et sont regroupés dans la famille CNAS (*cytosolic nucleic acid sensors*) (Dempsey and Bowie 2015).



**Figure 23: Exemple de signalisation intracellulaire induite par les TLR humains d'après (De Nardo 2015)**

La liaison du ligand à son récepteur entraîne le recrutement des kinases IRAK (interleukin-1 receptor associated domain) (valable pour tous les TLR à l'exception du TLR3) par MyD88. IRAK1 se lie par la suite avec la molécule TRAF-6 (TNFR-associated factor-6). Le complexe ainsi formé interagit avec le complexe TAK1 (TGFβ-associated kinase-1) / TAB1 (TAK-1 binding protein-1) / TAB2. Ceci mène à l'activation de TAK1. Cette dernière serait responsable de la phosphorylation la protéine IKK (inhibitor of nuclear factor-κB kinase) qui, à son tour, phosphoryle les protéines IκBs, libérant ainsi le facteur de transcription NF-κB. TAK1 permet aussi l'activation des MAPK dont p38MAPK, JNK, et ERK. L'activation du TLR3 ou 4 induit le recrutement de la protéine TRIF (TIR domain containing Adapter Protein inducing IFN), d'une manière directe pour TLR3 ou via la molécule adaptatrice TRAM (TRIF Adapter Protein). TRIF peut induire l'activation de TRAF-6 et de TBK1 (TANK-binding kinase 1) phosphorylant ainsi le facteur de transcription IRF3(interferon regulatory factor). Agonistes exogènes ; Agonistes endogènes ; Agonistes synthétiques ; HSP : heat shock protein ; HMGB1 : high-mobility group box 1 ; MWHA : molecular weight hyaluronic acid.

## **1.2. Les conséquences de la reconnaissance des signaux de danger : maturation des cellules dendritiques**

La reconnaissance des PAMP et DAMP par les DC à travers les différents PRR déclenche un processus de maturation des DC, les faisant passer de cellules captatrices de l'antigène, au niveau des tissus périphériques, à des cellules présentatrices de l'antigène, au niveau du ganglion lymphatique. Les DC vont donc perdre leur capacité d'endocytose et l'expression des molécules d'E-cadhérine qui leur permettent d'adhérer aux cellules épithéliales. D'autre part, les DC perdent l'expression de certains récepteurs aux chimiokines (CCR1, CCR2, CCR5, et CXCR1) (Seyfizadeh et al. 2016) et acquièrent l'expression d'enzymes protéolytiques comme les métalloprotéinases (MMP2, MMP9) (Ratzinger et al. 2002) et d'autres récepteurs aux chimiokines qui leur permettent de migrer de l'épiderme vers le derme (cas des LC) et des tissus périphériques vers les ganglions lymphatiques (Seyfizadeh et al. 2016).

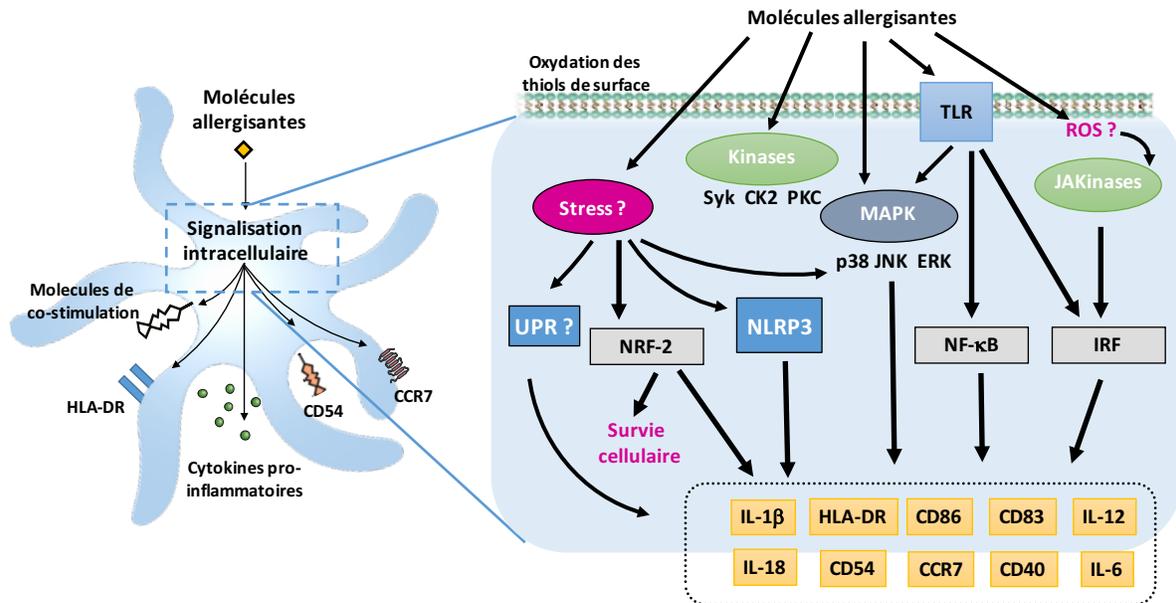
Ainsi la migration des LC de l'épiderme vers le derme serait assurée par le couple CXCL12 (produit par les fibroblastes) et CXCR4 (exprimé sur les DC) (Ouwehand et al. 2008). L'inhibition de CXCR4 altère l'HSC induite par le DNFB (Kabashima et al. 2007). D'autre part, plusieurs chimiokines interviennent dans la migration des DC vers les ganglions lymphatiques (Seyfizadeh et al. 2016). Outre le couple CXCL12/CXCR4 (Kabashima et al. 2007), les DC matures acquièrent l'expression de CCR7 : récepteur de CCL21 et CCL19 (Förster et al. 1999). Ces deux chimiokines sont produites dans les zones T et par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques (CCL21) et les cellules stromales attirant ainsi les DC en contact avec les LT (Comerford et al. 2013). Il est intéressant de noter que le couple CCR7/CCL21 semble aussi jouer un rôle dans la migration des DC des vaisseaux lymphatiques vers le ganglion lymphatique drainant (Russo et al. 2016). Par ailleurs, CX3CL1 est sécrétée par les cellules endothéliales lymphatiques en réponse à une inflammation et attire les DC (exprimant CX3CR1) vers les ganglions lymphatiques

(Johnson and Jackson 2013). L'inhibition de CX3CL1 altère l'HSC induite par l'oxazolone (Johnson and Jackson 2013). D'autre part, un gradient de chimiokine CXCL13 (produit par les DC folliculaires) dans les ganglions lymphatiques oriente les DC vers les follicules B (Förster et al. 2012). Outre les chimiokines, il a été récemment démontré un rôle important de NLRP12 dans la migration des DC vers les ganglions lymphatiques sans affecter leur maturation. Ainsi, l'HSC induite par l'oxazolone est diminuée chez des souris invalidées pour *nlrp12* (Arthur et al. 2010).

D'autre part, au cours de leur maturation les DC augmentent l'expression, à leur surface cellulaire, des molécules d'activation des LT (CD83), des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86) et d'adhésion (CD54) et secrètent essentiellement des cytokines pro-inflammatoires (Ryan et al. 2007; Bakdash et al. 2013).

## 2. Les molécules chimiques et médicamenteuses sont-elles capables d'induire des signaux de danger reconnus par les cellules dendritiques ?

### 2.1. Activation directe des cellules dendritiques



**Figure 24: Schéma général des voies de signalisations activées par les molécules allergisantes dans la cellule dendritique**

L'activation directe des DC par les molécules allergisantes est illustrée par une multitude d'études rapportées dans la littérature. CK2 : casein kinase 2 ; IRF : interferon regulatory factor ; Jak : janus kinase ; MAPK : mitogen-activated protein kinases ; NF- $\kappa$ B : nuclear factor kappa B ; NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 ; NRF-2 : nuclear factor erythroid-2- related factor ; PKC : protein kinase C ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; Syk : spleen tyrosine kinase ; UPR : unfolded protein response.

#### 2.1.1. Modifications du phénotype des cellules dendritiques

Les molécules chimiques allergisantes sont capables d'activer d'une manière directe les DC induisant leur maturation (**Figure 24**). A titre d'exemple, le nickel et le DNCB sont capables d'induire l'expression de CCR7 dans les DC humaines générées *in vitro* à partir des progéniteurs CD34+ (CD34+-DC) et provoquent leur migration en réponse au CCL19 (Boislève et al. 2004).

Les molécules organiques ( DNCB, TNCB), les métaux (nickel et cobalt), l'eugénol et le CinA sont capables d'induire l'expression de CD54 dans un autre de modèle de DC générées *in vitro* : les MoDC (*monocyte-derived dendritic cells*) (Coutant et al. 1999; Manome et al. 1999; Tuschl et al. 2000; de Bourayne et al. 2017). Par ailleurs, toutes ces molécules augmentent au moins l'expression d'une molécule de co-stimulation (CD86, CD80 et CD40), du CD83 et de HLA-DR dans les différents modèles de DC humaines générées *in vitro* (Coutant et al. 1999; Manome et al. 1999; Tuschl et al. 2000; Boislève et al. 2005; Antonios et al. 2009). Elles sont aussi capables d'induire la production d'une multitude de cytokines pro-inflammatoires par les DC. A titre d'exemple, le DNCB et le nickel induisent la production d'IL-6, d'IL-1, d'IL-8 et du TNF- $\alpha$  dans les DC humaines (Aiba et al. 1997; Manome et al. 1999; De Smedt et al. 2001; Ade et al. 2007; Antonios et al. 2009; Antonios et al. 2010; Rachmawati et al. 2013; de Bourayne et al. 2017).

Le cas des molécules médicamenteuses est plus complexe et peu documenté (Séguin and Uetrecht 2003). Le SMX et son métabolite réactif (SMX-NO) sont capables d'induire l'expression du CD40 sans modification du CD80, du CD83 et du CD86, sur des DC humaines générées *in vitro*. D'une manière intéressante, l'inhibition du métabolisme intracellulaire des DC, empêche l'augmentation de CD40 par le SMX mais pas avec le SMX-NO. Ceci montre que l'activation des DC passe par un métabolisme intracellulaire du SMX et non pas par un récepteur membranaire (Sanderson et al. 2007). Par ailleurs, l'augmentation de CD40 est 5 fois plus intense chez les patients allergiques au SMX. Il est intéressant de noter que les signaux de danger augmentent significativement les adduits SMX-protéines dans les DC *in vitro* (Lavergne et al. 2009). Certaines pénicillines sont aussi capables d'induire la maturation des DC *in vitro* mise en relief par une augmentation de l'expression de l'IL-1 $\beta$  (BP, pénicilline V) et de gènes impliqués dans le stress oxydatif (*cesI*, *nqoI*) (BP, pénicilline V et ampicilline) (Sebastian et al. 2012).

### 2.1.2. Activation de voies de signalisations spécifiques dans les cellules dendritiques

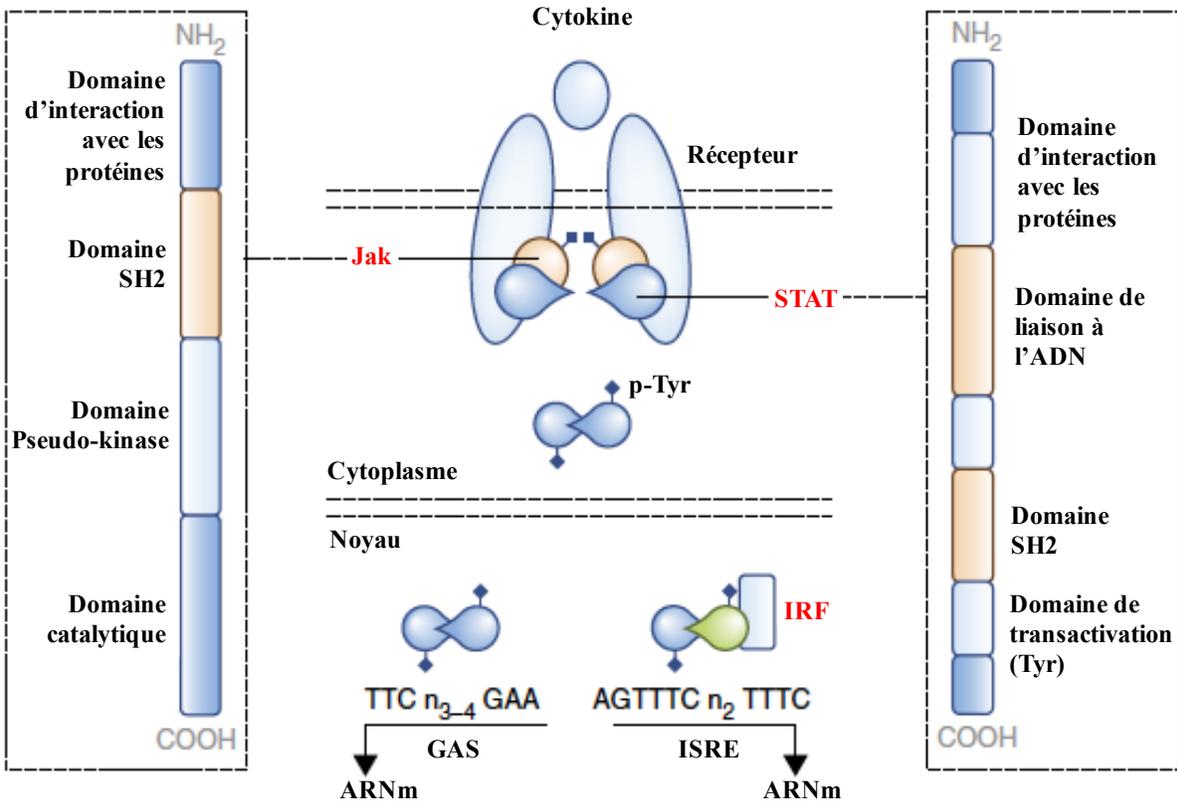
Il est bien connu que le phénotype des DC est bien régulé par un réseau de signalisations intracellulaires. Ainsi la littérature montre clairement que les molécules chimiques allergisantes peuvent activer des voies de signalisations intracellulaires dans les DC aboutissant à leur maturation (**Figure 24**). A titre d'exemple, le DNCB et le nickel sont capables d'induire une activation rapide des MAPK qui sont impliquées dans l'expression de molécules de co-stimulation et dans la production de cytokines pro-inflammatoires (Aiba et al. 2003; Boislève et al. 2004; Boislève et al. 2005; Antonios et al. 2009). La voie NF- $\kappa$ B est aussi activée par plusieurs molécules allergisantes et impliquée dans le processus de maturation des DC (Ade et al. 2007; Antonios et al. 2009; Antonios et al. 2010; Neves et al. 2011). D'autre part, l'AX est aussi capable d'activer les voies de MAPK et NF- $\kappa$ B mais uniquement dans les DC issues de patients allergiques à l'AX (Lopez et al. 2015).

Les molécules allergisantes sont capables d'induire un stress oxydatif dans les DC. En effet, NRF-2 (Nuclear Factor erythroid-2- Related Factor), est un autre facteur de transcription activé par les molécules allergisantes (Migdal et al. 2013; Mussotter et al. 2016; El Ali et al. 2017). Il est impliqué dans la défense contre le stress oxydant et le stress électrophile en induisant l'expression de nombreuses protéines cytoprotectives comme des enzymes antioxydantes et des enzymes de phase II et permet la survie des DC face aux molécules sensibilisantes (El Ali et al. 2017). L'invalidation de *nrf-2* chez des souris, entraîne une exacerbation de l'HSC induite par le DNCB (El Ali et al. 2013).

D'une manière intéressante, il a été montré que certaines molécules allergisantes sont capables d'activer des kinases en amont des voies de signalisation comme CK2 (*casein kinase 2*), PKC (*protein kinase C*), Syk et la voie Jak-STAT (Janus kinase/signal transducers and activators of

transcription). Grâce à un phosphokinome réalisé sur les DC humaines, il a été montré que le nickel et le DNCB sont capables d'activer CK2 et que son inhibition altère le phénotype mature des DC en réponse à ces molécules allergisantes (de Bourayne et al. 2017). PKC a été initialement impliquée dans la migration des DC de l'épiderme en réponse au TNCB et récemment PKC- $\beta$  a été impliquée dans l'induction de l'expression de CD86 dans les DC humaines (Corsini et al. 2014). En plus, les molécules allergisantes comme le TNBS (acide trinitrobenzène sulfonique) et la FITC (isothiocyanate de fluorescéine) peuvent activer Syk dans les DC induisant une synthèse de la pro-IL-1 $\beta$  (Yasukawa et al. 2014).

Par ailleurs, le nickel est capable d'induire une phosphorylation de STAT-1 sur des résidus serine et tyrosine dans les MoDC d'une manière respectivement dépendante de la p38 MAPK et de la voie Jak-STAT. Les résidus tyrosines participent à l'activation d'IRF-1 et à la production de l'IL-12p40 (Antonios et al. 2010). Cependant, l'identification de la protéine Jak impliquée dans l'activation des DC en réponse au nickel reste à déterminer. En effet, la famille des protéines Jak compte quatre membres : Jak1, Jak2, Tyk2 et Jak3. Bien que l'expression de Jak3 soit restreinte aux cellules hématopoïétiques (cellules NK, thymocytes, cellules T et B, cellules myéloïdes), Jak1, Jak2 et Tyk2 sont d'expression ubiquitaire. L'interaction récepteur-ligand induit l'activation des Jak qui phosphorylent alors les chaînes du récepteur activé et créent des sites d'ancrage pour des facteurs de transcription STAT *via* leur domaine SH2 (**Figure 25**). La multiplicité des Jak et des STAT (**Tableau 3**) conduit à la formation d'un grand nombre de combinaisons d'homo- et d'hétérodimères STAT ainsi que de plus larges complexes transcriptionnels qui participent à la régulation de l'expression de nombreux gènes (Seif et al. 2017).



**Figure 25: Activation de la voie Jak-STAT et signalisation intracellulaire (Villarino et al. 2017)**

La voie de signalisation Jak-STAT est déclenchée suite à l'association du ligand (Tableau 3) avec son récepteur. L'oligomérisation du récepteur induit la trans-activation de Jak et qui à son tour induit la phosphorylation du récepteur et crée ainsi le site de fixation des STAT. Une fois, les Jak et STAT sont à proximité, Jak phosphoryle les tyrosines des STAT (p-Tyr). Ceci entraîne la dimérisation des STAT, leur translocation nucléaire et leur liaison à l'ADN. Les STAT peuvent se lier au motif GAS (Interferon-Gamma Activated Sequence) sauf STAT-2 qui se lie avec le complexe (STAT-1-IRF-9) au motif ISRE (Interferon-Stimulated Response Element). IRF: interferon regulatory factor.

A l'état physiologique, la voie Jak/STAT est finement régulée par trois familles de protéines : les phosphotyrosines phosphatases (SHP, CD45), les SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) et les PIAS (*protein inhibitor of activated STAT*). Bien que les tyrosine phosphatases et les PIAS soient constitutivement exprimées, les protéines SOCS sont induites par la voie Jak/STAT elle-même (Seif et al. 2017). Des molécules pharmacologiques peuvent aussi interférer avec la voie

Jak-STAT. Par exemple, le ruxolintib utilisé dans les syndromes myéloprolifératifs est un inhibiteur de Jak1 et Jak2 alors que le tofacitinib qui bloque essentiellement Jak1 et Jak3 est utilisé dans la polyarthrite rhumatoïde (Welsch et al. 2017; Villarino et al. 2017). Par ailleurs, des inhibiteurs de la voie Jak-STAT sont aussi en cours d'étude dans plusieurs pathologies inflammatoires cutanées tels que le tofacitinib en application topique dans la dermatite atopique (Bissonnette et al. 2016; Villarino et al. 2017).

**Tableau 3: Liste de quelques ligands de la voie Jak-STAT d'après (Seif et al. 2017)**

	IL-3, G-CSF, GM-CSF, IL-5, GH	IL-2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21	IL-4	IL-6, IL-11	IL-12	IL-13	IFN- I ( $\alpha,\beta$ )	IFN-II ( $\gamma$ )	IL-10	IL-23
Jak 1		■	■	■		■	■	■	■	
Jak 2	■			■	■	■		■		■
Jak 3		■	■							
Tyk 2				■	■	■	■			■
STAT 1		■					■	■		
STAT 2							■			
STAT 3		■		■					■	■
STAT 4					■		■			■
STAT 5a	■	■								
STAT 5b	■	■								
STAT 6			■			■				

### 2.1.3. Mécanismes d'activation des voies de signalisations intracellulaires

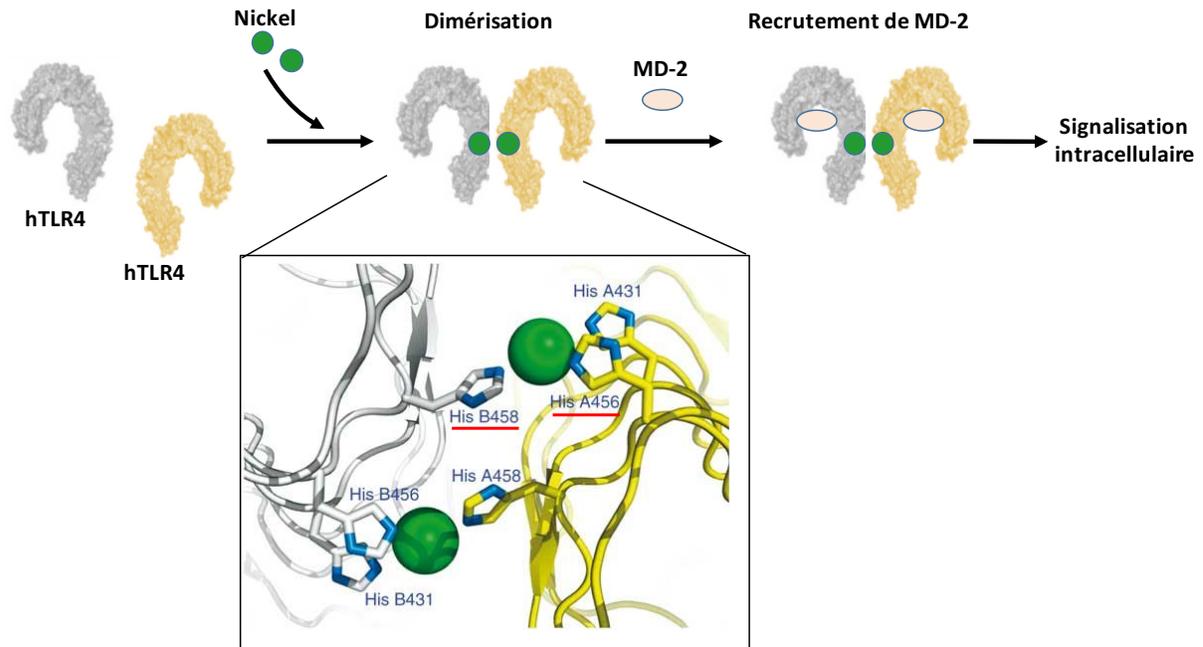
#### 2.1.3.1. Activation de récepteurs cellulaires spécifiques : exemple des métaux

L'activation des signalisations intracellulaires par le nickel était au début rattachée à une induction secondaire du TNF- $\alpha$  vu l'analogie dans l'activation de p38 MAPK et de NF- $\kappa$ B entre le nickel et le TNF- $\alpha$ . Cette conclusion a poussé Viemann *et al* à réaliser une étude génomique sur des cellules humaines activées par les 2 *stimuli*. Bien que certains gènes semblent être régulés par les 2 *stimuli* et sensibles à l'inhibition de p38 MAPK et de NF- $\kappa$ B, une majorité de gènes est régulée uniquement par le nickel (Viemann et al. 2007). Ainsi l'induction de gènes pro-inflammatoires par le nickel ne peut pas être due à une simple production secondaire de TNF- $\alpha$ . Vu la cinétique rapide d'activation de MAPK et de NF- $\kappa$ B par le nickel, la présence d'un récepteur cellulaire pour le nickel a été suspectée. Ceci est mis en relief par des expériences d'inhibition de MyD88 et d'IRAK1 et qui ont abouti à une abolition de l'activité pro-inflammatoire du nickel. Ainsi les chercheurs ont examiné le rôle des TLR comme récepteur du nickel après exclusion d'un rôle pour le récepteur de l'IL-1 (qui active aussi une signalisation *via* IRAK1). Enfin, il a été montré que le nickel était un agoniste du TLR4 en se liant aux groupements imidazoles de deux résidus histidines (His 456 et His 458) présents au niveau du TLR4 humain (**Figure 26**). En effet, l'expression du TLR4 humain et de son co-récepteur MD2 simultanément dans des cellules endothéliales HEK293, qui n'expriment pas de TLR à l'état basal, leur confère une capacité de répondre à une activation par du nickel. Ces résidus His sont absents du TLR4 murin ce qui explique pourquoi le nickel est un faible sensibilisant chez la souris. Par contre des souris transgéniques pour le TLR4 humain développent une HSC normale au nickel (Schmidt et al. 2010b). Outre le nickel, d'autres métaux tels que le cobalt et le palladium sont aussi capables d'activer les DC *via* le TLR4 (Schmidt and Goebeler 2011; Raghavan et al. 2012; Rachmawati et

al. 2013). Quant à l'or métal (Au), il peut induire une maturation des DC *via* le TLR3 (Rachmawati et al. 2015).

Bien que le LPS soit aussi un agoniste du TLR4, le mécanisme par lequel le nickel et le cobalt activent ce récepteur diffère du LPS (Raghavan et al. 2012). Outre les histidines engagées, il a été montré que le nickel et le cobalt n'ont pas besoin de MD2 pour induire la dimérisation du TLR4 (forme active) comme le LPS. Cependant MD2 est recrutée après la dimérisation du récepteur et est crucial pour activer la signalisation intracellulaire (**Figure 26**) (Raghavan et al. 2012; Oblak et al. 2015). D'une manière intéressante, l'utilisation d'un récepteur soluble TLR4 en thérapeutique pourrait être avantageuse car il pourra séquestrer les métaux sans altérer l'activation du TLR4 par les constituants bactériens (Raghavan et al. 2012).

Malgré la découverte du TLR4 comme récepteur pour le nickel, il est intéressant de noter que ce dernier peut aussi activer des voies de signalisation indépendamment du TLR4. En effet, HIF-1 $\alpha$  (*transcription factor hypoxia-inducible factor 1*) est stabilisé en réponse à une hypoxie et induit l'expression de gènes pro-angiogéniques. Le nickel mime les conditions d'hypoxie en induisant une stabilisation de HIF-1 $\alpha$  indépendamment de la voie NF- $\kappa$ B et du TLR4 (Viemann et al. 2007; Schmidt and Goebeler 2011). Le nickel peut aussi diminuer l'expression de cFLIP (*FLICE-like inhibitory protein*), un inhibiteur des caspases pro-apoptiques, d'une manière indépendante des MAPK et de NF- $\kappa$ B, et rend les cellules sensibles à l'apoptose médiée par TRAIL (*tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) (Schmidt et al. 2010a).



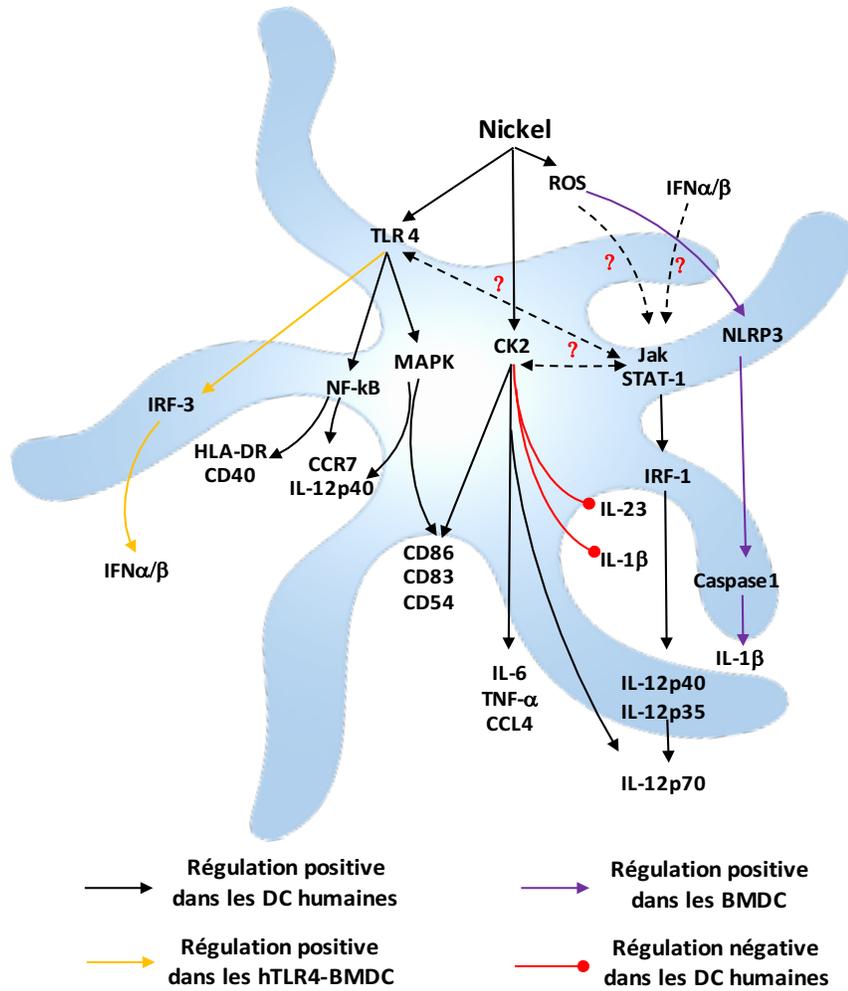
**Figure 26: Modèle d'activation du TLR4 humain par le nickel d'après (Schmidt et al. 2010b; Raghavan et al. 2012)**

*Le nickel est capable d'activer le TLR4 humain en se fixant sur deux résidus histidines soulignés en rouge (His 456 et His 458).*

### 2.1.3.2. Production d'espèces réactives de l'oxygène

La plupart des molécules allergisantes et surtout celles organiques sont capables d'induire la production de ROS dans les DC humaines (Byamba et al. 2010; Corsini et al. 2013). Les ROS sont connues pour agir comme des seconds messagers, impliqués dans des signalisations intracellulaires (Neves et al. 2011; Corsini et al. 2013) et aboutissant à l'activation des DC (Martin et al. 2011; Kaplan et al. 2012; Martin 2012). Le prétraitement des cellules par des antioxydants comme la N-acétylcystéine (NAC) entraîne une diminution de la phosphorylation de p38 MAPK associée à une diminution de l'expression de CD86 en réponse aux molécules sensibilisantes (DNCB, thiomersal) dans les DC (Neves et al. 2011). La plupart des molécules allergisantes sont

aussi capables d'induire plusieurs gènes et protéines impliqués dans le stress oxydatif (Mussotter et al. 2016). Par ailleurs, il a été montré récemment l'implication du stress généré par le RE dans la maturation des DC. En effet, dans certaines conditions d'accumulation de protéines mal-repliées et/ou en cas de perturbations de l'homéostasie calcique du RE, la voie UPR (*unfolded protein response*) est déclenchée afin de rétablir l'homéostasie (Cho and Uetrecht 2017). Ainsi, il a été montré que le DNFB est capable d'induire, d'une manière dépendante des ROS, l'activation de la voie PERK-eIF $\alpha$ -ATF4 (une des 3 branches de la voie UPR) entraînant la modification phénotypique des cellules pro-monocytaires humaines (THP-1) (Luís et al. 2014). D'autre part, le TNBS (Yasukawa et al. 2014), le nickel (Li and Zhong 2014), le chrome hexavalent (Adam et al. 2017), et l'ABC (Toksoy et al. 2017) sont capables d'activer l'inflammasome NLRP3 *via* la production de ROS aboutissant à l'activation de la caspase 1 et à la production de l'IL-1 $\beta$ . Il est intéressant de noter que l'activation de l'inflammasome induite par le chrome et l'ABC ne survient qu'en synergie avec un prétraitement des cellules par des agonistes TLR ou par des esters de phorbol (TPA) (Adam et al. 2017; Toksoy et al. 2017).



**Figure 27: Schéma général des voies de signalisations activées par le nickel dans les cellules dendritiques**

*BMDC : bone-marrow derived dendritic cells ; CK2 : casein kinase 2 ; IRF : interferon regulatory factor ; Jak : janus kinase ; MAPK : mitogen-activated protein kinases ; NF-κB : nuclear factor kappa B ; NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 ; ROS : espèces réactives de l'oxygène.*

## 2.2. Activation indirecte des cellules dendritiques : modification de l'épimmunome

Les molécules allergisantes sont aussi capables d'activer indirectement les cellules dendritiques à travers une modification du microenvironnement cellulaire (kératinocytes, cellules épithéliales, hépatocytes...) et entraînent la production de signaux de danger (DAMP). Cette idée

découle d'une observation intéressante concernant le TNCB. En effet, ce dernier n'est pas capable d'induire une activation complète des DC *in vitro*. Plus particulièrement, les DC traitées par du TNCB augmentent l'expression de molécules de co-stimulation mais ne sécrètent pas de cytokines pro-inflammatoires (Martin et al. 2008). En plus, l'observation que le TNCB est incapable d'induire une HSC chez des souris invalidées pour le *tlr2* et le *tlr4* mais pas chez des souris sauvages ou axéniques (*germe-free*), illustre encore une fois l'importance des TLR dans cette pathologie cutanée et montre la capacité des molécules allergisantes à induire des signaux de dangers endogènes (DAMP) au niveau de la peau (Tsan and Gao 2004; Martin et al. 2008; Esser et al. 2012; Kaplan et al. 2012).

Ainsi les molécules allergisantes sont capables d'induire un stress oxydatif, une perturbation du statut cellulaire en glutathion (Schmidt and Chung 1993), une production de ROS (Vandebriel et al. 2010; Wang et al. 2010; Esser et al. 2012; Galbiati et al. 2014; Onami et al. 2014) et la libération de MWA de faible poids moléculaire (Esser et al. 2012; Nikitovic et al. 2015; Kavasi et al. 2017), d'ATP (Onami et al. 2014) et d'HMGB1 (Galbiati et al. 2014) par les cellules cutanées. En effet, les kératinocytes représentent environ 90% des cellules épidermiques et sont des acteurs essentiels de l'immunité innée. Ces cellules expriment une multitude de PRR (surtout des TLR et NLR) qui leur permettent de reconnaître des PAMP et DAMP. A leur tour, les kératinocytes constituent une importante source de peptides antimicrobiens et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et d'autres DAMP qui peuvent jouer un rôle dans l'activation des DC et dans la création d'un environnement pro-inflammatoire (Nestle et al. 2009). A titre d'exemple, il a été montré récemment que les molécules organiques sensibilisantes sont capables d'induire la libération d'ATP par ouverture des canaux transmembranaires pannexines dans les kératinocytes d'une manière dépendante des ROS (Onami et al. 2014). Ainsi, la libération d'ATP par les cellules

stressées module la réponse immunitaire à travers son récepteur P2X7 et aboutit à une activation de l'inflammasome et à la production de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18. D'une manière intéressante les souris invalidées pour le récepteur P2X7 sont résistantes à l'induction de l'HSC par le DNCB (Watanabe et al. 2007; Weber et al. 2010; Kaplan et al. 2012). En plus, il a été montré récemment que le DNCB induit l'expression de Blimp1 (*B-lymphocyte-induced maturation protein-1*) dans les kératinocytes *in vitro*. Ce dernier agit comme un répresseur de NLRP12, un régulateur négatif de l'inflammasome NLRP3, et permet ainsi la production de l'IL-18 (Papale et al. 2017).

Les molécules allergisantes sont aussi capables d'induire la libération d'HMGB1 par les kératinocytes aboutissant à une production de l'IL-18 *via* un mécanisme dépendant du TLR4 (Galbiati et al. 2014). D'autre part, la libération de MWA de faible poids moléculaire par le micro-environnement entraîne une activation des DC à travers les TLR2 et TLR4 (Termeer et al. 2002; Scheibner et al. 2006) et l'inhibition de l'hyaluronidase (HYAL), enzyme clé dans la dégradation du MWA de haut poids moléculaire en faible poids moléculaire, réduit l'HSC induite par le DNCB (Martin et al. 2008). Parallèlement, une surexpression constitutive de l'HYAL dans la peau des souris résulte en une exacerbation de l'HSC (Muto et al. 2014). Par ailleurs, l'augmentation de l'activité de l'HYAL par les molécules allergisantes au niveau cutané est aussi médiée par les ROS et l'activation de p38 MAPK (Esser et al. 2012; Nikitovic et al. 2015).

D'autre part, l'interaction entre le TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*, sécrété par les kératinocytes et les cellules épithéliales, et son récepteur TSLPR, exprimé par les DC, représente un autre exemple d'interaction entre l'épimunome et les DC (Saito et al. 2016). En effet, le TSLP peut induire la maturation des DC aboutissant à une réponse lymphocytaire Th2 (Soumelis et al. 2002; Kitajima and Ziegler 2013; Ochiai et al. 2014). Ainsi, en utilisant un modèle de souris allergiques au nickel (après administration d'un adjuvant), il a été montré une augmentation de

l'expression de TSLP au niveau des cellules épithéliales des oreilles des souris et une production de TSLP par les kératinocytes *in vitro*, associée à une augmentation de l'expression de TSLPR au niveau des DC. D'une manière intéressante, l'injection de siRNA pour le *tslp* au niveau des oreilles de souris sensibilisées par le nickel altère l'HSC lors d'un contact ultérieur (Ashrin et al. 2014). L'implication de ce mécanisme dans l'EAC induit par le nickel chez l'homme reste à démontrer puisque l'expression de TSLP n'a pas été détectée dans les biopsies cutanées de patients allergiques au nickel (Soumelis et al. 2002).

Il est intéressant de noter que des études récentes ont révélé le rôle des canaux TRP (*transient receptor potential*) dans l'EAC. En effet, les canaux TRP représentent une grande famille qui comprend plus de 50 canaux perméables aux cations suite à leur activation par de nombreux ligands ou suite à une modification du pH ou de la température. Au niveau de la peau, ces canaux sont essentiellement exprimés au niveau des kératinocytes, des neurones sensitifs, des mélanocytes et des cellules immunitaires (Caterina and Pang 2016). Plus particulièrement, l'HSC induite par l'oxazolone, l'urushiol (Liu et al. 2013) et le cinA (Silva et al. 2011) est diminuée chez les souris invalidées pour *trpa1* ou après utilisation de son antagoniste. D'une manière intéressante, l'induction de l'HSC par le DNFB semble être plus intense dans un modèle de souris présentant une mutation de gain de fonction du TRPV3. Ceci est associé à une augmentation de la production de TSLP au niveau des kératinocytes et à une plus forte migration des DC vers les ganglions lymphatiques (Yamamoto-Kasai et al. 2013).

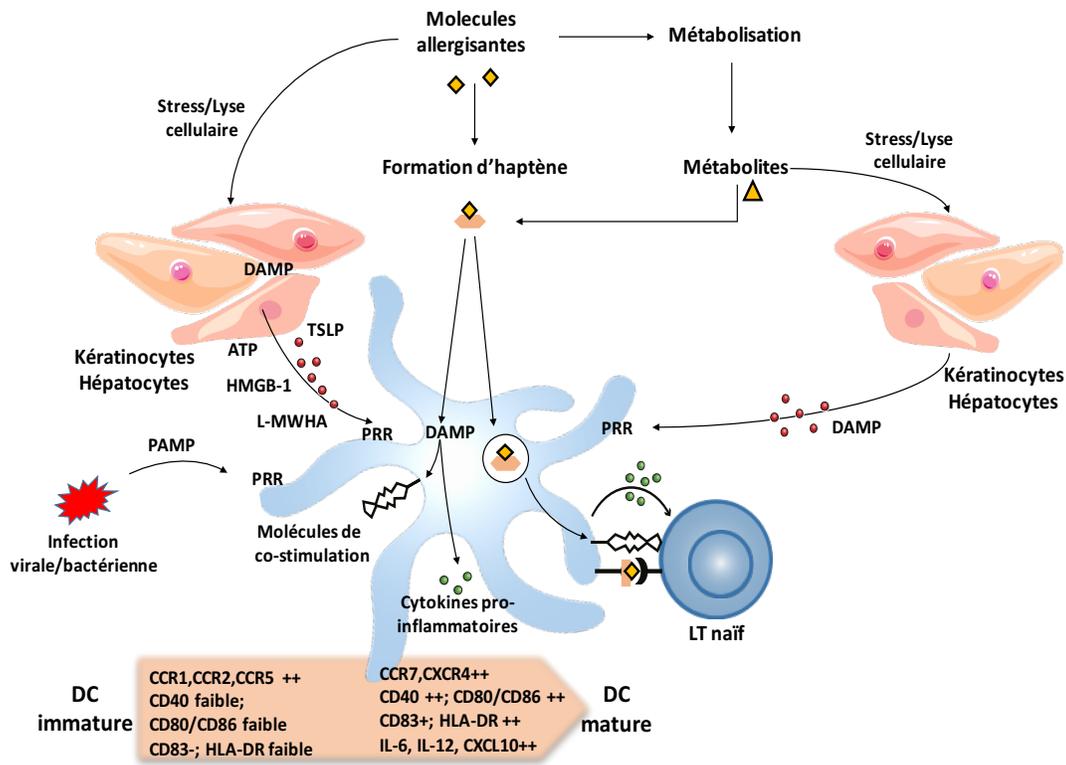
Plusieurs molécules médicamenteuses sont aussi capables de modifier l'épimune. A titre d'exemple, la 12-hydroxy NVP (métabolite hépatique de la NVP) semble induire des signaux de danger au niveau de la peau et l'expression de divers gènes impliqués dans la destruction tissulaire et l'inflammation (Zhang et al. 2013). L'induction des DAMP par les molécules médicamenteuses

a été aussi observée au niveau hépatique puisque le foie constitue l'organe principal de leur métabolisation et la production de métabolites réactifs (Cho and Uetrecht 2017). Ce mécanisme est l'un des facteurs qui pourrait aboutir au DILI. Ainsi, les hépatocytes lésés peuvent libérer de l'ATP, d'HMGB1, des ROS mais aussi du matériel génomique (ADN) qui pourrait agir *via* le TLR9 afin de créer un environnement pro-inflammatoire et activer les cellules de l'immunité innée dont les DC (Imaeda et al. 2009; Martin 2014). A titre d'exemple, la CBZ et la phénytoïne sont capables d'induire un stress oxydatif au niveau hépatique (Lu et al. 2008). Le SMX-NO et la FLU sont aussi capables de provoquer la libération d'HMGB1 par hépatocytes humains (Ogese et al. 2015). D'une manière intéressante, le surnageant des hépatocytes stimulés par ces médicaments induit la maturation des DC *in vitro* (Ogese et al. 2015).

### **3. Le concept de l'immunité innée hétérologue**

Comme nous venons de présenter dans les paragraphes précédents, certaines molécules chimiques et médicamenteuses allergisantes sont capables d'activer des PRR d'une manière directe ou indirecte *via* les DAMP. Une vraie particularité des molécules sensibilisantes et leur capacité à apporter ce signal de danger en plus du signal antigénique. Cependant, nous pouvons assister à des cas où le seuil d'activation des cellules de l'immunité innée n'est pas atteint et donc ne permet pas le déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative. A part l'exposition répétée, le concept de l'immunité hétérologue permet de dépasser ce seuil (Martin 2014). Il s'agit en effet de la synergie créée entre plusieurs molécules allergisantes ou bien entre des molécules allergisantes et des irritants ou même entre une molécule inerte (du point de vue activation des PRR) et une infection bactérienne ou virale par exemple. Plusieurs exemples témoignent de cette hypothèse. En effet, le nickel n'est pas allergisant chez la souris par défaut de fixation sur le TLR4

murin (Schmidt et al. 2010b), cependant en association avec du LPS ou des irritants (SDS), il serait capable d'induire une HSC (Artik et al. 1999; Takahashi et al. 2011). D'une manière intéressante, la combinaison de l'AX avec des agonistes TLR induit significativement la maturation des DC *in vitro* chez des patients allergiques à l'AX (Sanchez-Quintero et al. 2013). D'une manière générale, les réactions allergiques médicamenteuses sont plus communes chez des patients présentant des infections virales. Ceci pourrait être dû en partie aux signaux de danger et à l'environnement pro-inflammatoire créé par ces infections (Shiohara and Kano 2007) (*cf. chapitre 3, partie V-2*).



**Figure 28: Activation directe ou indirecte des cellules dendritiques par les molécules allergisantes**

*En plus du signal antigénique, les molécules allergisantes peuvent induire l'activation des DC d'une manière directe (nickel) ou indirecte (molécules chimiques organiques) à travers la libération de DAMP qui agissent comme des seconds messagers. Par conséquent, les DC acquièrent un phénotype mature qui leur permet d'activer les LT spécifiques. ATP : adenosine triphosphate ; DAMP : damage-associated molecular patterns ; DC : cellule dendritique ; HMGB1 : high-mobility group box 1 ; MSHA : molecular weight hyaluronic acid ; PAMP : pathogen-associated molecular patterns ; PRR : patterns recognition receptors.*

## **IV. Présence d'un répertoire de lymphocytes T reconnaissant l'antigène**

La maturation des cellules dendritiques est une étape critique du processus de déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative. Cependant, l'absence d'un répertoire de LT capable de reconnaître l'antigène rend peu probable l'activation des LT et le déclenchement de l'immunité adaptative. Les LT circulent dans l'organisme et entrent en contact avec les DC présentant à leur surface le complexe CMH/peptide (pCMH). La reconnaissance par le TCR du pCMH qui lui est spécifique entraîne une cascade de signalisation intracellulaire qui aboutit à une activation des LT accompagnée d'une production de cytokine (polarisation). La formation d'haptène, son internalisation et sa présentation sous forme de peptides hapténisés ne représentent qu'un des modes de reconnaissance et d'activation des LT. Ainsi, dans cette partie, nous allons présenter les différents mécanismes de reconnaissance des molécules allergisantes par les LT et leurs conséquences.

### **1. Développement du répertoire des lymphocytes T**

Les précurseurs de LT se développent dans la moelle osseuse puis migrent dans le thymus. A ce stade, on les qualifie de thymocytes. Leur développement dans le thymus passe par plusieurs étapes s'effectuant du cortex vers la médulla et allant de précurseurs doubles négatifs (DN) pour le CD4 et le CD8 vers des précurseurs doubles positifs (DP) pour enfin aboutir à des précurseurs simples positifs CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> (SP). Durant ce processus, les thymocytes vont acquérir un TCR fonctionnel suite à un réarrangement génique de la chaîne  $\beta$  en premier lieu, son association après avec la chaîne  $\alpha$  pour former un pré-TCR et la sélection  $\beta$  qui aboutit à la prolifération des

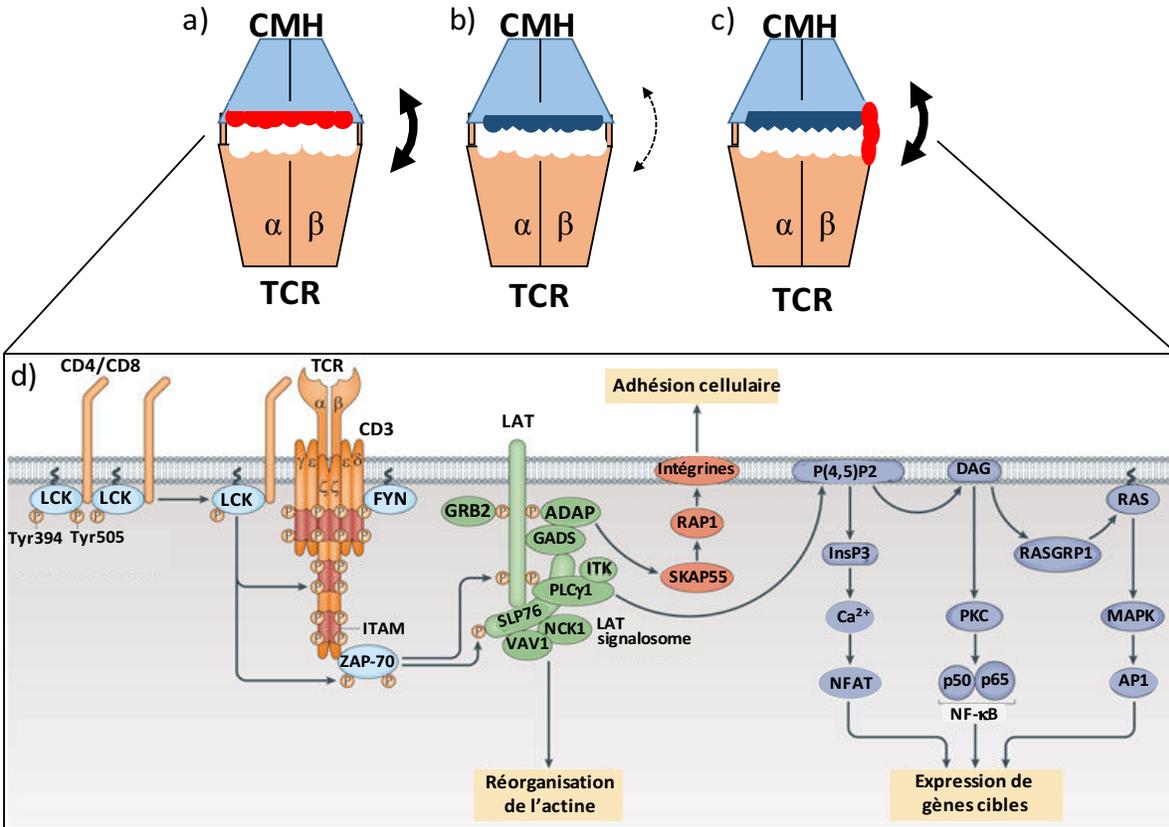
thymocytes DN ayant un réarrangement productif de la chaîne  $\beta$  du TCR. Une fois le TCR exprimé à la membrane, les thymocytes vont interagir essentiellement avec les cellules corticales épithéliales (cTEC), les DC thymiques et les cellules épithéliales médullaires (mTEC). Ces interactions permettent la sélection des thymocytes dont le TCR est capable de reconnaître avec une affinité suffisante un antigène du soi présenté par les molécules du CMH (sélection positive surtout avec cTEC) et d'autre part éliminer ceux ayant une forte affinité pour les antigènes du soi (sélection négative surtout avec mTEC). En effet, environ 50 millions de thymocytes CD4+CD8+ (DP : double positive) sont générés par jour au niveau du thymus de la souris mais plus de 90% de ces précurseurs ne recevront pas un signal de survie et meurent par négligence. Environ 2% des thymocytes survivent à cette double sélection et arrivent à maturité. Ils sont par la suite exportés du thymus vers la périphérie et forment ainsi un répertoire périphérique de LT naïfs. Ils sont qualifiés de naïfs tant qu'ils n'ont pas rencontré leur antigène spécifique (Klein et al. 2014).

## 2. Structure du récepteur de l'antigène des lymphocytes T (TCR)

Le TCR est un hétérodimère constitué de deux chaînes polypeptidiques  $\alpha$  et  $\beta$  pour la majorité des LT. La spécificité des TCR d'un LT donné provient du réarrangement génique des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . En effet, le locus du TCR  $\alpha$  contient des segments géniques codant pour la partie variable V, pour la jonction J et pour un segment constant C. En plus de ces segments géniques, le locus du TCR  $\beta$  contient des segments codant pour la partie diversité D. Un TCR  $\alpha\beta$  provient d'un réarrangement unique, lors de la sélection des thymocytes dans le thymus, de tous ces segments géniques, et est ainsi composé d'une combinaison unique de  $V\alpha$ ,  $J\alpha$ , et  $C\alpha$  pour la chaîne  $\alpha$  et de  $V\beta$ ,  $J\beta$ ,  $D\beta$  et  $C\beta$  pour la chaîne  $\beta$ . Les régions variables des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont constituées de deux feuillets  $\beta$  reliés entre eux par un pont disulfure. Chaque domaine variable expose trois

boucles vers l'extérieur (CDR1, CDR2 et CDR3). Elles sont appelées régions hypervariables et sont aptes à interagir avec le complexe pCMH. Plus particulièrement, les régions CDR1 et CDR2 entrent en contact avec le CMH alors que la région CDR3 entre en contact avec le peptide. Suite aux différents processus de diversification, la diversité potentielle des TCR $\alpha\beta$  est estimée à  $10^{20}$  chez l'homme mais elle est largement supérieure à la capacité cellulaire du compartiment lymphocytaire T périphérique. Ainsi, la diversité TCR $\alpha\beta$  disponible est estimée à  $2.5 \times 10^7$  (Zarnitsyna et al. 2013). La nature des liaisons engendrées entre le TCR et le pCMH détermine l'affinité du TCR. Le complexe CMH-peptides exogènes comme ceux qui dérive d'un pathogène présente une forte affinité pour le TCR qui lui correspond (**Figure 29a**). En revanche, à cause de la sélection négative au niveau du thymus, les LT matures présentent une faible affinité pour le complexe CMH-peptide du soi et donc le LT ne sera pas stimulé (**Figure 29b**). Quant aux superantigènes, ils sont reconnus par un ou plusieurs V $\beta$  du TCR et par les molécules du CMH indépendamment du peptide présent dans le poche CMH. De ce fait, les superantigènes peuvent activer un grand nombre de LT (**Figure 29c**).

Le TCR est associé au complexe CD3 qui joue un rôle important dans la transduction du signal à travers des motifs ITAM phosphorylés sous l'action d'une kinase Lck (**Figure 29d**). Quant aux molécules CD4 et CD8, elles permettent de stabiliser l'interaction TCR/pCMH (Nikolich-Zugich et al. 2004; van der Merwe and Dushek 2011; Malissen and Bongrand 2015).



**Figure 29: Le complexe TCR/CD3 et la reconnaissance de l'antigène d'après (Brownlie and Zamoyska 2013)**

a) cas d'un peptide (en rouge) qui provient d'une protéine du non-soi ; b) cas d'un peptide (en bleu) qui provient d'une protéine du soi ; c) cas d'un superantigène (en rouge) ; d) signalisation intracellulaire et transduction du signal : Suite à l'engagement du TCR, la tyrosine kinase Lck est activée permettant la phosphorylation des résidus tyrosine des motifs ITAM des chaînes CD3. La principale protéine recrutée sur les motifs ITAM est la tyrosine kinase ZAP-70. Cette dernière phosphoryle la protéine d'échafaudage LAT qui orchestre la formation de complexes multiprotéiques au niveau la membrane plasmique. Ces complexes vont déclencher une signalisation intracellulaire qui aboutit au réarrangement du cytosquelette et à l'activation de gènes cibles.

### 3. Mécanismes de reconnaissance de l'antigène et d'activation des lymphocytes T

#### 3.1. La théorie de l'haptène

C'est le mécanisme le plus rencontré avec les molécules allergisantes qui se comportent comme des haptènes. En effet, le complexe formé par la molécule allergisante ou son métabolite

réactif et la protéine circulante ou cellulaire serait pris en charge par la DC, digéré en peptides hapténisés et présenté aux LT. Par différence avec le complexe CMH-peptide du soi, le complexe CMH-peptide du soi hapténisé possède une bonne affinité pour le TCR qui lui est spécifique et stimule le LT. Ce complexe CMH-peptide du soi hapténisé étant absent lors du développement des thymocytes dans le thymus (*cf. chapitre 3 partie IV-1 et 2*), le TCR qui leur est spécifique n'a pas été éliminé a priori du répertoire LT (Martin et al. 2010).

Ainsi, il a été démontré que les LT peuvent reconnaître des peptides hapténisés [peptide-TNP(trinitrophényl) ou peptide-BP] associés au CMH (von Bonin et al. 1992; Ortmann et al. 1992; Padovan et al. 1997; Scornet et al. 2016). En plus, les souris injectées par des DC chargées par les peptides-TNP développent une HSC en réponse au TNCB. Elles ont donc été sensibilisées par ces peptides hapténisés (Martin et al. 2000). Plusieurs études de prolifération lymphocytaire et de co-cultures autologues DC/LT *in vitro* (**Tableau 4**), ont montré la possibilité de détecter un répertoire de LT, chez des donneurs allergiques (PPD, BP, PIP), sensibilisés (cas du DNCB) ou sains (TNCB, BP), capable de proliférer en cas de co-culture avec des DC modifiées directement par l'haptène (DC traitées par du TNBS, DNCB, BB, BP, PIP) ou après utilisation d'un bioconjugué (TNP-HSA, DNP-HSA, PPD-HSA, BP-HSA, PIP-HSA) (**Tableau 4**). D'une manière intéressante, l'intensité de la réponse générée par les LT spécifiques semble être corrélée avec le taux de protéines hapténisées (Dietz et al. 2010; El-Ghaiesh et al. 2012; Meng et al. 2017) et la prolifération lymphocytaire est abrogée en cas d'inhibition de l'apprêtement de l'antigène par les DC en les fixant au glutaraldéhyde (Brander et al. 1995; Pickard et al. 2007; Jenkinson et al. 2010; El-Ghaiesh et al. 2012). En plus de la prolifération, le profil cytokinique des LT a été aussi étudié dans certaines études (Brander et al. 1995; Dai and Streilein 1998; Pickard et al. 2007; Vocanson et al. 2008; Dietz et al. 2010; Jenkinson et al. 2010).

Plusieurs études *in vitro* ont montré la capacité des sensibilisants forts comme le TNBS et la BB à induire une prolifération des LT isolés de donneurs sains ou allergiques ) (Moulon et al. 1993; Krasteva et al. 1996; Rougier et al. 1998; Rougier et al. 2000; Guironnet et al. 2000; Vocanson et al. 2008; Dietz et al. 2010; Gibson et al. 2015; Faulkner et al. 2016). Cependant, la détection d'un répertoire de LT spécifiques des sensibilisants faibles (citronellal, coumarine) semble être plus difficile et moins reproductible (Krasteva et al. 1996; Guironnet et al. 2000). Ceci pourrait être dû à la faible fréquence des précurseurs LT spécifiques dont la détection nécessite l'utilisation des méthodes plus sensibles.

La majorité des études avec les médicaments ont été réalisées essentiellement sur des patients allergiques et ont bien montré l'existence d'un répertoire de LT spécifiques dans le sang et les tissus de ces patients. Cependant, il a été récemment démontré l'existence d'un répertoire de LT naïfs spécifiques de l'AX, de la PIP, du SMX-NO et du bioconjugué HSA-BP dans le sang de donneurs sains (Faulkner et al. 2012; Nhim et al. 2013; Faulkner et al. 2016). D'une manière intéressante et très originale, des peptides candidats dérivant du bioconjugué HSA-BP et identifiés par une approche *in silico* (Scornet et al. 2016) sont aussi reconnus par les LT CD4<sup>+</sup> naïfs des donneurs sains et certains sont immunodominants : PT-BP, KV-BP, FS-BP, avec BP fixée respectivement sur les lysines 159, 525 and 212. Des clones spécifiques des peptides-BP reconnaissent aussi le bioconjugué HSA-BP et *vice-versa* appuyant une activation des LT selon un mécanisme dépendant de l'haptène. Deux de ces peptides immunodominants (Lys 159 et 525) ont été aussi reconnus par les PBMC de patients allergiques confirmant leur rôle dans la sensibilisation des patients (Azoury ME et al en révision).

**Tableau 4: Résumé général de quelques études *in vitro* mettant en relief l'activation des LT suivant la théorie de l'haptène**

Exemples de molécules chimiques allergisantes					
Références	Donneurs	APC	Lymphocyte T	Méthodes	Résultats majeurs
Moulon et al. 1993	Sains	LC chargées avec TNBS, FITC	LT CD45RA+	Co-culture pour 9 jours puis une restimulation	*LTT: Prolifération des LT en co-culture avec des LC modifiées par le TNBS dépendante du CMH I et II + Étude de la spécificité de la réponse (TNBS vs FITC)
Krasteva et al. 1996	Sains	LC chargées avec TNBS, FITC, PPD, BB, SDS	LT CD3+	Co-culture pour 4-7 jours	*LTT: Prolifération des LT en co-culture avec des LC modifiées par : TNBS (13/13); FITC (7/10); BB (6/6); PPD (1/10); coumarine (1/12); citronellal (0/10); OH-citronellal (2/8); SDS (0/10).
Dai and Streilein 1998	Sains sensibilisés (DNCB) et Sains	PBMC (+/- GM-CSF) chargés avec DNCB	LT CD3+	Co-culture pour 5 jours	*LTT : Prolifération des LT des donneurs sains et sensibilisés en co-culture avec des PBMC (+/- GM-CSF) chargés par du DNCB. *Production d'IFN- $\gamma$ .
Rougier et al. 1998	Sains	CD34+ DC chargées avec TNBS, FITC, SDS	LT totaux du sang de cordon LT CD45RA+ LT CD45RO+	Co-culture pour 10-14 jours	*LTT : Prolifération des LT (totaux et CD45RA+) en co-culture avec des CD34+ DC chargées par TNBS ou FITC. Intensité de la réponse est plus faible avec les LT CD45RO+.
Rougier et al. 2000	Sains	CD34+ DC chargées avec TNBS, FITC, SDS, PPD et BB	LT totaux du sang de cordon	Co-culture pour 12-14 jours (ajout d'IL-1 $\beta$ et d'IL-2)	*LTT : Prolifération des LT en co-culture avec des CD34+ DC chargées par du TNBS (49/50) ou du FITC (16/26) ou BB (47/50) mais pas avec les sensibilisants faibles même après ajout d'IL-1 $\beta$ et d'IL-2. Cependant une incubation à priori des DC avec les sensibilisants pendant 48h augmente la réponse.
Guironnet et al. 2000	Sains	MoDC chargées avec TNBS, FITC, Eugénol, Isoeugénol	LT périphériques	Co-culture pour 4-6 jours	*LTT: Prolifération des LT en co-culture avec des MoDC chargées par du TNBS (16/16) ou du FITC (8/16) mais pas avec les prohaptènes sauf si ces derniers sont ajoutés directement lors de la co-culture et en absence de lavage des DC.
Pickard et al. 2007	Sains sensibilisés (DNCB) et Sains	*Addition directe du DNCB en culture *LB chargés avec DNCB	PBMC LT CD4+ ou LT CD8+	LTT classique + clonage	*LTT : Prolifération des PBMC, CD4+ et CD8+ en réponse au DNCB seulement chez les sujets sensibilisés *Nécessité de l'apprêtement du DNCB (manip au glutaraldéhyde) * Production d'IFN- $\gamma$ , peu d'IL-5 et pas d'IL-10

Exemples de molécules chimiques allergisantes (suite)					
Références	Donneurs	APC	Lymphocyte T	Méthodes	Résultats majeurs
Vocanson et al. 2008	Sains	MoDC chargées avec TNBS, FITC, HCA	LT périphériques +/- déplétés en LT CD4+ CD25+	Co-culture pour 5-7 jours	*LTT : Augmentation significative du taux de prolifération des LT en co-culture avec des MoDC chargées en cas d'une déplétion préalable de CD4+CD25+ *Production d'IFN- $\gamma$ nettement plus significative en cas de déplétion CD4+CD25+
Dietz et al. 2010	Sains	MoDC chargées avec DNBS, TNBS, DNCB, DNP-HSA	LT CD45RA+ CD25-	Co-culture pour 5-7 jours (ajout d'IL-2, IL-7 et IL-15)	*LTT : Prolifération des LT en co-culture avec des MoDC chargées par du TNBS, du DNBS, du DNP-HSA mais pas avec le DNCB d'une manière dépendante du CMH I et II + Étude de la spécificité de la réponse (TNBS vs DNBS) *Détection de population LT CD4+ et CD8+ spécifiques des MoDC chargées avec DNBS, TNBS + production de l'IFN- $\gamma$
Jenkinson et al. 2010	Sains et allergiques (PPD)	*Ajout de PPD ou PPD-HSA directement en culture *LB chargés avec PPD ou PPD-HSA	PBMC	LTT classique + Clonage des lignées qui sont positives après LTT. (ajout d'IL-2)	*LTT : Prolifération des PBMC en réponse au PPD et PPD-HSA seulement chez les sujets allergiques *Production d'IL-4, IL-5, IL-13 *Détection de LT CD4+ et CD8+ et LT CD4+CD8+ spécifiques. *Nécessité de l'apprêtement pour PPD-HSA et dans 47% des clones pour la PPD seule.
Exemples de molécules médicamenteuses					
Références	Donneurs	APC	Lymphocyte T	Méthodes	Résultats majeurs
Brander et al. 1995	Sains et allergiques (BP)	*Addition directe de la BP ou du HSA-BP sur les PBMC *PBMC irradiés chargés avec BP ou HSA-BP	PBMC	LTT classique + clonage (ajout d'IL-2)	*LTT : Prolifération des PBMC de patients allergiques en réponse à la BP et à la HSA-BP *Clones positifs LT CD4+ et CD8+ pour la BP et LT CD4+ pour HSA-BP *Nécessité de l'apprêtement pour HSA-BP *ELISA : IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ mais IL-4 et IL-5 variable

Exemples de molécules médicamenteuses (suite)					
Références	Donneurs	APC	Lymphocyte T	Méthodes	Résultats majeurs
Whitaker et al. 2011	Patients atteints de mucoviscidose et allergiques à la PIP	*Addition directe de PIP sur les PBMC *LB chargés avec PIP ou HSA-PIP	PBMC LT CD3+	LTT classique + clonage (ajout d'IL-2) et restimulations	*LTT : Prolifération des PBMC et des LT CD3+ de patients allergiques en réponse à la PIP et à la HSA-PIP et sécrétion d'IFN- $\gamma$ /IL-13
El-Ghaiesh et al. 2012	Patients atteints de mucoviscidose et allergiques à la PIP	*Addition directe de PIP sur les PBMC *LB chargés avec PIP ou HSA-PIP	PBMC	LTT classique + clonage (ajout d'IL-2)	*LTT : Prolifération des PBMC de patients allergiques en réponse à la PIP et sécrétion d'IFN- $\gamma$ /IL-13 *Clones positifs LT CD4+, CD8+ et LT CD4+CD8+ *Clones positifs pour PIP sont aussi positifs pour la HSA-PIP et <i>vice-versa</i> * Nécessité de l'apprêtement pour HSA-PIP
Nhim et al. 2013	Sains	MoDC chargées avec HSA-BP	LT CD4+ LT CD4+ CD45RA+ LT CD4+ CD45RO+	Co-culture + 3 restimulations (ajout IL-12, IL-6, IL-2 et IL-7)	*Elispot IFN- $\gamma$ : Détection d'un répertoire de LT CD4+ spécifiques du HSA-BP chez 9/10 des donneurs sains. *Répertoire issu du pool de LT naïfs
Azoury ME et al. en révision Scornet et al. 2016	Sains Et allergiques	MoDC matures avec peptides-BP	LT CD4+ CD45RA+	Co-culture + 3 restimulations (ajout IL-12, IL-6, IL-2 et IL-7)	*Elispot IFN- $\gamma$ : Détection d'un répertoire de LT CD4+CD45RA+ spécifiques de certains peptides-BP chez 13/14 des donneurs sains. *Des lignées positives pour peptides-BP sont aussi positives pour HSA-BP et <i>vice-versa</i> *Identification de trois peptides-BP immunodominants : Lys 159, 212, 525 chez des donneurs sains et prolifération des PBMC de patients allergiques en réponse aux peptides-BP (Lys 159 et 525)
Meng et al. 2017	Allergique PIP	*Addition directe de PIP et HSA-PIP sur les PBMC *LB chargés avec PIP et HSA-PIP	PBMC	LTT classique + clonage (ajout d'IL-2)	*LTT : Prolifération des PBMC de patients allergiques en réponse à la PIP et à la HSA-PIP *Majorité des clones sont des LT CD4+. *Prédominance des V $\beta$ 5.1, 13.1 et 17 pour la PIP et un profil V $\beta$ plus restreint pour la HSA-PIP. *Nécessité de l'apprêtement pour PIP, et HSA-PIP

### 3.2. Pi-concept

Le pi-concept constitue un mécanisme alternatif par lequel une molécule est capable de stimuler le système immunitaire (Schnyder et al. 1997; Pichler et al. 2011) (**Figure 30**). Ce concept fait suite à des observations expérimentales *in vitro* montrant que certains médicaments et molécules chimiques considérés comme chimiquement non réactifs (sans métabolisation préalable) tels que le SMX, la lamotrigine, la CBZ, la lidocaïne, l'allopurinol, la PPD et les produits de contraste sont capables de se fixer directement entre le CMH et le TCR des LT de patients allergiques avec une affinité suffisante pour les activer. Ainsi, le pi-concept semble plutôt s'appliquer aux LT mémoires qui ont un seuil de réactivité plus bas que celui des LT naïfs.

Le métabolisme et l'apprêtement de l'antigène par les APC ne sont pas requis. Ainsi les APC fixées au glutaraldéhyde et chargées par les molécules sont capables d'activer les lignées lymphocytaires spécifiques de ces molécules (Mauri-Hellweg et al. 1995; Schnyder et al. 1997; Zanni et al. 1998a; Zanni et al. 1998b; Schnyder et al. 2000; Depta et al. 2004; Keller et al. 2010). L'activation rapide des LT est incompatible avec des étapes de métabolisation intracellulaire et constitue un autre argument en faveur du pi-concept. En effet, ces molécules entraînent quasi-immédiatement une augmentation rapide du calcium intracellulaire et une internalisation du TCR (Zanni et al. 1998a; Schnyder et al. 2000). Ainsi, ces molécules seraient capables d'interagir avec le complexe CMH-TCR *via* des liaisons non covalentes labiles et probablement d'une manière indépendante d'un peptide déjà présent dans la poche du CMH (SMX, CBZ) (Burkhart et al. 2002; Yang et al. 2007). Le lavage des APC chargées avec ces molécules avant de les mettre en co-culture avec les LT empêche l'activation de ces derniers. Plus particulièrement et *via* des études de modélisation moléculaire, l'affinité de liaison du SMX au complexe pCMH/TCR a été évaluée

à 121 Kj/mole ce qui équivaut à une faible liaison de covalence ou à plusieurs liaisons de coordination (Castrejon et al. 2010).

De la même manière qu'avec les pénicillines, le SMX peut entraîner une activation des LT selon la théorie de l'haptène (pro-haptène) ainsi le complexe SMX-NO-protéine est digéré en peptides, et ces peptides sont présentés aux LT de patients allergiques (Schnyder et al. 2000; Elsheikh et al. 2010; Castrejon et al. 2010). Le traitement des APC par des inhibiteurs du métabolisme pendant le chargement par le SMX empêche l'activation des LT spécifiques. De même, le traitement des APC par la GSH pendant le chargement par le SMX-NO empêche aussi l'activation des LT spécifiques (Burkhart et al. 2001; Elsheikh et al. 2010; Elsheikh et al. 2011). Ces observations mettent en relief le métabolisme intracellulaire de la SMX en SMX-NO et sont concordants avec l'implication du SMX-NO comme déterminant antigénique puisque la GSH réduit le SMX-NO en métabolites moins réactifs (SMX-hydroxylamine) et empêche l'activation de LT spécifiques.

Malgré que, les LT de patients atteints de mucoviscidose et allergiques au SMX reconnaissent exclusivement le SMX-NO (Elsheikh et al. 2011), plusieurs études *in vitro* montrent que le SMX peut également être directement présenté aux LT et agir majoritairement non pas *via* ses métabolites réactifs mais *via* le pi-concept (Mauri-Hellweg et al. 1995; Schnyder et al. 1997; Zanni et al. 1998a; Schnyder et al. 2000; Elsheikh et al. 2011).

Récemment le pi-concept a été divisé en deux sous-groupes (**Figure 30**). Dans le premier sous-groupe, la molécule se fixe en premier lieu sur le TCR (pi-TCR) (Yun et al. 2016). A titre d'exemple, l'activation de certains clones de LT spécifiques de la SMX ou de la lidocaïne est dépendante de la structure unique du TCR spécifique et ne nécessite pas la présence d'un peptide

donné avec une séquence d'acides aminés déterminée (Zanni et al. 1998b; Burkhart et al. 2002; Pichler et al. 2015).

Dans le second sous-groupe du pi-concept, les molécules se fixent au début sur les molécules HLA (pi-HLA) ; c'est le cas des médicaments dont l'action allergique est liée à un HLA particulier (allopurinol, FLU) (Yun et al. 2016). A titre d'exemple, le SJS/TEN et le DRESS liés à l'allopurinol sont associés au génotype HLA-B\*58:01. Les études *in vitro* ont montré que l'allopurinol et son métabolite (oxypurinol) sont capables d'induire quasi-immédiatement et indépendamment de l'apprêtement antigénique, la prolifération de LT de donneurs HLA-B\*58:01 indépendamment de leur statut allergique (Yun et al. 2013; Yun et al. 2014). D'une manière originale, il a été suggéré que le peptide présent dans la poche du CMH est capable de se dissocier de la poche pour laisser entrer l'allopurinol ou l'oxypurinol. Ces derniers vont ensuite se fixer sur des résidus arginine du HLA-B\*58:01 et altérer la conformation du peptide (Lin et al. 2015). La FLU se comporte aussi dans certains cas selon le concept du pi-HLA. En effet, Le DILI lié à la FLU est aussi associé à un HLA déterminé : HLA-B\*57:01 (Monshi et al. 2013) et la majorité des LT issus de donneur HLA-B\*57:01+ sont activés par la FLU selon le pi-concept alors que ceux des donneurs HLA-B\*57:01- sont activés selon la théorie de l'haptène (Wuillemin et al. 2013).

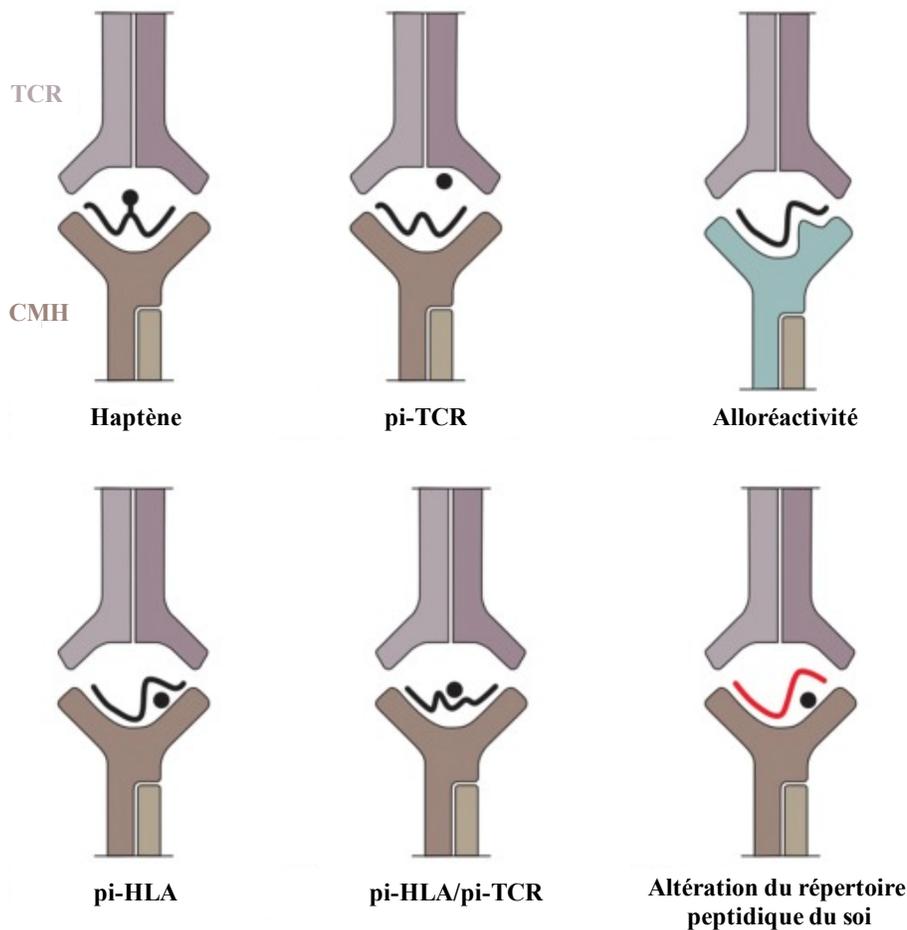
Certaines molécules peuvent faire partie des deux sous-groupes (pi-HLA et pi-TCR) (Yun et al. 2016; Zhou et al. 2016). A titre d'exemple, le SJS/TEN lié à la CBZ a été associé au HLA-B\*15:02 (résidus Asn63, Ile95, and Leu156)(Wei et al. 2012) d'une part et au TCR V $\beta$ -11-ISGSY d'autre part (Ko et al. 2011). En effet, les LT de donneurs HLA-B\*15:02+ et TCR V $\beta$ -11-ISGSY+ sont activés par la CBZ d'une manière rapide et indépendante de l'apprêtement antigénique (Ko et al. 2011). Il est intéressant de noter que 15% des peptides élués à partir des APC HLA-B\*15:02+ traitées par la CBZ sont différents de ceux qui se trouvent dans la poche HLA-B\*15:02 des APC

en absence de traitement par la CBZ (Illing et al. 2012). Ceci suggère qu'en plus du pi-concept, le modèle d'altération du répertoire peptidique du soi peut être impliqué (*cf. chapitre 3 partie IV-3.3*).

### **3.3. Altération du répertoire peptidique du soi**

Cette hypothèse a été évoquée suite à la caractérisation de la réaction d'hypersensibilité induite par l'ABC (syndrome d'hypersensibilité à l'ABC ; **Tableau 1**) et postule qu'une molécule chimique ou médicamenteuse peut modifier le recrutement des peptides dans la poche des molécules du CMH, permettant à un répertoire inapproprié de peptides du soi d'être présent dans cette poche (**Figure 30**). En effet, une forte association entre ce syndrome et le HLA-B\*57:01 a été décrite avec une valeur prédictive négative de 100% (Mallal et al. 2002).

Il a été proposé, grâce à des méthodes de cristallographie et d'éluion peptidiques, que l'ABC peut se lier au niveau de la poche F du sillon de présentation de la molécule HLA-B\*57:01 (résidu sérine) par des liaisons non covalentes et altère le répertoire habituel de peptides qui se lient à cette molécule du CMH. Au niveau de l'extrémité C-terminale, l'ABC favorise la liaison de peptides contenant des résidus aliphatiques de petite taille (valine, alanine ou isoleucine) au lieu des résidus hydrophobes comme le tryptophane ou la phénylalanine qui se lient habituellement à la molécule HLA-B\*57:01. Il est intéressant de noter qu'environ 20-45% des peptides élués à partir des APC HLA-B\*57:01+ traitées par l'ABC sont différents de ceux qui se trouvent dans la poche HLA-B\*57:01 en absence de l'ABC (Illing et al. 2012; Ostrov et al. 2012; Norcross et al. 2012). D'autre part, des études *in vitro* ont montré que des LT CD8+ naïfs et mémoires de donneur HLA-B\*57:01+ peuvent être activés par l'ABC (Chessman et al. 2008; Adam et al. 2012; Adam et al. 2014).



**Figure 30: Différentes hypothèses d'activation des lymphocytes T d'après (Yun et al. 2016).**

*Haptène : la molécule est conjuguée à un peptide dérivé d'une protéine du soi générant un nouveau déterminant antigénique présenté par les molécules du CMH ; Pi-concept : la molécule se lie de façon non covalente entre le TCR et la molécule du CMH ; Altération du répertoire peptidique du soi : la molécule change la spécificité de la poche CMH permettant à un nouveau répertoire de peptides du soi d'être présenté.*

### 3.4. Cas particulier des haptènes métalliques

Le nickel étant le métal le plus étudié, l'ensemble des études effectuées sur la reconnaissance du nickel par le TCR des LT a permis une meilleure compréhension de la réponse immunitaire spécifique des métaux. A la différence des haptènes/pro-haptènes, les ions  $Ni^{2+}$  engagent des liaisons de coordination avec les protéines et malgré l'activation des LT isolés de patients

allergiques au nickel par un bioconjugué HSA-Ni, ceci ne constitue pas le déterminant antigénique reconnu par les LT (Thierse et al. 2004). En effet, la HSA facilite le transfert du nickel vers le complexe CMH-TCR (Thierse et al. 2004; Thierse et al. 2005).

Différentes études ont permis de détecter des LT spécifiques du nickel dans le sang et les tissus de patients allergiques au nickel (Sinigaglia et al. 1985; Moulon et al. 1995; Albanesi et al. 2000). Les propriétés de ces clones de LT sont hétérogènes. Par exemple, la réactivité de certains clones spécifiques du nickel est strictement dépendante de l'apprêtement antigénique. Cependant, la majorité des clones présentent toujours une réactivité même après fixation des APC (Moulon et al. 1995; Nasorri et al. 2002; Gamerdinger et al. 2003). Bien qu'il n'y a pas d'association connue entre un HLA particulier et l'allergie au nickel, certains clones spécifiques du nickel (clones ANi-2.3) présentent une spécificité pour le HLA-DR52c (HLA-DRB3\*0301) (Lu et al. 2003). Il est intéressant de noter que la majorité des clones spécifiques du nickel (clones SE9 et ANi-2.3) expriment le V $\beta$ 17, nommé aussi TRBV19 selon la nomenclature IMGT (*The international ImMunoGeneTics information system*) (Moulon et al. 1995; Vollmer et al. 1997; Büdinger et al. 2001; Zhang et al. 2017).

Les premières études ont suggéré que le nickel était capable de modifier un peptide déjà présent dans la poche CMH ; ainsi il a été décrit comme modifiant la réactivité des clones spécifiques d'un peptide issu d'une protéine du *plasmodium* en se fixant sur des résidus His du peptide (Romagnoli et al. 1991). Il a été aussi proposé qu'en présence du nickel, l'apprêtement antigénique pourrait être altéré entraînant la présentation de nouveaux peptides cryptiques (Griem et al. 1998). Cette hypothèse a été aussi suggérée pour d'autres métaux tels que l'or ou le palladium (Griem et al. 1996; Griem et al. 1998). Plus tardivement, l'identification de l'épitope reconnu par les LT spécifiques du nickel a été adressée grâce aux études basées sur l'expression d'un TCR humain

spécifique du nickel dans des cellules murines déficientes en TCR (Vollmer et al. 1999). Outre la facilité de leur mise en culture, ces hybridomes permettent l'étude du site du contact du nickel au niveau du TCR grâce aux méthodes de mutagenèse des CDR3 (Vollmer et al. 2000). Les études avec ces hybridomes ont révélé deux mécanismes principaux d'interactions du nickel avec le complexe CMH/TCR (**Tableau 5**). Dans la première étude, l'épitope reconnu par les LT (ANi-2.3) serait le nickel lié par des liaisons de coordination à l'His en position 81 de la molécule HLA-DR52c et à deux autres acides aminés du côté N-terminal du peptide présent dans la poche HLA. Le complexe ainsi formé interagit avec le TCR (Lu et al. 2003). Récemment, une étude de modélisation moléculaire et de cristallographie, a mis en évidence des peptides mimotopes pouvant remplacer le complexe peptide du soi et nickel au niveau de la poche HLA-DR52c (Yin et al. 2012) et servant pour la fabrication de tétramères.

**Tableau 5: Mécanismes d'activation des lymphocytes T spécifiques du nickel d'après (Vollmer et al. 2000; Gamedinger et al. 2003; Lu et al. 2003)**

		Clones ANi-2.3	Clones SE9
<b>TCR</b>		V $\alpha$ 1, V $\beta$ 17	V $\alpha$ 22, V $\beta$ 17
<b>CMH</b>		Spécificité pour le HLA-DR52c	Activation dépendante du HLA-DR
<b>Liaisons de coordination</b>	<b>TCR</b>	Spécificité dépendante de la chaîne $\alpha$ et $\beta$ du TCR  *Asp (CDR2 $\alpha$ ) (identification par modélisation)  *Arg <sub>95</sub> et Asp <sub>96</sub> (CDR3 $\beta$ ) (identification par mutagenèse)	Spécificité dépendante de la chaîne $\alpha$ du TCR  *Tyr <sub>29</sub> (CDR1 $\alpha$ ) et Tyr <sub>94</sub> (CDR3 $\alpha$ ) (identification par mutagenèse)
	<b>CMH</b>	His <sub>81</sub> de la chaîne $\beta$	His <sub>81</sub> de la chaîne $\beta$
	<b>Contribution du peptide présent dans la poche du CMH</b>	Oui	Non
<b>Activation par des APC fixées</b>		Oui	Oui
<b>Activation par des APC chargées et lavées</b>		Oui	Non

Cependant, l'étude réalisée sur des clones SE9 (Gamerding et al. 2003) suggère que le nickel pourrait se positionner entre le CMH et le TCR d'une manière indépendante du peptide présent dans la poche CMH, tout en impliquant par des liaisons de coordinations, les résidus His en  $\beta$ 81 de la molécule du CMH de classe II (HLA-DR) et la chaîne  $\alpha$  du TCR (**Tableau 5**).

Outre l'identification des LT spécifiques du nickel chez des donneurs allergiques, plusieurs études ont mis en évidence une réactivité lymphocytaire vis-à-vis du nickel chez des donneurs sains (Cavani et al. 1998; Lisby et al. 1999a; Lisby et al. 1999b; Rustemeyer et al. 1999; Cavani et al. 2003) (**Tableau 6**).

A la différence du nickel, l'hypersensibilité au béryllium (Be) est associée au HLA-DP (Richeldi et al. 1993). Plus particulièrement, des études *in vitro* ont détecté des clones de LT réactifs vis-à-vis du Be. Cette réactivité dépend d'un résidu acide glutamique (Glu) en position 69 de la chaîne  $\beta$  du HLA-DP (Richeldi et al. 1993; Lombardi et al. 2001). Le Be entame donc des liaisons de coordination avec ce résidu et le peptide présent dans la poche CMH. Cependant, il a été récemment démontré que les ions  $\text{Be}^{2+}$  peuvent rejoindre la structure interne du complexe pCMH et entraîner des modifications structurales de la surface du complexe pCMH présenté au TCR (Clayton et al. 2014). Ainsi, tout comme l'ABC, le TCR des clones spécifiques ne reconnaît pas directement les ions  $\text{Be}^{2+}$ . Cependant, le Be modifie l'épitope présenté au TCR mais sans altérer le répertoire de peptides du soi.

**Tableau 6: Résumé général de quelques études *in vitro* mettant en relief l'activation des LT par le nickel chez des donneurs sains**

Références	Donneurs	Lymphocytes	Méthodes/Readout	Résultats majeurs
Lisby et al. 1999b	Donneurs sains (Patch test négatif)	PBMC	LTT	*Nickel induit la prolifération des PBMC de donneurs sains * Nécessité de la présence d'APC * Sécrétion d'IFN- $\gamma$ et pas d'IL-4
Lisby et al. 1999a	Donneurs sains (Patch test négatif)	PBMC CD4+/CD8+ CD4+ CD45RA+ CD8+ CD45RA+ CD4+ CD45RO+ CD8+ CD45RO+	Co-culture APC chargée avec le nickel et LT  LTT	*Nickel induit la prolifération des PBMC et des LT CD4+ de donneurs sains *Nickel induit la prolifération des populations CD4+ CD45RA+ et CD4+ CD45RO+ * Nécessité de la présence d'APC
Rustemeyer et al. 1999	Donneurs sains (Patch test négatif)	PBMC CD4+CD45RA+ CD4+ CD45RO+	Co-culture APC chargée avec le nickel et LT (Ajout du TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , d'IL-2, d'IL-4 et d'IL-7) + une restimulation  LTT	*Nickel induit la prolifération des LT CD4+ chez les donneurs sains et allergiques *Nickel induit la prolifération des clones CD4+ CD45RA+ de deux donneurs différents (8 clones/40 et 3 clones/40) *Réactivité croisée avec cuivre et palladium
Cavani et al. 1998	Donneurs sains et allergiques	CD4+/CD8+ CD4+ CD45RA+ CD8+ CD45RA+ CD4+ CD45RO+ CD8+ CD45RO+	Co-culture APC et LT en présence du nickel  LTT	*Nickel induit la prolifération des LT CD4+ chez les donneurs sains et allergiques et des LT CD8+ juste chez les donneurs allergiques *Intensité de la réponse plus élevée dans la population mémoire *Production d'IL-10 plus forte par les LT CD4+ de donneur sains
Cavani et al. 2003	Donneurs sains et allergiques	PBMC CD4+CD25+ CD4+CD25-	Co-culture APC et LT en présence du nickel  LTT	*Augmentation significative du taux de prolifération des LT en cas d'une déplétion préalable des cellules CD4+CD25+

### **3.5. Immunité adaptative hétérologue**

Le concept de l'immunité adaptative hétérologue est basé sur le principe qu'un seul TCR peut reconnaître plusieurs peptides. Il est donc polyspécifique (White et al. 2015). A titre d'exemple, le vitiligo associé au traitement du mélanome par le DNCB pourrait être dû à une réactivité croisée du TCR vis-à-vis des peptides-DNP et des peptides du soi non-haptenisés (Henderson and Ilchyshyn 1995). D'autre part, il est probable que les LT qui reconnaissent des molécules allergisantes soient déjà à la base spécifiques de peptides viraux (HHV, CMV, EBV) et générés lors d'une infection virale par exemple. Ceci pourrait expliquer la réactivité *in vitro* des LT mémoires face à une molécule allergisante chez des individus sains non sensibilisés (Lucas et al. 2015; White et al. 2015). Par ailleurs, un même clonotype TCR de LT, issu de patients ayant développé un SJS/TEN induit par la CBZ, a été détecté au niveau des LT isolés de la muqueuse génitale d'une patiente infectée par le HSV-2 (White et al. 2015). De plus, des clones de LT réactifs vis-à-vis de l'ABC sont aussi capables de reconnaître *in vitro* un peptide dérivant du HSV1/2 (Yerly et al. 2017).

## **4. Activation et polarisation des lymphocytes T**

### **4.1. La synapse immunologique**

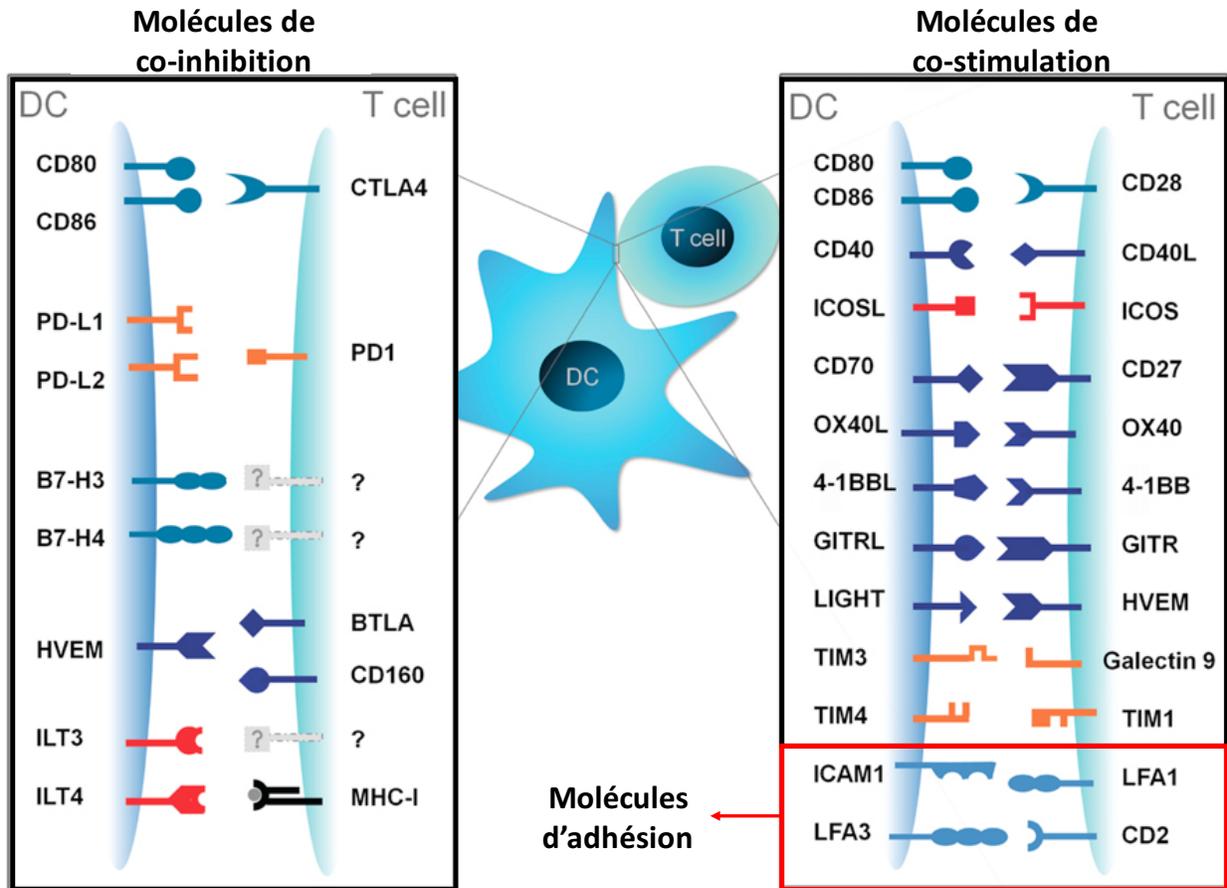
Au niveau du ganglion lymphatique, l'activation des LT par les DC nécessite trois signaux. Le premier signal passe par la reconnaissance du complexe CMH/peptide antigénique par le TCR des lymphocytes. Le second signal met en jeu les molécules d'adhésion et de co-stimulation. Enfin, le dernier signal est formé par les cytokines sécrétées par les DC dont ceux de la famille de l'IL-12 permettant la polarisation lymphocytaire. Ces interactions se font à travers la synapse immunologique. C'est une superstructure moléculaire spatiale où se déroulent les événements

précédents et dont l'objectif final est de relocaliser d'une manière optimale l'ensemble des partenaires nécessaires à l'activation lymphocytaire (Valitutti et al. 2010). Cette structure est au début décrite pour avoir une forme discoïde avec un diamètre d'environ 5µm (Monks et al. 1998) mais en réalité elle est assez dynamique. Elle est organisée en trois régions concentriques : une partie centrale c-SMAC (*central-supramolecular activation complex*), une partie périphérique et une troisième distale. La partie c-SMAC comporte le TCR et les molécules de co-stimulation. Elle est entourée par un anneau dans lequel sont retrouvés des couples de molécules d'adhésion (**Figure 31**) (Valitutti et al. 2010).

Les molécules allergisantes sont capables d'induire l'expression d'un panel de molécules de co-stimulation sur les DC favorisant leur interaction avec les LT (**Figure 24**) (*cf. chapitre 3 partie III-2.1.1*).

En plus des molécules de co-stimulation, les DC et les LT présentent à leur surface des molécules de co-inhibition. Certains ligands peuvent s'avérer stimulateurs ou inhibiteurs en fonction du récepteur qu'ils lient. Par exemple, lorsque CD80 et CD86 lient CD28, un signal co-stimulateur est induit dans le LT. Cependant, ces molécules peuvent aussi lier la molécule CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4), qui permet au contraire de délivrer un signal inhibiteur (Valitutti et al. 2010). Ainsi, une expression de CTLA-4 a été détectée dans des biopsies cutanées de patients allergiques au nickel (Bangert et al. 2003). L'injection de CTLA-4 Ig chez la souris altère l'HSC induite par le DNFB (Tang et al. 1996). Parallèlement, une inhibition du CTLA-4, pendant la phase de sensibilisation, amplifie l'HSC induite par le DNFB et le FITC (Nuriya et al. 2001). D'autre part, le nickel et le DNCB induisent l'expression de PD-L1 et PD-L2 (*Programmed death ligand*) au niveau des LC (Peña-Cruz et al. 2010). Dans un modèle de co-culture de LC chargées par du nickel et des LT, le blocage de PD-L1 entraîne une augmentation de la

prolifération des LT accompagnée d'une production de TNF- $\alpha$  et d'IL-22 (Hitzler et al. 2012). Le blocage de PD-L1 ou de CTLA-4 mais pas celui de PD-L2 augmente aussi la prolifération de LT spécifiques du SMX-NO et la production d'IFN- $\gamma$ , d'IL-13 et d'IL-22 (Gibson et al. 2014; Gibson et al. 2017).

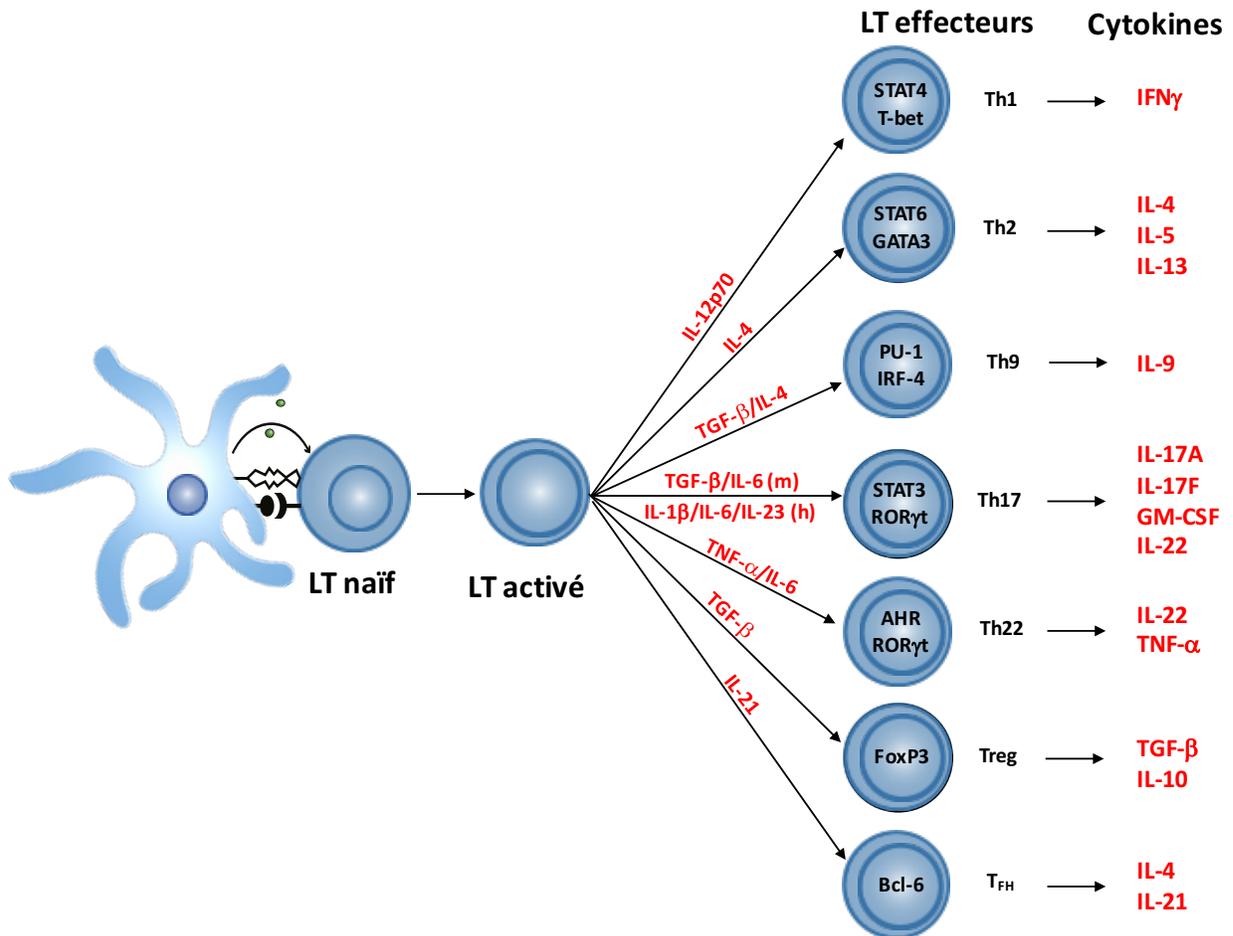


**Figure 31: Liste des molécules de co-stimulation, co-inhibition et d'adhésion impliquées dans la synapse immunologique d'après (Valitutti et al. 2010).**

*Les molécules de co-stimulation ou de co-inhibition sont exprimées au niveau de la synapse immunologique formée par les DC et les LT et constituent un signal d'activation ou d'inhibition des LT.*

## 4.2. La polarisation lymphocytaire

La sécrétion des cytokines par les DC constitue le signal 3 permettant l'orientation de la réponse lymphocytaire. Ainsi suite à l'état d'activation des DC et des cytokines présentes dans l'environnement, un LT CD4<sup>+</sup> naïf peut se différencier en LT Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, T folliculaire (T<sub>FH</sub>) ou T régulateur (Treg) (**Figure 32**).



**Figure 32: La polarisation des lymphocytes T d'après (Deenick et al. 2011)**

(m) murins ; (h) humains

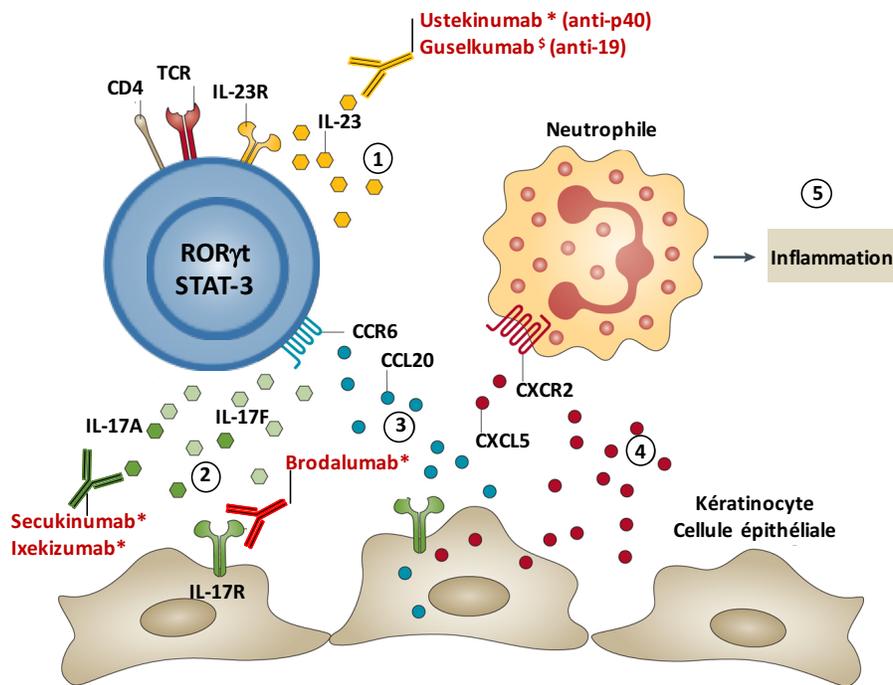
#### 4.2.1. Les lymphocytes Th17

Les lymphocytes Th1 et Th2 ont été pour longtemps considérés comme les cellules responsables de l'initiation et de la promotion des processus inflammatoires. Ce paradigme a changé suite à l'identification en 2005 d'une population de LT CD4<sup>+</sup> pathogénique produisant de l'IL-17A et nommée Th17 (Park et al. 2005; Harrington et al. 2005). Outre leur implication dans les mécanismes de défense contre les pathogènes extracellulaires, les LT Th17 sont impliqués dans plusieurs maladies inflammatoires. Ainsi le ciblage de la voie Th17 représente un intérêt thérapeutique majeur (surtout pour le psoriasis et la spondylarthrite ankylosante) (Gaffen et al. 2014; Krebs et al. 2017) (**Figure 33**).

Les LT Th17 sont caractérisés par l'expression des facteurs de transcription ROR $\gamma$ t (*RAR-related orphan receptor gamma*) et STAT-3 (Ivanov et al. 2006), du récepteur de l'IL-23 (Acosta-Rodriguez et al. 2007) et du récepteur de type C-lectine CD161 (Cosmi et al. 2008). Les LT Th17 sont aussi caractérisés par la production de l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-22 et le GM-CSF accompagnée de l'expression de CCR6 nécessaire pour l'infiltration des Th17 au niveau des tissus inflammatoires (Acosta-Rodriguez et al. 2007; Hirota et al. 2007). Les différentes cytokines sécrétées par les Th17 induisent la libération de peptides antimicrobiens et la production de chimiokines (ex CXCL5, CXCL2) et de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8) par les cellules épithéliales et endothéliales permettant le recrutement des cellules immunitaires telles que les neutrophiles au site de l'inflammation (**Figure 33**) (Krebs et al. 2017).

Plusieurs cytokines peuvent jouer un rôle dans le développement des LT Th17. Les études chez la souris ont permis de classer les cytokines impliquées dans la polarisation Th17 en deux groupes. Le premier groupe est formé par les cytokines qui initient le processus de polarisation telles que le TGF- $\beta$  et l'IL-6 qui activent respectivement la voie des SMAD et de STAT3 et induisent

l'expression de ROR $\gamma$ t et de STAT-3. Le deuxième groupe est formé par l'IL-23, cytokine qui permet de stabiliser le phénotype des LT Th17 et les rend plus pathogènes (Gaffen et al. 2014). En effet, l'IL-23 permet le recrutement de la protéine Blimp1 au niveau du complexe transcriptionnel ROR $\gamma$ t/STAT-3 et induit les gènes caractéristiques des Th17 (*il23R*, *il17a*, *Csf2*...). Bien qu'un rôle pour le TGF- $\beta$  dans la polarisation Th17 a été décrit chez la souris, cette cytokine ne semble pas être impliquée d'une manière directe dans la polarisation Th17 chez l'homme mais la favorise en inhibant la polarisation Th1 (Santarlaschi et al. 2009). Par contre, la présence simultanée de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-23 induit le développement des LT Th17 à partir des précurseurs LT CD4<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> détectés au niveau du sang de cordon ou dans le thymus chez l'homme (Cosmi et al. 2008).



**Figure 33: Caractéristiques et ciblage thérapeutique de la voie Th17 d'après (Krebs et al. 2017)**

*Les Th17 sont caractérisés par l'expression du récepteur de l'IL-23 (IL-23R), du CCR6 et par la production de cytokines comme l'IL-17A et l'IL-17F (1). Ces derniers vont agir sur les cellules épithéliales (2) et entraînent la libération de CCL20 et CXCL5 qui vont entraîner un recrutement des LT Th17 (via CCR6) et des neutrophiles (via CXCR2) (4). § essai clinique dans le psoriasis. \* Autorisation de mise sur le marché (pour psoriasis essentiellement mais aussi pour la maladie de Crohn dans le cas de l'ustekinumab).*

#### **4.2.2. Différents sous-types de lymphocyte T dans les allergies aux produits chimiques et aux médicaments**

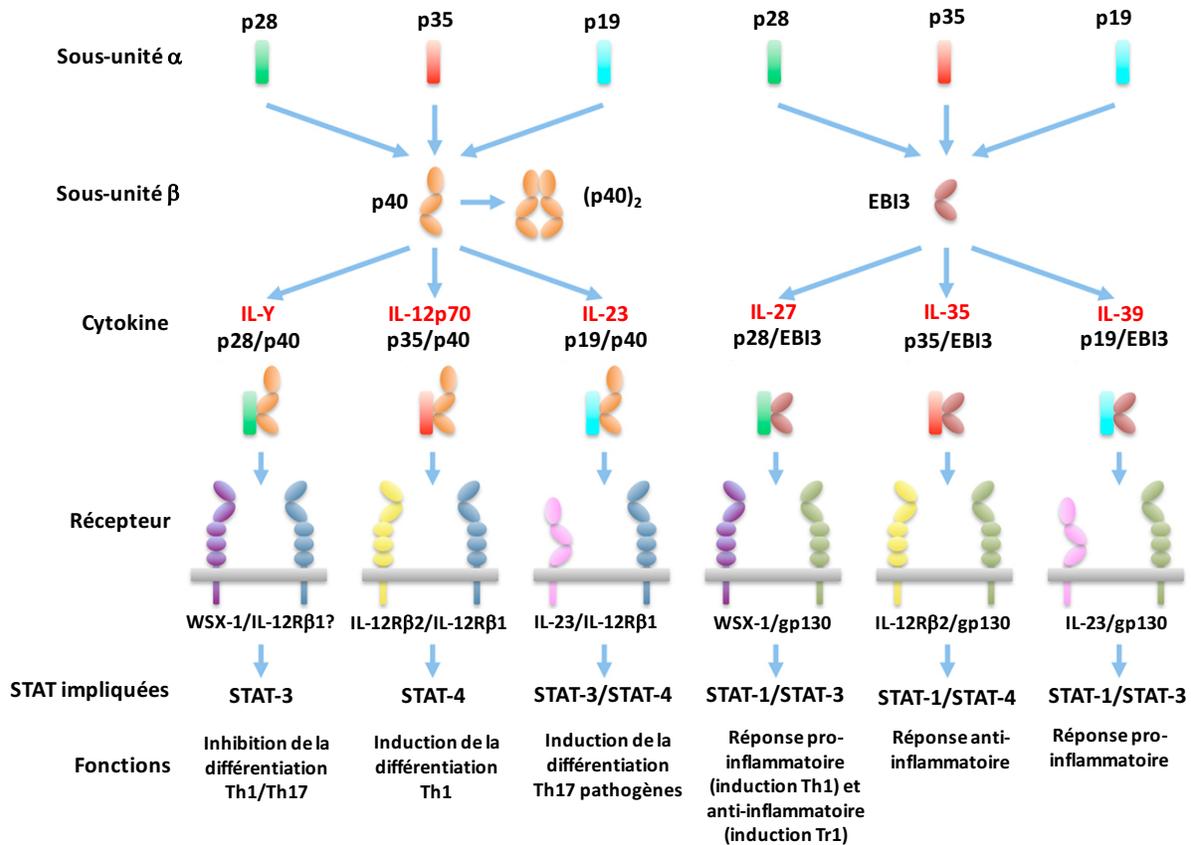
L'hétérogénéité de la polarisation lymphocytaire induite par les molécules allergisantes témoigne encore une fois de la complexité des mécanismes impliqués dans les réactions allergiques. En effet, dans les modèles murins d'HSC, le FITC induit une polarisation Th2 (effet probablement dû à son solvant : le phtalate de dibutyle) (Larson et al. 2010) alors que le DNFB et le TNCB induisent une polarisation Th1 (Dearman et al. 1996; Dearman and Kimber 1999). Le nickel induit une polarisation Th1/Th2 des LT spécifiques isolés du sang de patients allergiques (Cavani et al. 1998; Minang et al. 2005; Minang et al. 2006). Récemment des LTh17 spécifiques du nickel ont été détectés dans le sang et les tissus des patients allergiques (Albanesi et al. 2000; Larsen et al. 2009; Zhao et al. 2009; Dyring-Andersen et al. 2013). Une étude transcriptomique réalisée à partir de biopsies cutanées de patients allergiques montre une polarisation Th2 induite par des sensibilisants faibles et une plus faible contribution des LT Th1/Th17. Alors que le nickel induit une polarisation Th1/Th17 et plus rarement Th22 (Dhingra et al. 2014). D'une manière intéressante, la présence de l'IL-17 est corrélée avec la sévérité de l'EAC induit par le nickel (Schmidt et al. 2016). D'autre part, l'induction de l'HSC par le DNFB et le TNCB est altérée chez des souris invalidées pour le gène de l'*il-17* (Nakae et al. 2002) et l'injection d'un anti-IL-17 diminue l'HSC (He et al. 2006). En synergie avec l'IFN- $\gamma$ , l'IL-17 entraîne une augmentation de l'expression d'ICAM-1 (CD54) au niveau des kératinocytes favorisant l'adhésion des LT et l'apoptose des kératinocytes d'une manière indépendante de l'antigène (Pennino et al. 2010). Plus récemment des Th9 ont été détectés dans le sang et tissus cutanés de patients allergiques au nickel. De plus, l'induction de l'HSC par le DNFB est majorée chez des souris invalidées pour le gène de l'*il-9*. En effet, l'IL-9 semble jouer un rôle régulateur dans l'EAC en inhibant la production d'IFN- $\gamma$  (Liu et al. 2014).

D'une manière générale, les PBMC ou LT isolés de patients allergiques à la pénicilline ont montré une polarisation Th1/Th2 suite à leur stimulation *in vitro* (Brander et al. 1995; Gaspard et al. 2000; Lochmatter et al. 2009). En plus de la polarisation Th1/Th2 (Lochmatter et al. 2009; El-Ghaiesh et al. 2012), les PBMC isolés de patients allergiques à la PIP ou au SMX présentent une polarisation Th22 (Gibson et al. 2014; Sullivan et al. 2017). Cependant, le rôle joué par l'IL-22 dans les allergies médicamenteuses reste à étudier (Pichler et al. 2017). Par différence avec les LT spécifiques de l'AX issus de patients ayant développé un SJS ou une anaphylaxie induite par l'AX, ceux issus de patients allergiques ayant développé de l'AGEP sont caractérisés par une polarisation Th17 (Fili et al. 2014). Ceci montre davantage que la polarisation des LT dépend, en plus des DC, du contexte inflammatoire associé à la pathologie.

Il est intéressant de noter qu'il existe une certaine plasticité entre les différents profils de LT résultant en une adaptation des LT effecteurs au contexte immunologique dans lequel ils se trouvent (Zhou et al. 2009). Des expériences *in vitro* (après ajout d'IL-12) et de transferts adoptifs ont montré que les Th17 peuvent acquérir un phénotype Th1 (Bending et al. 2009; Harbour et al. 2015). D'autres études basées sur l'identification du lignage cellulaire ont montré une plasticité des Th17 vers des Th1 dans l'encéphalopathie expérimentale auto-immune (Hirota et al. 2011) mais aussi vers des T<sub>FH</sub> au niveau des plaques de Peyer (Hirota et al. 2013) ou des Tr1 après résolution de l'inflammation (Gagliani et al. 2015).

#### **4.2.3. Rôle des cytokines membres de la famille de l'IL-12**

La famille de l'IL-12 est une famille de cytokines hétérodimériques formées d'une chaîne  $\alpha$  (p35, p19 ou p28) et d'une chaîne  $\beta$  (p40 ou Ebi3) (**Figure 34**).



**Figure 34: Les cytokines membres de la famille de l'IL-12 d'après (Hasegawa et al. 2016)**

*Les cytokines membres de la famille de l'IL-12 sont hétérodimériques et plusieurs sous-unités de ces cytokines et de leur récepteur sont communes entre-elles.*

L'IL-12p70 est la première cytokine décrite (Kobayashi et al. 1989), mais selon les combinaisons possibles, la famille de l'IL-12 est composée d'au moins 6 membres. Malgré leur homologie structurelle, ces cytokines présentent différentes fonctions biologiques. D'une manière générale, l'IL-12p70 et l'IL-23 sont considérées comme étant des cytokines pro-inflammatoires jouant un rôle essentiel respectivement dans le développement des LT Th1 et Th17. L'IL-27 joue plutôt un rôle immunomodulateur. L'IL-35 est immunosuppressive et est produite par des lymphocytes Treg (Treg naturelles qui proviennent du thymus)(Vignali and Kuchroo 2012). L'IL-Y et l'IL-39 ont été récemment découvertes (Wang et al. 2012b; Wang et al. 2016).

En effet, l'IL-10 semble être une cytokine immunosuppressive puisque son injection dans un modèle murin d'uvéite expérimentale auto-immune entraîne une inhibition de la différenciation des LT Th1 et Th17 (Wang et al. 2012b). L'IL-39 est sécrétée par les LB activés (lupus) (Wang et al. 2016) et les kératinocytes (agoniste TLR3) (Ramnath et al. 2015) et est plutôt pro-inflammatoire. L'IL-12p70, l'IL-23 et l'IL-27 sont essentiellement produites par les DC et les macrophages et seront traitées dans cette partie.

Contrairement à la sous-unité p40, la sous-unité p35 est exprimée dans la plupart des types cellulaires. Malgré cette expression constitutive, la sous-unité p35 n'est sécrétée qu'en association avec la sous-unité p40. En effet, la sous-unité p35 nouvellement synthétisée persiste à l'état immature dans la cellule au niveau du RE et subit un premier clivage d'une partie du peptide signal suivi d'une glycosylation. La pré-protéine obtenue nécessite un deuxième clivage au niveau de l'appareil de Golgi pour pouvoir se lier à la sous-unité p40 et être sécrétée sous forme d'un hétérodimère (Carra et al. 2000; Lyakh et al. 2008). De même, la sous-unité p19 n'est sécrétée qu'en association avec la sous-unité p40 mais ne présente pas de sites de glycosylation (Oppmann et al. 2000; Lyakh et al. 2008). Par contre, la sous-unité p40 peut être sécrétée sous forme de monomère ou homodimère et qui, en se fixant sur la sous-unité IL-12R $\beta$ 1, bloque compétitivement l'interaction de l'IL-12p70 ou de l'IL-23 avec leur récepteur (Gillesen et al. 1995; Mattner et al. 1997; Shimozato et al. 2006). Cependant, l'IL-12p40 est chimio-attractante pour les macrophages, induit la migration des DC (Cooper and Khader 2007) et joue un rôle pro-inflammatoire en induisant la production d'IFN- $\gamma$  par les LT CD8<sup>+</sup> (Piccotti et al. 1997; Stallmach et al. 2004).

L'IL-27 est aussi une cytokine hétérodimérique, formée d'une sous-unité p28 associée à un récepteur soluble de cytokine EB13 (*Epstein Barr virus induced gene-3*) mais, contrairement à l'IL-12p70 et à l'IL-23, ces deux sous-unités ne sont pas reliées par un pont disulfure mais par des

liaisons non covalentes (Pflanz et al. 2002). De plus et contrairement à l'IL-23 qui agit préférentiellement sur des LT mémoires (Oppmann et al. 2000), l'IL-27 est impliquée essentiellement dans la prolifération des LT naïfs. L'IL-27 est responsable d'une polarisation précoce des LT en Th1 d'une manière indépendante de l'IL-12p70, de T-bet et de STAT-4 mais *via* une activation de STAT-1 au niveau des LT naïfs (Owaki et al. 2005; Owaki et al. 2006). Il est intéressant de noter que les kératinocytes répondent à une stimulation par l'IL-27 en augmentant la production de CXCL-10 et l'expression des molécules du CMH de classe I et du CD54. Cet effet n'a pas été détecté avec les autres cytokines membres de la famille d'IL-12 (Wittmann et al. 2009). Cependant, plusieurs études mettent en relief un rôle anti-inflammatoire de cette cytokine en inhibant la polarisation Th17 (diminution de l'expression de ROR $\gamma$ t) (Diveu et al. 2009; Pot et al. 2011) et en induisant une population de lymphocytes Treg qui n'exprime pas FoxP3 nommée Tr1 et qui sécrète de l'IL-10 (Awasthi et al. 2007; Pot et al. 2011). En effet, l'induction des Tr1 par l'IL-27 est la conséquence d'activation des facteurs de transcriptions c-Maf (Pot et al. 2009) et AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) (Apetoh et al. 2010). L'induction de c-Maf par l'IL-27 facilite aussi le développement des T<sub>FH</sub> et la production de l'IL-21 (Batten et al. 2010).

L'implication des cytokines membres de la famille de l'IL-12 dans les réactions allergiques a été décrite. En effet, la neutralisation de l'IL-12p70 altère l'HSC induite par le DNFB (Riemann et al. 1996). Parallèlement, les souris invalidées pour le *tlr4* et *l'il-12r $\beta$ 2* présentent une diminution de l'intensité de l'HSC en réponse aux TNCB, oxazolone et TNCB (Martin et al. 2008). Dans un modèle d'HSC subaiguë induite par le DNFB (sensibilisation suivie par une ré-application du produit au jour 5, 6 et 7), l'injection d'un anticorps neutralisant pour l'IL-12p40 (au jour 5) entraîne une diminution de l'intensité de l'HSC (Röse et al. 2012). Cependant, dans une étude réalisée sur 5 patients présentant des EAC chroniques, le traitement par l'ustekinumab (anticorps monoclonal

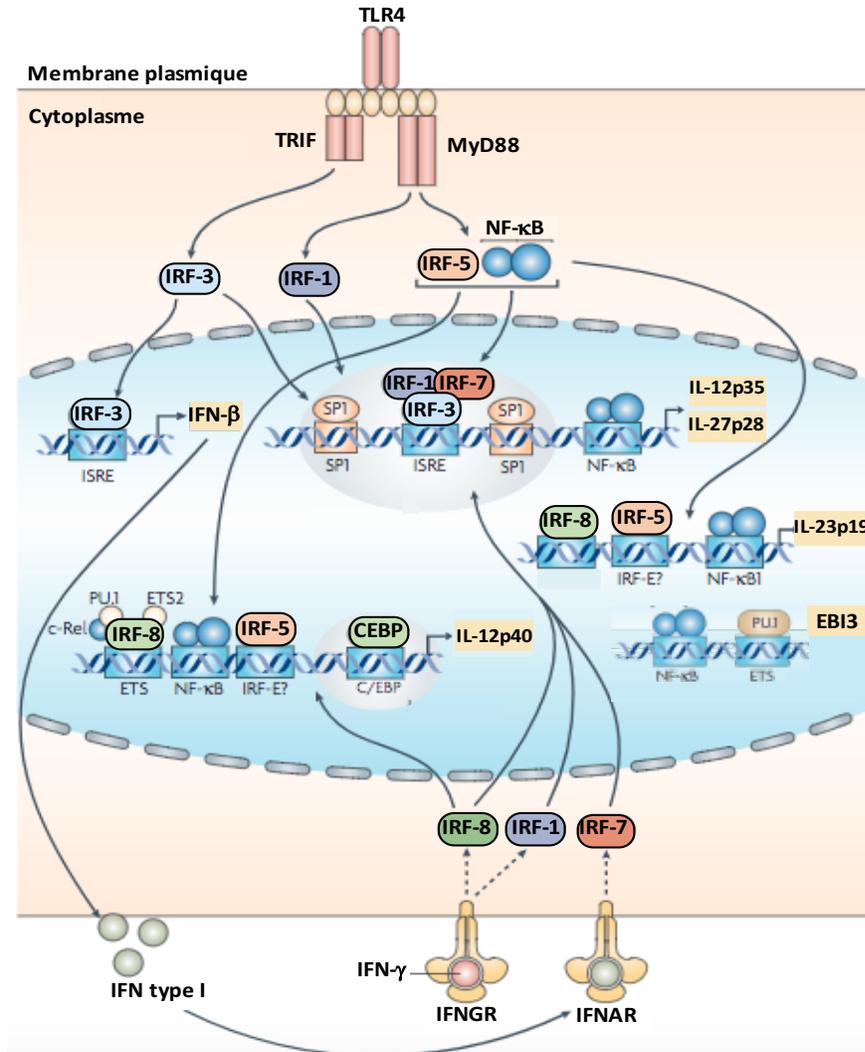
contre l'IL-12p40 ; **Figure 33**) ne semble pas avoir un effet thérapeutique majeur (Bangsgaard et al. 2011). D'autre part, l'IL-27 a été détectée au niveau des biopsies cutanées de patients souffrant d'EAC surtout au niveau des lésions chroniques (Wittmann et al. 2009).

#### 4.2.4. Régulation des cytokines membres de la famille de l'IL-12

L'IL-12, l'IL-23 et l'IL-27 sont synthétisées selon différents mécanismes en fonction des *stimuli*. Les DC activées par du LPS expriment les cinq sous-unités p19, p35, p40, p28 et EB13 alors que le PGN induit des taux élevés d'IL-23 (Re and Strominger 2001). La production optimale de l'IL-12p70 nécessite souvent deux signaux complémentaires comme l'association d'un *stimulus* microbien avec de l'IFN- $\gamma$  ou du CD40L (Ma et al. 1996). Il est donc intéressant de noter que l'IFN- $\gamma$  initialement induit par l'IL-12p70, agit par rétrocontrôle positif et augmente la synthèse de l'IL-12p70 (Goriely et al. 2008). Dans les MoDC, le nickel induit la production de l'IL-12p40. L'addition de l'IFN- $\gamma$  à une stimulation par du nickel induit une forte production de l'IL-12p70. Cette association est donc nécessaire pour l'induction de l'expression du facteur limitant qui est l'*il-12p35* (Antonios et al. 2010). Cependant, le taux de la sous-unité p40 est aussi essentiel pour une production optimale de l'IL-12p70 puisqu'il augmente la stabilité post-transcriptionnelle de la sous-unité p35 (Jalah et al. 2013).

L'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B est impliqué dans la production des différentes sous-unités (Goriely et al. 2008). Bien que l'expression d'EB13 semble être indépendante des IRF (Zhang et al. 2010), plusieurs IRF participent à la production de l'IL-12p70, de l'IL-23 et de l'IL-27. Ainsi, l'activation d'IRF-1 et d'IRF-3 est cruciale pour induire l'expression des sous-unités p35 (Negishi et al. 2006; Goriely et al. 2006; Johnson et al. 2011) et p28 (Zhang et al. 2010; Molle et al. 2010; Johnson et al. 2011). A titre d'exemple, le traitement des MoDC par l'association

nickel et IFN- $\gamma$  induit fortement l'expression d'IRF-1 et l'inhibition d'IRF-1 par siRNA entraîne une diminution de la production de l'IL-12p70 (Antonios et al. 2010). Quant à IRF8 et IRF5, ils sont plutôt impliqués dans l'expression des sous-unités p40 et p19 (Ireland et al. 2013; Ouyang et al. 2007) (**Figure 35**).



**Figure 35: Régulation transcriptionnelle de l'IL-12p70, de l'IL-23 et de l'IL-27 par un agoniste TLR4 : cas du LPS d'après (Goriely et al. 2008)**

*MyD88: Myeloid differentiation primary-response gene 88; IRF: Interferon regulatory factor; TRIF: TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN $\beta$ ; ISRE: IFN-stimulated response element; IFANR: récepteur IFN type I.*

Une régulation négative de la production de ces cytokines est nécessaire pour maintenir un équilibre entre une réponse immunitaire efficace et une réponse inflammatoire systémique. A titre d'exemple, E4BP4 ou NFIL-3 (*Nuclear factor, interleukin 3 regulated*), possédant un domaine bZip (*basic leucine zipper*), est un facteur de transcription qui agit comme un répresseur transcriptionnel (Cowell et al. 1992). Tout d'abord étudié pour son interaction avec un élément de réponse ATF (*activation transcription factor*) dans le promoteur de l'adénovirus E4 (Cowell et al. 1992), ce répresseur transcriptionnel est maintenant connu comme étant un facteur important dans le maintien du rythme circadien, la survie cellulaire, le développement des cellules NK (Male et al. 2014; Gascoyne et al. 2009), des ILC (*innate lymphoid cells*) (Yu et al. 2014), des DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> (Kashiwada et al. 2011), des LB (switch IgE) (Kashiwada et al. 2010) et dans l'inflammation où NFIL-3 est décrit comme répresseur de l'IL-12p40 (Kobayashi et al. 2011; Smith et al. 2011; Kobayashi et al. 2014). Le mécanisme par lequel NFIL-3 réprime l'IL-12p40 n'est pas bien élucidé mais semble être indépendant de l'IL-10 (Kobayashi et al. 2011). Comme tous les autres bZIPs, il doit directement interagir avec un élément de réponse présent dans le promoteur du gène cible. NFIL-3 pourrait aussi recruter un co-répresseur comme DR1 (*Downregulator of Transcription 1*) (Kobayashi et al. 2011). En effet, DR1, en association avec son co-répresseur DRAP1, empêche la formation du complexe de pré-initiation de la transcription. D'une manière intéressante, le LPS induit l'expression de NFIL-3 dans les macrophages *via* la voie MyD88 et les macrophages de souris invalidées pour *nfil-3* augmentent la production de l'IL-12p40 suites à leur activation par du LPS (Kobayashi et al. 2011). Parallèlement, les souris invalidées pour *nfil-3* développent spontanément des colites caractérisées par une augmentation de la production de l'IL-12p40 et de l'IL-23 (Kobayashi et al. 2014).

## **V. Facteurs dépendants de l'individu**

Dans les paragraphes précédents, nous avons exposé les étapes essentielles pour déclencher une réponse immunitaire adaptative aux produits chimiques et aux médicaments. Ces étapes dépendent essentiellement de la molécule elle-même, de sa structure chimique et de son interaction avec les récepteurs immunitaires au niveau des DC et des LT, dans une conformation adaptée à leur activation en présence des signaux de danger. Cependant, dans la plupart des cas, cette activation lymphocytaire ne se traduit pas en immunopathologie. En effet, la plupart des individus sont exposés aux molécules allergisantes mais ne développent pas d'allergie. Ceci pourrait être dû à un manque d'un répertoire de LT capables d'interagir avec la molécule par exemple. Cependant l'hétérogénéité de la réponse immunitaire contre ces molécules, la présence pour presque toutes les molécules testées d'un répertoire de LT et le fait que certaines réactions allergiques sont plus fréquentes chez une population particulière soulignent la présence d'autres facteurs clés tels que la génétique, les infections et les maladies associées ou même une défaillance des mécanismes de régulation. Dans cette partie, nous allons exposer quelques facteurs supplémentaires dépendants de la biologie de chaque individu et qui pourraient expliquer pourquoi certains individus sont plus susceptibles pour développer une immunopathologie.

### **1. Facteurs génétiques et polymorphismes**

D'une manière générale, les femmes développent plus de réactions allergiques comparées aux hommes (Gamboa 2009). A titre d'exemple, les femmes sont plus fréquemment touchées par l'allergie au nickel dû à un niveau d'exposition plus élevée (bijoux) (Diepgen et al. 2016). Une prédominance féminine est aussi observée dans le cas de l'allergie aux curares myorelaxants

probablement due à une sensibilisation croisée avec des produits contenant des ammoniums quaternaires (cosmétiques, produits ménagers) (Baldo et al. 2009).

Plusieurs facteurs génétiques sont impliqués dans la pathogenèse des allergies et permettent d'expliquer la forte susceptibilité de certains individus aux réactions allergiques. En effet, des associations entre les molécules HLA et les réactions allergiques ont été détectées (Sousa-Pinto et al. 2016). La plus forte association décrite est celle entre l'allèle HLA-B\*57:01 et les réactions allergiques à l'ABC dans la population caucasienne (Mallal et al. 2002) mais pas chez les Afro-américains (Hughes et al. 2004) ni dans la population Coréenne (Park et al. 2009). D'autres associations ont été aussi décrites comme les liens entre l'allèle HLA-B\*57:01 et le DILI lié à la FLU (Daly et al. 2009), l'allèle HLA-B\*15:02 et le SJS/TEN lié à la CBZ dans la population Chinoise Han mais pas chez les Européens (Chung et al. 2004), l'allèle HLA-B\*31:01 et le DRESS lié à la CBZ (Khan 2016), l'allèle HLA-B\*58:01 et les toxidermies liées à l'allopurinol (Hung et al. 2005), le HLA-DP et l'allergie liée au Be (Richeldi et al. 1993). Plusieurs associations d'intensités plus faibles ont été aussi décrites telles que : l'allèle HLA-B\*35:05 et le rash cutané lié à la NVP (Chantarangsu et al. 2009), le DILI induit par l'AX et l'halotype DRB1\*15:01-DRB5\*01:01-DQB1\*06:02 (O'Donohue et al. 2000), l'allèle HLA-A\*33:03 et le DILI lié à la ticlopidine (Hirata et al. 2008), l'allèle HLA-DQA1\*02:01 et le DILI lié à la lapatinib (Spraggs et al. 2011). Ces associations ont permis la mise en place de tests de dépistage pour l'allèle HLA-B\*57:01 afin d'éviter une réaction d'hypersensibilité liée à l'ABC et pour l'allèle HLA-B\*15:02 afin d'éviter le SJS/TEN lié à la CBZ (Khan 2016).

Il est intéressant de noter que certains individus ne développent pas d'allergie même s'ils sont porteurs de l'allèle à risque en question. Ceci montre qu'outre les molécules du CMH, d'autres facteurs sont impliqués tels que le TCR. En effet, en comparaison avec les sujets HLA-B\*15:02

tolérants la CBZ, les LT réactifs vis-à-vis de la CBZ, isolés de patients allergiques HLA-B\*15:02, sont caractérisés par un TCR V $\beta$ 11 bien particulier (Ko et al. 2011) (*cf. chapitre 3 partie IV-3.2*).

Des polymorphismes génétiques des récepteurs aux IgE (Fc $\epsilon$ R1B) (Qiao et al. 2005) présents sur les mastocytes et les basophiles ainsi que certains gènes codant pour des cytokines (IL-13, IL-10) et leurs récepteurs (IL-4R) ont été détectés avec les réactions immédiates aux BL (Guglielmi et al. 2006; Guéant-Rodriguez et al. 2006). Récemment un polymorphisme du gène codant pour le TNF- $\alpha$  a été proposé comme marqueur de sensibilisation multiple à plusieurs métaux (Colagiovanni et al. 2016). Une altération de l'intégrité de l'épiderme (ex : mutation de la protéine filaggrine) est associée avec une augmentation du risque de développer un EAC au nickel (Novak et al. 2008; Thyssen et al. 2010). Par ailleurs, des polymorphismes de gènes codants pour des protéines impliquées dans la métabolisation des médicaments sont aussi impliqués dans les réactions allergiques. A titre d'exemple, un lien entre certains polymorphismes du CYP 2C9 et les réactions cutanées médiées par la phénytoïne ont été décrits (Franco and Perucca 2015). De même, il a été démontré que les patients développant des allergies au SMX présentent plutôt un phénotype acétyleur lent (NAT2) (Rieder et al. 1991). Cependant, aucun lien entre le polymorphisme de cette enzyme et la susceptibilité aux réactions allergiques à la SMX chez des patients atteints par le VIH n'a été détecté (Pirmohamed et al. 2000). D'une manière intéressante, les patients VIH positifs et ayant le polymorphisme rs761142 au niveau de la sous-unité catalytique de la glutamate-cystéine ligase (GCLC), une enzyme clé pour la synthèse du glutathion, présentent une diminution de l'expression de l'ARNm de la *gclc* et une augmentation de l'incidence de l'allergie induite par le SMX (Wang et al. 2012a).

## 2. Maladies associées, microbiomes et inflammation

Les patients atteints de mucoviscidose semblent plus prédisposés aux réactions allergiques (25-50%) par rapport à la population générale (1-10%)(Koch et al. 1991; Pleasants et al. 1994). Cette différence dans l'incidence des réactions allergiques peut être due à la fréquence élevée d'administration du médicament (3-6 cycles/an), la voie d'administration (voie intraveineuse), la durée du traitement et la dose administrée (jusqu'à 12 g/jour).

D'autre part, une perturbation du statut immunitaire associée à des infections récurrentes pourrait aussi prédisposer aux réactions allergiques en diminuant le seuil de co-stimulation requis pour induire une activation lymphocytaire (Elsheikh et al. 2011) (*cf. chapitre 3 partie III-3*). C'est le cas par exemple de l'allergie au SMX qui survient chez environ 3 à 8% des patients mais peut atteindre les 50% chez des patients infectés par le VIH (Castrejon et al. 2010). Outre le concept de l'immunité hétérologue, où l'infection virale pourrait induire la maturation des DC ou bien générer des LT spécifiques qui réagissent de manière croisée avec la molécule allergisante (*cf. chapitre 3 partie III-3 et partie IV-3.5*), certaines réactions allergiques sont associées à une réactivation virale (Shiohara and Kano 2007; Chen et al. 2015). En effet, la réactivation des virus HHV-6, EBV et CMV a été détectée chez plusieurs patients 2 à 4 semaines après le début du DRESS ou autres atteintes cutanées sévères (Shiohara et al. 2007; Cho et al. 2017). Cette réactivation pourrait être la résultante d'une action directe du médicament (ex : AX et valproate de sodium induisent la réplication de HHV-6 *in vitro*) (Mardivirin et al. 2010) ou indirecte suite à une altération du statut immunitaire durant la phase aiguë de la maladie (Takahashi et al. 2009; Chen et al. 2015).

Les patients polymédicamentés sont aussi plus prédisposés aux réactions allergiques (Cardona et al. 2011), ceci pouvant être dû par exemple aux interactions médicamenteuses. L'administration du valproate de sodium chez des patients traités par la lamotrigine augmente le risque d'avoir un

rash cutané médié par la lamotrigine (Messenheimer et al. 1998). Ceci peut être dû à une diminution de la clairance de la lamotrigine par inhibition de sa glucuronidation par le valproate de sodium (Yuen et al. 1992). L'insuffisance rénale est aussi un facteur prédisposant aux réactions allergiques. En effet, l'augmentation de la concentration sérique de l'oxypurinol suite à une diminution de sa clairance rénale peut augmenter le risque de développer des réactions cutanées médiées par l'allopurinol (Yun et al. 2013; Chung et al. 2015).

Par ailleurs, le microbiome intestinal et cutané pourrait jouer un rôle important dans le déclenchement des réactions inflammatoires (Tang 2009; Prescott et al. 2017). En effet, le traitement par l'ipilimumab peut entraîner des colites chez les patients présentant une diminution de la colonisation intestinale par du *Bacteroidetes phylum* (Dubin et al. 2016). D'une manière intéressante, l'administration d'un antibiotique à large spectre à des souris avant leur sensibilisation, supprime l'HSC induite par le TNCB suite à une modification du microbiome intestinal (diminution des bactéries filamenteuses segmentées et augmentation des *clostridium* et *bacteroides*) et à l'émergence d'une population de lymphocytes Treg (Strzępa et al. 2017).

### 3. Mécanismes de tolérance

D'une manière générale, on peut distinguer deux groupes de lymphocytes Treg : les Treg dits « naturels » et les Treg « induits ». Les Treg naturels (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) acquièrent leur fonction directement, au cours de leur différenciation, dans le thymus. Les Treg induits sont produits en périphérie ou *in vitro* à partir de LT naïfs et sont divisés en sous-populations: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> induits, les Treg Tr1 et les Treg Th3 (Zhang et al. 2014; Noval Rivas and Chatila 2016; Waisman et al. 2017). Les Treg sont connus pour réguler les réactions allergiques en induisant la tolérance immunitaire (Zhang et al. 2014; Noval Rivas and Chatila 2016).

Des études d'HSC induites par des molécules chimiques ont démontré que ces molécules sont capables d'induire l'expansion d'une population de Treg (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup>) qui présente des propriétés suppressives spécifiques de l'antigène en inhibant la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> et la production d'IFN- $\gamma$  (Vocanson et al. 2010). Parallèlement, une déplétion des Treg (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) chez des souris exposées à une variété de molécules sensibilisantes entraîne une augmentation drastique des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène au niveau du ganglion lymphatique suivie par une exacerbation de l'HSC (Dubois et al. 2003; Vocanson et al. 2009). D'une manière intéressante, l'injection sous-cutanée de microparticules libérant le TGF- $\beta$ , l'IL-2 et la rapamycine entraîne l'expansion de Treg (CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) et diminue l'HSC chez la souris (Balmert et al. 2017). Outre les LT CD4<sup>+</sup>, les LT CD8<sup>+</sup> peuvent aussi présenter des propriétés suppressives. Ainsi, une expansion des LT CD8<sup>+</sup> qui produisent de l'IL-10 et de l'IL-4 a été retrouvée chez la souris suite à une exposition cutanée répétée de molécules sensibilisantes (Seidel-Guyenot et al. 2006).

Les évidences que les Treg jouent un rôle dans les phénomènes allergiques chez l'homme sont surtout liées à l'étude de l'EAC causée par le nickel. En effet, des LT Tr1 spécifiques du nickel et qui secrètent de l'IL-10 ont été détectés dans le sang de patients non allergiques au nickel (Cavani et al. 1998). A une plus faible fréquence, des LT Tr1 spécifiques du nickel ont été aussi retrouvés dans la peau de patients allergiques au nickel. Ceci montre la capacité de ces Treg à être recrutés au site d'exposition à l'haptène (Sebastiani et al. 2001). L'analyse phénotypique de ces LT Tr1 révèle une forte expression de CCR8, un récepteur de CCL1. En effet, CCL1 est exprimé au niveau des tissus cutanés d'une manière retardée lors de la phase de résolution de l'EAC correspondant au recrutement des LT Tr1. Les LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> ont été aussi décrits pour induire la tolérance en cas d'EAC au nickel. D'une manière intéressante, les LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> présents chez

les patients allergiques au nickel possèdent une capacité limitée *in vitro* pour réguler les LT effecteurs spécifiques du nickel par rapport aux sujets sains (Moed et al. 2005).

Le rôle des Treg dans l'allergie médicamenteuse est peu documenté. Il a été évoqué une différence qualitative et non quantitative au niveau de la population Treg (CD4+ CD25+ FoxP3+) entre des patients développant le TEN et des individus sains (Takahashi et al. 2009). Cependant, une augmentation de la fréquence des Treg dans le sang et les tissus cutanés des patients lors de la phase aiguë du DRESS a été détectée. Ces Treg maintiennent leur capacité suppressive *in vitro* et permettent ainsi d'expliquer le temps de latence relativement élevé entre la prise médicamenteuse et l'atteinte cutanée (Takahashi et al. 2009). Par comparaison aux Treg de patients ayant un DRESS, les Treg de patients développant un TEN reprennent leur fonction suppressive après résolution de la maladie (Takahashi et al. 2009). Dans une étude non publiée menée par l'équipe de Pichler, aucune différence qualitative ou quantitative dans la population de Treg n'a été détectée en comparant des patients allergiques à l'AX et des sujets sains (Pichler et al. 2011).

Dans les modèles de co-culture autologue DC/LT, la déplétion des PBMC en LT CD25+ permet d'augmenter la sensibilité de détection des LT spécifiques des molécules chimiques (Cavani et al. 2003; Vocanson et al. 2008) et médicamenteuses (Faulkner et al. 2012).

Outre les LT, les cellules NKT (*natural killer T*) peuvent aussi induire une tolérance immunitaire. Ainsi, la déplétion des cellules NKT invariants chez des souris exposées au DFNB entraîne une augmentation drastique des LT CD8+ spécifiques de l'antigène au niveau du ganglion lymphatique suivie par une exacerbation de l'HSC (Goubier et al. 2013).

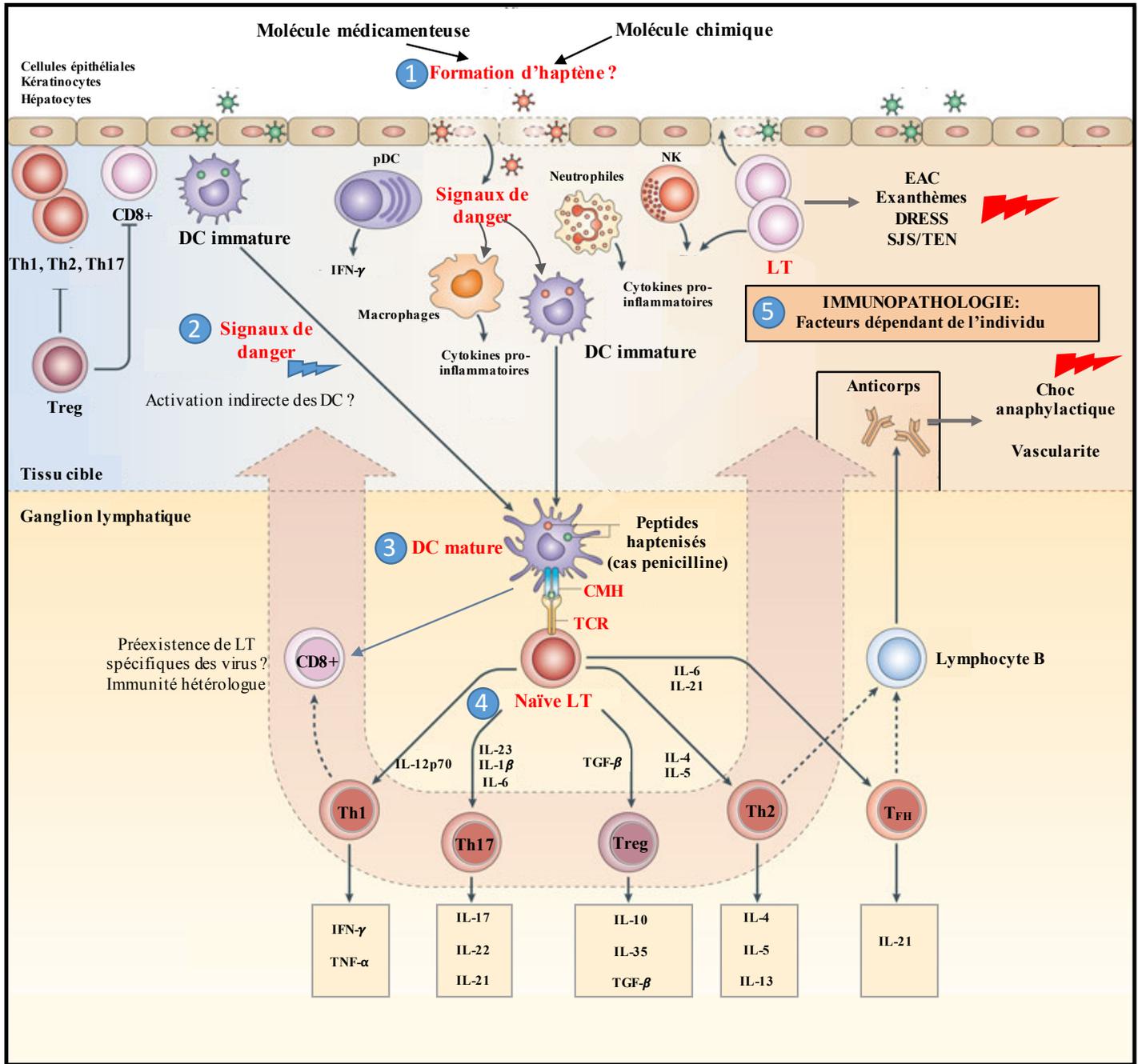


Figure 36: Aperçu général des étapes clés pour déclencher une réponse immunitaire adaptative d'après (Rouse and Sehrawat 2010)

Le déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative contre les produits chimiques et médicamenteuses nécessite la présence d'un antigène et sa présentation aux lymphocytes T spécifiques (LT) par les cellules dendritiques (DC) en présence des signaux de danger. Les facteurs dépendant du médicament et du patient jouent un rôle essentiel dans l'immunopathologie des réactions allergiques.



# **PRESENTATION DU TRAVAIL**



## Présentation du travail

Les allergies représentent un problème majeur de santé publique. Les allergies aux substances chimiques telles que le nickel sont répandues dans les pays industrialisés. Les réactions allergiques représentent aussi un problème majeur de sécurité d'emploi des médicaments et la majorité de ces réactions est due à des antibiotiques tels que les BL. Ces réactions peuvent être responsables d'affections graves qui peuvent engager le pronostic vital des patients (Gomes and Demoly 2005; Tanno et al. 2016).

Notre objectif global est de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les allergies aux produits chimiques et aux médicaments, en prenant comme exemple les métaux allergisants et la benzylpénicilline (BP). Notre travail permet, d'une part, de mieux comprendre le mécanisme de l'EAC induit par les métaux allergisants, en étudiant leurs effets sur la maturation des DC (étude du signal adjuvant) et d'autre part les mécanismes d'immunisation contre le nickel et la BP à travers l'identification d'un répertoire de LT naïfs spécifiques de ces molécules (étude du signal antigénique).

Dans la première partie du travail, nous nous sommes intéressés à la phase de sensibilisation de l'EAC causée par les métaux (nickel et cobalt) et plus particulièrement à la modulation du phénotype des DC par les métaux allergisants (signal adjuvant) impactant la polarisation lymphocytaire Th1/Th17 observée chez la plupart des patients allergiques au nickel (Larsen et al. 2009; Zhao et al. 2009; Dyring-Andersen et al. 2013; Dhingra et al. 2014). Pour cela, nous nous sommes intéressés aux cytokines membres de la famille de l'IL-12 connues pour être secrétées par les DC en réponse à des signaux de danger et pour moduler la polarisation des LT (Vignali and

Kuchroo 2012). Plus particulièrement, nous avons étudié l'effet des métaux allergisants sur la production des cytokines hétérodimériques de la famille de l'IL-12 (IL-12p70, IL-23) et sur les voies de signalisations intracellulaires de la DC régulant cette production. La première partie du travail a été réalisée sur les DC différenciées à partir de monocytes humains (MoDC) qui ont été ensuite stimulées par les métaux allergisants. Le sulfate de nickel ( $\text{NiSO}_4$ ), le chlorure de cobalt ( $\text{CoCl}_2$ ) et le dichromate de potassium ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) ont été choisis car ils représentent les haptènes métalliques les plus prévalent dans l'EAC (Uter et al. 2017). Nous avons montré que le nickel, en comparaison avec les autres haptènes métalliques, était capable d'induire un ratio IL-23/IL-12p70 élevé conduisant à une polarisation Th17 et que cet effet peut être abrogé en présence d'un anticorps neutralisant anti-IL-23p19. Par la suite, nous avons montré que les voies du TLR4, de p38 MAPK et de NF- $\kappa$ B jouaient un rôle important dans la production de ces cytokines. Par ailleurs, l'inhibition de la voie Jak-STAT favorise la production de l'IL-23 par rapport à l'IL-12p70 dans les MoDC traitées par  $\text{NiSO}_4$  et altère leur capacité à induire la polarisation Th1. Ces travaux ont fait l'objet d'une première publication (**Article 1**) et ont été aussi complétés par des résultats complémentaires divisés en trois sous-parties en fonction de la question posée :

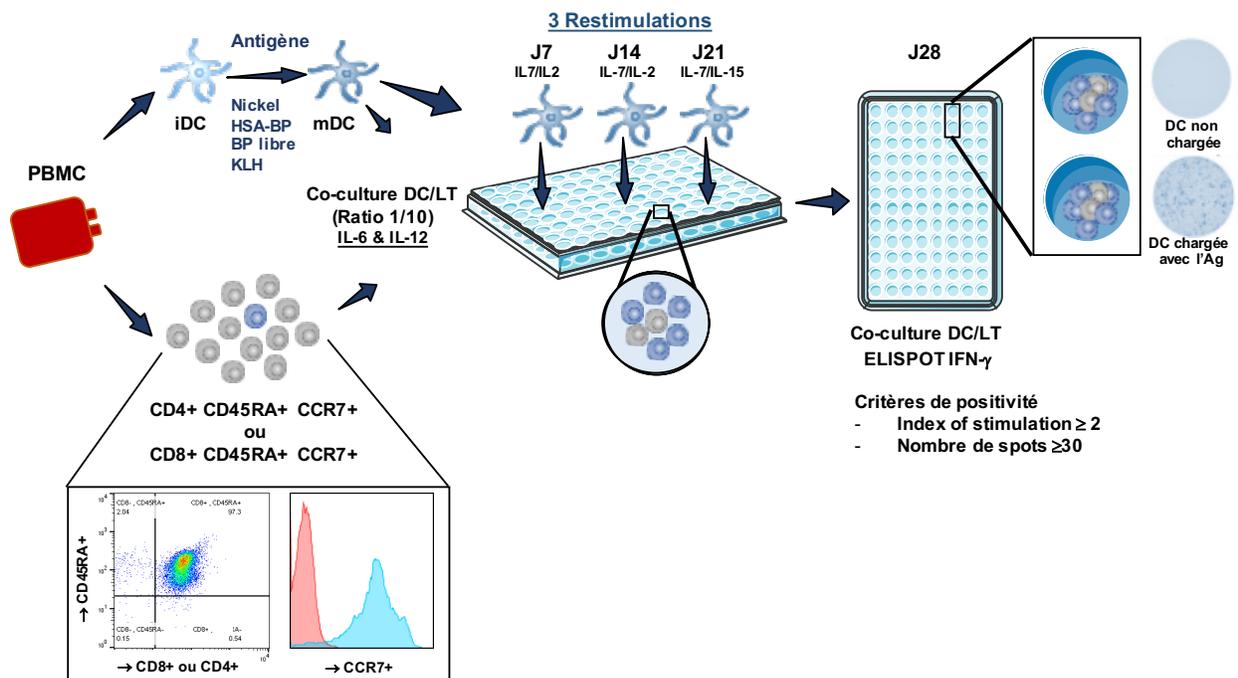
- Sous-partie 1 : Quel est le mécanisme responsable de l'augmentation de la production de l'IL-23 et de l'IL-12p40 observée en cas d'inhibition de la voie Jak-STAT dans les MoDC stimulées par le nickel ?
- Sous-partie 2 : Pourquoi le cobalt, qui est aussi un agoniste TLR4, est incapable d'induire la production des cytokines membres de l'IL-12 ?
- Sous-partie 3 : Les haptènes métalliques sont-ils capables d'induire la production de l'IL-27, une autre cytokine immunomodulatrice de la famille de l'IL-12, par les MoDC ?

Dans les sous-parties 1 et 2, nous nous sommes intéressés au facteur de transcription E4BP4 ou NFIL-3 qui agit comme répresseur transcriptionnel (Cowell et al. 1992) et qui a été récemment identifié comme un répresseur de l'expression de l'*il-12p40* (Kobayashi et al. 2011; Smith et al. 2011). En utilisant le modèle de MoDC, nous montrons que le nickel induit l'expression de NFIL-3 mais aussi que l'inhibition de la voie Jak-STAT diminue le niveau d'expression de NFIL-3 induit par le nickel. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la production de l'IL-12p40 et de l'IL-23. De même, nous avons montré que le cobalt était capable d'induire l'expression de NFIL-3 d'une manière plus intense que le nickel *via* un mécanisme dépendant des espèces réactives mais indépendant du TLR-4. Nos résultats ont montré une production plus importante des espèces réactives par le cobalt qui pourrait expliquer la forte induction de NFIL-3 et l'incapacité du cobalt à induire la production de l'IL-12p40.

Dans la sous-partie 3, nous montrons que le nickel est aussi capable d'induire la production de l'IL-27 par les MoDC *via* les voies du TLR4, de p38MAPK, de NF- $\kappa$ B et de Jak-STAT.

Dans la deuxième partie du travail, nous avons essayé de comprendre les mécanismes d'immunisation contre le nickel et la BP en évaluant le répertoire de LT naïfs spécifiques de ces molécules. Ce sont ces LT qui, chez des patients allergiques, rendent possible la synthèse d'IgE spécifiques par les LB dans les réactions allergiques immédiates, et qui sont responsables de la phase effectrice dans les réactions allergiques retardées. Bien que diverses études *in vitro* ont montré que des PBMC isolés de patients allergiques sont capables de proliférer en présence de la molécule allergisante impliquée ( Brander et al. 1995; Moulon et al. 1995; Cavani et al. 1998), l'évaluation du répertoire de LT naïfs spécifiques de ces molécules est peu documentée. Pour cela, et en collaboration avec le Dr Bernard Maillère (CEA, Saclay, France) nous avons utilisé un

modèle de co-culture autologue DC-LT (**Figure 37**). Brièvement, les monocytes sont isolés d'un prélèvement de sang de donneurs sains et différenciés en DC (MoDC). Les LT naïfs (CD4+ ou CD8+) sont isolés par purification magnétique. Les DC sont ensuite chargées avec les molécules [nickel ou bioconjugué albumine-penicilline G (HSA-BP) ou BP libre non-conjuguée]. Les DC chargées sont ensuite mises en culture avec les LT. Etant donné que nous cherchons à détecter des LT naïfs rares nous avons choisi d'effectuer trois restimulations hebdomadaires des LT par des DC chargées avec les molécules en question. Une semaine après la dernière restimulation, un Elispot IFN- $\gamma$  est réalisé. En effet, les LT sont cultivés en présence d'un cocktail cytokinique qui induit une différenciation du type Th1. Les lignées lymphocytaires spécifiques de la molécule sont détectées et leur fréquence est calculée en se basant sur la distribution de Poisson.



**Figure 37: Identification de lignées lymphocytaires spécifiques de l'antigène.**

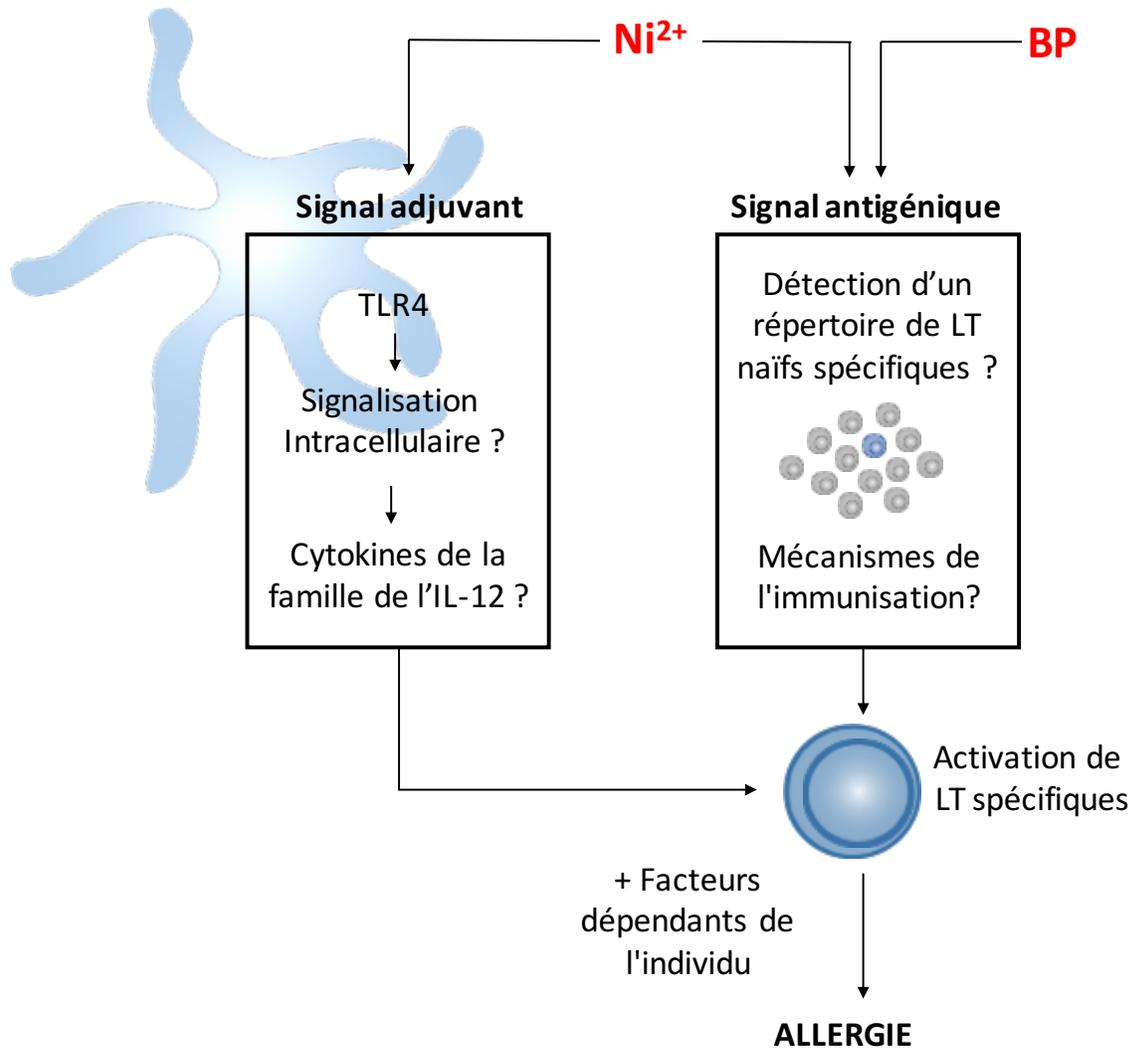
*PBMC : peripheral blood mononuclear cells ; iDC : DC immature ; mDC : DC mature ; Ag : antigène ; BP : benzylpénicilline ; HSA : albumine sérique humaine ; KLH : keyhole limpet hemocyanin. En cas de chargement par la HSA-BP, la BP ou la KLH la maturation des DC est assurée en présence de LPS. La KLH est employée comme témoin positif.*

Nos résultats ont mis en évidence l'existence d'un répertoire de LT naïfs CD4+ et CD8+ spécifiques du nickel dans la population générale (**Article 2 en préparation**). Nous avons travaillé avec des LT naïfs et la fréquence de LT naïfs capables de reconnaître le nickel est très proche de celle retrouvée pour des LT spécifiques de l'antigène chez des individus sains non-sensibilisés (Delluc et al. 2011; Nhim et al. 2013). Il est important de noter que d'autres travaux ont mis en évidence une certaine réactivité des LT CD4+ naïfs vis-à-vis du nickel (Lisby et al. 1999a; Lisby et al. 1999b; Rustemeyer et al. 1999) mais l'identification d'un répertoire de LT CD8+ naïfs n'a pas encore été montré. Par la suite, nous avons caractérisé cette réponse lymphocytaire en vérifiant, en premier lieu, l'implication des molécules du CMH dans l'activation lymphocytaire. De plus, nous avons montré que la plupart des LT spécifiques du nickel ne réagissaient pas avec le cobalt et que le TRBV19 semblait être représenté dans la plupart des LT CD4+ naïfs identifiés. Ces caractéristiques sont aussi retrouvées au niveau des LT spécifiques du nickel isolés de patients allergiques (Moulon et al. 1995; Vollmer et al. 1997; Büdinger et al. 2001; Zhang et al. 2017). Ceci montre bien que ce sont ces LT qui seraient responsables de l'immunisation des patients contre le nickel et que le déclenchement des réactions allergiques dépendrait d'autres facteurs tels que l'exposition et/ou la rupture de la tolérance.

Concernant la BP, des résultats précédents obtenus dans notre équipe ont mis en évidence l'existence d'un répertoire de LT CD4+ naïfs spécifique du bioconjugué HSA-BP (Nhim et al. 2013). Des peptides hapténisés par la BP issus de la HSA et responsables de l'immunisation des patients allergiques ont été aussi identifiés. Dans cette partie et en raison du rôle important des LT CD8+ dans les réactions allergiques médicamenteuses retardées (ex lésions bulleuses) (Pichler 2003), nous nous sommes intéressés à mettre en évidence la présence de LT CD8+ naïfs spécifiques de la BP chez des donneurs sains et de déterminer leur fréquence. De plus nous

cherchons à comprendre les mécanismes entraînant l'activation de ces LT spécifiques. Dans un premier lieu les bioconjugués HSA-BP ont été synthétisés à pH basique et caractérisés par spectrométrie de masse en collaboration avec Pr. Delphine Joseph (UMR CNRS 8076, Université Paris-Sud, France). Ces bioconjugués présentent en moyenne 15 molécules de BP fixées par molécules d'HSA (Scornet et al. 2016). La HSA a été choisie comme protéine porteuse parce qu'elle est la protéine la plus abondante du sérum et parce qu'il a été montré en analysant les sérums de patients allergiques que la BP était capable de se fixer à la HSA (**Tableau 2**). Le même protocole de co-culture autologue DC/LT, employé précédemment, a été ensuite utilisé. Il est intéressant de noter qu'une série d'expériences utilisant un pool de peptides connus pour être présentés par les molécules du CMH de classe I (peptides dérivés du CMV, EBV et influenza virus) et la KLH ont permis de vérifier d'une part, la viabilité et fonctionnalité des LT CD8<sup>+</sup> naïfs après 4 semaines de co-culture et d'autre part, la capacité des MoDC générées *in vitro* à présenter un antigène exogène aux LT CD8<sup>+</sup> (présentation croisée). Cependant nous n'avons pu identifier un répertoire de LT CD8<sup>+</sup> naïfs spécifiques de la HSA-BP que chez un des 5 donneurs testés. Il est bien connu selon la théorie de l'haptène que les médicaments peuvent aussi hapténiser des protéines intracellulaires (Ariza et al. 2014; Sánchez-Gómez et al. 2017). Pour cela nous avons émis l'hypothèse que la BP libre pourrait rejoindre le cytosol et hapténiser des protéines intracellulaires dans la DC et que les peptides hapténisés ainsi formés pourront être présentés aux LT CD8<sup>+</sup> *via* le processus classique de présentation par les molécules du CMH de classe I. Pour cela, nous avons cherché à détecter un répertoire de LT CD8<sup>+</sup> naïfs spécifiques de la BP libre. Nos résultats préliminaires ont mis en évidence l'existence de ce répertoire chez deux donneurs testés pour le moment. La réponse des LT CD8<sup>+</sup>, évaluée par le nombre de spots IFN- $\gamma$ , est

proportionnelle à la concentration de BP utilisée lors du chargement des DC, et est dépendante du protéasome et des molécules du CMH de classe I.



**Figure 38: Résumé général des objectifs du travail.**

$Ni^{2+}$  : nickel ; BP : benzylpénicilline ; LT : lymphocytes T





# RÉSULTATS



## **PARTIE I :**

# **Effets des métaux : nickel et cobalt sur la synthèse et la régulation des cytokines membres de la famille de l'IL-12 dans les cellules dendritiques humaines**



## Article 1

# Le nickel induit la production d'IL-23 par les cellules dendritiques et favorise le développement des LT Th17 : implication des voies du TLR4 et de Jak-STAT

## Nickel Sulfate Promotes IL-17A Producing CD4+ T-Cells by an IL-23-Dependent Mechanism Regulated by TLR4 and Jak-STAT Pathways

Rami Bechara, Diane Antonios, Hayat Azouri and Marc Pallardy

*Journal of Investigative Dermatology*; (2017) 137, 2140-2148.

Le nickel est l'haptène métallique le plus allergisant. L'application cutanée du nickel entraîne l'activation des cellules de l'immunité innée dont les DC qui vont migrer vers le ganglion lymphatique drainant afin de présenter l'antigène aux LT spécifiques. Une des particularités des haptènes métalliques est leur capacité à fournir un signal de danger en plus du signal antigénique.

Parmi les nombreuses cytokines produites par les DC, les cytokines membres de la famille de l'IL-12 présentent des caractéristiques structurelles et fonctionnelles uniques. Bien que l'IL-12p70 (formée par l'IL-12p40 et l'IL-12p35) favorise la polarisation Th1, l'IL-23 (formée par l'IL-12p40 et l'IL-23p19) est nécessaire pour le développement des cellules Th17. Les deux types de polarisation lymphocytaire ont été retrouvés chez les patients allergiques au nickel.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à comprendre la polarisation de la réponse des LT induite par le nickel en LT Th7. Nous avons montré que le nickel favorise une production précoce de l'IL-23 dans les MoDC, ainsi qu'une augmentation de l'expression de ses deux sous-unités : l'*il-23p19* et de l'*il-12p40* comme nous le montrons par PCR en temps réel. Cependant, la production d'un niveau significatif de l'IL-12p70 nécessite un signal supplémentaire tel que l'addition de l'IFN- $\gamma$ . En effet, l'IFN- $\gamma$  en association avec le NiSO<sub>4</sub> est nécessaire pour l'induction

de l'expression de l'*il-12p35* qui est la sous-unité spécifique de l'IL-12p70. De plus, les MoDC traitées par du nickel induisent une augmentation du pourcentage des LT CD4+ qui sécrètent de l'IL-17A, un effet réduit par la neutralisation de l'IL-23 grâce à un anticorps anti-IL-23p19.

Par la suite, nous avons étudié les mécanismes moléculaires de la production de l'IL-23 induite par le nickel dans les MoDC humaines. Grâce à l'utilisation d'un anticorps bloquant du TLR4 et des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des voies de p38MAPK et de NF- $\kappa$ B, nous montrons que les voies du TLR4, de p38MAPK et de NF- $\kappa$ B participent à la production de l'IL-23 induite par le nickel. Cependant, la voie Jak-STAT, connue pour être activée par le nickel dans les MoDC (Antonios et al. 2010), semble maintenir l'équilibre entre l'IL-23 et l'IL-12p70 en limitant la production de l'IL-23 induite par le nickel et en favorisant ainsi la polarisation Th1. En effet, l'inhibition de la voie Jak-STAT grâce à un inhibiteur pharmacologique entraîne une augmentation de la production de l'IL-23.



# Nickel Sulfate Promotes IL-17A Producing CD4<sup>+</sup> T Cells by an IL-23-Dependent Mechanism Regulated by TLR4 and Jak-STAT Pathways

Rami Bechara<sup>1,2</sup>, Diane Antonios<sup>2</sup>, Hayat Azouri<sup>2</sup> and Marc Pallardy<sup>1</sup>

Allergic contact dermatitis, caused by nickel, is a delayed-type hypersensitivity reaction, and 14.5% of the general population may be affected in Europe. Among a wide range of cytokines, the IL-12 family has unique structural and immunological characteristics. Whereas IL-12p70 promotes T helper (Th) 1 cell polarization, IL-23 promotes Th17 cell development and both have been isolated from nickel-allergic patients. In this work, we were interested in understanding the mechanism behind nickel-induced Th17 cell development. We showed that nickel induced an early production of IL-23 in human monocyte-derived dendritic cells along with an increase in the expression of *il-23p19* and *il-12p40* mRNA. However, the production of a significant level of IL-12p70 required an additional signal such as IFN- $\gamma$ . Moreover, nickel-treated monocyte-derived dendritic cells induced an increase in the percentage of IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells, an effect reduced by IL-23 neutralization. We then investigated the molecular mechanism of IL-23 production. Our results showed that toll-like receptor 4, p38 mitogen-activated protein kinase, and NF- $\kappa$ B were involved in IL-23 production induced by nickel. However, Jak-signal transducer and activator of transcription activation seems to maintain the IL-23/IL-12p70 balance by limiting IL-23 production and promoting Th1 polarization. These results indicate that nickel-induced Th17 cell development is dependent on the production of IL-23 by human monocyte-derived dendritic cells via toll-like receptor 4, p38 mitogen-activated protein kinase, NF- $\kappa$ B, and Jak-signal transducer and activator of transcription pathways.

*Journal of Investigative Dermatology* (2017) 137, 2140–2148; doi:10.1016/j.jid.2017.05.025

## INTRODUCTION

Allergic contact dermatitis (ACD) is a worldwide prevalent disorder caused by low molecular weight chemicals applied to the skin (Ibler et al., 2016). Nickel is among the most prevalent contact allergens (Diepgen et al., 2016). The sensitization phase of nickel-induced ACD is caused by the uptake of nickel by skin dendritic cells (DCs) followed by the priming of nickel-specific T cells in the draining lymph nodes (Martin, 2015). Nickel differs from classical haptens by its ability to form coordinative bonds with proteins and to directly activate human innate immune cells via the toll-like receptor (TLR) 4 (Raghavan

et al., 2012; Schmidt et al., 2010) leading to the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK), NF- $\kappa$ B, and interferon regulatory factor-1 signaling pathways (Ade et al., 2007; Antonios et al., 2010; Boislève et al., 2004, 2005). During the sensitization phase of ACD, mature DCs play an important role in driving T-cell polarization into different T helper (Th) cell types that influence the clinical outcome (Kaplan et al., 2012). Recently, nickel-specific Th17 cells were found in the blood and the skin of nickel-allergic patients (Dyring-Andersen et al., 2013; Larsen et al., 2009; Zhao et al., 2009).

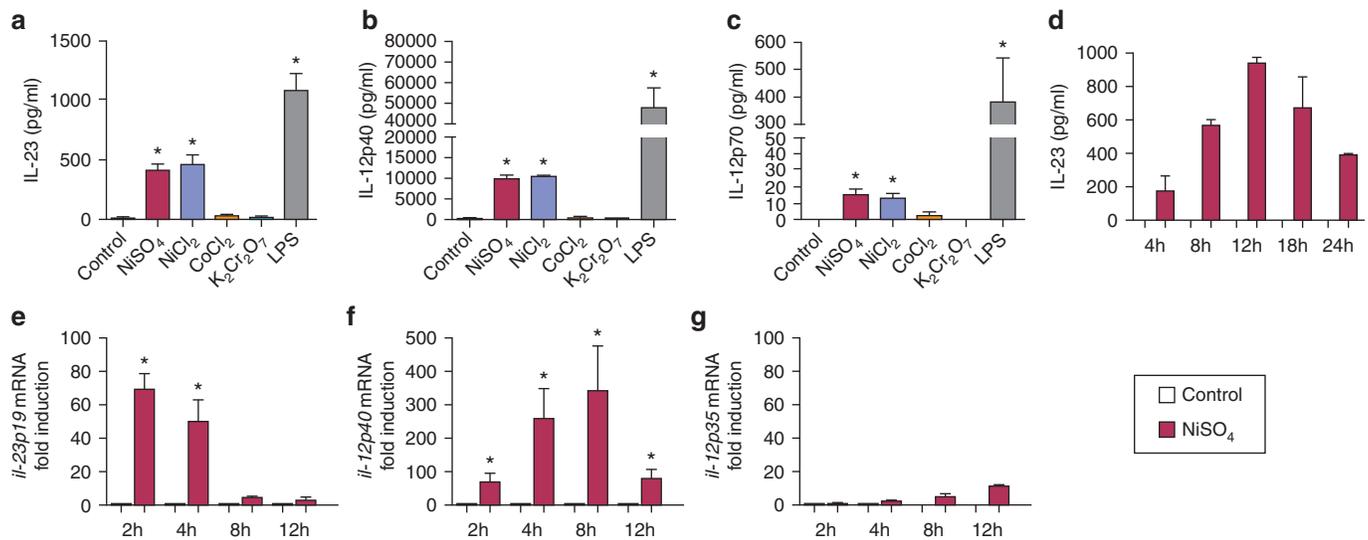
The IL-12 cytokine family is composed of heterodimeric cytokines sharing homology at the subunit, receptor, and signaling levels (Vignali and Kuchroo, 2012). Two cytokines from this family have been found to play a major role in skin allergy (Larsen et al., 2009): IL-12p70, composed of IL-12p40 subunit linked to IL-12p35 subunit, and IL-23, composed of the IL-12p40, common with IL-12p70, linked to IL-23p19 subunit. Both cytokines are produced by DCs and influence the development of IFN- $\gamma$ -producing T cells (Th1) and IL-17-producing T cells (Th17), respectively (Vignali and Kuchroo, 2012). We and others have previously shown that nickel can trigger the production of IL-12p40 and IL-23 in different models of human DCs generated in vitro (Aiba et al., 2003; Antonios et al., 2009; de Bourayne et al., 2017). Moreover, we showed that the production of IL-12p40 by nickel in human monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) was

<sup>1</sup>Inflammation Chimiokines et Immunopathologie, INSERM, Fac. de pharmacie—Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France; and <sup>2</sup>Laboratory of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Saint-Joseph University, Beirut, Lebanon

Correspondence: Marc Pallardy, Inflammation Chimiokines et Immunopathologie, INSERM, Fac. de pharmacie—Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France. E-mail: marc.pallardy@u-psud.fr

Abbreviations: Ab, antibody; ACD, allergic contact dermatitis; DC, dendritic cell; MoDC, monocyte-derived dendritic cell; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NFIL-3, nuclear factor, interleukin 3 regulated; NiSO<sub>4</sub>, nickel sulfate; STAT, signal transducer and activator of transcription; Th, T helper; TLR, toll-like receptor

Received 23 December 2016; revised 5 May 2017; accepted 24 May 2017; accepted manuscript published online 17 June 2017; corrected proof published online 31 August 2017



**Figure 1. Effect of metallic haptens on the production of IL-23 and IL-12 by human MoDCs.** Immature DCs were treated or not with 500  $\mu$ M of NiSO<sub>4</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, or 5  $\mu$ M of K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> or 25 ng/ml of LPS for the indicated time. ELISA was performed to measure (a) IL-23, (b) IL-12p40, and (c) IL-12p70 production after 24 hours. Values are presented as mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. (d) Kinetics of IL-23 production by NiSO<sub>4</sub>-activated MoDCs. Values are presented as mean  $\pm$  SEM of two independent experiments. (e) *il-23p19*, (f) *il-12p40*, and (g) *il-12p35* mRNA levels were quantified by qRT-PCR. Results are expressed as fold factor compared with untreated samples and corrected by the expression of  $\beta$ -actin and *gapdh*. Values are presented as mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \**P*  $\leq$  0.05, Mann-Whitney. CoCl<sub>2</sub>, cobalt chloride; K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, potassium dichromate; LPS, lipopolysaccharide; MoDC, monocyte-derived dendritic cell; NiCl<sub>2</sub>, nickel chloride; NiSO<sub>4</sub>, nickel sulfate; qRT-PCR, quantitative real-time reverse transcriptase-PCR; SEM, standard error of the mean.

dependent on p38MAPK, NF- $\kappa$ B, and interferon regulatory factor-1 pathways (Antonios et al., 2010).

In this work, we aimed to depict the modulation of the IL-23/IL-12p70 balance induced by nickel sulfate (NiSO<sub>4</sub>) in human MoDCs, thus affecting T-cell differentiation. Our results showed that NiSO<sub>4</sub> induced an early production of IL-23 and a higher IL-23/IL-12p70 molar ratio, promoting Th17 cell development. However, MoDCs treated concomitantly with NiSO<sub>4</sub> and IFN- $\gamma$  were characterized by a lower IL-23/IL-12p70 ratio despite the increase of IL-23, IL-12p70, and IL-12p40 production. Moreover, we found that TLR4, p38MAPK, and NF- $\kappa$ B pathways played an important role in IL-23/IL-12 production by nickel-treated MoDCs. Interestingly, the inhibition of the Jak-signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway seemed to favor IL-23 over IL-12p70 production in NiSO<sub>4</sub> or NiSO<sub>4</sub>- and IFN- $\gamma$ -treated MoDCs. As a consequence, Jak-STAT inhibition in nickel-activated MoDCs impaired their ability to induce Th1 cells but maintained Th17 cells.

## RESULTS

### Nickel induces the production of IL-23, IL-12p40, and IL-12p70 by human MoDCs

NiSO<sub>4</sub> or NiCl<sub>2</sub> but not CoCl<sub>2</sub> nor K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> induced the production of IL-23 and IL-12p40 in human MoDCs and lower levels of IL-12p70 (Figure 1a–c) were detected at 24 hours. The early production of IL-23 was followed by a rapid decay (Figure 1d). We then studied mRNA expression of IL-23 and IL-12p70 subunits in NiSO<sub>4</sub>-activated MoDCs. In comparison with other metals, only nickel upregulated the expression of the two subunits of IL-23 (Supplementary Figure S1 online). In fact, NiSO<sub>4</sub> induced an early expression of *il-23p19* mRNA by 2 hours that declined rapidly. *il-12p40* mRNA was delayed compared with *il-23p19* mRNA

but declined over time. However, low levels of *il-12p35* mRNA were detected after nickel stimulation (Figure 1e–g).

### NiSO<sub>4</sub>-treated MoDCs promote IL-17A producing CD4<sup>+</sup> T cells through IL-23 production

On the basis of the significant secretion of IL-23 by nickel-activated MoDCs, we next examined whether these MoDCs were able to induce the production of IL-17A from allogeneic total CD4<sup>+</sup> T cells. We measured intracellular IFN- $\gamma$  and IL-17A production after gating on viable CD4<sup>+</sup> T cells. NiSO<sub>4</sub>-activated MoDCs augmented significantly CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation (Supplementary Figure S2a, S2c online) and the percentage of total IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (Figure 2a), IL-17A<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (Figure 2b), and IL-17A<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (Figure 2c). A representative result obtained from one experiment is shown in Figure 2i. To evaluate if the IL-23 produced by NiSO<sub>4</sub>-activated MoDCs was biologically significant, we added exogenous IL-23p19 neutralizing antibody (Ab) to the coculture system. The addition of IL-23 neutralizing Ab did not modify CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation (Figure S2a, S2c) but significantly inhibited the percentage of total IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (Figure 2e), mainly the IL-17A<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (Figure 2f).

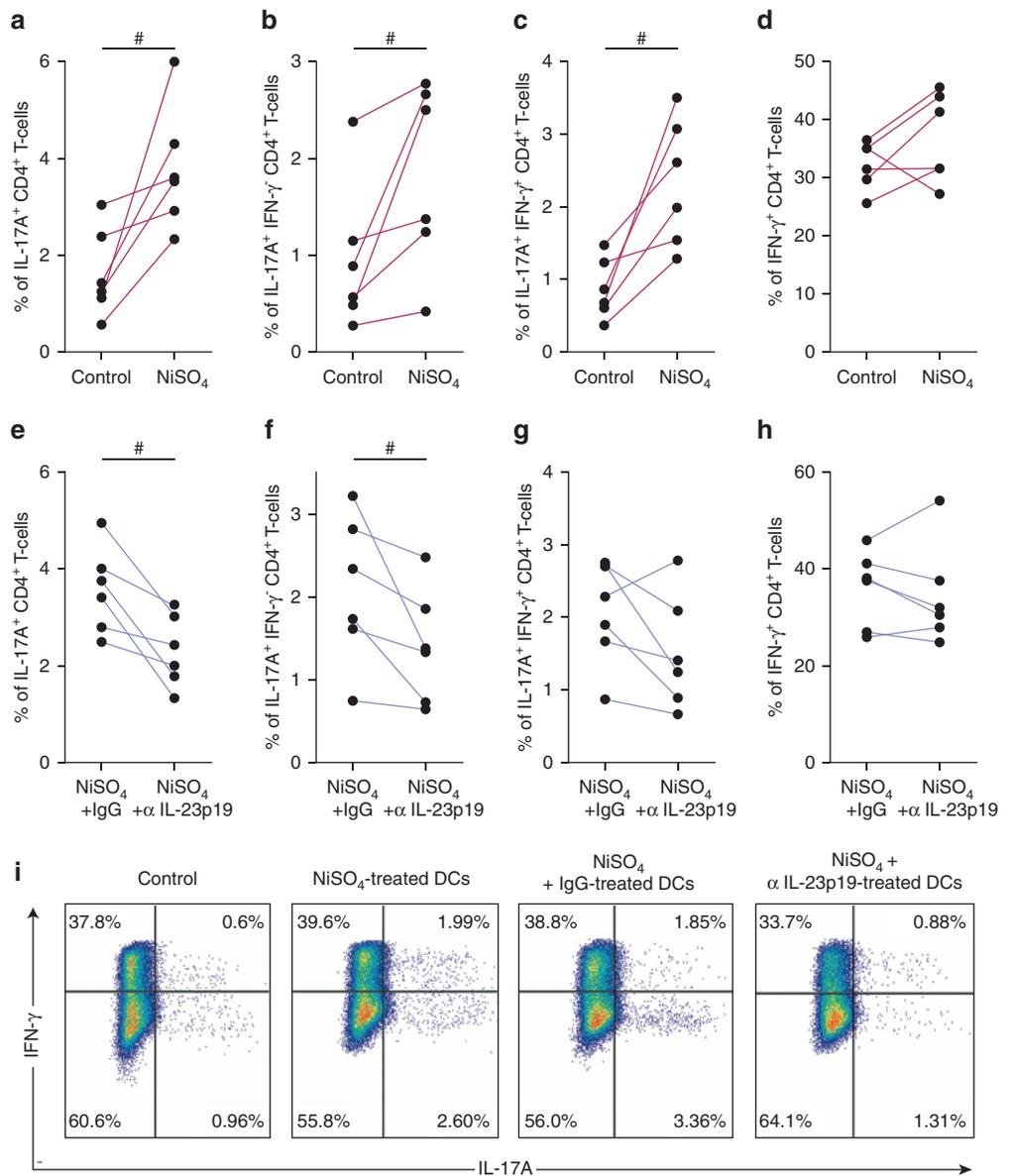
### IFN- $\gamma$ regulates the IL-23/IL-12p70 ratio in NiSO<sub>4</sub>-treated MoDCs

We then evaluated the effect of IFN- $\gamma$  on NiSO<sub>4</sub>-induced IL-23/IL-12 production. The concomitant presence of IFN- $\gamma$  and NiSO<sub>4</sub> induced an increase in the production of these cytokines (Figure 3a–c). IL-23 production reached its peak by 12 hours and then decreased over time, whereas NiSO<sub>4</sub> and IFN- $\gamma$ -induced-IL-23 continued to rise (Figure 3d). Importantly, when we calculated the IL-23/IL-12p70 molarity ratio in this human in vitro model, we found that in the presence of NiSO<sub>4</sub> alone, this ratio was higher than the one found with

**Figure 2. NiSO<sub>4</sub>-activated MoDCs promote IL-17A-producing-CD4<sup>+</sup> T cells through IL-23 production.**

(a–d) Frequency of IL-17A and/or IFN- $\gamma$ -positive CD4<sup>+</sup> T cells cultured for 9 days with NiSO<sub>4</sub>-activated MoDCs or control. Cytokine content was measured by intracellular staining after 5 hours of PMA/ionomycin activation and after gating on viable CD4<sup>+</sup> T cells. (e–h) Anti-IL-23p19 neutralizing Ab or control Ab were added to NiSO<sub>4</sub>-activated MoDCs 1 hour before the coculture, for 9 days, with allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells.

Cytokine content was measured by intracellular staining after 5 hours of PMA/ionomycin activation and after gating on viable CD4<sup>+</sup> T cells. One representative experiment is shown in (i). Each circle represents a donor for a total of six independent experiments with six different donors. \**P* ≤ 0.05, Wilcoxon signed rank test. Ab, antibody; MoDC, monocyte-derived dendritic cell; NiSO<sub>4</sub>, nickel sulfate; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate.



NiSO<sub>4</sub> and IFN- $\gamma$  (Figure 3e). Surprisingly, the addition of IFN- $\gamma$  induced a significant decrease approximately threefold in the expression of *il-23p19* mRNA at 2 and 4 hours in NiSO<sub>4</sub>-treated MoDCs while significantly increasing *il-12p40* and *il-12p35* mRNA (Figure 3f–h). Taken together, these data suggested that IFN- $\gamma$  differentially regulates IL-23/IL-12p70 subunits in NiSO<sub>4</sub>-activated MoDCs.

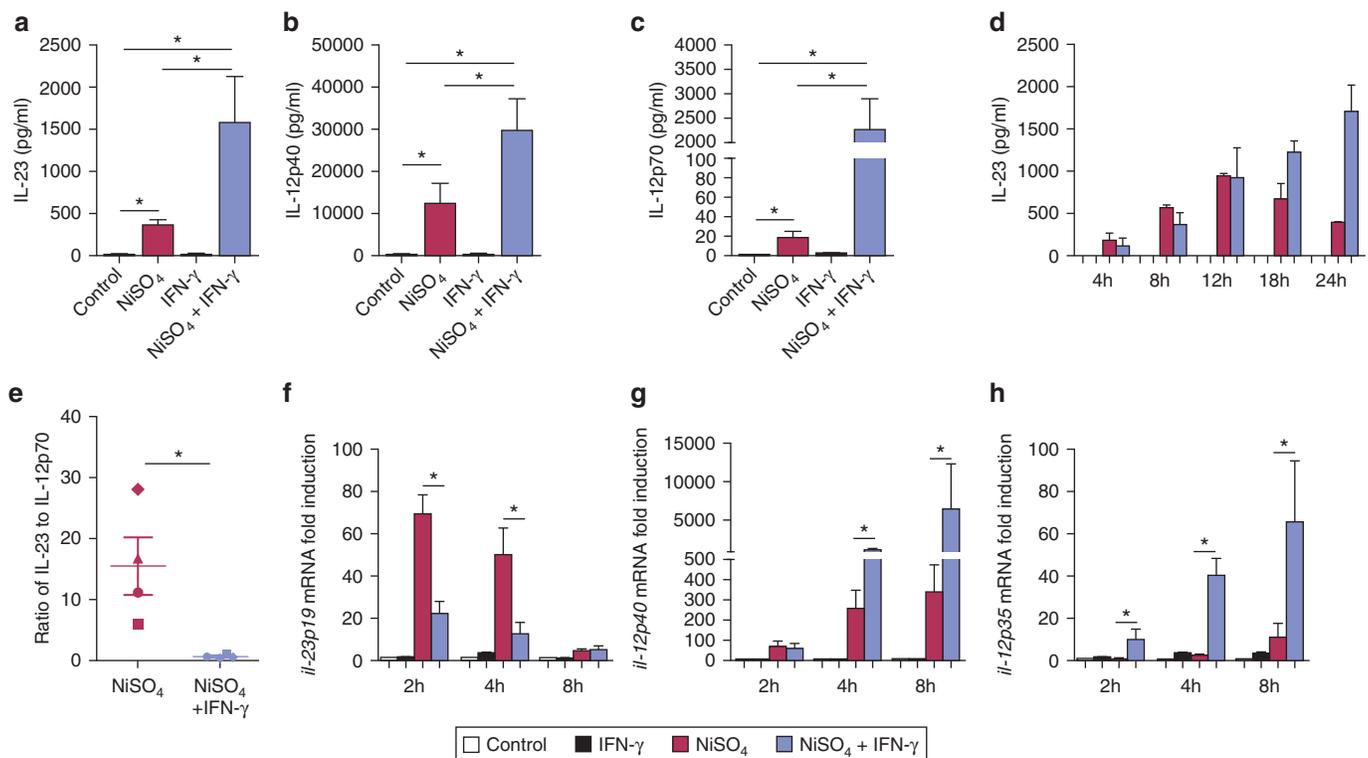
**TLR4, p38MAPK, and NF- $\kappa$ B pathways are crucial for NiSO<sub>4</sub>-induced production of IL-23, IL-12p40, and IL-12p70**

To investigate if the effect of nickel on the IL-12 cytokine family was mediated by the TLR4 signaling pathway, we performed TLR4 blocking experiments. Blocking TLR4 induced a concentration-dependent decrease in IL-23/IL-12 production at 24 hours by nickel-treated MoDCs (Figure 4a–c). Moreover, the inhibition of p38MAPK (SB203580) or NF- $\kappa$ B (BAY 11-7085) pathways induced a significant decrease in the production of IL-23/IL-12 at

24 hours. Likewise, these pathways mediated the expression of IL-23/IL-12 subunits (Supplementary Figure S3 online).

**The Jak-STAT pathway regulates the IL-23/IL-12p70 balance**

We previously showed that nickel was able to induce interferon regulatory factor-1 expression via Jak-STAT activation, in human MoDCs, and that interferon regulatory factor-1 was essential for IL-12p40 and IL-12p70 production in NiSO<sub>4</sub>- and IFN- $\gamma$ -treated MoDCs (Antonios et al., 2010). Here, we asked whether Jak-STAT activation was also required for IL-23 production. The inhibition of the Jak-STAT pathway induced an increase in the production of IL-23 and IL-12p40 at 24 hours but not of IL-12p70 (Figure 5a–c). Moreover, pretreatment of MoDCs with Jak Inhibitor 1 followed by NiSO<sub>4</sub> and IFN- $\gamma$  stimulation induced a decrease in the production of IL-23/IL-12 cytokines (Figure 5d–f). Interestingly, when we calculated the IL-23/IL-12p70 molarity ratio, we found that in the presence of Jak Inhibitor I, the ratio was higher than the one found with NiSO<sub>4</sub> or with NiSO<sub>4</sub> and IFN- $\gamma$ -activated



**Figure 3. IFN- $\gamma$  regulates IL-23 production by NiSO<sub>4</sub> in human MoDCs.** DCs were treated or not with NiSO<sub>4</sub>, in addition or not of IFN- $\gamma$  (1,000 U/ml) for the indicated time. ELISA was performed to measure (a) IL-23, (b) IL-12p40, and (c) IL-12p70 production after 24 hours. Values are presented as means  $\pm$  SEM of four independent experiments (a–c). (d) Kinetics of IL-23 production by NiSO<sub>4</sub> or NiSO<sub>4</sub>- and IFN- $\gamma$ -activated DCs. Values are presented as mean  $\pm$  SEM of two independent experiments. (e) Molarity ratio of IL-23 to IL-12p70 for each condition of stimulation based on the molecular weight of IL-23 and IL-12p70 and their respective concentrations obtained by ELISA at 24 hours after stimulation. (f) *il-23p19*, (g) *il-12p40*, and (h) *il-12p35* mRNA levels were quantified by qRT-PCR. Values are presented as mean  $\pm$  SEM of four independent experiments \* $P \leq 0.05$ , Mann-Whitney. MoDC, monocyte-derived dendritic cell; NiSO<sub>4</sub>, nickel sulfate; qRT-PCR, quantitative real-time reverse transcriptase-PCR; SEM, standard error of the mean.

MoDCs (Figure 5g). We next evaluated the effect of Jak-STAT inhibition on IL-23 and IL-12p70 subunit regulation. As expected, the inhibition of the Jak-STAT pathway in nickel-activated MoDCs induced an increase in the expression of the two subunits of IL-23 but decreased *il-12p35* mRNA expression (Supplementary Figure S4a–c online). Furthermore, the inhibition of the Jak-STAT pathway in nickel and IFN- $\gamma$ -activated MoDCs induced an increase in the expression of *il-23p19* mRNA but a decrease in the expression of the two subunits of IL-12p70 (Supplementary Figure S4d–f). To investigate the mechanisms mediating the increased IL-23 production seen after the pretreatment of nickel-activated MoDC with Jak Inhibitor I, we examined nuclear factor, interleukin 3 regulated (NFIL-3) expression, a recently identified repressor of *il-12p40* mRNA. We showed that nickel induced the expression of NFIL-3 (Supplementary Figure S5a, S5b online). The inhibition of the Jak-STAT pathway decreased the expression of NFIL-3 in nickel-activated MoDCs (Supplementary Figure S5c, S5d), which may be translated in an increase in IL-12p40 and IL-23 production.

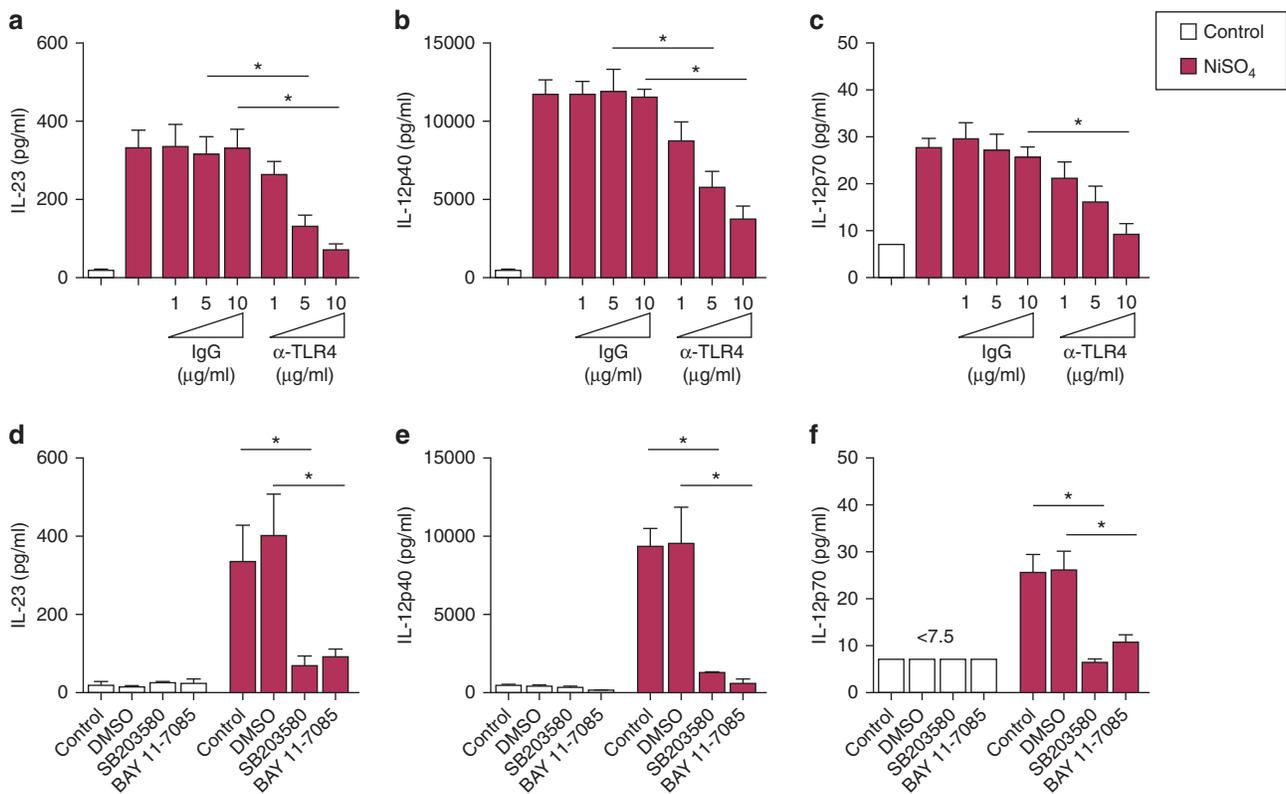
#### Inhibition of the Jak-STAT pathway in NiSO<sub>4</sub>-activated MoDCs modulates Th1/Th17 cell balance

Because our data showed that the Jak-STAT pathway can regulate the IL-23/IL-12p70 balance, we speculated that the ability of nickel-activated MoDCs to drive T-cell polarization

would be modified in the case of Jak-STAT inhibition. MoDCs were pretreated or not with Jak Inhibitor I for 2 hours, and stimulated with nickel for 4 hours. After 24 hours, MoDCs were cocultured with allogeneic total CD4<sup>+</sup> T cells and we measured intracellular IFN- $\gamma$  and IL-17A production after gating on viable CD4<sup>+</sup> T cells. The capacity of nickel-activated MoDCs to induce IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-cell (Figure 6a, 6e), IL-17A<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-cell (Figure 6b, 6e), IL-17A<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-cell (Figure 6c, 6e), and CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation was maintained (Supplementary Figure S2b, S2c) after Jak-STAT inhibition. However, the inhibition of the Jak-STAT pathway in NiSO<sub>4</sub>-activated MoDCs induced a significant decrease in the percentage of total IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (Figure 6d, 6e).

#### DISCUSSION

ACD is a common skin disease caused by chemicals applied to the skin (Kaplan et al., 2012) and nickel is one of the most prevalent contact allergens (Diepgen et al., 2016). DCs play an important role in ACD by capturing the antigen, presenting it to specific T cells and shaping their responses through differential cytokine production (Kaplan et al., 2012). Whereas IL-12p70 drives a Th1-type response, IL-23 is crucial for the development of Th17 cells (Vignali and Kuchroo, 2012). Both populations have been isolated from nickel-allergic patients and involved in skin inflammation



**Figure 4. Production of IL-23 and IL-12 in NiSO<sub>4</sub>-activated MoDCs is TLR4, p38MAPK, and NF-κB dependent.** At day 5, immature DCs were pretreated or not (control) for (a–c) 1 hour with an anti-TLR4 or isotype control antibodies (1, 5, and 10 µg/ml) or (d–f) 30 minutes with the inhibitor of the p38MAPK pathway (SB203580, 20 µM) or for 1 hour with either DMSO or with the inhibitor of the NF-κB pathway (BAY 11-7085, 3 µM). Cells were then treated or not with NiSO<sub>4</sub> (500 µM) for 24 hours. ELISA was performed after 24 hours of stimulation. Values are presented as mean ± SEM of four independent experiments. \**P* ≤ 0.05, Mann-Whitney. MAPK, mitogen-activated protein kinase; MoDCs, monocyte-derived dendritic cells; NiSO<sub>4</sub>, nickel sulfate; SEM, standard error of the mean; TLR, toll-like receptor.

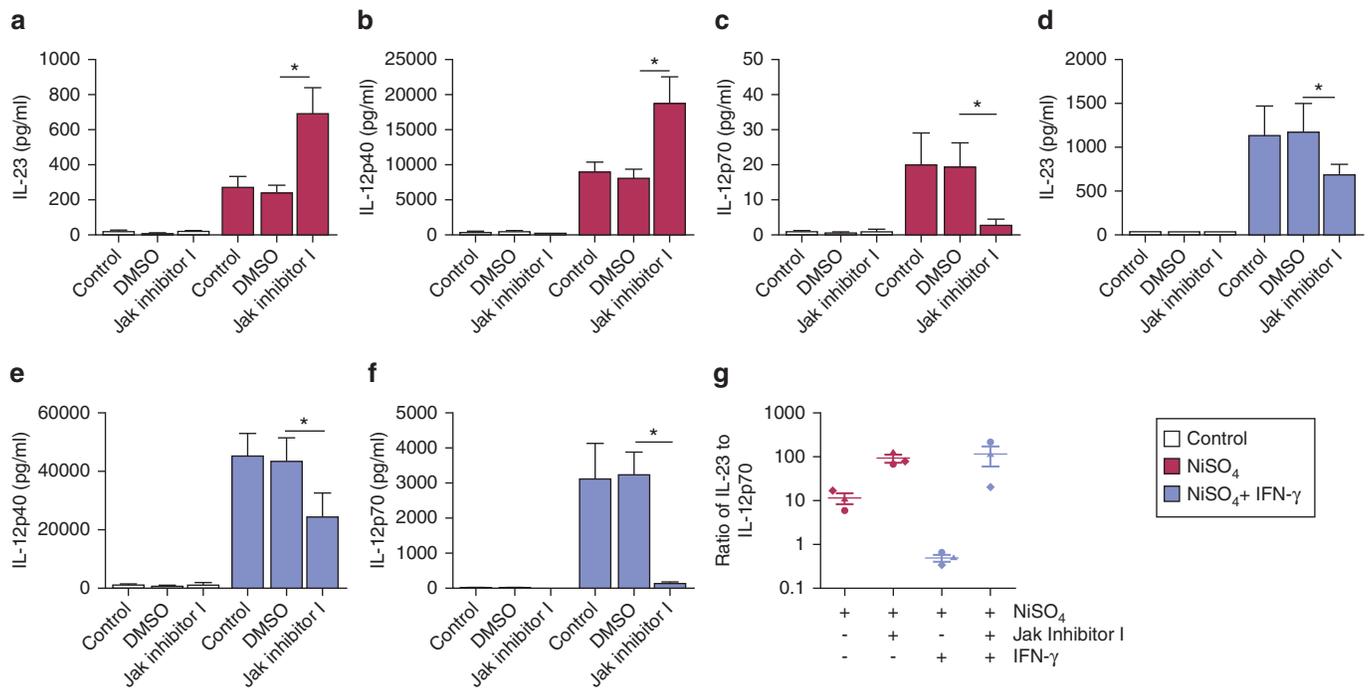
(Dhingra et al., 2014; Dyring-Andersen et al., 2013; Larsen et al., 2009; Zhao et al., 2009). Interestingly, the presence of IL-17A was correlated with the clinical score in nickel-allergic patients (Schmidt et al., 2017). Moreover, IL-17-deficient mice showed impaired contact hypersensitivity responses to contact allergens (Nakae et al., 2002), and injection of anti-IL-17 neutralizing antibodies reduced the severity of contact hypersensitivity (He et al., 2006).

In this work, we provided original mechanistic regulation of IL-23 and IL-12p70 by nickel in human MoDCs. We found that exposure of MoDCs to nickel leads to an increase in the production of IL-23, IL-12p40, and of low levels of IL-12p70. This production of IL-23 seems to be a particular feature of nickel because other metallic haptens and dinitrochlorobenzene did not induce its production (de Bourayne et al., 2017). In fact, human MoDCs treated with different TLR agonists (TLR2, TLR4, TLR7/8) were also able to produce IL-23 (Roses et al., 2008; van Beelen et al., 2007; Wei et al., 2015). Nickel-activated MoDCs showed an early upregulation of the expression of IL-23-specific *il-23p19* mRNA followed by high and sustained amounts of *il-12p40* mRNA in the quasi-absence of IL-12p70-specific *il-12p35* mRNA expression. These data are consistent with the early production of IL-23 induced by nickel-activated MoDCs.

To verify if the IL-23 derived from nickel-activated MoDCs was functional and involved in Th17 differentiation, we first

showed that nickel-activated MoDCs induced Th17 (IL-17A<sup>+</sup>IFN-γ<sup>-</sup>) and Th17/Th1 (IL-17A<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>) cell polarization. We also found that IL-23 produced by nickel-activated MoDCs was essential for Th17 cell development because an anti-IL-23p19 Ab reduced significantly Th17 polarization. These results were in line with other studies performed with lipopolysaccharide-activated human MoDCs where IL-23 neutralization provoked a decrease in IL-17A production from allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells (Roses et al., 2008). Human DC-derived IL-23 is also a key factor in IL-17A production by T cells in response to pathogens such as *Candida albicans* (Maher et al., 2015), *Mycobacterium tuberculosis* (Basile et al., 2017), and other bacteria (van Beelen et al., 2007) acting through TLR2/4 and NOD2 signaling pathways.

We then investigated the role of IFN-γ in conjunction with nickel on the IL-23/IL-12p70 balance in human MoDCs. We showed that IL-23 produced by MoDCs upon NiSO<sub>4</sub> stimulation alone was greatly enhanced when adding IFN-γ. This result is in favor of the hypothesis that engagement to IL-23 production may persist in proinflammatory conditions such as natural killer cell activation (Butchar et al., 2007; Kim et al., 2009) or even after the DC-T cell interaction, leading to IFN-γ production in the microenvironment. Moreover, IFN-γ-priming of human monocytes or human monocyte-derived macrophages/DCs enhances IL-23 production during *Francisella* infection (Butchar et al., 2008) or



**Figure 5. Inhibition of the Jak-STAT pathway enhances the IL-23/IL-12p70 ratio in NiSO<sub>4</sub> or NiSO<sub>4</sub> and IFN- $\gamma$ -activated MoDCs.** At day 5, immature DCs were pretreated with either DMSO or with the inhibitor of the Jak-STAT pathway (Jak Inhibitor I, 0.5  $\mu$ M) and subsequently treated or not with NiSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ M) (a–c) in the presence or not of IFN- $\gamma$  (1,000 U/ml) (d–f) for 24 hours. Cell supernatants were assayed by ELISA. Results are expressed in pg/ml. Values are presented as mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \* $P \leq 0.05$ , Mann-Whitney. (g) Molarity ratio of IL-23 to IL-12p70 for each condition of stimulation based on the molecular weight of IL-23 and IL-12p70 and their respective concentrations obtained by ELISA after 24 hours of stimulation. MoDC, monocyte-derived dendritic cell; NiSO<sub>4</sub>, nickel sulfate; SEM, standard error of the mean; STAT, signal transducer and activator of transcription.

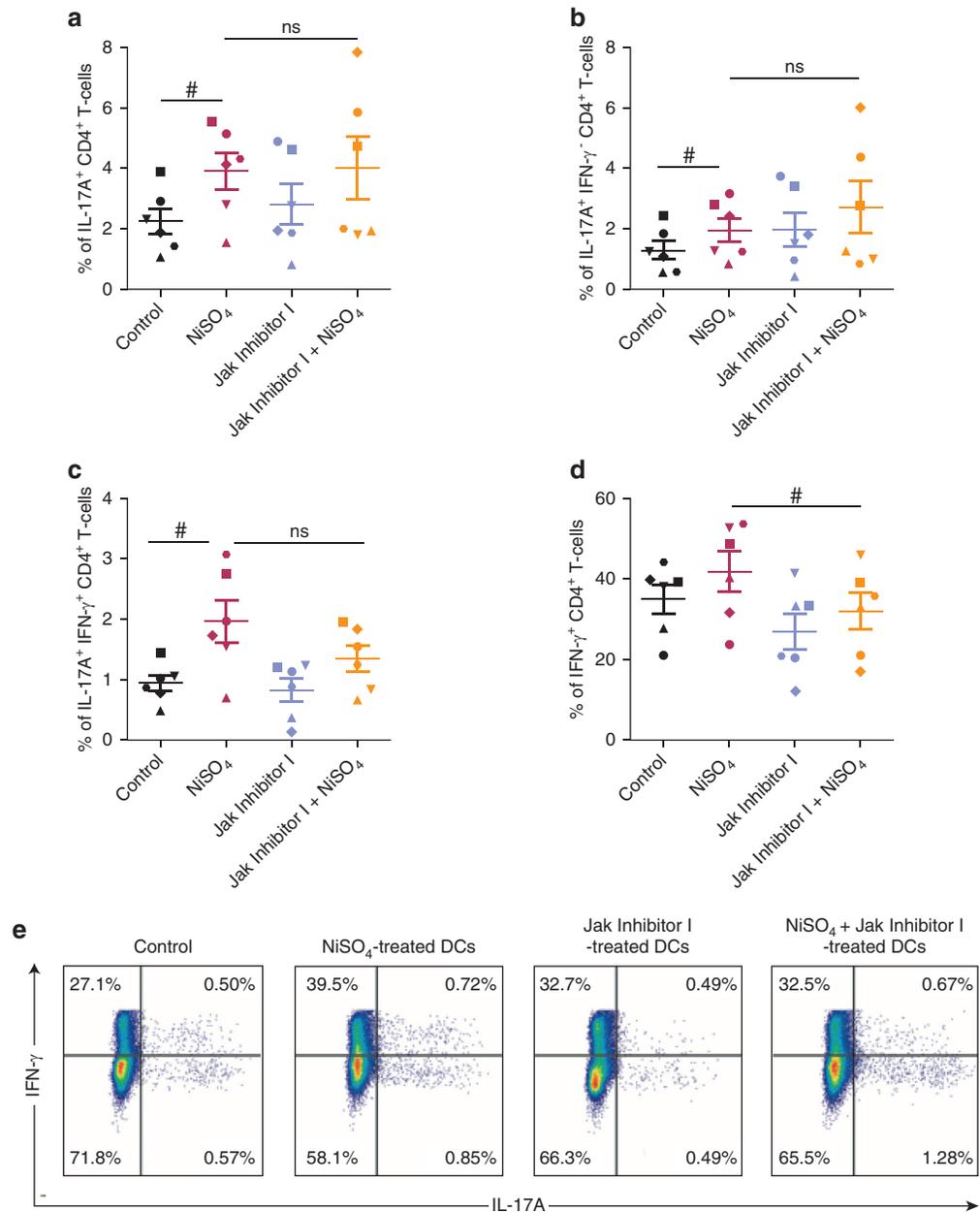
lipopolysaccharide treatment, respectively (Roses et al., 2008; Verreck et al., 2004). Interestingly, this increase in IL-23 production in NiSO<sub>4</sub> and IFN- $\gamma$ -activated MoDCs was accompanied with a higher fold induction of IL-12p70 as shown in this study and previously described by Antonios et al. (2010), suggesting that IL-12p70 was the master regulatory cytokine in shaping T-cell responses in the case of DCs treated concomitantly with NiSO<sub>4</sub> and IFN- $\gamma$ . Whereas IFN- $\gamma$  potently synergized with NiSO<sub>4</sub> for optimal induction of *il-12p40* and *il-12p35* mRNA expressions, it inhibited nickel-induced *il-23p19* mRNA expression and thus prevented the early production of IL-23. The absence of correlation between *il-23p19* mRNA expression and IL-23 production in DCs treated with nickel and IFN- $\gamma$  is probably due to an increase in the IL-12p40 subunit production that can still interact with the induced and pre-existent pool of IL-23p19.

To dissect the signaling pathways leading to nickel-induced IL-23 by MoDCs, and because nickel is known to be a TLR4 agonist (Schmidt et al., 2010), we investigated the role of TLR4 on nickel-induced IL-23/IL-12 production. Our results suggested that the production of these cytokines was dependent on the TLR4 pathway. Moreover, we have previously shown that NiSO<sub>4</sub> can activate MAPK and NF- $\kappa$ B pathways in human DCs (Antonios et al., 2009; Turbica et al., 2015). Here we showed that IL-23/IL-12 production in NiSO<sub>4</sub>-activated MoDCs was also dependent on p38MAPK and NF- $\kappa$ B pathways at both the protein and the transcriptional levels. These results are in line with other studies performed with lipopolysaccharide-activated DCs or

macrophages (Carmody et al., 2007; Happel et al., 2003; Liu et al., 2009; Qian et al., 2011).

On the other hand, we showed that the Jak-STAT pathway can regulate the IL-23/IL-12p70 balance in human MoDCs as it was reported in macrophages infiltrated in the tumor microenvironment (Kortylewski et al., 2009). We demonstrated that IL-23 and IL-12p70 production in NiSO<sub>4</sub>-activated MoDCs was differentially regulated by the Jak-STAT signaling pathways. We confirmed the positive role of the Jak-STAT pathway in IL-12p70 production in NiSO<sub>4</sub> or NiSO<sub>4</sub> and IFN- $\gamma$ -activated MoDCs, found previously for TLR-activated DCs (Antonios et al., 2010; Goriely et al., 2008; Heine et al., 2013), and we demonstrated that this signaling pathway negatively regulates IL-23 production in NiSO<sub>4</sub>-activated MoDCs. The decrease in IL-23 production in NiSO<sub>4</sub>- and IFN- $\gamma$ -treated MoDCs, after Jak-STAT inhibition, despite the increase in *il-23p19* mRNA expression supports the hypothesis that IL-12p40 may be the limiting factor in IL-23 production. To understand the mechanism mediating the increase in IL-23 production after Jak-STAT inhibition in nickel-activated DCs, we checked if Jak-STAT inhibition interfered with NFIL-3, a mammalian basic leucine zipper transcription factor activated by multiple cytokines via the Jak-STAT pathway (Lang et al., 2002; Kashiwada et al., 2010) and recently identified as a repressor of *il-12p40* mRNA (Kobayashi et al., 2011; Lang et al., 2002; Smith et al., 2011). Nickel induced the expression of NFIL-3 in MoDCs. Using a genome-wide transcriptome analysis, Gölz et al. (2016) showed that nickel upregulated *nfil-3* mRNA expression in

**Figure 6. Inhibition of the Jak-STAT pathway in NiSO<sub>4</sub>-treated MoDCs modulates the Th1/Th17 balance.** (a–d) Frequency of IL-17A and/or IFN- $\gamma$ -positive CD4<sup>+</sup> T cells cultured for 9 days with MoDCs treated or not with NiSO<sub>4</sub>. In some conditions, MoDCs were pretreated with Jak Inhibitor I (0.5  $\mu$ M) for 2 hours and then activated or not with NiSO<sub>4</sub>. Cytokine content was measured by intracellular staining after 5 hours of PMA/ionomycin activation and after gating on viable CD4<sup>+</sup> T cells. One representative experiment is shown in (e). Each circle represents a donor for a total of six independent experiments with six different donors. #*P*  $\leq$  0.05, Wilcoxon signed rank test. MoDC, monocyte-derived dendritic cell; NiSO<sub>4</sub>, nickel sulfate; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; STAT, signal transducer and activator of transcription; Th, T helper.



human monocytes. The inhibition of the Jak-STAT pathway leads to a decrease in NFIL-3 expression that may explain the increase in IL-12p40 and IL-23 production.

Finally, our results described the ability of NiSO<sub>4</sub>-treated MoDCs to produce a higher IL-23/IL-12p70 ratio compared with untreated MoDCs or NiSO<sub>4</sub>- and IFN- $\gamma$ -treated MoDCs. These results confirmed the capacity of NiSO<sub>4</sub>-activated MoDCs to promote Th17 cell polarization through IL-23 production regulated by the TLR4, p38MAPK, and NF- $\kappa$ B pathways. Activation of the Jak-STAT pathway by IFN- $\gamma$  will provide the necessary and required signals for *il-12p35* mRNA expression that is needed for IL-12p70 production. Interestingly, the inhibition of the Jak-STAT pathway produced a higher IL-23/IL-12p70 ratio compared with NiSO<sub>4</sub> or NiSO<sub>4</sub>- and IFN- $\gamma$ -treated MoDCs leading to maintenance of Th17 cells but a decrease in Th1 cell polarization. This is in agreement with a role of IL-23 and IL-12p70 as Th17- and

Th1-polarizing cytokines. We could postulate that in the absence of Jak-STAT activation, the IL-23-Th17-cell axis, rather than the IL-12p70-Th1-cell axis, will be favored.

## MATERIALS AND METHODS

### Generation of human MoDCs

Buffy coats were collected from the Etablissement Français du Sang (EFS, Rennes, France) from anonymous healthy donors after approval for experiments and written informed consent. Peripheral blood mononuclear cells were purified from buffy coats by density centrifugation on a Ficoll gradient (lymphocyte separation medium; PAA, Les Mureaux, France). The preparation of MoDCs was previously described (Antonios et al., 2010).

### Chemical treatment of immature MoDCs

MoDCs were treated or not with NiSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ M), nickel chloride (NiCl<sub>2</sub>; 500  $\mu$ M), cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>; 500  $\mu$ M), potassium

dichromate ( $K_2Cr_2O_7$ ; 5  $\mu$ M), and lipopolysaccharide (25 ng/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for the indicated time. In some experiments, MoDCs were treated with IFN- $\gamma$  (1,000 U/ml, Abcys). To study the involvement of signaling pathways in IL-23 production, MoDCs were pretreated for 1 hour with anti-TLR4 or isotype control (BioLegend, San Diego, CA) or for 30 minutes with SB203580 (20  $\mu$ M) or for 1 hour with BAY 11-7085 (3  $\mu$ M) or for 2 hours with Jak Inhibitor I (0.5  $\mu$ M) (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany). Cell viability after treatment was never less than 75% as assessed by trypan blue exclusion or propidium iodide.

#### RNA isolation and real-time RT-PCR analysis

Total RNA was extracted after lysis of treated MoDCs in RNA-PLUS reagent (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France). Quantitative real-time reverse transcriptase-PCR was performed using the SYBR Green technology. Quantification was performed with the CFX Manager software of Bio-Rad Laboratories. Ratios were calculated as the mean of  $(1 + E)^{-\Delta\Delta Ct}$  values, where  $E$  is the efficiency and  $\Delta\Delta Ct$  is the target gene expression of treated cells compared with untreated cells, corrected to the expression of two reference genes *gapdh* and  $\beta$ -actin. Results were expressed as the fold-factor induction: ratio of  $(1 + E)^{-\Delta\Delta Ct}$  of treated cells/ $(1 + E)^{-\Delta\Delta Ct}$  of untreated cells.

#### Cytokines quantification in MoDC supernatants

ELISA assays were performed on culture supernatants according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN). In some experiments, the IL-23/IL-12p70 molarity ratio for each condition of stimulation was calculated based on the molecular weight of IL-23 (59 kD) and IL-12p70 (75 kD), and their respective concentrations obtained by ELISA at 24 hours after stimulation. Ratio =  $\frac{\text{Molarity of IL-23}}{\text{Molarity of IL-12p70}}$  of donor X.

#### CD4<sup>+</sup> T-cell polarization experiments

MoDCs were stimulated with NiSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ M) for 4 hours, washed and kept for 20 hours, in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (Biowest, Nuaille, France), 1% sodium pyruvate, and 1% penicillin/streptomycin (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA). Purified allogeneic total CD4<sup>+</sup> T cells (10<sup>6</sup> cells/ml, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) were cocultured with nickel-activated MoDCs (10<sup>5</sup> cells/ml) in round-bottom 96-well plates. The purity (>95%) of CD4<sup>+</sup> T cells was confirmed by flow cytometry. In some wells, anti-IL-23p19 neutralizing Ab or control goat IgG (2.5  $\mu$ g/ml; R&D Systems) was added to NiSO<sub>4</sub>-activated MoDCs 1 hour before the coculture. In other experiments, MoDCs were pretreated with Jak Inhibitor I (0.5  $\mu$ M) for 2 hours, and then activated with NiSO<sub>4</sub> for 4 hours. CD4<sup>+</sup> T cells were restimulated on day 6 with MoDCs treated with different conditions. At day 9, intracellular cytokine production was analyzed as described below. In some experiments, allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells were labeled with 0.5  $\mu$ M carboxyfluorescein succinimidyl ester (Invitrogen, Carlsbad, CA) and then cocultured with MoDCs (10<sup>5</sup> cells/ml). Five days later, CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation was analyzed by flow cytometry and expressed as the percentage of carboxyfluorescein succinimidyl ester low cells.

#### Flow cytometry analysis of cytokine production

After 9 days of coculture, T cells were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (10 ng/ml) and ionomycin (1  $\mu$ g/ml), and, after 1 hour, brefeldin A (10  $\mu$ g/ml) was added for an additional 4 hours (Sigma-Aldrich). Cells were first stained with the Zombie Aqua viability dye (BioLegend) and with CD4-Alexa fluor 700

(ebioscience, Paris, France) and then permeabilized using appropriate buffers (Inside Fix Stain Kit, Miltenyi Biotec). IFN- $\gamma$ -allophycocyanin and IL-17A-FITC (Miltenyi Biotec) were used according to the manufacturer's instructions. Cytometry analysis was performed using the LSR-Fortessa cytometer (BD Biosciences). Cell aggregates were gated out based on the forward scatter-height versus forward scatter-area plot, and the live cell gate was established based on the exclusion of viability dye.

#### Western blot analysis

After pretreatment or not with inhibitors, MoDCs were incubated for the indicated time with nickel and washed in cold phosphate buffered saline before lysis. Thirty micrograms of denatured protein was loaded onto 10% SDS-PAGE gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes, which were successively incubated with an Ab directed against NFIL-3 and an Ab against  $\beta$ -actin as a loading control (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France). Immunoreactive bands were detected by their chemiluminescence by use of the ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad Laboratories). Bands were quantified with the Image Lab software.

#### Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Differences between groups were evaluated with the Wilcoxon signed rank test or the Mann-Whitney  $U$  test (GraphPad, La Jolla, CA). The  $P$ -values < 0.05 were considered to denote statistical significance.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from "Programme Cedre," "National Council for Scientific Research in Lebanon (CNRS-L)," as well as "Conseil de la Recherche" of Saint-Joseph University. We would like to thank Marie-Laure Aknin, Hélène Gary, and Claudine Delom enie for technical assistance.

#### SUPPLEMENTARY MATERIAL

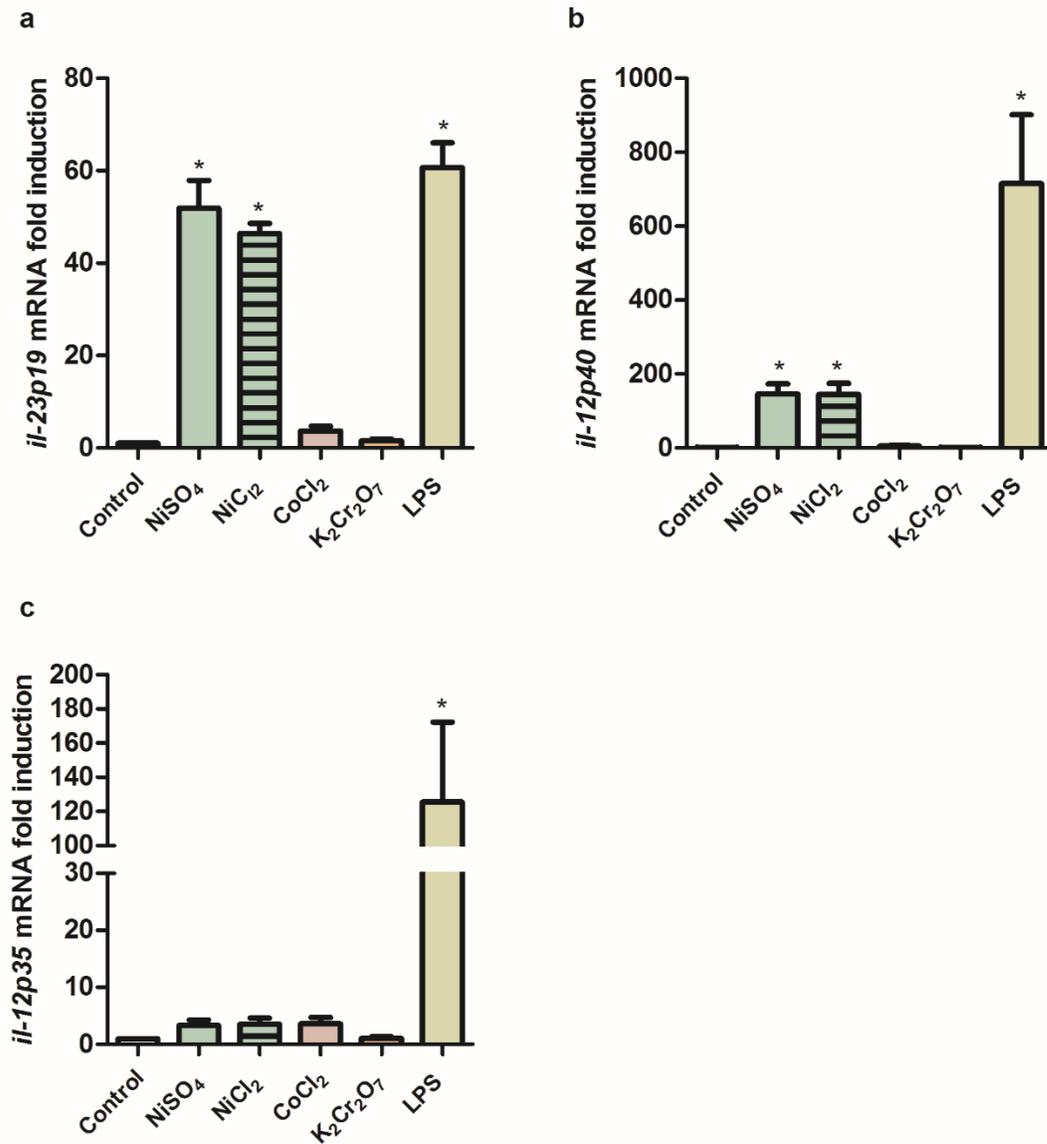
Supplementary material is linked to the online version of the paper at [www.jidonline.org](http://www.jidonline.org), and at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2017.05.025>.

#### REFERENCES

- Ade N, Antonios D, Kerdine-Romer S, Boislev e F, Rousset F, Pallardy M. NF-kappaB plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO(4) but not by DNCB. *Toxicol Sci* 2007;99:488–501.
- Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZUA, Mizuashi M, Ohtani T, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl<sub>2</sub> and 2,4-dinitrochlorobenzene. *J Invest Dermatol* 2003;120:390–9.
- Antonios D, Ade N, Kerdine-Römer S, Assaf-Vandecasteele H, Larangé A, Azouri H, et al. Metallic haptens induce differential phenotype of human dendritic cells through activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *Toxicol Vitro* 2009;23:227–34.
- Antonios D, Rousseau P, Larangé A, Kerdine-Römer S, Pallardy M. Mechanisms of IL-12 synthesis by human dendritic cells treated with the chemical sensitizer NiSO<sub>4</sub>. *J Immunol* 2010;185:89–98.
- Basile JJ, Kviatcovsky D, Romero MM, Balboa L, Monteserin J, Ritacco V, et al. Mycobacterium tuberculosis multi-drug-resistant strain M induces IL-17(+) IFN- $\gamma$ (-) CD4(+) T cell expansion through an IL-23 and TGF- $\beta$ -dependent mechanism in patients with MDR-TB tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2017;187:160–73.
- Boislève F, Kerdine-Römer S, Pallardy M. Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha. *Toxicology* 2005;206:233–44.
- Boislève F, Kerdine-Römer S, Rougier-Larzat N, Pallardy M. Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF-alpha and MAPK. *J Invest Dermatol* 2004;123:494–502.

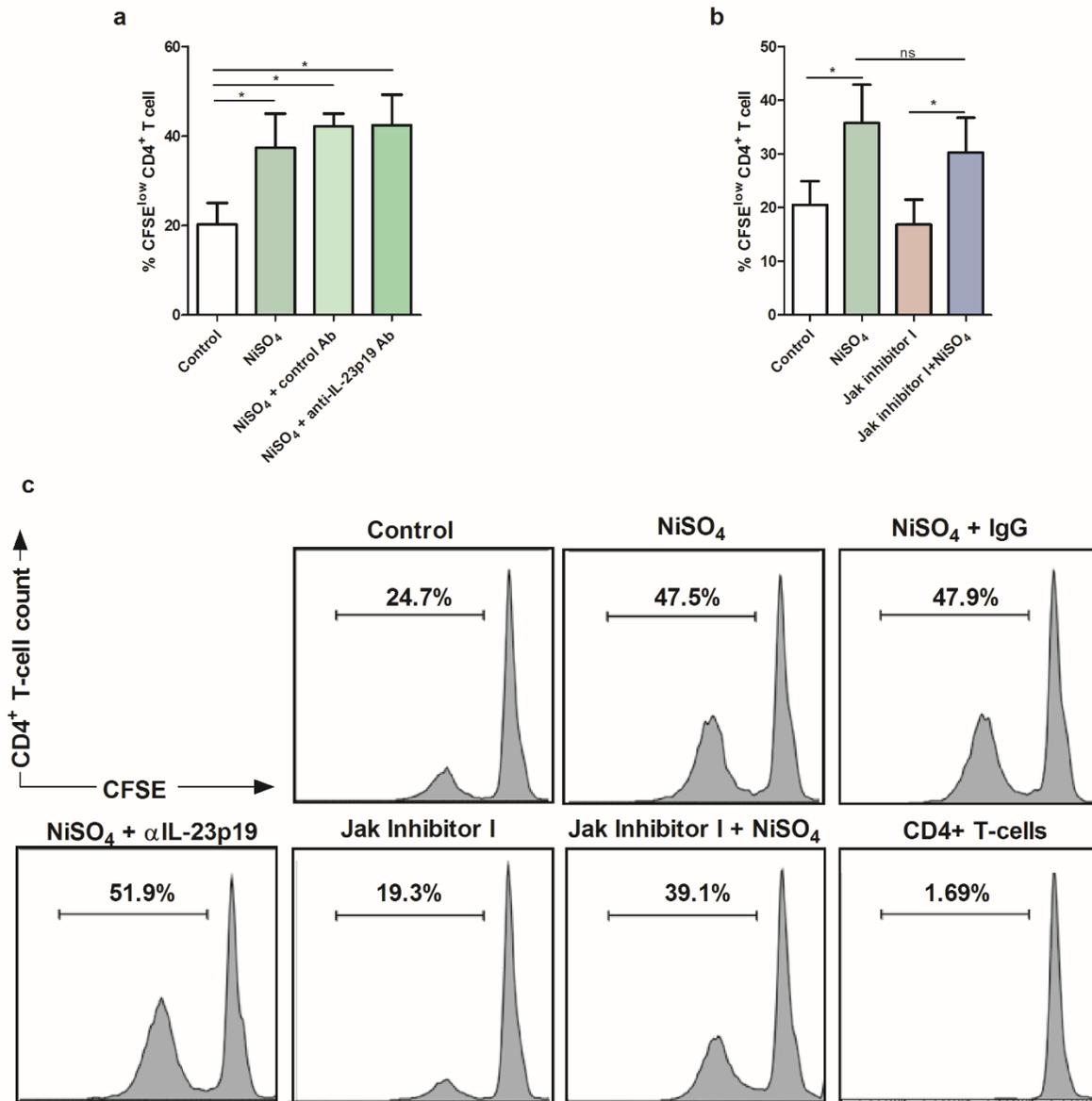
- Butchar JP, Parsa KVL, Marsh CB, Tridandapani S. IFN $\gamma$  enhances IL-23 production during *Francisella* infection of human monocytes. *FEBS Lett* 2008;582:1044–8.
- Butchar JP, Rajaram MVS, Ganesan LP, Parsa KVL, Clay CD, Schlesinger LS, et al. *Francisella tularensis* induces IL-23 production in human monocytes. *J Immunol* 2007;178:4445–54.
- Carmody RJ, Ruan Q, Liou H-C, Chen YH. Essential roles of c-Rel in TLR-induced IL-23 p19 gene expression in dendritic cells. *J Immunol* 2007;178:186–91.
- de Bourayne M, Gallais Y, El Ali Z, Rousseau P, Damiens M-H, Cochet C, et al. Protein kinase CK2 controls T-cell polarization through dendritic cell activation in response to contact sensitizers. *J Leukoc Biol* 2017;101:703–15.
- Dhingra N, Shemer A, Correa da Rosa J, Rozenblit M, Fuentes-Duculan J, Gittler JK, et al. Molecular profiling of contact dermatitis skin identifies allergen-dependent differences in immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:362–72.
- Diepgen TL, Ofenloch RF, Bruze M, Bertuccio P, Cazzaniga S, Coenraads P-J, et al. Prevalence of contact allergy in the general population in different European regions. *Br J Dermatol* 2016;174:319–29.
- Dyring-Andersen B, Skov L, Lovendorf MB, Bzorek M, Søndergaard K, Lauritsen JP, et al. CD4(+) T cells producing interleukin (IL)-17, IL-22 and interferon- $\gamma$  are major effector T cells in nickel allergy. *Contact Dermatitis* 2013;68:339–47.
- Gözl L, Buerfent BC, Hofmann A, Rühl H, Fricker N, Stamminger W, et al. Genome-wide transcriptome induced by nickel in human monocytes. *Acta Biomater* 2016;43:369–82.
- Goriely S, Neurath MF, Goldman M. How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members. *Nat Rev Immunol* 2008;8:81–6.
- Happel KI, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ, et al. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Immunol* 2003;170:4432–6.
- He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmets CA, Xu H. CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol* 2006;177:6852–8.
- Heine A, Held SAE, Daecke SN, Wallner S, Jaynarayana SP, Kurts C, et al. The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. *Blood* 2013;122:1192–202.
- Ibler KS, Jemec GBE, Garvey LH, Agner T. Prevalence of delayed-type and immediate-type hypersensitivity in healthcare workers with hand eczema. *Contact Dermatitis* 2016;75:223–9.
- Kaplan DH, Igyártó BZ, Gaspari AA. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol* 2012;12:114–24.
- Kashiwada M, Levy DM, McKeag L, Murray K, Schröder AJ, Canfield SM, et al. IL-4-induced transcription factor NFIL3/E4BP4 controls IgE class switching. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:821–6.
- Kim JY, Huh K, Lee KY, Yang JM, Kim TJ. Nickel induces secretion of IFN- $\gamma$  by splenic natural killer cells. *Exp Mol Med* 2009;41:288–95.
- Kobayashi T, Matsuoka K, Sheikh SZ, Elloumi HZ, Kamada N, Hisamatsu T, et al. NFIL3 is a regulator of IL-12 p40 in macrophages and mucosal immunity. *J Immunol* 2011;186:4649–55.
- Kortylewski M, Xin H, Kujawski M, Lee H, Liu Y, Harris T, et al. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2009;15:114–23.
- Lang R, Patel D, Morris JJ, Rutschman RL, Murray PJ. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol* 2002;169:2253–63.
- Larsen JM, Bonefeld CM, Poulsen SS, Geisler C, Skov L. IL-23 and T(H)17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:486–92.
- Liu W, Ouyang X, Yang J, Liu J, Li Q, Gu Y, et al. AP-1 activated by toll-like receptors regulates expression of IL-23 p19. *J Biol Chem* 2009;284:24006–16.
- Maher CO, Dunne K, Comerford R, O’Dea S, Loy A, Woo J, et al. *Candida albicans* stimulates IL-23 release by human dendritic cells and downstream IL-17 secretion by V $\delta$ 1 T cells. *J Immunol* 2015;194:5953–60.
- Martin SF. Immunological mechanisms in allergic contact dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2015;15:124–30.
- Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 2002;17:375–87.
- Qian X, Ning H, Zhang J, Hoft DF, Stumpo DJ, Blackshear PJ, et al. Post-transcriptional regulation of IL-23 expression by IFN- $\gamma$  through tristetraprolin. *J Immunol* 2011;186:6454–64.
- Raghavan B, Martin SF, Esser PR, Goebeler M, Schmidt M. Metal allergens nickel and cobalt facilitate TLR4 homodimerization independently of MD2. *EMBO Rep* 2012;13:1109–15.
- Roses RE, Xu S, Xu M, Koldovsky U, Koski G, Czerniecki BJ. Differential production of IL-23 and IL-12 by myeloid-derived dendritic cells in response to TLR agonists. *J Immunol* 2008;181:5120–7.
- Schmidt JD, Ahlström MG, Johansen JD, Dyring-Andersen B, Agerbeck C, Nielsen MM, et al. Rapid allergen-induced interleukin-17 and interferon- $\gamma$  secretion by skin-resident memory CD8(+) T cells. *Contact Dermatitis* 2017;76:218–27.
- Schmidt M, Raghavan B, Müller V, Vogl T, Fejer G, Tchapchet S, et al. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol* 2010;11:814–9.
- Smith AM, Qualls JE, O’Brien K, Balouzian L, Johnson PF, Schultz-Cherry S, et al. A distal enhancer in *Il12b* is the target of transcriptional repression by the STAT3 pathway and requires the basic leucine zipper (B-ZIP) protein NFIL3. *J Biol Chem* 2011;286:23582–90.
- Turbica I, Gallais Y, Gueguen C, Tharinger H, Al Sabbagh C, Gorges R, et al. Ectosomes from neutrophil-like cells down-regulate nickel-induced dendritic cell maturation and promote Th2 polarization. *J Leukoc Biol* 2015;97:737–49.
- van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, Muller FJ, Hommes DW, Zaat SAJ, et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 2007;27:660–9.
- Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4560–5.
- Vignali DAA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological play-makers. *Nat Immunol* 2012;13:722–8.
- Wei W-C, Liu C-P, Yang W-C, Shyr L-F, Sheu J-H, Chen S-S, et al. Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) regulates LPS-induced expression of IL-12 and IL-23 in human dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2015;97:1071–80.
- Zhao Y, Balato A, Fischelevich R, Chapoval A, Mann DL, Gaspari AA. Th17/Tc17 infiltration and associated cytokine gene expression in elicitation phase of allergic contact dermatitis. *Br J Dermatol* 2009;161:1301–6.

Figure S1



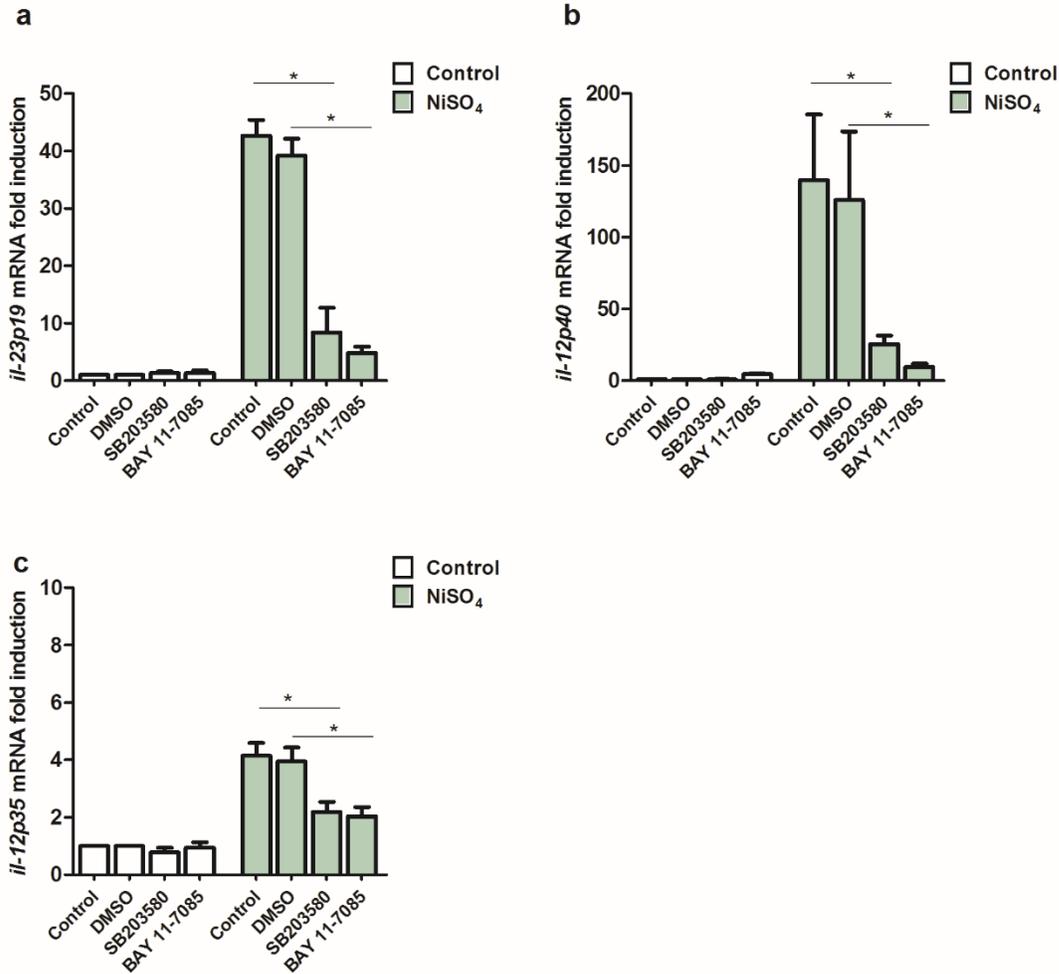
**FIGURE S1.** Nickel but not other metallic haptens induced IL-23 subunits mRNA expression. Immature DCs were treated or not with 500  $\mu$ M of NiSO<sub>4</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub> or 5 $\mu$ M of K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> or 25ng/ml of LPS for 4hrs. *il-23p19* (a), *il-12p40* (b) and *il-12p35* (c) mRNA levels were quantified by qRT-PCR. Results are expressed as fold factor compared with untreated samples and corrected by the expression of  $\beta$ -actin and *gapdh*. Values are presented as mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. \*p  $\leq$  0.05, Mann-Whitney.

**Figure S2**



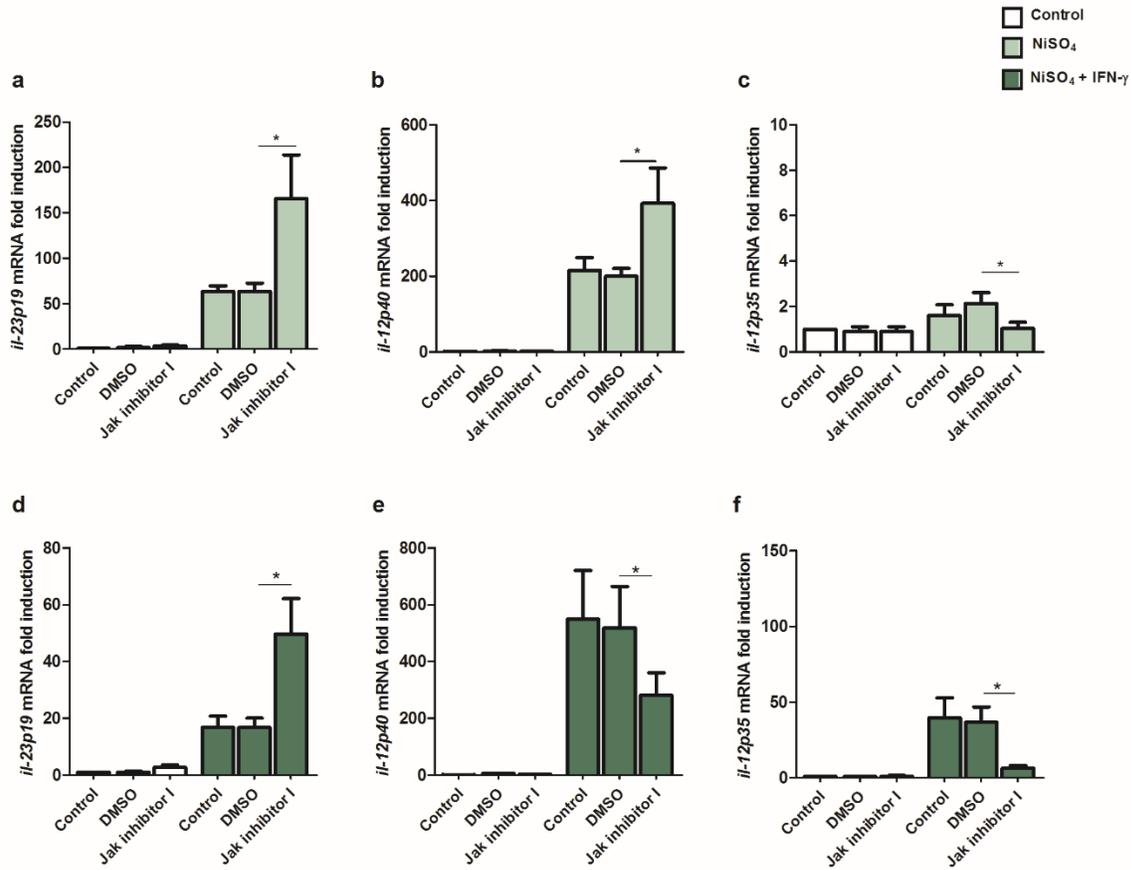
**FIGURE S2.** Anti-IL-23p19 Ab or Jak inhibitor I do not modify the ability of NiSO<sub>4</sub>-activated MoDCs to induce CD4<sup>+</sup> T cells proliferation. CFSE-loaded CD4<sup>+</sup> T cells were cultured with allogeneic untreated-MoDC or with different conditions at ratio 10/1. On day 5, the percentage of CFSE<sup>low</sup> cells was determined by flow cytometry. (a and b) Cumulative data from 4 experiments. Values are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0.05$ , Mann-Whitney. (c) One representative of 4 experiments is shown.

**Figure S3**



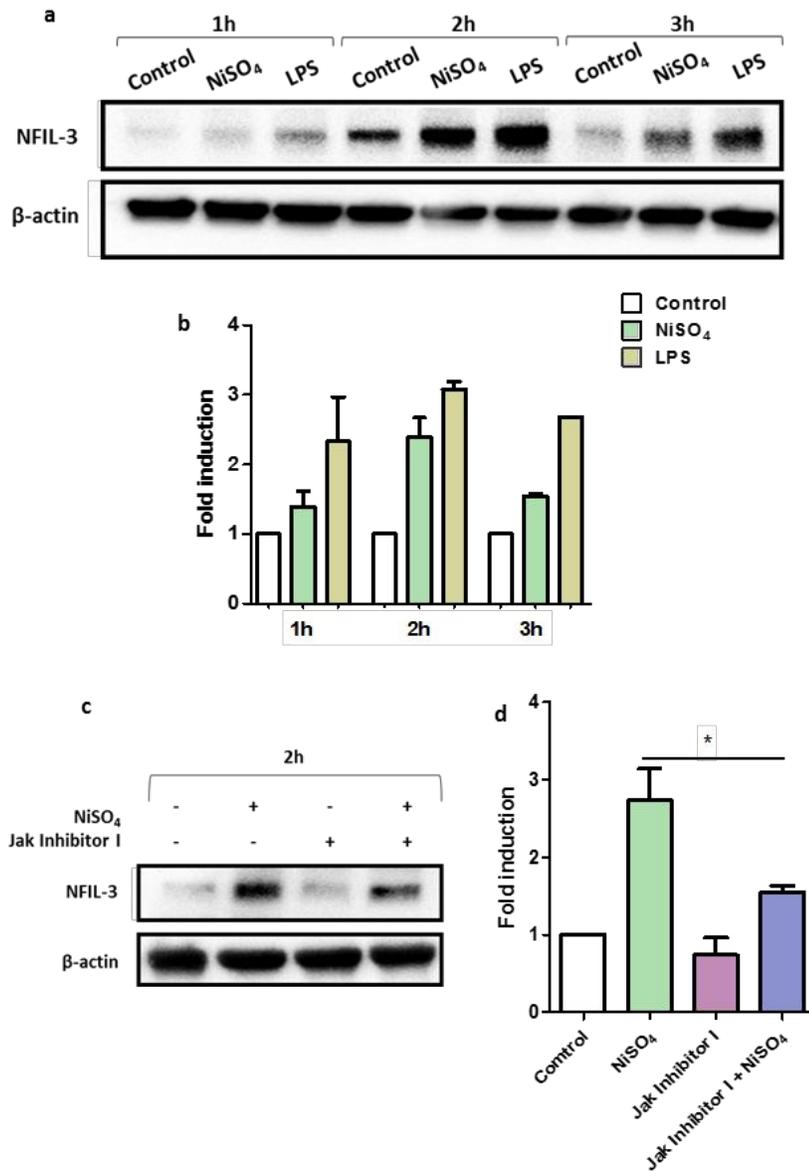
**FIGURE S3.** Nickel induced IL-23 and IL-12 subunits mRNA expression via p38MAPK and NF- $\kappa$ B pathways. Immature DCs were pre-treated or not (control) for 30min with inhibitor of p38MAPK pathway (SB203580, 20  $\mu$ M) or for 1h with either DMSO or with inhibitor of NF- $\kappa$ B pathway (BAY 11-7085, 3  $\mu$ M) and subsequently treated or not with NiSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ M) for 2hrs (a,b) or 4hrs (c). Values are presented as mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. \* $p \leq 0.05$ , Mann-Whitney.

**Figure S4**



**FIGURE S4.** Inhibition of the Jak-STAT pathway differentially regulates the expressions of IL-23 and IL-12p70 subunits. Immature DCs were pretreated with either DMSO or with inhibitor of Jak-STAT pathway (Jak Inhibitor I, 0.5  $\mu$ M) and subsequently treated or not with NiSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ M) (a-c) in the presence or not of IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) (d-f) for 4hrs. *il-23p19*, *il-12p40* and *il-12p35* mRNA levels were quantified by qRT-PCR. Results are expressed as fold factor compared with untreated samples (control) and corrected by the expression of the housekeeping genes  $\beta$ -actin and *gapdh*. Values are presented as mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. \* $p \leq 0.05$ , Mann-Whitney.

**Figure S5**



**FIGURE S5.** Nickel upregulated NFIL-3 in MoDCs via the Jak-STAT pathway. Immature DCs were pre-treated or not with Jak inhibitor I (0.5  $\mu$ M) for 2hrs and subsequently treated or not with NiSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ M) for 1, 2 and 3hrs (a,b) or 2hrs (c,d). Levels of NFIL-3 were determined by immunoblotting. Results are expressed as fold factor compared with untreated samples (control) and corrected by the expression of  $\beta$ -actin. Values are presented as mean  $\pm$  SEM of 2 (b) or 4 (d) independent experiments. \*p  $\leq$ 0.05, Mann-Whitney.

# Résultats complémentaires 1

## Mécanismes responsables de l'inhibition de la production de l'IL-23 et de l'IL-12p40 par la voie Jak-STAT dans les cellules dendritiques traitées par le nickel

### 1. Introduction

Nous avons montré dans l'article 1 que le nickel induit la production de l'IL-23, de l'IL-12p40 et de l'IL-12p70 en présence d'IFN- $\gamma$  dans les MoDC et que la voie Jak-STAT semblait réguler différemment les différentes sous-unités de ces cytokines. Sachant que notre équipe avait montré précédemment que l'activation de la voie Jak-STAT semblait être importante pour l'induction de l'expression de l'*il-12p35* et la production de l'IL-12p70 *via* un mécanisme dépendant de STAT-1 et d'IRF-1 (Antonios et al. 2010), nous avons cherché à comprendre, dans cette partie, les mécanismes responsables de l'inhibition de l'IL-23 et de l'IL-12p40 par la voie Jak-STAT dans les MoDC stimulées par du nickel. Nous montrons que le nickel est capable d'induire l'expression de NFIL-3, un répresseur de l'IL-12p40, et ceci *via* la voie Jak-STAT.

### 2. Matériels et Méthodes

#### 2.1. Modèle cellulaire : cellules dendritiques dérivées de monocytes humains

Les cellules dendritiques sont différenciées à partir de monocytes du sang. Les PBMC sont tout d'abord isolés par gradient de Ficoll. Les monocytes CD14<sup>+</sup> sont ensuite purifiés par tri magnétique par sélection positive. Ils sont ensuite mis en culture à raison de 10<sup>6</sup> cellules/mL en milieu RPMI 1640 + GlutaMAX™, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Biowest, Nuaille, France), antibiotiques et 1% pyruvate de sodium, en présence de GM-CSF (550 U/mL) et d'IL-4 (550 U/mL) (Miltenyi Biotec) pendant 5 jours, à 37°C, sous atmosphère humidifiée, à 5 %

de CO<sub>2</sub>. La différenciation des cellules dendritiques (MoDC) et leur caractère immature sont vérifiés par cytométrie en flux en quantifiant l'expression des marqueurs de surface : CD1a, CD86, CD83, DC-SIGN.

## **2.2. Traitement des MoDC**

Les MoDC (10<sup>6</sup> cellules/mL) ont été incubées en milieu RPMI 1640 + GlutaMAX™, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Biowest, France), antibiotiques et 1% pyruvate de sodium, en présence du NiSO<sub>4</sub> à 500 µM, pendant 30 minutes, 1, 2 ou 3 heures selon les expériences. Dans certaines expériences, les cellules sont prétraitées 2 heures par le Jak Inhibitor I (Calbiochem, Darmstadt, Allemagne), inhibiteur de la voie Jak-STAT, à la concentration de 0.5 µM. La cytotoxicité des produits a été vérifiée après 24 heures de stimulation par un marquage des DC à l'iodure de propidium, et n'excède pas les 25%.

## **2.3. Analyse protéique par western blot**

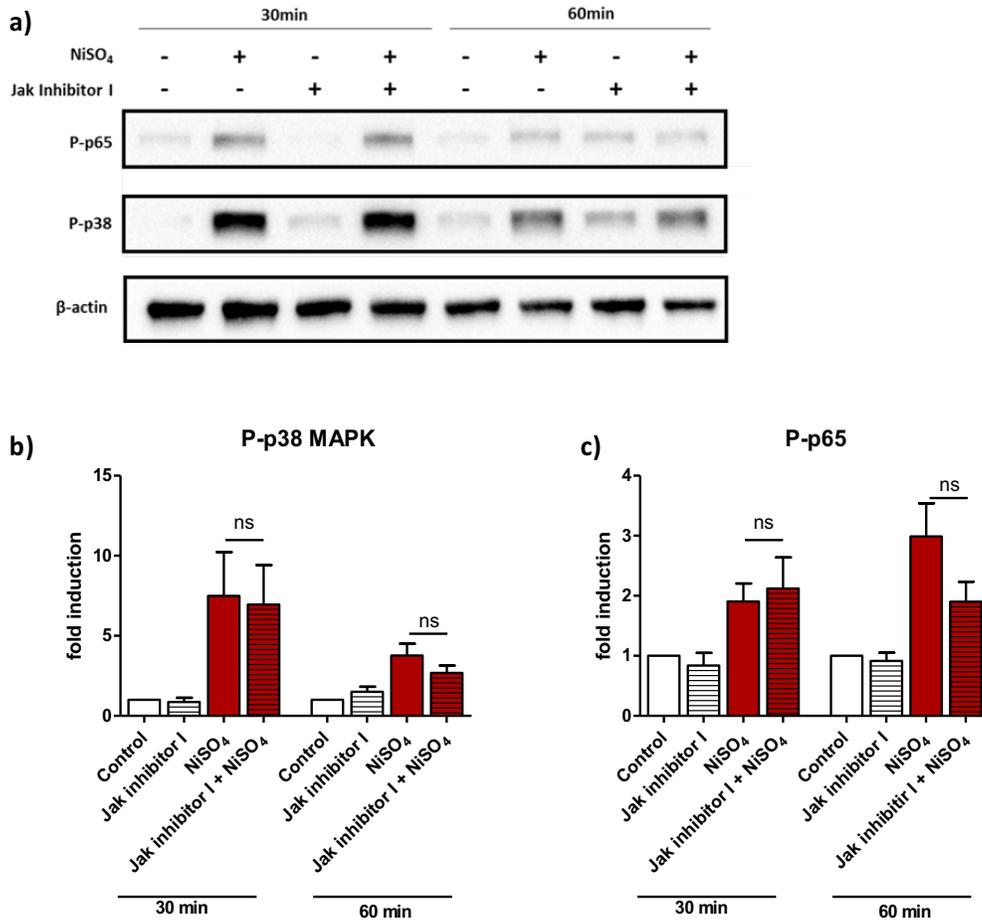
Les protéines totales sont obtenues après lyse des cellules dans un tampon composé de : 20 mM Tris HCl pH7,4, 137 mM de NaCl, 2 mM d'EDTA, 1% triton, 2 mM de pyrophosphate de sodium, 10% de glycérol 1 mg/ml aprotinine, 1 mg/ml leupeptine, 0.1 M PMSF, 100 µM orthovanadate de sodium, 1 M DTT, 10 mg/ml pepstatine, et H<sub>2</sub>O). Les lysats sont centrifugés à 15000 rpm à 4°C pendant 20 minutes. Les extraits protéiques sont ensuite isolés et dosés avec la méthode BCA (Bi-Cincohninic acid Assay) (Sigma, St Louis, MO). Trente microgrammes de protéines dénaturées sont séparés sur gel SDS-PAGE 10%, puis transférés sur une membrane de polyvinylidone difluoride (PVDF, Biorad, Marnes-la-Coquette, France). La membrane est saturée avec du TBS (Tris Buffer Saline) 1X supplémenté de 3% de BSA (Bovine Serum Albumin,

Biowest, Nuaille, France) pendant 1h à température ambiante. La membrane est ensuite incubée toute la nuit à 4°C avec un des anticorps primaires : P-p38 (CST #9211), P-p65 (CST #3033), NFIL-3 (CST #14312S) et  $\beta$ -actine (CST #12262S) tous de chez Ozyme. Après lavages dans une solution de TBS 1X 0.2% Tween, la membrane est incubée 45 minutes avec un anticorps secondaire couplé à la peroxidase (CS #7074, Cell Signaling, Ozyme, France). Les protéines d'intérêt sont révélées par chimioluminescence (ECL, Biorad). L'intensité des bandes obtenues est quantifiée par densitométrie associée à une analyse informatique grâce à un Chemidoc (Biorad) et comparée par rapport à celle de la  $\beta$ -actine.

### 3. Résultats

#### 3.1. L'inhibition de la voie Jak-STAT n'interfère pas avec la phosphorylation de p38 MAPK et de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B

Nous avons montré dans l'article 1 que les voies de p38MAPK et de NF- $\kappa$ B sont impliquées dans la production des cytokines membres de la famille d'IL-12. Ainsi nous avons voulu voir si l'augmentation de la production de l'IL-23 et de l'IL-12p40 suite au prétraitement des MoDC par l'inhibiteur de la voie Jak-STAT pourrait être due à une augmentation de la phosphorylation de p38MAK et de p65. Nous avons pour cela étudié par western blot la phosphorylation de p38MAPK et de p65 après 30 minutes et 1 heure d'incubation avec le nickel en présence ou non de l'inhibiteur de la voie Jak-STAT (**Figure 39**). Nos résultats montrent que l'augmentation de la production de l'IL-23 et de l'IL-12p40, suite au prétraitement par le Jak inhibitor I, ne peut pas être liée à une augmentation de la phosphorylation de p38MAPK et de p65.



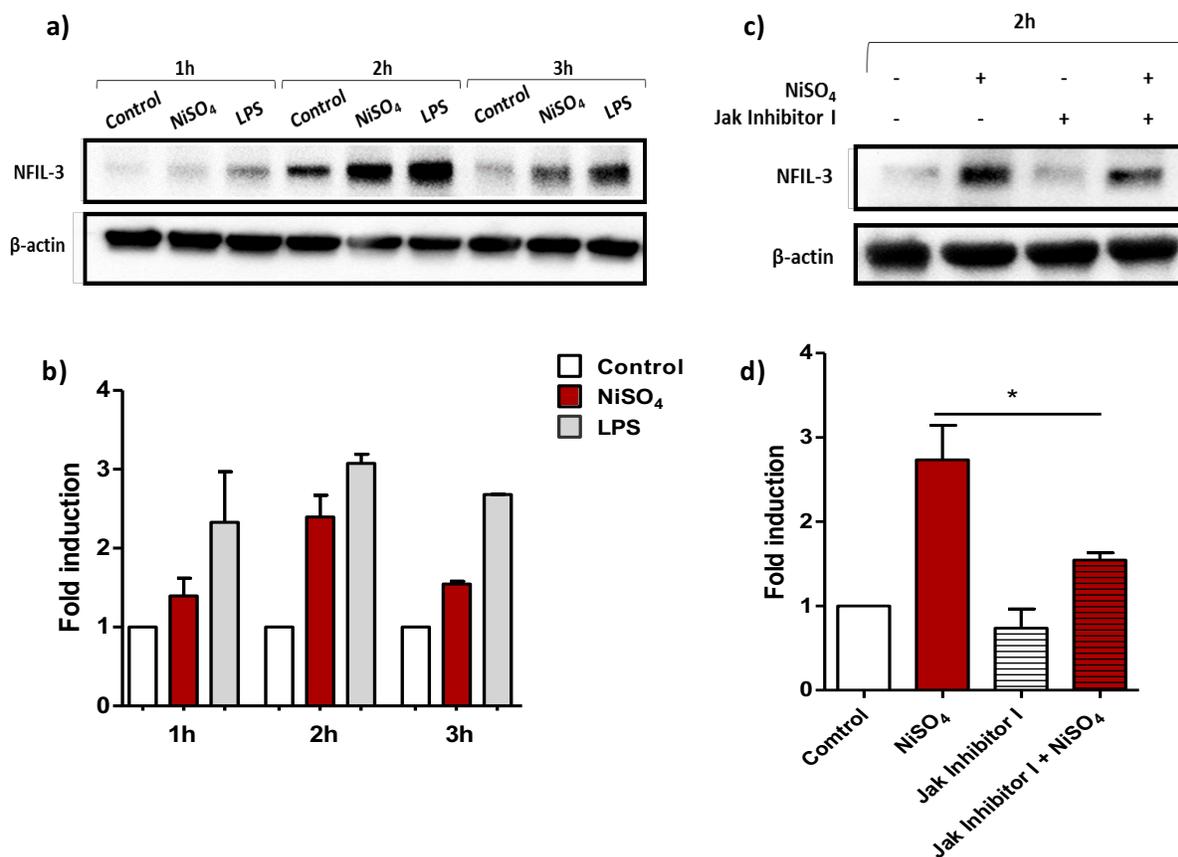
**Figure 39: L'inhibition de la voie Jak-STAT n'augmente pas la phosphorylation de la p38MAPK et de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B**

Les MoDC, prétraitées ou non par le Jak inhibitor I (0.5  $\mu$ M), ont été incubées 30 minutes ou 1 heure en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ M). **(a)** Un western blot représentatif de 4 expériences indépendantes. **(b-c)** L'intensité des bandes a été quantifiée en utilisant le logiciel Image Lab™ et les résultats sont exprimés en index de stimulation (fold induction) des MoDC traitées par rapport aux cellules non stimulées (n=4, ns= non significatif, test de Mann-Withney).

### 3.2. Le nickel induit l'expression de NFIL-3 dans les MoDC *via* la voie Jak-STAT

Une des hypothèses qui pourraient expliquer l'augmentation de la production de l'IL-23 et de l'IL-12p40 suite à l'inhibition de la voie Jak-STAT serait une diminution de l'expression d'un répresseur de ces cytokines. Un des candidats possibles serait le facteur de transcription NFIL-3.

Ainsi nous avons voulu voir si le nickel était capable d'induire l'expression de NFIL-3 et si cette induction passe par la voie Jak-STAT. Nous avons pour cela étudié par western blot l'expression de NFIL-3 après 1, 2 et 3 heures d'incubation avec le nickel en présence ou non de l'inhibiteur de la voie Jak-STAT (**Figure 40**). Nos résultats montrent que le nickel induit l'expression de NFIL-3 plus particulièrement après 2 heures de stimulation. L'inhibition de la voie Jak-STAT entraîne une diminution de l'expression de NFIL-3 dans les MoDC traitées par le nickel.



**Figure 40: Le nickel induit l'expression de NFIL-3 dans les MoDC *via* la voie Jak-STAT**

Les MoDC, prétraitées ou non par le Jak inhibiteur I (0.5  $\mu$ M), ont été incubées 1, 2 et 3 heures en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ M) ou du LPS (25 ng/mL) comme contrôle positif. **(a)** Un western blot représentatif de 2 expériences indépendantes. **(c)** Un western blot représentatif de 4 expériences indépendantes. **(b et d)** L'intensité des bandes a été quantifiée en utilisant le logiciel Image Lab™ et les résultats sont exprimés en index de stimulation (fold induction) des MoDC traitées par rapport aux cellules non stimulées (n=4, \*=p<0,05, test de Mann-Withney).

## Résultats complémentaires 2

# Effets comparés du Nickel et du Cobalt sur la production des cytokines membres de la famille de l'IL-12 dans les cellules dendritiques humaines.

### 1. Introduction

Il a été établi que le nickel et le cobalt sont des agonistes du TLR4 (Rachmawati et al. 2013; Schmidt et al. 2010b) et induisent une maturation directe des DC (Antonios et al. 2009). Nous avons montré dans l'article 1 que la production de l'IL-23, de l'IL-12p40 et de l'IL-12p70 est dépendante de la voie du TLR4. Bien que le nickel et le cobalt soient capables d'induire une faible expression de l'*il-12p35*, seul le nickel est capable d'induire l'expression des 2 sous-unités de l'IL-23 et la production de l'IL-23, de l'IL-12p40 et de l'IL-12p70. Cette différence observée entre le nickel et le cobalt suggère qu'il y aurait une voie supplémentaire indépendante du TLR4 qui serait induite par le nickel et qui serait impliquée dans la production de ces cytokines. Des travaux précédents dans notre équipe ont mis en évidence l'implication d'IRF-1 induite par le nickel dans la production de l'IL-12p40 et ceci en inhibant sélectivement l'expression d'*irf-1* par ARN interférence (Antonios et al. 2010). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que le nickel, et en comparaison du cobalt, serait un inducteur de IRF-1 dans les MoDC. Cependant, nos résultats montrent une induction d'IRF-1 par les deux métaux voire une expression plus intense avec le cobalt. Alternativement, nous avons émis l'hypothèse inverse et nous avons voulu voir s'il y avait une voie supplémentaire indépendante du TLR4 qui est induite par le cobalt et qui réprime la production de l'IL-23 et de l'IL-12p40 telle que la voie NFIL-3. Ainsi nous montrons, dans cette partie, que le cobalt est un fort inducteur de l'expression de NFIL-3 dans les MoDC d'une manière indépendante du TLR4 mais dépendante des espèces réactives et de la voie Jak-STAT. Par rapport

au nickel, le cobalt semble induire une production plus importante des espèces réactives dans les MoDC, ce qui peut expliquer la forte expression de NFIL-3 et la possibilité de répression de la production de l'IL-23 et de l'IL-12p40. D'une manière intéressante, l'inhibition de la voie Jak-STAT entraîne une augmentation de la production d'IL-12p40 par le cobalt. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour vérifier le rôle suppresseur de NFIL-3 dans la production de l'IL-23 et de l'IL-12p40 dans les MoDC traitées par du cobalt.

## **2. Matériels et Méthodes**

### **2.1. Modèle cellulaire : cellules dendritiques dérivées de monocytes humains**

Les cellules dendritiques sont différenciées à partir de monocytes du sang. Les PBMC sont tout d'abord isolés par gradient de Ficoll. Les monocytes CD14<sup>+</sup> sont ensuite purifiés par tri magnétique par sélection positive. Ils sont ensuite mis en culture à raison de 10<sup>6</sup> cellules/ml en milieu RPMI 1640 + GlutaMAX™, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Biowest, Nuaille, France), antibiotiques et 1% pyruvate de sodium, en présence de GM-CSF (550 U/mL) et d'IL-4 (550 U/mL) (Miltenyi Biotec) pendant 5 jours, à 37°C, sous atmosphère humidifiée, à 5 % de CO<sub>2</sub>. La différenciation des cellules dendritiques (MoDC) et leur caractère immature sont vérifiés par cytométrie en flux en quantifiant l'expression des marqueurs de surface : CD1a, CD86, CD83, DC-SIGN.

## 2.2. Traitement des MoDC

Les MoDC ( $10^6$  cellules/mL) ont été incubées en milieu RPMI 1640 + GlutaMAX™, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Biowest, France), antibiotiques et 1% pyruvate de sodium, en présence du NiSO<sub>4</sub> ou CoCl<sub>2</sub> à 500 µM, pendant 2 ou 4 heures. Dans certaines expériences, les cellules sont prétraitées par le Jak Inhibitor I (pendant 2 heures à la concentration de 0.5 µM, Calbiochem) ou par un anticorps bloquant du TLR4 ( $\alpha$ -TLR4) ou son contrôle isotypique ( $\alpha$ -IgG) (pendant 1 heure à la concentration de 10 µg/mL, BioLegend) ou par la N-acétylcystéine (NAC) (pendant 30 minutes à la concentration de 25mM, Sigma-Aldrich). La cytotoxicité des produits a été vérifiée après 24 heures de stimulation par un marquage des DC à l'iodure de propidium, et n'excède pas les 25%.

## 2.3. Analyse protéique par western blot

Les protéines totales sont obtenues après lyse des cellules dans un tampon composé de : 20 mM Tris HCl pH7,4, 137 mM de NaCl, 2 mM d'EDTA, 1% triton, 2 mM de pyrophosphate de sodium, 10% de glycérol 1 mg/ml aprotinine, 1 mg/ml leupeptine, 0.1 M PMSF, 100 µM orthovanadate de sodium, 1 M DTT, 10 mg/ml pepstatine, et H<sub>2</sub>O). Les lysats sont centrifugés à 15000 rpm à 4°C pendant 20 minutes. Les extraits protéiques sont ensuite isolés et dosés avec la méthode BCA (Bi-Cincohninic acid Assay) (Sigma, St Louis, MO). Trente microgrammes de protéines dénaturées sont séparés sur gel SDS-PAGE 10%, puis transférés sur une membrane de polyvinylidone difluoride (PVDF, Biorad, Marnes-la-Coquette, France). La membrane est saturée avec du TBS (Tris Buffer Saline) 1X supplémenté de 3% de BSA (Bovine Serum Albumin, Biowest, Nuaille, France) pendant 1 heure à température ambiante. La membrane est ensuite incubée toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivants : IRF-1 (CST #8478S), NFIL-3

(CST #14312S) et  $\beta$ -actine (CST #12262S) tous de chez Ozyme. Après lavages dans une solution de TBS 1X 0.2% Tween, la membrane est incubée 45 minutes avec un anticorps secondaire couplé à la peroxidase (CS #7074, Cell Signaling, Ozyme, France). Les protéines d'intérêt sont révélées par chimioluminescence (ECL, Biorad). L'intensité des bandes obtenues est quantifiée par densitométrie associée à une analyse informatique grâce à un Chemidoc (Biorad) et comparée par rapport à celle de la  $\beta$ -actine.

#### **2.4. Evaluation de la production des espèces réactives par cytométrie en flux**

La sonde 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate (H2DCFDA) est utilisée pour quantifier les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN). Ainsi, les cellules ont été incubées avec la sonde H2DCFDA (2  $\mu$ M) pendant 30min à 37°C. Après lavage, les cellules ont été stimulées avec du NiSO<sub>4</sub> ou CoCl<sub>2</sub> (500  $\mu$ M). Le Tert-butyl hydroperoxide (TB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a été utilisé comme contrôle positif (2  $\mu$ M). La production d'ERO et d'ERN a été analysée uniquement sur des cellules IP (Iodure de propidium) -négatives afin d'exclure les cellules mortes. Les cellules ont été ensuite analysées par cytométrie en flux. Pour chaque échantillon, 10 000 cellules ont été acquises et analysées en utilisant le logiciel Cell Quest<sup>TM</sup>. Le taux d'induction d'espèces réactives est calculé selon : MFI cellules traitées / MFI cellules non traitées, avec MFI correspondant à l'intensité moyenne de fluorescence.

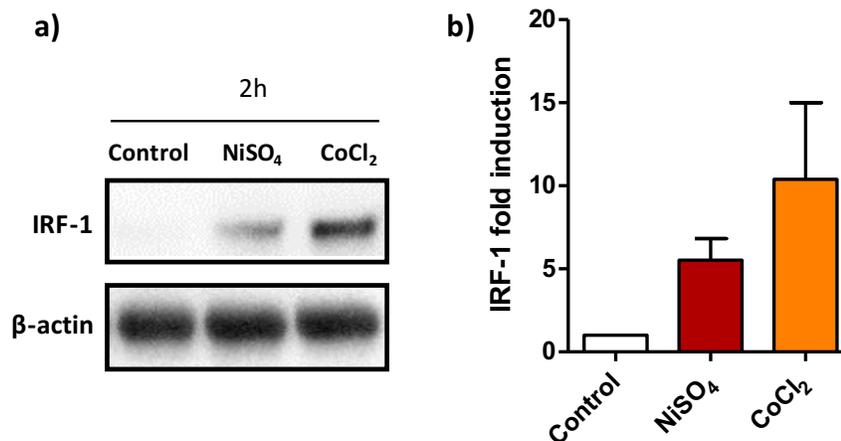
#### **2.5. Quantification de la production de l'IL-12p40 et de l'IL-23 par ELISA**

Des tests ELISA d'IL-12p40 et d'IL-23 ont été effectués sur des surnageants de culture des MoDC traitées ou non selon les instructions du fabricant (R&D Systems, Minneapolis, MN). La sensibilité du test est de 31 pg/mL pour l'IL-12p40 et de 16 pg/mL pour l'IL-23.

### 3. Résultats

#### 3.1. Le nickel et le cobalt induisent l'expression d'IRF-1 dans les MoDC

Nous avons voulu voir si une différence existe dans l'expression d'IRF-1 entre le nickel et le cobalt qui pourrait expliquer pourquoi ce dernier est incapable d'induire la production d'IL-23 et d'IL-12p40. Nous avons pour cela étudié par western blot l'expression d'IRF-1 après 2 et 4 heures d'incubation avec le nickel ou le cobalt (**Figure 41**). Nos résultats montrent que le nickel et le cobalt induisent l'expression d'IRF-1 voire d'une manière plus intense avec le cobalt.



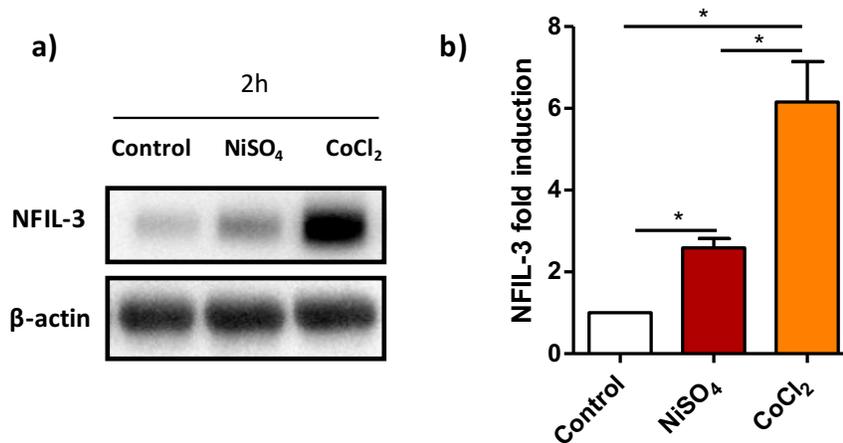
**Figure 41: Le nickel et le cobalt induisent l'expression d'IRF-1 dans les MoDC**

*Les MoDC ont été incubées 2 heures en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ M) ou du CoCl<sub>2</sub> (500  $\mu$ M). L'intensité des bandes a été quantifiée en utilisant le logiciel Image Lab™ et les résultats sont exprimés en index de stimulation des MoDC traitées par rapport aux cellules non stimulées. (n=2)*

#### 3.2. Le cobalt est un fort inducteur de l'expression de NFIL-3 dans les MoDC

Nos résultats précédents suggèrent que la différence dans l'induction de la production de l'IL-23 et de l'IL-12p40 entre le nickel et le cobalt ne peut pas être due à une différence d'induction de l'expression d'IRF-1. Pour cela, nous avons voulu voir si le cobalt était capable d'induire plus

fortement l'expression de NFIL-3 par rapport au nickel ce qui pourrait expliquer l'absence de production de l'IL-23 et de l'IL-12p40 par le cobalt dans les MoDC. Nous avons étudié par western blot l'expression de NFIL-3 après 2 heures d'incubation avec le nickel ou le cobalt (**Figure 42**). Nos résultats montrent que le cobalt induit une expression de NFIL-3 supérieure à celle retrouvée pour le nickel et à la même concentration de 500  $\mu$ M.

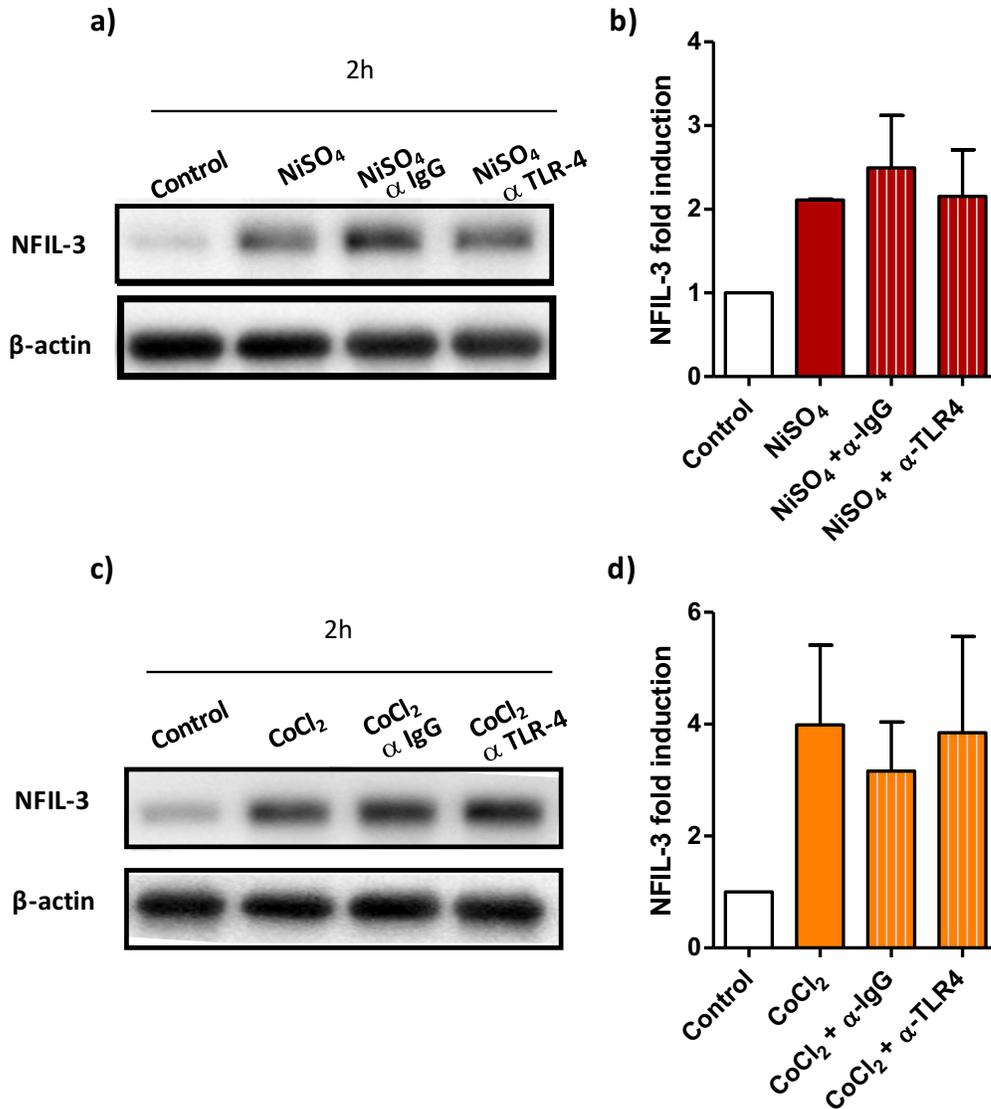


**Figure 42: Le cobalt est un fort inducteur de l'expression de NFIL-3 dans les MoDC**

*Les MoDC ont été incubées 2 heures en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ M) ou du CoCl<sub>2</sub> (500  $\mu$ M). (a) Un western blot représentatif de 4 expériences indépendantes. (b) L'intensité des bandes a été quantifiée en utilisant le logiciel Image Lab™ et les résultats sont exprimés en index de stimulation (fold induction) des MoDC traitées par rapport aux cellules non stimulées (n=4, \*= $p$ <0,05, test de Mann-Withney).*

### 3.3. L'induction de NFIL-3 par le nickel et le cobalt est indépendante du TLR4

Afin de savoir si l'induction de l'expression de NFIL-3 par le nickel et le cobalt est dépendante du TLR4, les MoDC ont été prétraitées pendant 1 heure avec un anticorps bloquant pour le TLR4 ( $\alpha$ -TLR4) ou son contrôle isotypique ( $\alpha$ -IgG) suivi par la stimulation avec du nickel ou du cobalt. Nos résultats montrent que le blocage du TLR4 n'empêche pas l'induction de l'expression de NFIL-3 par le nickel ou le cobalt (**Figure 43**).

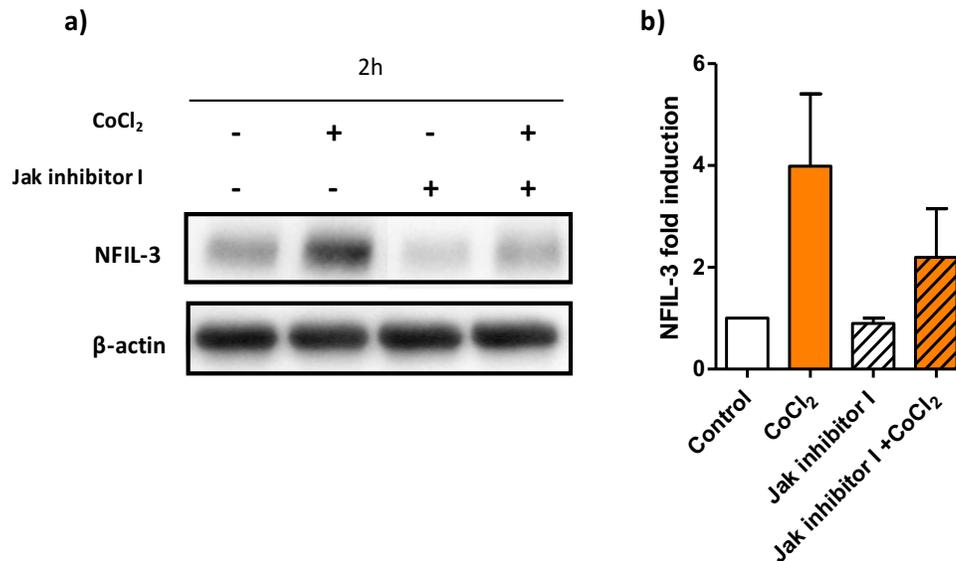


**Figure 43: L'induction de l'expression de NFIL-3 par le nickel et le cobalt est indépendante du TLR-4**

*Les MoDC ont été prétraitées avec un anti-TLR4 ( $\alpha\text{-TLR4}$ ) ou son contrôle isotypique ( $\alpha\text{-IgG}$ ) et ensuite incubées 2 heures en milieu de culture seul ou en présence du  $\text{NiSO}_4$  (500  $\mu\text{M}$ ) ou du  $\text{CoCl}_2$  (500  $\mu\text{M}$ ). (a et c) Un western blot représentatif de 3 expériences indépendantes. (b et d) L'intensité des bandes a été quantifiée en utilisant le logiciel Image Lab™ et les résultats sont exprimés en index de stimulation (fold induction) des MoDC traitées par rapport aux cellules non stimulées (n=3).*

### 3.4. Identification des voies de signalisation impliquées dans l'expression de NFIL-3 induite par le nickel et le cobalt

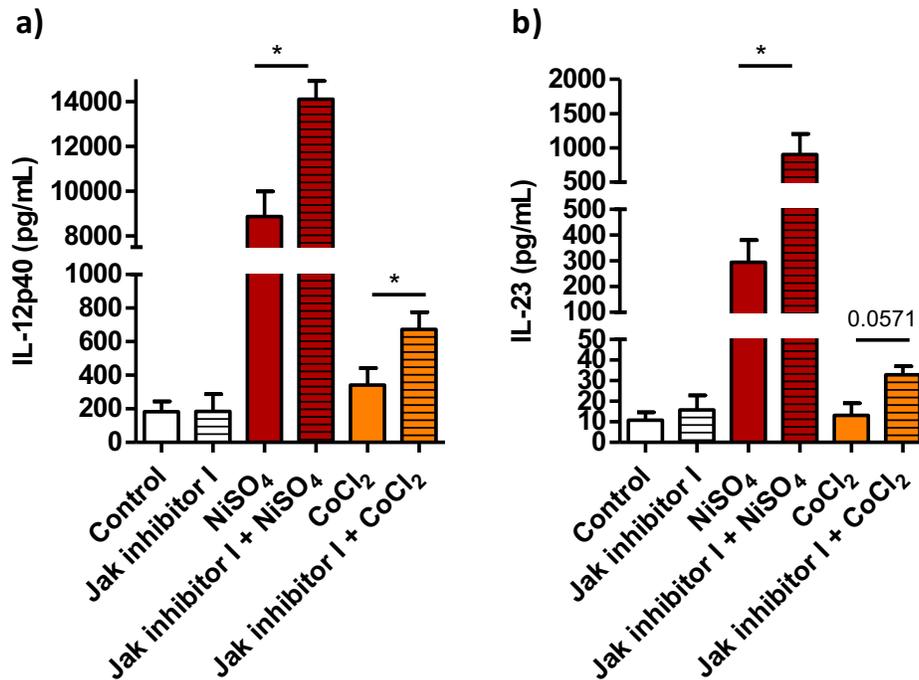
Nous avons montré précédemment que la voie Jak-STAT est impliquée dans l'induction de l'expression de NFIL-3 par le nickel. Dans cette partie, nous avons voulu voir si la voie Jak-STAT est aussi nécessaire pour une induction optimale de l'expression de NFIL-3 par le cobalt. Nous avons pour cela étudié par western blot l'expression de NFIL-3 après 2 heures d'incubation avec le cobalt en présence ou non de l'inhibiteur de la voie Jak-STAT (**Figure 44**). Nos résultats montrent que l'inhibition de la voie Jak-STAT entraîne une diminution de l'expression de NFIL-3 dans les MoDC traitées par du cobalt.



**Figure 44: L'induction de l'expression de NFIL-3 par le cobalt est dépendante de la voie Jak-STAT**

*Les MoDC, prétraitées ou non par le Jak inhibitor I (0.5  $\mu\text{M}$ ), ont été incubées 2 heures en milieu de culture seul ou en présence du  $\text{CoCl}_2$  (500  $\mu\text{M}$ ). (a) Un western blot représentatif de 3 expériences indépendantes. (b) L'intensité des bandes a été quantifiée en utilisant le logiciel Image Lab™ et les résultats sont exprimés en index de stimulation (fold induction) des MoDC traitées par rapport aux cellules non stimulées (n=3).*

D'une manière intéressante, l'inhibition de la voie Jak-STAT dans les MoDC traitées par du cobalt entraîne une augmentation de la production d'IL-12p40 (**Figure 45**). Ceci confirme davantage notre hypothèse sur le rôle de NFIL-3 et de la voie Jak-STAT dans la régulation des différentes cytokines de la famille de l'IL-12.

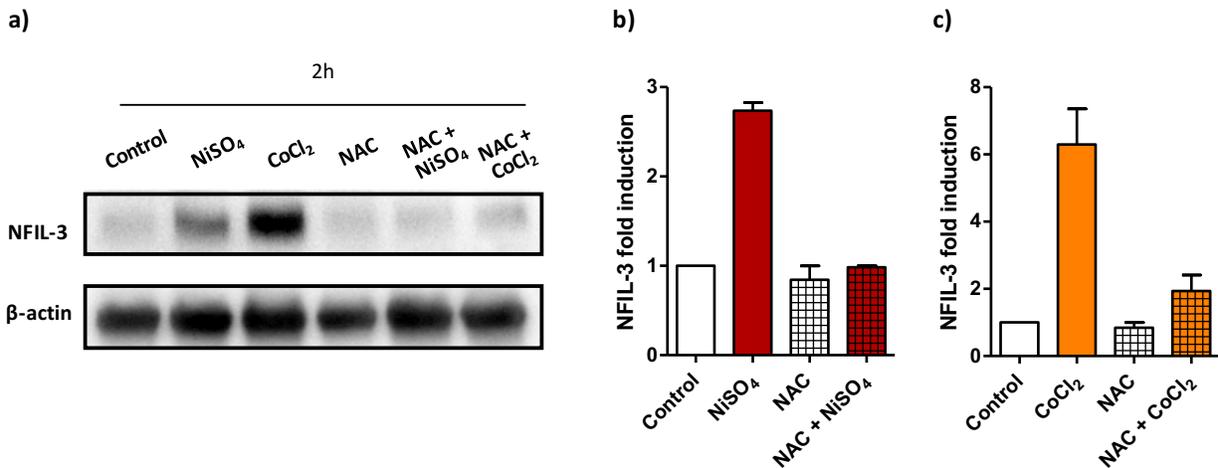


**Figure 45: L'inhibition de la voie Jak-STAT entraîne une augmentation de la production de l'IL-12p40 dans les MoDC traitées par du cobalt**

*Les MoDC, prétraitées ou non par le Jak inhibitor I (0.5  $\mu$ M), ont été incubées 24 heures en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ M) ou du CoCl<sub>2</sub> (500  $\mu$ M). La production de l'IL-12p40 et de l'IL-23 est évaluée par ELISA (n=4, \*= $p$ <0,05, test de Mann-Withney).*

Par la suite, nous avons cherché à comprendre pourquoi le cobalt était capable d'induire plus fortement l'expression de NFIL-3 dans les MoDC par rapport au nickel. Pour cela, nous avons évalué en premier lieu l'implication du stress oxydant dans l'expression de NFIL-3. Nous avons étudié par western blot l'expression de NFIL-3 après 2 heures d'incubation avec le nickel ou le cobalt et après prétraitement ou non avec de la NAC (précurseur du glutathion) (**Figure 46**). Nos

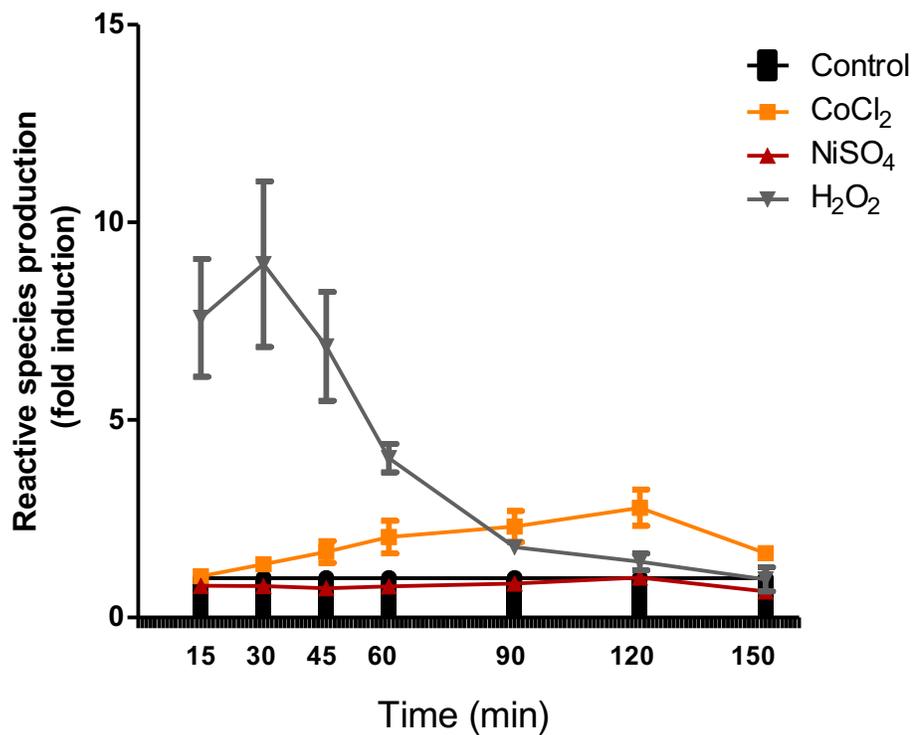
résultats montrent que l'inhibition de la formation des espèces réactives par la NAC entraîne une diminution drastique de l'expression de NFIL-3 dans les MoDC traitées par le nickel ou le cobalt.



**Figure 46: L'induction de l'expression de NFIL-3 est dépendante du stress oxydatif généré dans les MoDC**

*Les MoDC, prétraitées ou non par la NAC (25 mM), ont été incubées 2 heures en milieu de culture seul ou en présence du  $\text{NiSO}_4$  (500  $\mu\text{M}$ ) ou du  $\text{CoCl}_2$  (500  $\mu\text{M}$ ). (a) Un western blot représentatif de 3 expériences indépendantes. (b et c) L'intensité des bandes a été quantifiée en utilisant le logiciel Image Lab™ et les résultats sont exprimés en index de stimulation (fold induction) des MoDC traitées par rapport aux cellules non stimulées (n=3).*

Comme nous venons de montrer l'implication du stress oxydatif dans l'induction de l'expression de NFIL-3 dans les MoDC, nous avons émis l'hypothèse que le cobalt serait un plus fort inducteur de la production des espèces réactives dans les MoDC par rapport au nickel. Pour cela, nous avons évalué la formation des espèces réactives dans les MoDC traitées ou non par le nickel ou le cobalt (**Figure 47**). Nos résultats montrent que le cobalt induit la production des espèces réactives dans les MoDC avec un maximum à 120 minutes post-traitement.



**Figure 47: Le cobalt induit la formation des espèces réactives dans les MoDC**

*Les MoDC ont été incubées, aux différents temps, en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> (500 μM) ou du CoCl<sub>2</sub> (500 μM) ou du TB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 μM). La formation des espèces réactives est évaluée par la sonde H2DCFDA et analysée par cytométrie en flux (n=3).*

## Résultats complémentaires 3

# Effet du nickel et des autres métaux allergisants sur la production de l'IL-27 par les cellules dendritiques

### 1. Introduction

En parallèle de notre étude sur la régulation de l'IL-23, de l'IL-12p40 et de l'IL-12p70 par les haptènes métalliques dans les MoDC, nous nous sommes également intéressés durant ce travail à l'IL-27, une autre cytokine membre de la famille de l'IL-12. L'IL-27 a été décrite pour la première fois en 2002. Elle est composée de la sous-unité p28 (connue aussi sous le nom d'IL-30) et de la sous-unité EBI3 (Pflanz et al. 2002) et dont la fonction immunitaire est détaillée dans le chapitre 3 partie IV-4.2.3. D'une manière intéressante, l'IL-27 a été détectée au niveau des biopsies cutanées de patients souffrant d'EAC surtout au niveau des lésions chroniques (Wittmann et al. 2009).

L'objectif de cette partie vise à étudier l'effet des métaux allergisants sur la production de l'IL-27 et les voies de signalisation impliquées dans sa régulation dans les MoDC. Nous montrons d'abord que le nickel est capable d'augmenter l'expression des transcrits des 2 sous-unités de l'IL-27 et sa production d'une manière concentration-dépendante. Puis nous montrons, grâce à l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques, que la voie p38 MAPK et la voie Jak-STAT régulent positivement l'expression de la sous-unité *il-27p28* alors que la voie NF- $\kappa$ B régule positivement l'expression des 2 sous-unités de l'IL-27. De même, les voies p38MAPK, NF- $\kappa$ B et Jak-STAT sont impliquées dans la production de l'IL-27 induite par le nickel. L'addition de l'IFN- $\gamma$  à une stimulation par du nickel entraîne une forte expression de l'*il-27p28* sans modifier l'expression d'*ebi3*. Ceci est en concordance avec l'implication de la voie Jak-STAT dans l'expression de l'*il-27p28*. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour étudier la

fonctionnalité de l'IL-27 produite par les MoDC traitées par du nickel et son rôle dans la polarisation lymphocytaire.

## **2. Matériels et Méthodes**

### **2.1. Modèle cellulaire : cellules dendritiques dérivées de monocytes humains**

Les cellules dendritiques sont différenciées à partir de monocytes du sang. Les PBMC sont tout d'abord isolés par gradient de Ficoll. Les monocytes CD14<sup>+</sup> sont ensuite purifiés par tri magnétique par sélection positive. Ils sont ensuite mis en culture à raison de 10<sup>6</sup> cellules/ml en milieu RPMI 1640 + GlutaMAX™, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Biowest, Nuaillé, France), antibiotiques et 1% pyruvate de sodium, en présence de GM-CSF (550 U/mL) et d'IL-4 (550 U/mL) (Miltenyi Biotec) pendant 5 jours, à 37°C, sous atmosphère humidifiée, à 5 % de CO<sub>2</sub>. La différenciation des cellules dendritiques (MoDC) et leur caractère immature sont vérifiés par cytométrie en flux en quantifiant l'expression des marqueurs de surface : CD1a, CD86, CD83, DC-SIGN.

### **2.2. Traitement des MoDC**

Les MoDC (10<sup>6</sup> cellules/mL) ont été incubées en milieu RPMI 1640 + GlutaMAX™, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Biowest, France), antibiotiques et 1% pyruvate de sodium, en présence du NiSO<sub>4</sub> (500 µM) en association ou non à l'IFN-γ (1000 UI/mL), pendant le temps indiqué. Dans certaines expériences, les cellules sont prétraitées 2 heures par le Jak Inhibitor I (0.5 µM) ; 1 heure par le BAY 11-7085 (inhibiteur d'Ikkβ; 3 µM); 30 minutes par le SB203580 (inhibiteur de MAPK; 20 µM). Tous les inhibiteurs ont été obtenus auprès de

Calbiochem, Darmstadt, Allemagne. La cytotoxicité des produits a été vérifiée après 24 heures de stimulation par un marquage des DC à l'iodure de propidium, et n'excède pas les 25%.

### **2.3. Quantification de la production de l'IL-27 par ELISA**

Des tests ELISA d'IL-27 ont été effectués sur des surnageants de culture des MoDC traitées ou non selon les instructions du fabricant (Duoset ; R&D Systems, Minneapolis, MN). La sensibilité du test est de 150 pg/mL.

### **2.4. Isolement des ARN, transcription inverse et PCR en temps-réel (RT-qPCR)**

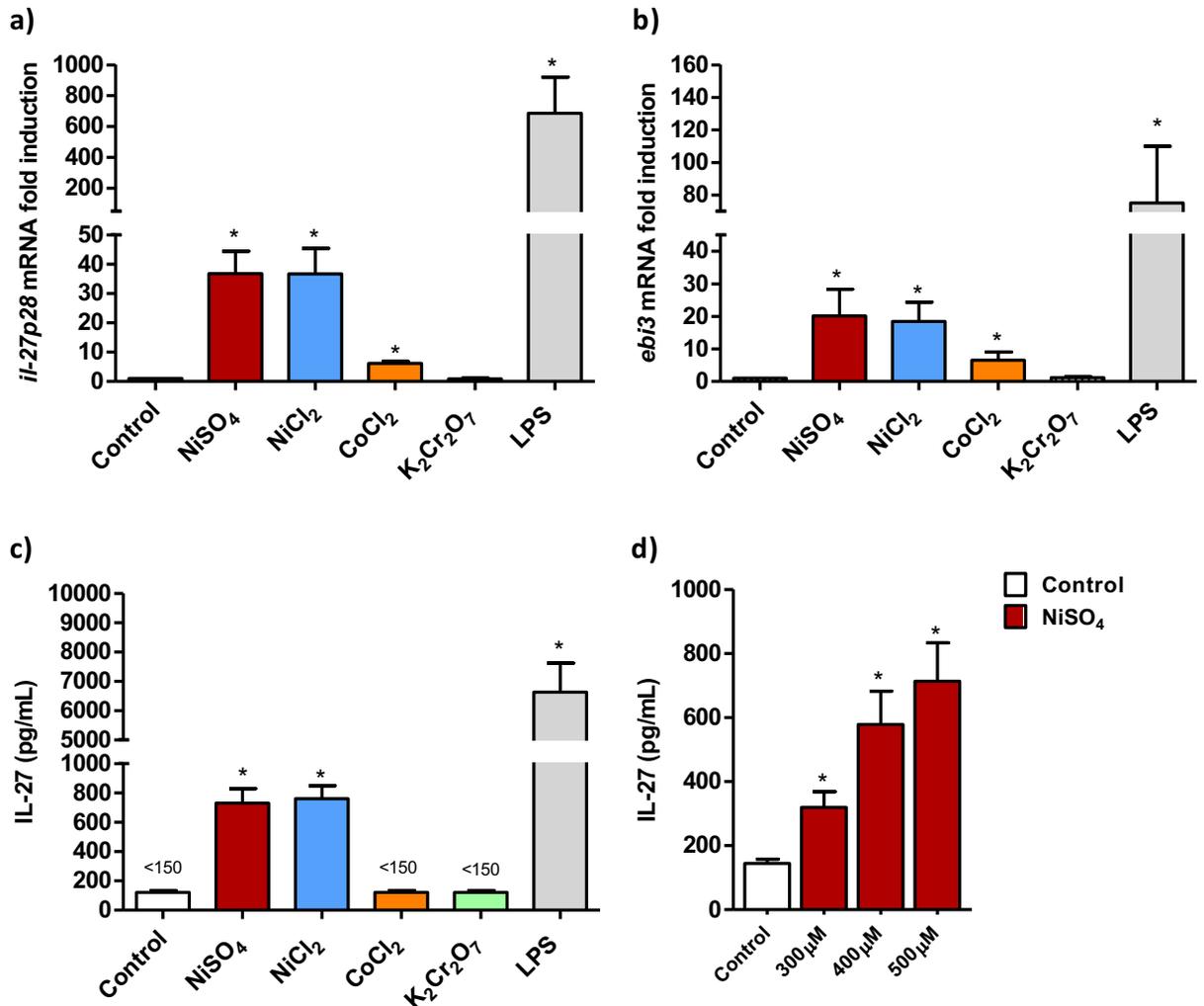
Après 4 heures de stimulation, les MoDC sont récupérées et lavées en PBS. Les ARN totaux sont ensuite extraits à l'aide du kit Nucleospin® RNA (Macherey Nagel), dosés et contrôlés pour leur intégrité. Le premier brin d'ADNc est synthétisé à partir d'1 µg d'ARN total avec des amorces oligo (dT) (MWG Biotech), 2 U/µL d'inhibiteurs d'ARNases et 0,2 U/µL de la transcriptase reverse AMV (Promega, France) en suivant le protocole du fournisseur de l'enzyme. Les qPCR sont réalisées en utilisant la technique du SYBR Green sur un appareil CFX96 (Biorad). Chaque milieu réactionnel de 10 µL est constitué de : 4 µL d'une dilution 1:50 de cDNA, amorces sens et anti-sens (0,5 µM), préparation de Sso Advanced Supermix (Biorad, France). Après activation de l'ADN polymérase à 95°C pendant 30 secondes, la réaction PCR est réalisée sur 44 cycles de 5 secondes à 95°C et 5 secondes à 60°C ; la lecture du signal SYBR Green est faite à la fin de chaque cycle. A la fin de la réaction, la dénaturation des amplicons en ADNdb est effectuée pour connaître leur homogénéité, indicatrice de la spécificité de la réaction d'amplification. Les amorces utilisées sont les suivantes : GAPDH (Fwd CAG CCT CAA GAT CAT CAG CA ; Rev TGT CGT CAT GAG TCC TTC); β-actine (Fwd GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA; Rev GCA CAC GCA GCT

CAT TG TAG); IL-27p28 (Fwd ATC TCA CCT GCC AGG AGT GAA; Rev TGA AGC GTG GTG GAG ATG AAG); EB13 (Fwd TCC TTC ATT GCC ACG TAC AG; Rev AAC AGC TGG ACA TCC GTG AT).

### 3. Résultats

#### 3.1. Le nickel induit la production de l'IL-27 et l'expression de ses sous-unités dans les MoDC

Le nickel ( $\text{NiSO}_4$  ou  $\text{NiCl}_2$ ) induit l'expression des deux sous-unités (IL-27p28 et EB13) de l'IL-27 et sa production d'une manière concentration-dépendante. Bien que le cobalt induit une faible expression des sous-unités de l'IL-27, ceci n'est pas traduit en une production significative de l'IL-27. Tout comme pour l'IL-23, l'IL-12p40 et l'IL-12p70, le chrome n'induit pas l'expression des deux sous-unités de l'IL-27, ni sa production (**Figure 48**).

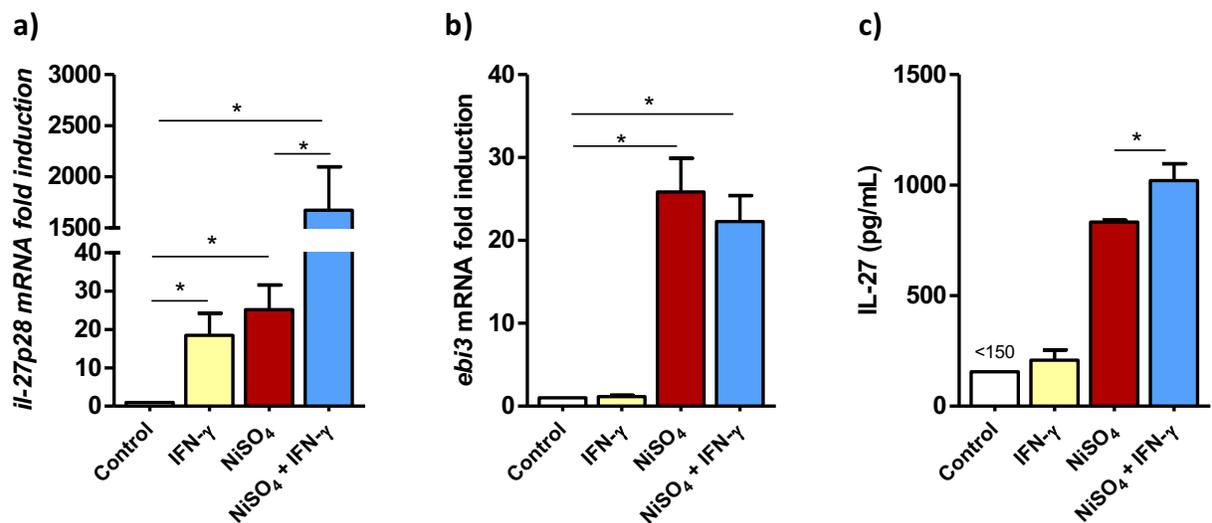


**Figure 48:** Effet des métaux allergisants sur la production de l'IL-27 et l'expression de l'*il-27p28* et de l'*ebi3*.

Les MoDC ont été incubées pendant 4 heures (**a et b**) ou 24 heures (**c et d**), en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> (500 μM), NiCl<sub>2</sub> (500 μM), CoCl<sub>2</sub> (500 μM), K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (5 μM), LPS (25 ng/mL) (**a-c**) ou en présence de concentration croissante de NiSO<sub>4</sub> (**d**). (**a et b**) Les résultats de qPCR sont présentés sous forme d'index de stimulation des cellules traitées par rapport aux cellules non traitées. (**c et d**) La quantification de l'IL-27 produite est effectuée par ELISA. (n=4, \*= p<0,05, test de Mann-Whitney).

### 3.2. L'addition de l'IFN- $\gamma$ à une stimulation par du nickel régule différemment l'expression des sous-unités de l'IL-27

Nous avons montré précédemment (article 1) que l'IFN- $\gamma$  en présence du nickel est nécessaire pour l'expression de l'*il-12p35* et l'*il-12p40* mais diminue l'expression de l'*il-23p19* induite par le nickel dans les MoDC. Nous avons voulu étudier l'effet de cette association sur la régulation de l'IL-27 (**Figure 49**). Nos résultats montrent que l'association de l'IFN- $\gamma$  à une stimulation par du nickel entraîne une forte augmentation de l'expression de l'*il-27p28* mais ne module pas l'expression d'*ebi3* évaluée par qPCR. Ceci résulte en une faible augmentation, mais significative, de la production de l'IL-27, évaluée par ELISA.

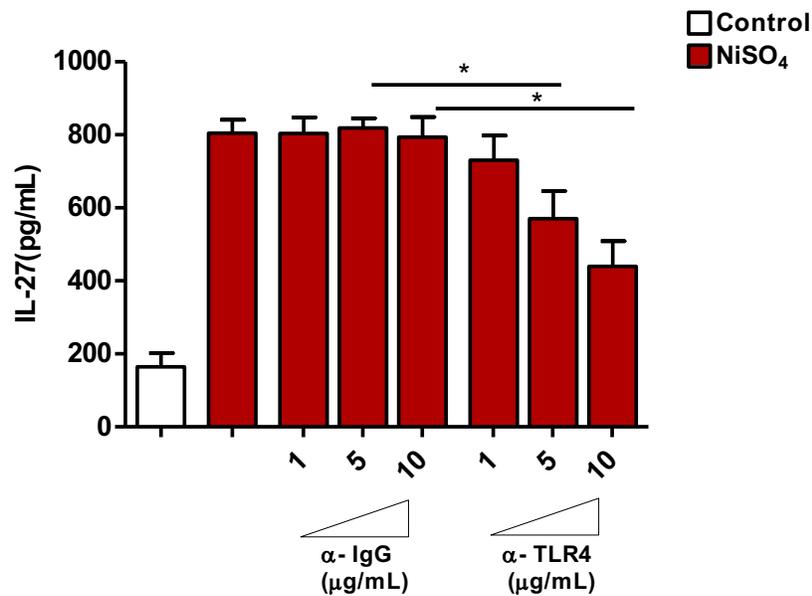


**Figure 49: Modulation de la production de l'IL-27 par l'IFN- $\gamma$  dans les MoDC traitées par du nickel**

Les MoDC ont été incubées pendant 4 heures (**a et b**) ou 24 heures (**c**), en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ M) et ou de l'IFN- $\gamma$  (1000 UI/mL). (**a et b**) Les résultats de qPCR sont présentés sous forme d'index de stimulation des cellules traitées par rapport aux cellules non traitées. (**c**) La quantification de l'IL-27 produite est effectuée par ELISA. (n=4, \*=p<0,05, test de Mann-Withney).

### 3.3. Implication des voies de signalisation dans la production de l'IL-27

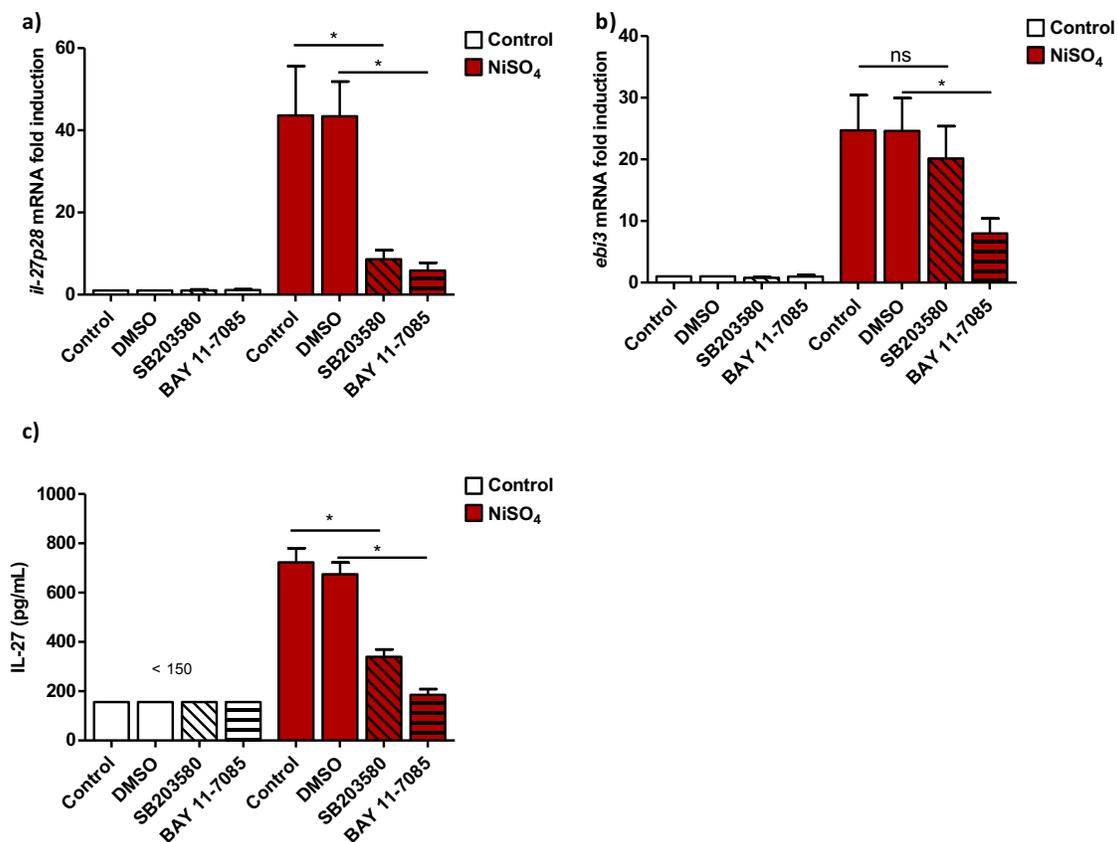
Il est bien connu que le nickel est un agoniste du TLR4 et induit l'activation des voies de signalisation MAPK, NF- $\kappa$ B et Jak-STAT. Dans cette partie, nous avons étudié le rôle de ces voies de signalisation dans la régulation de l'expression des deux sous-unités de l'IL-27 et la production de cette cytokine dans les MoDC traitées par du nickel. Dans un premier temps, les MoDC ont été prétraitées pendant 1 heure avec un anticorps bloquant le TLR4 ( $\alpha$ -TLR4) ou son contrôle isotypique ( $\alpha$ -IgG) suivi par la stimulation avec du nickel (500  $\mu$ M). Nos résultats montrent que la production de l'IL-27 dans les MoDC traitées par du nickel est dépendante de la voie du TLR4 (Figure 50).



**Figure 50: La production de l'IL-27 dans les MoDC traitées par du nickel est médiée par le TLR4**

*Les MoDC ont été prétraitées avec un anti-TLR4 ( $\alpha$ -TLR4) ou son contrôle isotypique ( $\alpha$ -IgG) et ensuite incubées pendant 24 heures en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ M). La quantification de l'IL-27 produite est effectuée par ELISA (n=4, \*=p<0,05, test de Mann-Whitney).*

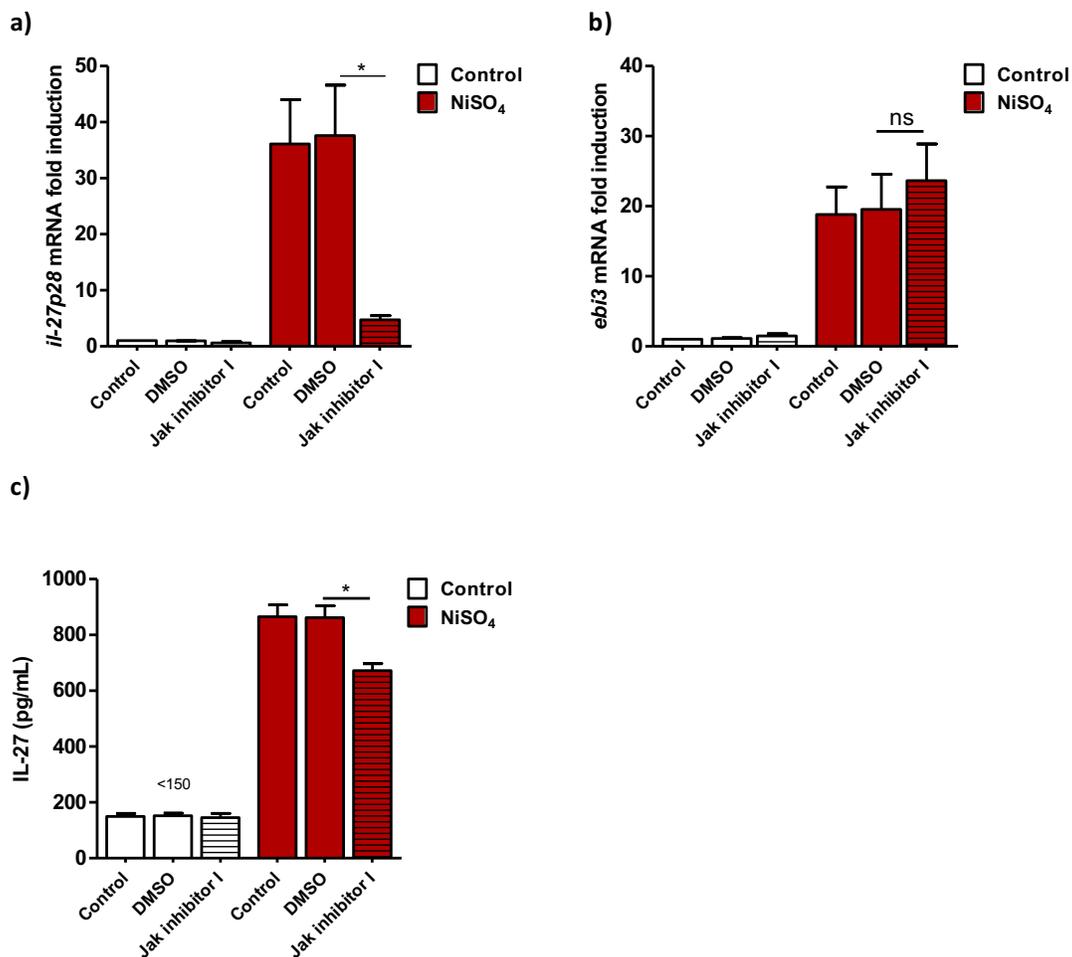
Dans un second temps, en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques des voies de p38MAPK (SB203580) et de NF- $\kappa$ B (BAY 11-7085), nous avons étudié leur implication dans l'expression des ARNm des deux sous-unités de l'IL-27 et sa production (**Figure 51**). Nos résultats montrent une implication de la voie NF- $\kappa$ B dans l'expression des deux sous-unités de l'IL-27 alors que la voie p38 MAPK ne semble être impliquée que dans l'expression d'*il-27p28*. Cette modulation des sous-unités par les voies de p38 MAPK et NF- $\kappa$ B affecte la production de l'IL-27 induite par le nickel.



**Figure 51: Modulation de l'expression des sous-unités de l'IL-27 et de sa production par les voies de p38 MAPK et de NF- $\kappa$ B**

Les MoDC ont été prétraitées avec les inhibiteurs pharmacologiques : SB203580 (20  $\mu$ M) ou BAY 11-7085 (3  $\mu$ M) et ensuite incubées pendant 4 heures (a et b) ou 24 heures (c) en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ M). (a et b) Quantification des ARNm par qPCR. (c) quantification de l'IL-27 par ELISA (n=4, ns= non significatif, \*=p<0,05, test de Mann-Whitney).

Enfin nous avons évalué le rôle de la voie Jak-STAT dans la régulation de l'IL-27 produite dans les MoDC traitées par du nickel (**Figure 52**). Nos résultats montrent que l'inhibition de la voie Jak-STAT par le Jak inhibiteur I entraîne une diminution de l'expression de l'*il-27p28* mais ne module pas l'expression d'*ebi3* dans les MoDC traitées par du nickel. Ceci résulte en une diminution de la production de l'IL-27.



**Figure 52: Rôle de la voie Jak-STAT dans la production de l'IL-27 dans les MoDC activées par du nickel**

Les MoDC ont été prétraitées avec le Jak inhibitor I (0.5  $\mu$ M) et ensuite incubées pendant 4 heures (**a et b**) ou 24 heures (**c**) en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ M). (**a et b**) quantification des ARNm par qPCR. (**c**) quantification de l'IL-27 par ELISA (n=4, ns= non significatif, \*=p<0,05, test de Mann-Withney).



**PARTIE II :**  
**Reconnaissance des haptènes par les**  
**lymphocytes T : application au nickel et**  
**à la benzylpénicilline**



## Article 2

# Identification et caractérisation d'un répertoire de LT naïfs reconnaissant le nickel

### Pre-existence of circulating naïve CD4+ and CD8+ T cells recognizing nickel: implication in metal allergy.

Rami Bechara, Sabrina Pollastro, Marie-Eliane Azoury, Natacha Szely, Bernard Maillère, Niek de Vries and Marc Pallardy

#### Article en préparation.

L'EAC est une maladie inflammatoire cutanée médiée par les LT. Ce sont ces LT et plus particulièrement des LT CD8+ qui, chez des patients allergiques au nickel, sont responsables de la phase effectrice et de l'apoptose des kératinocytes. Bien qu'un rôle régulateur de l'EAC a été démontré pour les LT CD4+ (López et al. 1998; Cavani et al. 2003; Cavani et al. 1998), ces derniers peuvent aussi contribuer à l'inflammation locale en synergie avec les LT CD8+ (Traidl et al. 2000; Albanesi et al. 2000).

Dans cette partie du projet, la question posée est de savoir s'il est possible de détecter des LT naïfs CD4+ et CD8+ provenant de la population générale et qui reconnaissent le nickel mais aussi de déterminer leur fréquence. En utilisant un modèle de co-culture DC/LT autologue (**Figure 37**), nos résultats montrent qu'il est possible de détecter un répertoire de LT naïfs CD4+ et CD8+. La fréquence moyenne de ces LT naïfs est de 0,49 LT CD4+ et de 0,37 LT CD8+ spécifiques du nickel par million de LT circulants. L'activation de ces LT spécifiques requiert les molécules de CMH et ils présentent un faible taux de réactivité croisée avec le cobalt. De plus, une forte représentation de l'expression du TRBV19 a été détectée au niveau du TCR des LT CD4+. Nos résultats contribuent à une meilleure compréhension du mécanisme de l'immunisation au nickel.



## **Pre-existence of circulating naïve CD4+ and CD8+ T cells recognizing nickel: implication in metal allergy.**

Rami Bechara <sup>1</sup>, Sabrina Pollastro <sup>2</sup>, Marie-Eliane Azoury <sup>1</sup>, Natacha Szely <sup>1</sup>; Bernard Maillère <sup>3</sup>, Niek de Vries <sup>2</sup> and Marc Pallardy <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Inflammation Chimiokines et Immunopathologie, INSERM, Fac. de pharmacie - Univ.Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

<sup>2</sup> Amsterdam Rheumatology and Immunology Center, and Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

<sup>3</sup> CEA, Institut de Biologie et de Technologies, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, 91190, France

**Corresponding Author:** [marc.pallardy@u-psud.fr](mailto:marc.pallardy@u-psud.fr)

**Abbreviations:** ACD: Allergic contact dermatitis; CoCl<sub>2</sub>: Cobalt chloride; DC: Dendritic cell; MHC: Major histocompatibility complex; MoDC: Monocyte-derived dendritic cell; NiSO<sub>4</sub>: Nickel sulfate; TCR: T-cell receptor

## ABSTRACT

Allergic contact dermatitis caused by contact sensitizers is a T-cell-mediated inflammatory skin disease and nickel is among the most prevalent contact allergens. The strength of this immune reaction is linked to the T-cell response. Whereas memory T cells from nickel-allergic patients are well characterized, little is known concerning the naïve T-cell repertoire. The purpose of the study was to identify and quantify naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells recognizing nickel in the general population. Using a T-cell priming *in vitro* assay based on autologous co-cultures between naïve T cells and dendritic cells loaded with nickel followed by three restimulations and an IFN- $\gamma$  Elispot assay, we were able to detect a naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell repertoire for nickel in 10/11 and 7/8 of the tested donors. We calculated a mean frequency of 0.49 naïve nickel-specific CD4<sup>+</sup> T cells and 0.37 naïve nickel-specific CD8<sup>+</sup> T cells per million of circulating naïve T cells. The activation of these specific T cells requires the MHC molecules. Moreover, nickel-specific naïve CD4<sup>+</sup> T cells showed a polyclonal TCR $\beta$  composition and the presence of highly expanded clones. Interestingly, the TRBV19 gene was found to be highly represented in nickel-specific naïve CD4<sup>+</sup> T cells. Furthermore, nickel-specific naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells showed a low rate of cross-reactivity with cobalt, another metallic hapten. Our results contribute to a better understanding of the mechanism of immunization to nickel and propose the T-cell priming assay as a useful tool to identify antigen-specific naïve T cells.

## INTRODUCTION

ACD is a common skin disease affecting up to 20% of the general population (1). It is caused by low-molecular weight chemicals that encounter the skin and mediated by hapten-specific T cells. During the sensitization phase, both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells are activated by skin dendritic cells (DCs) presenting the antigen, in the draining lymph nodes (2). Thus, two signals must be triggered to initiate an adaptive immune response: the antigenic signal sensed by specific T cells and the danger signal sensed by DCs leading to their maturation and subsequently the activation of T cells (3). A particular feature of contact allergens is their ability to deliver both signals, meaning they can be considered as ‘complete allergens’(4). For instance, nickel which represents the most common contact allergen can directly activate human Toll-like receptor 4 in DCs (5). As a consequence, signaling pathways are activated in DCs and lead to their maturation (6–11). In contrast to classical haptens which covalently bind to proteins, metallic haptens interact with protein through coordinative bonds leading to a specific geometrical configuration (12,13). Re-exposure to the same hapten initiates the elicitation phase characterized by the rapid recruitment and activation of hapten-specific T cells. This leads to the apoptosis of keratinocytes, recruitment of inflammatory cells and development of clinical symptoms (2,3).

The naïve T-cell repertoire is mainly formed by positive and negative selections occurring in the thymus (14). The positive selection allows the survival of T cells that react with MHC molecules, while negative selection eliminates T cells that are strongly activated by self-peptides (14). The specific recognition of an antigen by the T-cell receptor (TCR) will lead to the generation of a memory T-cell pool readily available to induce an accelerated recall-response (15).

Metals-specific T cells have been detected in the blood and skin of nickel allergic patients and were shown to proliferate in response to nickel *in vitro*, demonstrating their involvement in allergic

reactions (16-20). Moreover, studies performed on nickel-specific memory T cells revealed two main ways of nickel recognition by the TCR via both peptide-dependent (21) and peptide-independent (22) mechanisms, whereby nickel bridges the TCR and MHC molecules with coordinative bonds (13,23). Furthermore, different reports analyzed the TCR repertoire expression by metals-specific T cells isolated from allergic patients and showed in some cases an overexpression of a specific TRBV gene (16,19,24-26). However, little is known on the factors that determine the strength of the T-cell response such as the naïve T-cell repertoire (15) that can shape the allergic response along with the chemical reactivity, the magnitude of the innate inflammatory response and individual factors (27). Thus, the aim of this study was to investigate the presence, the activation requirements and the characteristics of nickel-specific naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the general population by using an *in vitro* T-cell assay based on the amplification of preexisting antigen-specific T-cells and the evaluation of their antigen specificity by an IFN- $\gamma$  ELISpot assay.

Nickel-recognizing naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were detected in 10/11 and 7/8 of the tested donors with a mean frequency of specific naïve T cells of 0.49 and 0.37 per million of circulating naïve T cells respectively. These positive naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were shown to recognize nickel in the context of major histocompatibility complex (MHC) class II and I molecules respectively. Moreover, nickel-recognizing naïve CD4<sup>+</sup> T cells showed a polyclonal TCRV $\beta$  composition with a high representation of the TRBV19 gene. Furthermore, we showed that a low frequency of nickel-recognizing naïve CD4<sup>+</sup> T cells can cross-react with cobalt. Our results contribute to a better understanding of the mechanism of immunization to nickel by identifying nickel-specific T cells in the naïve repertoire which share the same characteristics previously described for their memory analogs isolated from allergic patients.

## **METHODS**

### **Blood collection and HLA-DRB1 genotyping**

Blood was collected from the Etablissement Français du Sang (EFS, Rennes, France) from anonymous healthy donors (these will be named ‘donors’ in the manuscript) after informed consent and following EFS guidelines. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density centrifugation on a Ficoll gradient (lymphocyte separation medium LSM1077; PAA, Les Mureaux, France). For some donors, DNA was extracted from PBMC using the NucleoSpin Blood L Kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) as described by the manufacturer’s protocol. HLA-DR genotyping was performed using the All Set Gold SSP DRB1 typing kit (Eurobio, France ce), according to the manufacturer protocol. The HLA-DR genotype of donors is shown in supplementary data 1.

### **Generation of naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell lines recognizing nickel**

Monocyte-derived dendritic cells (DCs) were generated from monocytes isolated from PBMC by magnetic-positive selection with MiniMacs separation columns and anti-CD14 antibodies coated on magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) after 5 days of culture in the presence of GM-CSF (550 U/ml) and IL-4 (550 U/ml) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) in RPMI 1640 (Gibco Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS, Biowest, France), 1% sodium pyruvate and 1% penicillin/streptomycin (Gibco Invitrogen) at 37°C in humidified air containing 5% CO<sub>2</sub>. Naïve CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from PBMCs by negative selection using specific microbeads (Miltenyi Biotec). Naïve CD8<sup>+</sup> T cells were isolated from PBMCs based on a two-step procedure

and using specific microbeads (Miltenyi Biotec). Percentage of CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> T-cells (>90%) was evaluated using flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences). For T-cell stimulation, DCs were loaded with nickel sulfate (NiSO<sub>4</sub>) (500 μM; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) for 24 hours. DCs were then washed and 10<sup>4</sup> cells were added to 10<sup>5</sup> autologous naïve CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells per round-bottom microwell containing 200 μl Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 10% human AB serum (Lonza, Basel, Switzerland), 11000 U/ml of rh-IL-6 and 10 ng/ml rh-IL-12 (R&D Systems). T cells were restimulated on days 7, 14, and 21, with autologous DCs loaded with NiSO<sub>4</sub>, rh-IL-2 (10 U/ml) and rh-IL-7 (5 ng/ml) (R&D Systems). In the case of naïve CD8<sup>+</sup> T cells, rhIL-15 (25 ng/ml) was also added at day 21. Specificity of the T-cell lines was investigated using IFN-γ ELISPOT assay at day 27. T-cell stimulation with KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin; Thermo Fisher Scientific) was used as a positive control and, in some experiments, DCs were loaded with CoCl<sub>2</sub> (500 μM).

### **IFN-γ ELISPOT assay**

IFN-γ ELISPOT assay was performed after 18 h of co-culturing T cells and DCs loaded with NiSO<sub>4</sub> or KLH. In some experiments, DCs were loaded with CoCl<sub>2</sub> (500 μM). Spots were revealed by the addition of extravidin conjugate and BCIP substrate (SigmaAldrich). The number of spot was determined using the AID ELISPOT Reader system (AID). T-cell lines were considered specific when the spot count was at least two-fold higher in the presence of NiSO<sub>4</sub>-loaded DCs compared to non-loaded DCs. A minimum of 30 spots/well is required for analysis to be valid.

### **Requirement for MHC class I and II molecules**

Anti-human MHC class II antibodies (Abs): anti-human HLA-DP, DQ and DR $\alpha$  blocking antibodies (10  $\mu$ g/ml; a kind gift from Dr. Bernard Maillère) and anti-human MHC class I Abs (10  $\mu$ g/ml; Clone DX17; BD France) were used to determine MHC molecules role in nickel-recognizing T-cell responses. DCs were pre-treated for 1 hour with the different MHC class II or class I Abs and then stimulated with NiSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ M) for 24 hours before starting the autologous co-culture assay.

### **High-throughput sequencing**

RNA extraction, complementary DNA synthesis, and linear amplification were performed as previously described. Six nickel-recognizing CD4<sup>+</sup> naive T-cell lines were selected for high-throughput sequencing of the T cell receptor  $\beta$  chain (TCR  $\beta$ ) repertoire. Cell pellets were snap frozen in liquid nitrogen and store at -80°C until RNA extraction. Due to the small cells numbers, 10<sup>5</sup> (TCR-negative) HEK293T cells were added to each samples before starting the RNA isolation procedure, performed following manufacturer's instructions (QIAGEN, Hilden, Germany). Complementary DNA (cDNA) synthesis and amplification of the TCR  $\beta$  repertoire were performed as previously described (28)(29). Briefly, a linear amplification was performed using a mix of primers covering all the functional TCR  $\beta$  variable genes. After purification, the amplification product was used in a normal PCR to obtain amplicons spacing from the TCR  $\beta$  variable region to the TCR  $\beta$  constant region. Amplicons were purified, quantified and prepared for sequencing according to the sequencing platform manufacturer's manual (Illumina MiSeq, San Diego, California, USA).

### **CDR3 sequence analysis**

A total of 305683 reads were retrieved from the sequencing platform. After quality check and filtering, a total of 15000 reads per samples were used for repertoire analysis. The bioinformatic pipeline used to extract TCR $\beta$  sequences was described previously (28)(29). In short, reads are “fingerprinted” based on the V-J-CDR3 identified in the sequence (V= Variable gene, J= Joining gene, CDR3= Complementary Determining Region 3). TCR $\beta$  sequences with unique fingerprint are regarded as a *clone*. The frequency of each clone is calculated based on the total amount of reads. Clones with frequencies above 0.5% of the total repertoire are considered as Highly Expanded Clones (HECs).

### **Statistical analysis**

The frequency of naïve T cells-recognizing nickel was estimated using the Poisson distribution according to the following formula:

$$\text{Frequency} = \frac{-\ln(\text{Number of negative T-cell lines} / \text{Total number of T-cell lines tested})}{\text{Number of T-cells per well}}$$

## RESULTS

### Detection of nickel-specific naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell lines

To identify naïve T cells that are able to recognize nickel, naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell lines were generated from PBMC after 4 weekly rounds of stimulation of T cells by DCs loaded with NiSO<sub>4</sub> (500 µM). Each independent T-cell line (T cells present in a single well) was evaluated for its ability to recognize nickel using an IFN-γ Elispot assay where each T-cell line was stimulated with unloaded DCs or NiSO<sub>4</sub>-loaded DCs. Results from donors PR4 (for naïve CD4<sup>+</sup> T cells) and PR13 (for naïve CD8<sup>+</sup> T cells) are shown as a representative result for eleven and eight tested donors respectively (**Figure 1**). For donor PR4, two naïve CD4<sup>+</sup> T-cell lines (well 3 and 5) were found specific for nickel among ninety CD4<sup>+</sup> naïve T-cell lines tested (**Figure 1a, b**). For donor PR13, two naïve CD8<sup>+</sup> T-cell lines (well 14 and 22) were also able to recognize nickel among thirty naïve CD8<sup>+</sup> T-cell lines tested (**Figure 1c, d**).

### Quantification of the frequency of blood-circulating nickel-recognizing naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells

Naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells that were able to recognize nickel were detected in 10/11 and 7/8 healthy donors respectively (**Figure 2**). PR7 (for naïve CD4<sup>+</sup> T cells) and PR22 (for naïve CD8<sup>+</sup> T cells) were the only non-responder donors. We then used these results to calculate the frequency of preexisting nickel-recognizing naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells for each donor using the Poisson distribution law. For nickel-specific naïve CD4<sup>+</sup> T cells, the ten responding donors exhibited a frequency varying from 0.14 to 1.42 cells per million of circulating naïve CD4<sup>+</sup> T cells (**Figure 2a**). The mean frequency for the eleven tested donors was 0.49 nickel-recognizing naïve CD4<sup>+</sup> T cells per million of circulating naïve CD4<sup>+</sup> T cells. The frequency for KLH specific naïve CD4<sup>+</sup>

T cells used as a positive control was 11.57 (**Figure 2b**). The mean frequency for the eight tested donors was 0.37 nickel-recognizing naïve CD8<sup>+</sup> T cells per million of circulating naïve CD8<sup>+</sup> T cells (**Figure 2c**). The frequency for KLH specific naïve CD8<sup>+</sup> T cells used as a positive control was 7 (**Figure 2d**). Spot count for nickel-recognizing naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from all the tested donors are shown in supplementary figures 2 and 3.

### **Requirement for the MHC class II and I molecules respectively**

To determine if the T-cell response to nickel was mediated by MHC molecules, we tested the capacity of blocking antibodies specific for MHC class I (A, B, and C) and II (DP, DQ and DR) molecules to inhibit the activation of nickel-specific T-cell lines. From three different donors, we identified four naïve CD4<sup>+</sup> T-cell lines specific to nickel in the first Elispot assay. In a second Elispot assay, we confirmed the positivity of these T-cell lines for nickel and we showed that their response was dependent on MHC class II molecule but not on MHC class I molecule (**Figure 3a, b**). On another hand, five naïve CD8<sup>+</sup> T-cell lines specific for nickel from two different donors were also tested in a second Elispot assay. Our results showed that the activation of these naïve CD8<sup>+</sup> T cells was dependent on MHC class I molecule but not on MHC class II molecule (**Figure 3c, d**).

### **TCR $\beta$ repertoire analysis of nickel-recognizing naïve CD4<sup>+</sup> T cells**

Previous studies indicated that nickel-specific memory T cells derived from nickel-allergic patients preferentially express distinct TCRV $\beta$  chains (16,19,24,25). To gain more insight into the clonal expansion of nickel-specific naïve T cells, six nickel-recognizing naïve CD4<sup>+</sup> T-cell lines from three different donors were randomly selected and their TCR $\beta$  repertoire was analyzed with high-

throughput sequencing. All T-cells lines analyzed showed a polyclonal TCR $\beta$  repertoire composition and an elevated clonal expansion, with 93% (median, IQR: 92%-96%) of the TCR $\beta$  repertoire being occupied by highly expanded clones (HECs, clonal frequency >0.5% of the total repertoire) (**Figure 4a, b**). In addition, we analyzed the TCR $\beta$  variable gene usage to investigate whether nickel-specific T-cells have a skewed TCR $\beta$  repertoire. The most represented TCR $\beta$  variable gene among the highly expanded clones of all T-cell lines analyzed was TRBV19, followed by TRBV20.1 (11.8% and 10.3% respectively of the total HECs) (**Figure 4c**). Of note, the most dominant clones in all T cell lines analyzed was never found to carry TRBV19 nor TRBV20.1 (**Supplementary data 4**). Only one nickel-specific T-cell line (PR19.30) did not contain any clone expressing the TRBV19 gene but showed a high expression of TRBV27. Moreover, TRBV7.9 and TRBV28 were also found to be used by dominant clones but were detected only in two and one naïve CD4<sup>+</sup> T-cell lines respectively (**Supplementary data 4**).

### **Cross-reactivity of nickel-recognizing naïve T-cells to cobalt**

Nickel and cobalt are constituents of many alloys and a high prevalence of concomitant nickel and cobalt allergy can be observed in the general population (30). To determine if nickel-recognizing naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, identified in a first Elispot assay, were also able to recognize cobalt, we tested, in a second Elispot assay, the cross-reactivity of these nickel-recognizing naïve T cells (**Supplementary data 5**). In total, fifteen nickel-recognizing naïve T-cell lines were identified from six different donors and were tested for their cross-reactivity to cobalt (**Figure 5a**). Our results showed that only two nickel-recognizing naïve CD4<sup>+</sup> T-cell lines (PR5 W.3 and PR6 W.44) but not naïve CD8<sup>+</sup> T-cells were also able to recognize cobalt (**Figure 5b, c**).

## DISCUSSION

ACD is a common T cell-mediated inflammatory skin disease and is regarded as a prototype of delayed hypersensitivity (type IV hypersensitivity), as classified by Gell and Coombs (3). Nickel-specific T cells have been previously detected in the blood and skin of nickel allergic patients (16-20) and the response of nickel-specific memory T cells was well characterized. Different groups have isolated nickel-specific T-cell clones from allergic patients *in vitro* (16,31,32). These clones showed heterogeneous responses because in some cases the TCR (clone ANi-2.3) was recognizing nickel bound to the peptide-MHC molecule complex (21) whereas in other cases, no requirement for a specific MHC-bound peptide (clone SE9) was evidenced (22). However much less is known concerning the nickel-recognizing naïve T-cell repertoire. The objectives of this work were to identify naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells able to recognize nickel in the general population, to characterize their TCR $\beta$  repertoire and to study the cross-reactivity to cobalt, a common metal allergen usually found with nickel in many alloys (30).

Our results showed the presence of a naïve CD4<sup>+</sup> T-cell repertoire for nickel. This is in concordance with previous reports showing that nickel can activate CD4<sup>+</sup> T cells even from non-allergic individuals (33-36).

Of particular interest, in our study, is the finding that a naïve CD8<sup>+</sup> T-cell repertoire for nickel could also be detected in almost all the tested donors. However, previous studies using the lymphocyte proliferation assay after a co-culture with antigen presenting cells (APC) and T cells in the presence of nickel, could not detect an increase in CD8<sup>+</sup> T-cells proliferation in non-allergic donors (33,34). From our point of view, this discrepancy could be due to a better sensitivity of our T-cell priming assay. In fact, the successive restimulations of naïve T cells by nickel-loaded autologous DCs amplify nickel-specific T cells already present at low frequency and facilitate their

detection. Multiple similar strategies based on DC/T cells co-cultures and restimulations have been used to characterize the naïve T-cell response to a variety of drugs, chemicals and therapeutic antibodies (37–42). Moreover, CD8<sup>+</sup> T-cells activation might be prevented by regulatory mechanisms. In our model, immunomodulatory CD56<sup>+</sup> cells are removed during the selection process of naïve CD8<sup>+</sup> T-cells. Our data are in line with another study showing that the depletion of CD56<sup>+</sup> cells in peripheral blood lymphocytes improves the *in vitro* detection of hapten-specific T cells (40).

The mean frequency of nickel-recognizing naïve CD4<sup>+</sup> T cells and naïve CD8<sup>+</sup> T cells was 0.49 and 0.37 per million of circulating naïve T cells, respectively. The result for CD4<sup>+</sup> T cells was very similar to the one analyzed by linear regression where a frequency of less than one nickel-specific cell per  $2 \times 10^6$  T cells was found (36). In our study, a low frequency of naïve T cells was detected as expected for hapten-specific T cells in non-sensitized individuals (36,38) since previous works performed on nickel allergic patients showed a frequency of nearly 100 to 1000-fold higher than our findings (25,34). The frequencies of nickel-specific naïve T cells were in the same range as those found for benzylpenicillin (BP) (38) and immunogenic therapeutic antibodies (39). It is important to note that the frequency of nickel-recognizing naïve T cells that we identified could be underestimated since we were using nickel-loaded DCs and it was shown that the activation of some nickel-specific T-cell lines such as clone SE9 requires the permanent presence of nickel in the culture media (22).

To explore the molecular requirement for nickel to stimulate specific T cells, we performed MHC blocking experiments. Our observation that the blocking of the MHC class II molecules alters the CD4<sup>+</sup> response but not the CD8<sup>+</sup> response, whereas the blocking of the MHC class I molecules

alters CD8+ response only is in agreement with the specific activation of each T-cell subtype and the requirement for MHC molecules.

Moreover, all nickel-specific naïve CD4+ T-cell lines analyzed showed a polyclonal TCR $\beta$  composition and the presence of highly expanded clones. It should be noted that in our study we used the IMGT gene nomenclature (43) which have been approved by the HUGO Nomenclature Committee. For example, the TRBV19, TRBV20.1, TRBV27, TRBV7.9 and TRBV28 in our study were previously termed TCRV $\beta$ 17, TCRV $\beta$ 2, TCRV $\beta$ 14, TCRV $\beta$ 6S5 and TCRV $\beta$ 3, respectively according to the nomenclature of Wei et al (44). Interestingly, nickel-specific naïve CD4+ T cells showed a high representation of the TRBV19 gene which was also detected in nickel-specific T cells isolated from allergic patients (16,19,24). Moreover, it was demonstrated that TRBV19 gene's over-expression was correlated with the individuals reactivity to nickel (19,24,45). TRBV20.1, TRBV27 and TRBV28 were also detected, to a lower extent, in nickel-specific T cells isolated from allergic patients (25,46). However, whether this expression of specific TRBV gene in naïve T cells specific for nickel is due to nickel reactivity itself will need further investigation. It is well known that ACD to different metals can occur simultaneously and high prevalence of concomitant nickel and cobalt allergy can be found in the general population (30). However, most nickel-specific naïve T cells tested showed a high specificity to nickel since they were not able to recognize cobalt, another metallic hapten belonging to the same period as nickel. In fact, nickel and cobalt have different coordination geometries in their protein bound state (12) that may explain why nickel-specific TCR could not cross-react with cobalt. Interestingly, nickel-specific memory T-cell clones derived *in vitro* from allergic patients did not proliferate also in response to cobalt either (16,47). Taken together, these results show the same behavior of nickel-specific naïve T cells compared to their memory analogs isolated from allergic patients.

In resume, our results showed the existence of naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells repertoire for nickel in the general population. We were also able to quantify their frequency using an *in vitro* T-cell assay. The preexistence of a naïve T-cell repertoire for nickel in almost all the tested donors further supports the hypothesis that most people can be sensitized to nickel but only a few can mount an allergic response due to additional factors such as the rate of exposition or the disturbance of tolerance (48). However, the correlation between the size of the naïve T-cell repertoire and the potential sensitization potency of the chemicals as described for the immunogenicity of therapeutic antibodies (39), will need further investigation.

## REFERENCES

1. Diepgen TL, Ofenloch RF, Bruze M, Bertuccio P, Cazzaniga S, Coenraads P-J, et al. Prevalence of contact allergy in the general population in different European regions. *Br J Dermatol*. 2016 Feb;174(2):319–29.
2. Vocanson M, Hennino A, Chavagnac C, Saint-Mezard P, Dubois B, Kaiserlian D, et al. Contribution of CD4(+) and CD8(+) T-cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2005 May;1(1):75–86.
3. Kaplan DH, Igyártó BZ, Gaspari AA. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol*. 2012 Feb;12(2):114–24.
4. McFadden JP, Puangpet P, Basketter DA, Dearman RJ, Kimber I. Why does allergic contact dermatitis exist? *Br J Dermatol*. 2013 Apr;168(4):692–9.
5. Schmidt M, Raghavan B, Müller V, Vogl T, Fejer G, Tchaptchet S, et al. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol*. 2010 Sep;11(9):814–9.
6. Antonios D, Ade N, Kerdine-Römer S, Assaf-Vandecasteele H, Larangé A, Azouri H, et al. Metallic haptens induce differential phenotype of human dendritic cells through activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *Toxicol Vitro*. 2009 Mar;23(2):227–34.
7. Antonios D, Rousseau P, Larangé A, Kerdine-Römer S, Pallardy M. Mechanisms of IL-12 synthesis by human dendritic cells treated with the chemical sensitizer NiSO<sub>4</sub>. *J Immunol*. 2010 Jul 1;185(1):89–98.
8. Ade N, Antonios D, Kerdine-Romer S, Boisleve F, Rousset F, Pallardy M. NF-kappaB plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO<sub>4</sub> but not by DNCB. *Toxicol Sci*. 2007 Oct;99(2):488–501.
9. Boislève F, Kerdine-Römer S, Rougier-Larzat N, Pallardy M. Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF-alpha and MAPK. *J Invest Dermatol*. 2004 Sep;123(3):494–502.
10. Boislève F, Kerdine-Römer S, Pallardy M. Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha. *Toxicology*. 2005 Jan 15;206(2):233–44.
11. Bechara R, Antonios D, Azouri H, Pallardy M. Nickel sulfate promotes IL-17A producing CD4+ T-cells by an IL-23 dependent mechanism regulated by TLR4 and Jak-STAT pathways. *J Invest Dermatol*. 2017 Oct;137(10):2140-2148.
12. Basketter D, Dooms-Goossens A, Karlberg AT, Lepoittevin JP. The chemistry of contact allergy: why is a molecule allergenic? *Contact Dermatitis*. 1995 Feb;32(2):65–73.

13. Thierse H-J, Gamedinger K, Junkes C, Guerreiro N, Weltzien HU. T cell receptor (TCR) interaction with haptens: metal ions as non-classical haptens. *Toxicology*. 2005 Apr 15;209(2):101–7.
14. Jenkins MK, Chu HH, McLachlan JB, Moon JJ. On the composition of the preimmune repertoire of T cells specific for Peptide-major histocompatibility complex ligands. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:275–94.
15. Esser PR, Kimber I, Martin SF. Correlation of contact sensitizer potency with T cell frequency and TCR repertoire diversity. *EXS*. 2014;104:101–14.
16. Moulon C, Vollmer J, Weltzien HU. Characterization of processing requirements and metal cross-reactivities in T cell clones from patients with allergic contact dermatitis to nickel. *Eur J Immunol*. 1995 Dec;25(12):3308–15.
17. Albanesi C, Scarponi C, Cavani A, Federici M, Nasorri F, Girolomoni G. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2000 Jul;115(1):81–7.
18. Moulon C, Wild D, Dormoy A, Weltzien HU. MHC-dependent and -independent activation of human nickel-specific CD8+ cytotoxic T cells from allergic donors. *J Invest Dermatol*. 1998 Sep;111(3):360–6.
19. Büdinger L, Neuser N, Totzke U, Merk HF, Hertl M. Preferential usage of TCR-Vbeta17 by peripheral and cutaneous T cells in nickel-induced contact dermatitis. *J Immunol*. 2001 Nov 15;167(10):6038–44.
20. Minang JT, Areström I, Troye-Blomberg M, Lundeberg L, Ahlborg N. Nickel, cobalt, chromium, palladium and gold induce a mixed Th1- and Th2-type cytokine response in vitro in subjects with contact allergy to the respective metals. *Clin Exp Immunol*. 2006 Dec;146(3):417–26.
21. Lu L, Vollmer J, Moulon C, Weltzien HU, Marrack P, Kappler J. Components of the ligand for a Ni<sup>++</sup> reactive human T cell clone. *J Exp Med*. 2003 Mar 3;197(5):567–74.
22. Gamedinger K, Moulon C, Karp DR, Van Bergen J, Koning F, Wild D, et al. A new type of metal recognition by human T cells: contact residues for peptide-independent bridging of T cell receptor and major histocompatibility complex by nickel. *J Exp Med*. 2003 May 19;197(10):1345–53.
23. Thierse H-J, Moulon C, Allespach Y, Zimmermann B, Doetze A, Kuppig S, et al. Metal-protein complex-mediated transport and delivery of Ni<sup>2+</sup> to TCR/MHC contact sites in nickel-specific human T cell activation. *J Immunol*. 2004 Feb 1;172(3):1926–34.
24. Vollmer J, Fritz M, Dormoy A, Weltzien HU, Moulon C. Dominance of the BV17 element in nickel-specific human T cell receptors relates to severity of contact sensitivity. *Eur J Immunol*. 1997 Aug;27(8):1865–74.

25. Werfel T, Hentschel M, Kapp A, Renz H. Dichotomy of blood- and skin-derived IL-4-producing allergen-specific T cells and restricted V beta repertoire in nickel-mediated contact dermatitis. *J Immunol*. 1997 Mar 1;158(5):2500–5.
26. Bowerman NA, Falta MT, Mack DG, Wehrmann F, Crawford F, Mroz MM, et al. Identification of multiple public TCR repertoires in chronic beryllium disease. *J Immunol*. 2014 May 15;192(10):4571–80.
27. Pichler WJ, Naisbitt DJ, Park BK. Immune pathomechanism of drug hypersensitivity reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Mar;127(3 Suppl):S74-81.
28. Klarenbeek PL, Tak PP, van Schaik BDC, Zwinderman AH, Jakobs ME, Zhang Z, et al. Human T-cell memory consists mainly of unexpanded clones. *Immunol Lett*. 2010 Sep 6;133(1):42–8.
29. Klarenbeek PL, de Hair MJH, Doorenspleet ME, van Schaik BDC, Esveldt REE, van de Sande MGH, et al. Inflamed target tissue provides a specific niche for highly expanded T-cell clones in early human autoimmune disease. *Ann Rheum Dis*. 2012 Jun;71(6):1088–93.
30. Thyssen JP. Nickel and cobalt allergy before and after nickel regulation--evaluation of a public health intervention. *Contact Dermatitis*. 2011 Sep;65 Suppl 1:1–68.
31. Romagnoli P, Labhardt AM, Sinigaglia F. Selective interaction of Ni with an MHC-bound peptide. *EMBO J*. 1991 Jun;10(6):1303–6.
32. Vollmer J, Weltzien HU, Moulon C. TCR reactivity in human nickel allergy indicates contacts with complementarity-determining region 3 but excludes superantigen-like recognition. *J Immunol*. 1999 Sep 1;163(5):2723–31.
33. Lisby S, Hansen LH, Menn T, Baadsgaard O. Nickel-induced proliferation of both memory and naive T cells in patch test-negative individuals. *Clin Exp Immunol*. 1999 Aug;117(2):217–22.
34. Cavani A, Mei D, Guerra E, Corinti S, Giani M, Pirrotta L, et al. Patients with allergic contact dermatitis to nickel and nonallergic individuals display different nickel-specific T cell responses. Evidence for the presence of effector CD8<sup>+</sup> and regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *J Invest Dermatol*. 1998 Oct;111(4):621–8.
35. Lisby S, Hansen LH, Skov L, Menné T, Baadsgaard O. Nickel-induced activation of T cells in individuals with negative patch test to nickel sulphate. *Arch Dermatol Res*. 1999 May;291(5):247–52.
36. Rustemeyer T, De Ligter S, Von Blomberg BM, Frosch PJ, Scheper RJ. Human T lymphocyte priming in vitro by haptened autologous dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. 1999 Aug;117(2):209–16.

37. Faulkner L, Martinsson K, Santoyo-Castelazo A, Cederbrant K, Schuppe-Koistinen I, Powell H, et al. The development of in vitro culture methods to characterize primary T-cell responses to drugs. *Toxicol Sci*. 2012 May;127(1):150–8.
38. Nhim C, Delluc S, Halgand F, de Chaisemartin L, Weaver RJ, Claude N, et al. Identification and frequency of circulating CD4(+) T lymphocytes specific to Benzylpenicillin in healthy donors. *Allergy*. 2013 Jul;68(7):899–905.
39. Delluc S, Ravot G, Maillere B. Quantitative analysis of the CD4 T-cell repertoire specific to therapeutic antibodies in healthy donors. *FASEB J*. 2011 Jun;25(6):2040–8.
40. Vocanson M, Achachi A, Mutez V, Cluzel-Tailhardat M, Varlet BL, Rozières A, et al. Human T cell priming assay: depletion of peripheral blood lymphocytes in CD25(+) cells improves the in vitro detection of weak allergen-specific T cells. *EXS*. 2014;104:89–100.
41. Richter A, Schmucker SS, Esser PR, Traska V, Weber V, Dietz L, et al. Human T cell priming assay (hTCPA) for the identification of contact allergens based on naive T cells and DC--IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  readout. *Toxicol Vitro*. 2013 Apr;27(3):1180–5.
42. Dietz L, Esser PR, Schmucker SS, Goette I, Richter A, Schnölzer M, et al. Tracking human contact allergens: from mass spectrometric identification of peptide-bound reactive small chemicals to chemical-specific naive human T-cell priming. *Toxicol Sci*. 2010 Oct;117(2):336–47.
43. Folch G, Lefranc MP. The human T cell receptor beta variable (TRBV) genes. *Exp Clin Immunogenet*. 2000;17(1):42–54.
44. Wei S, Charmley P, Robinson MA, Concannon P. The extent of the human germline T-cell receptor V beta gene segment repertoire. *Immunogenetics*. 1994;40(1):27–36.
45. Zhang Y, Wang Y, Anderson K, Novikov A, Liu Z, Pacheco K, et al. Using DR52c/Ni(2+) mimotope tetramers to detect Ni(2+) reactive CD4(+) T cells in patients with joint replacement failure. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017 Sep 15;331:69–75.
46. Moulon C, Vollmer J, Weltzien HU. Characterization of processing requirements and metal cross-reactivities in T cell clones from patients with allergic contact dermatitis to nickel. *Eur J Immunol*. 1995 Dec;25(12):3308–15.
47. Pistor FH, Kapsenberg ML, Bos JD, Meinardi MM, von Blomberg ME, Scheper RJ. Cross-reactivity of human nickel-reactive T-lymphocyte clones with copper and palladium. *J Invest Dermatol*. 1995 Jul;105(1):92–5.
48. Cavani A, Nasorri F, Ottaviani C, Sebastiani S, De Pità O, Girolomoni G. Human CD25+ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals. *J Immunol*. 2003 Dec 1;171(11):5760–8.

### **Figure 1: Naïve CD4+ and CD8+ T-cell lines recognizing nickel**

(a) IFN- $\gamma$  ELISPOT response of naïve CD4+ T cells from donor PR4 stimulated with unloaded DC or DC loaded with NiSO<sub>4</sub>. (b) Spot count for naïve CD4+ T cells specific for nickel from donor PR4. (c) IFN- $\gamma$  ELISPOT response of naïve CD8+ T cells from donor PR13 stimulated with unloaded DC or DC loaded with NiSO<sub>4</sub>. (d) Spot count for naïve CD8+ T cells specific for nickel from donor PR13.

### **Figure 2: Frequency of human naïve CD4+ and CD8+ T cells recognizing nickel**

Frequency of human naïve CD4+ (a) and CD8+ (b) T cells specific for nickel. Frequency was calculated for each donor using the Poisson distribution law. On the x-axis is represented the donor's number. For the different donors tested, the number of T-cell lines found specific for nickel out of the number of T-cell lines tested is indicated in brackets. (c, d) Comparison of the nickel-specific T-cell frequency to the KLH-specific T-cell frequency performed on different donors.

### **Figure 3: Implication of MHC class II and I molecules in the T-cell response specific for nickel**

(a) IFN- $\gamma$  ELISPOT response of naïve CD4+ T cells from donors PR20, PR29 and PR43 stimulated with unloaded DC or DC loaded with NiSO<sub>4</sub> or DC loaded with MHC blocking antibodies prior to nickel treatment. (b) Spot count for naïve CD4+ T cells specific for nickel from donors PR20, PR29 and PR43 stimulated with unloaded DC or DC loaded with NiSO<sub>4</sub> or DC loaded with MHC blocking antibodies prior to nickel treatment. (c) IFN- $\gamma$  ELISPOT response of naïve CD8+ T cells from donors PR42 and PR44 stimulated with unloaded DC or DC loaded with NiSO<sub>4</sub> or DC loaded with MHC blocking antibodies prior to nickel treatment. (d) Spot count for naïve CD8+ T cells

specific for nickel from donors PR42 and PR44 stimulated with unloaded DC or DC loaded with NiSO<sub>4</sub> or DC loaded with MHC blocking antibodies prior to nickel treatment.

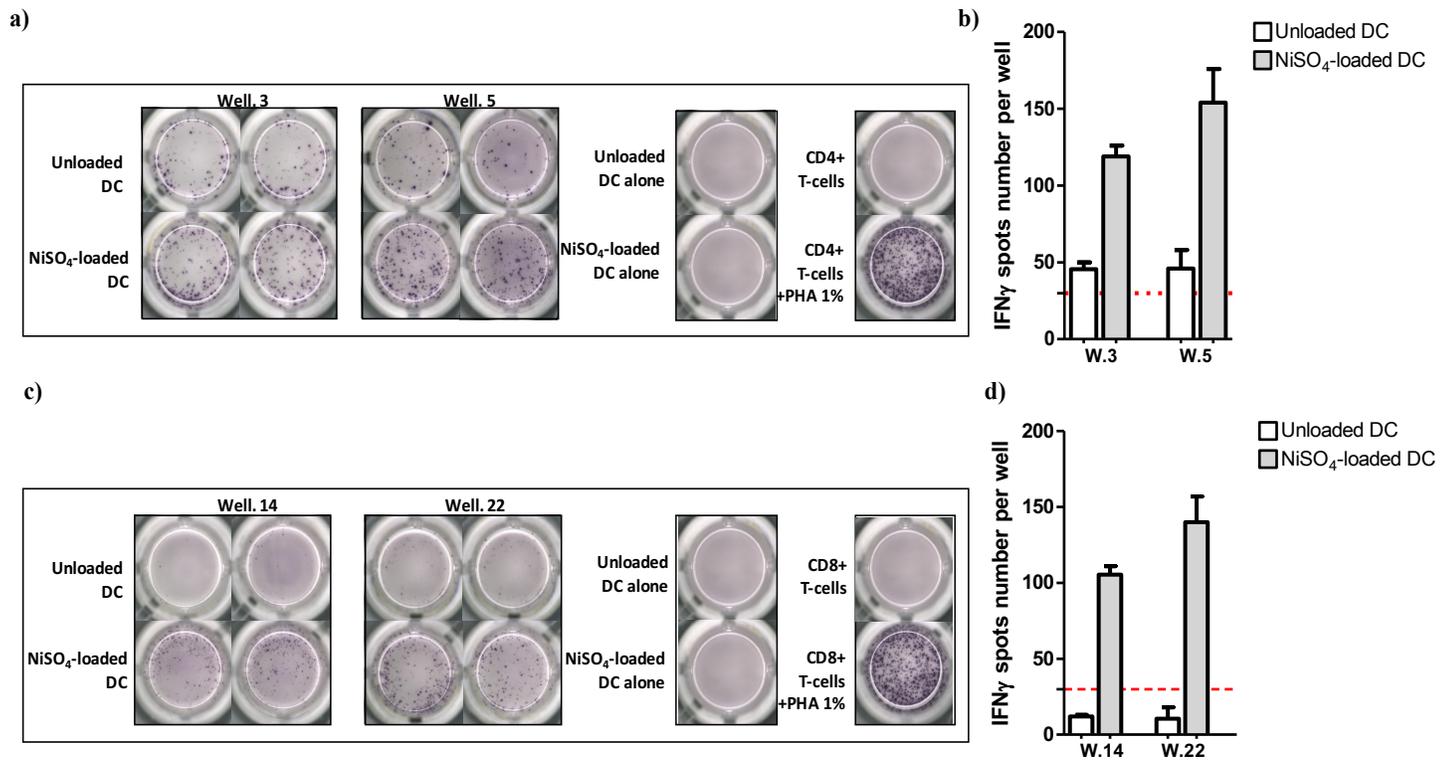
**Figure 4: TCR $\beta$  repertoire analysis of nickel-recognizing naïve CD4+ T-cell lines**

**(a)** Scatter plot representing the clonal distribution of the TCR $\beta$  repertoire for the six nickel-specific T-cell lines analyzed. Each dot represents a single clone and its frequency in the total repertoire is depicted on the y-axis as percentage of total reads. The grey dotted line indicates the frequency cut-off of 0.5% for the definition of highly expanded clones (HECs). **(b)** Impact on the total repertoire of clones with clonal frequency below 0.1% (light grey bars), between 0.1% and 0.5% (dark grey bars) and above 0.5% (black bars) in the six nickel-specific T-cell lines analyzed. **(c)** TCR $\beta$  variable gene usage of the HECs detected in the six nickel-specific T-cell lines analyzed. The percentage of HECs carrying a particular TCR $\beta$  variable gene (TRBV) is depicted on the y-axis. All the genes names followed the IMGT nomenclature.

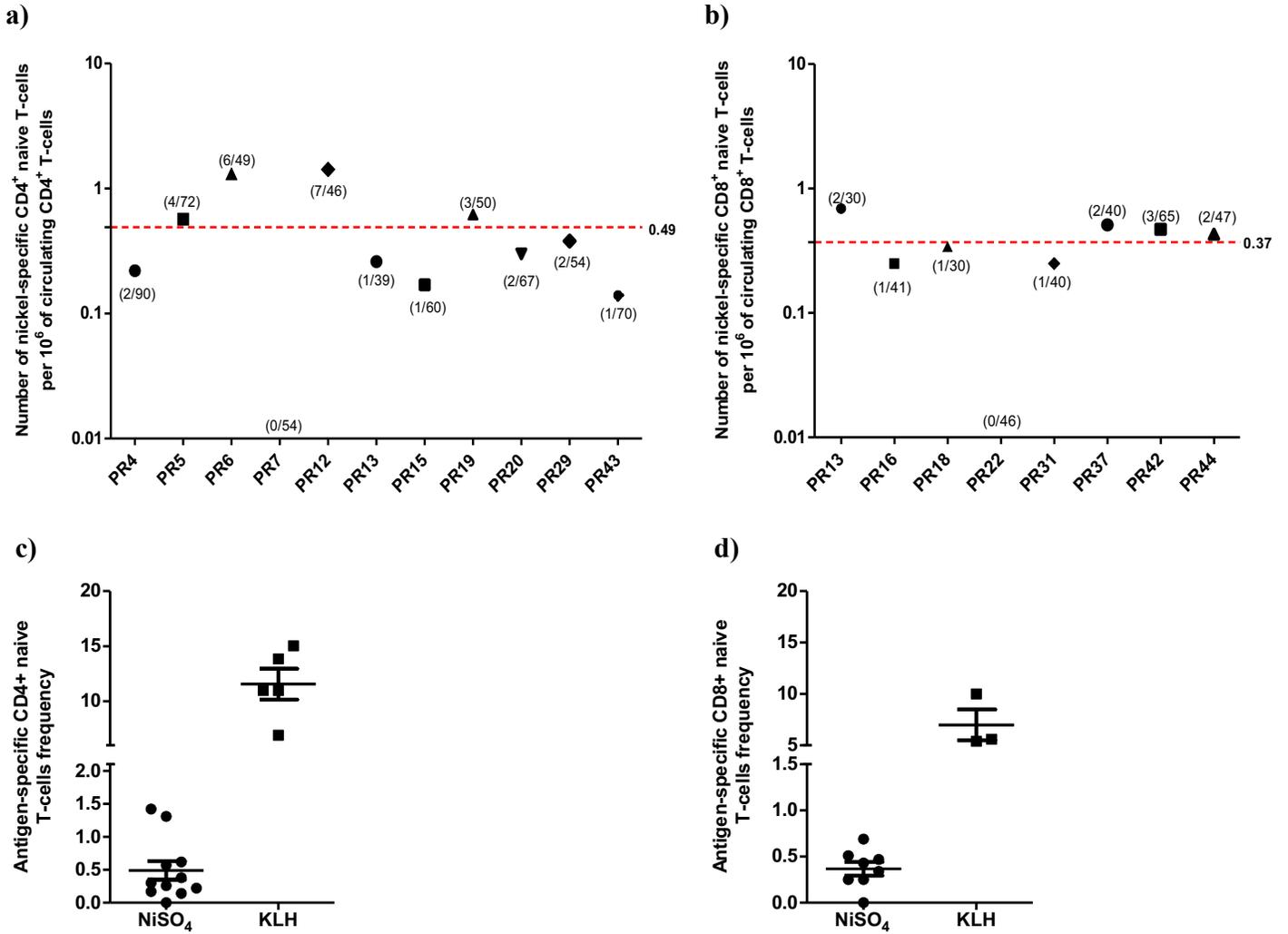
**Figure 5: Cobalt cross-reactivity of nickel-recognizing naïve CD4+ and CD8+ T cells**

**(a)** Number of cross-reactive T-cell lines among nickel specific T cells from different donors. **(b)** Spot count for naïve CD4+ T cells specific for nickel from donors PR5, PR6 and PR20 stimulated with unloaded DC or DC loaded with NiSO<sub>4</sub> or DC loaded with CoCl<sub>2</sub>. **(c)** Spot count for naïve CD8+ T cells specific for nickel from donors PR18, PR31 and PR44 stimulated with unloaded DC or DC loaded with NiSO<sub>4</sub> or DC loaded with CoCl<sub>2</sub>.

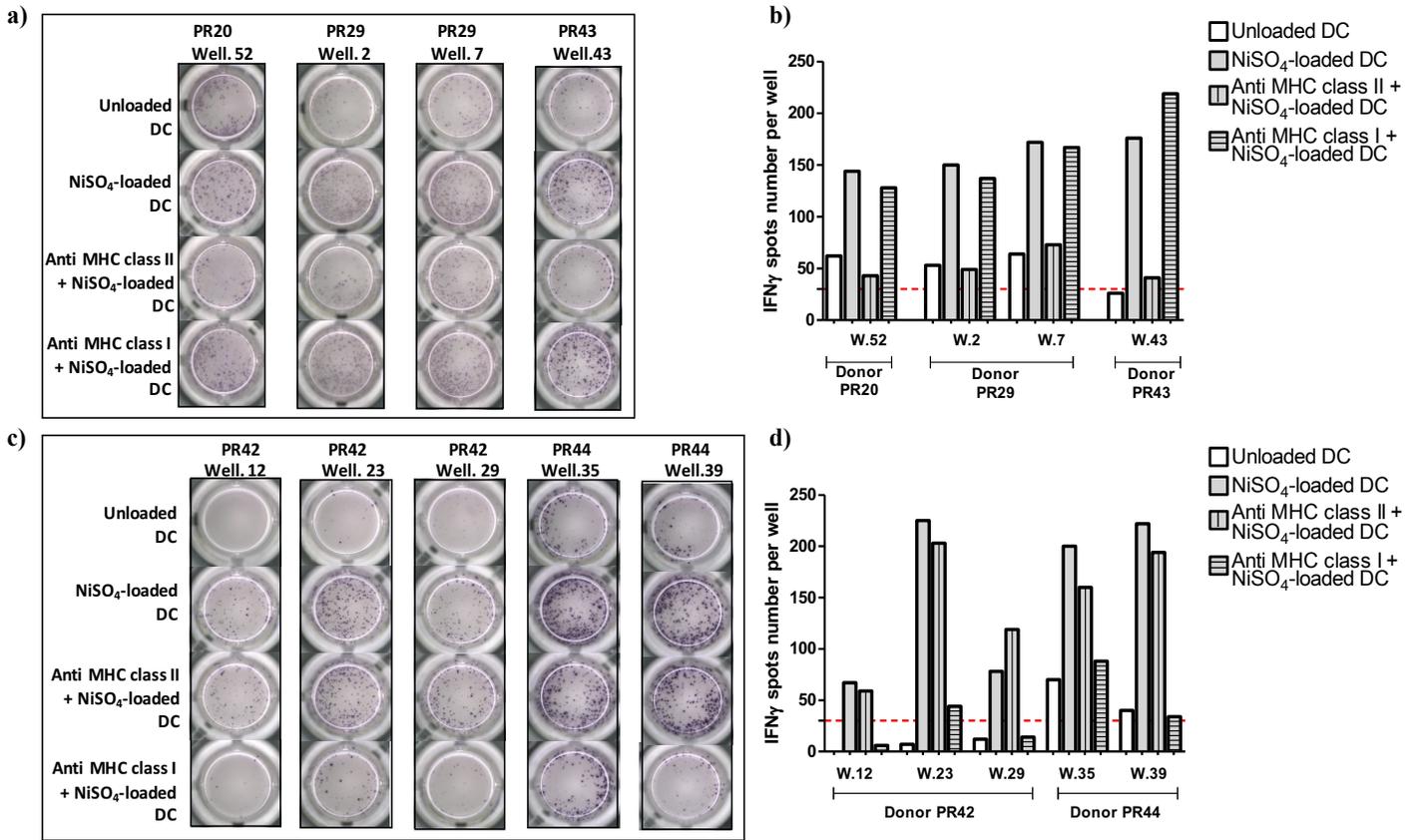
**Figure 1**



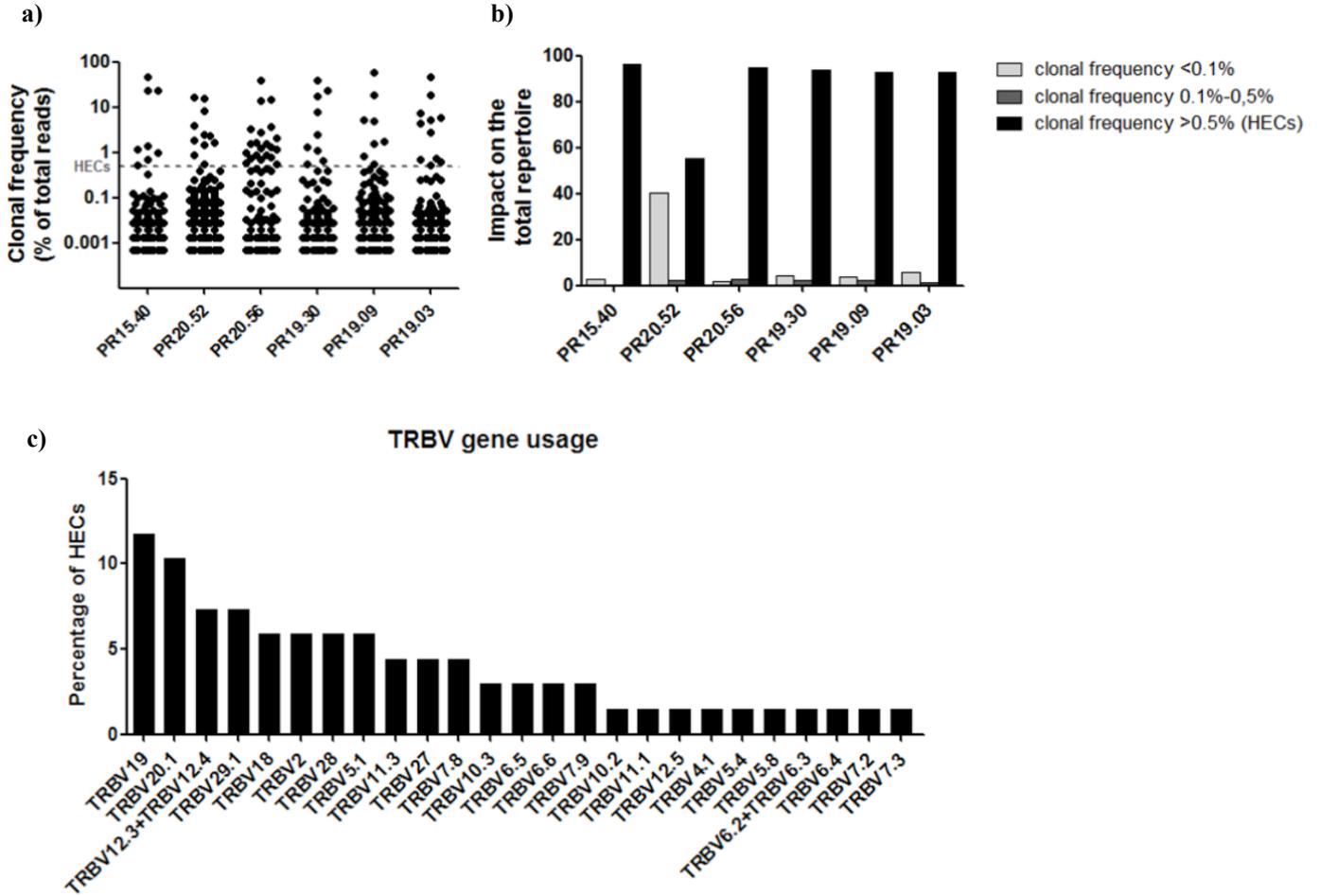
**Figure 2**



**Figure 3**



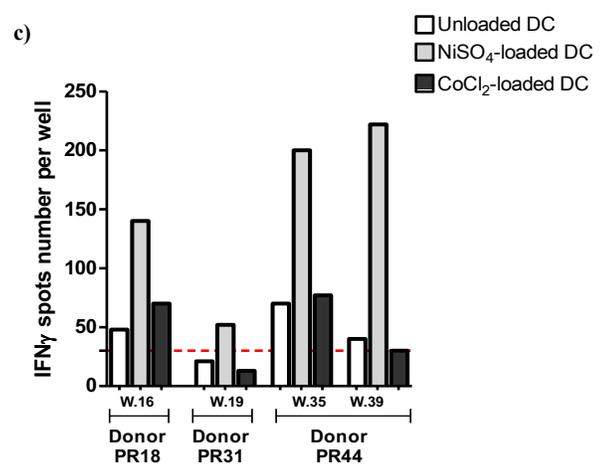
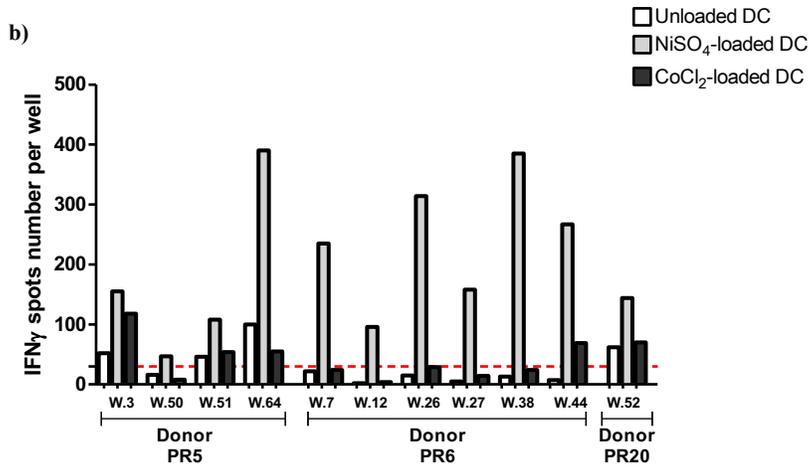
**Figure 4**



**Figure 5**

a)

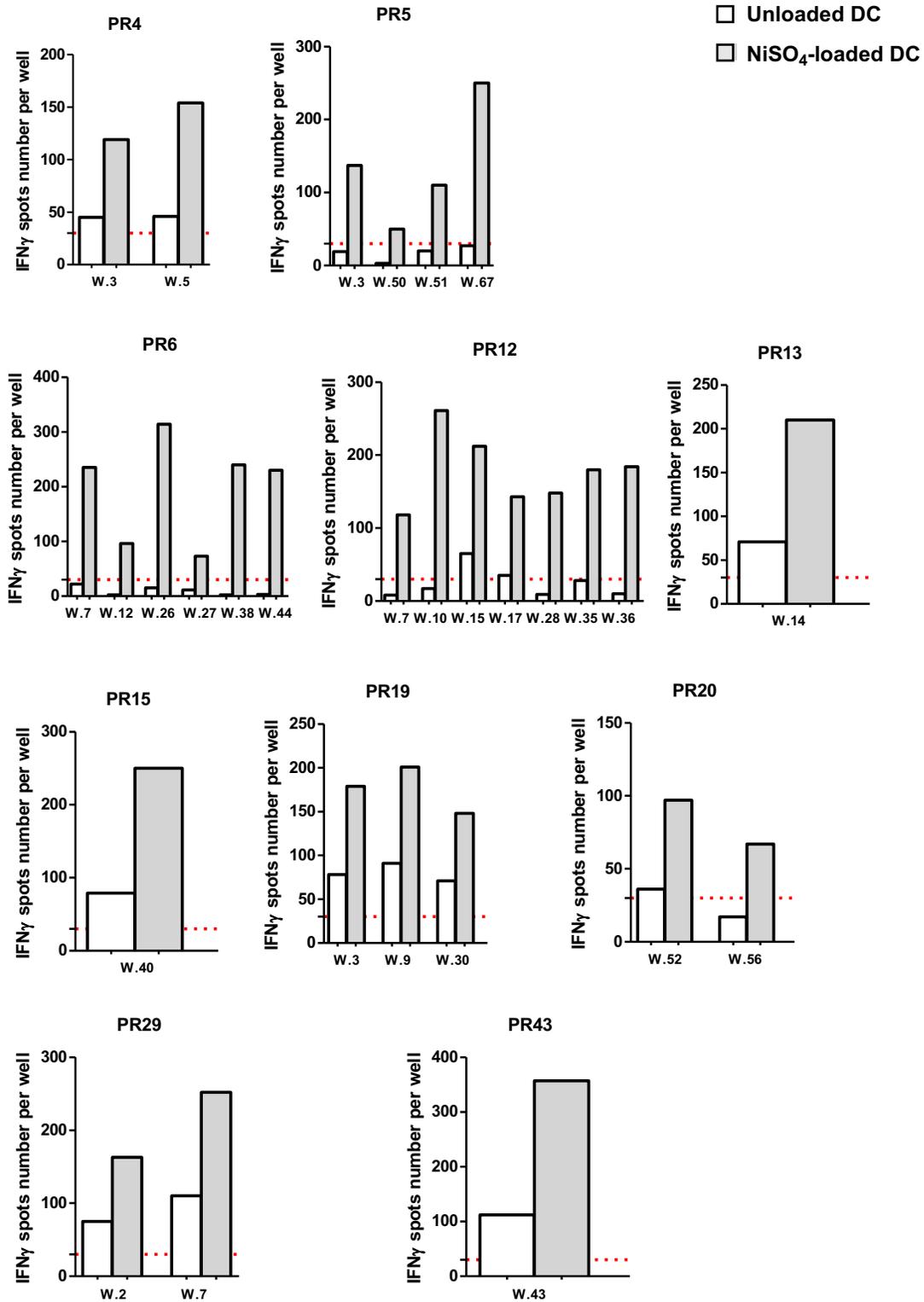
	Donor	CoCl <sub>2</sub>
CD4+ naïve T-cells	PR5	1/4
	PR6	1/6
	PR20	0/1
CD8+ naïve T-cells	PR18	0/1
	PR31	0/1
	PR44	0/2
Total number of cross-reactive T-cells		2/15



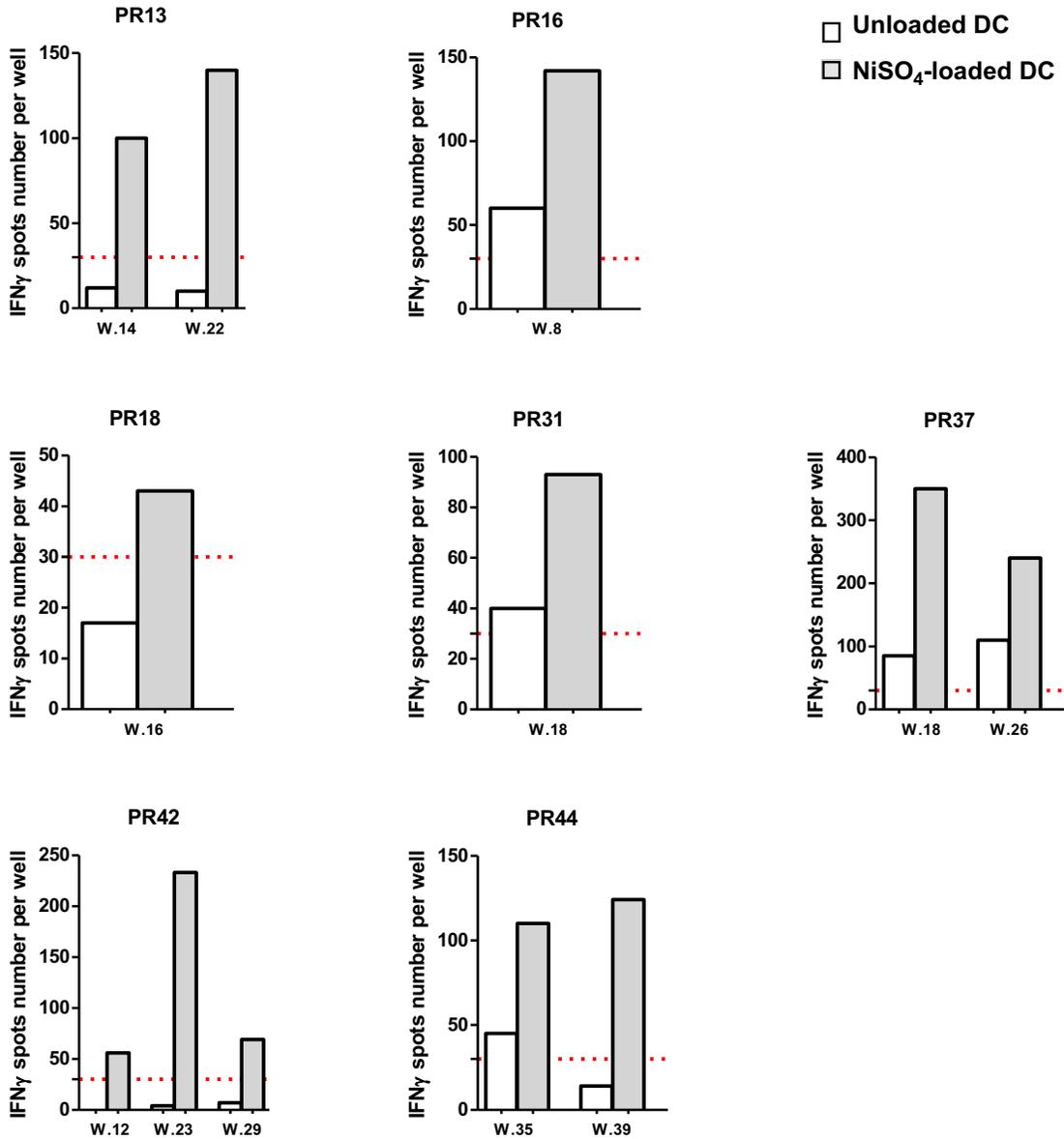
**Supplementary data 1** HLA-DRB1 genotype was performed using the All Set Gold SSP DRB1 typing kit as described in Methods section.

Donor numbers	HLA-DR genotyping
PR15	DRB1*0701, DRB4*01
PR19	DRB1*0101, DRB1*0301; DRB3*01
PR20	DRB1*0701, DRB1*1302; DRB3*02

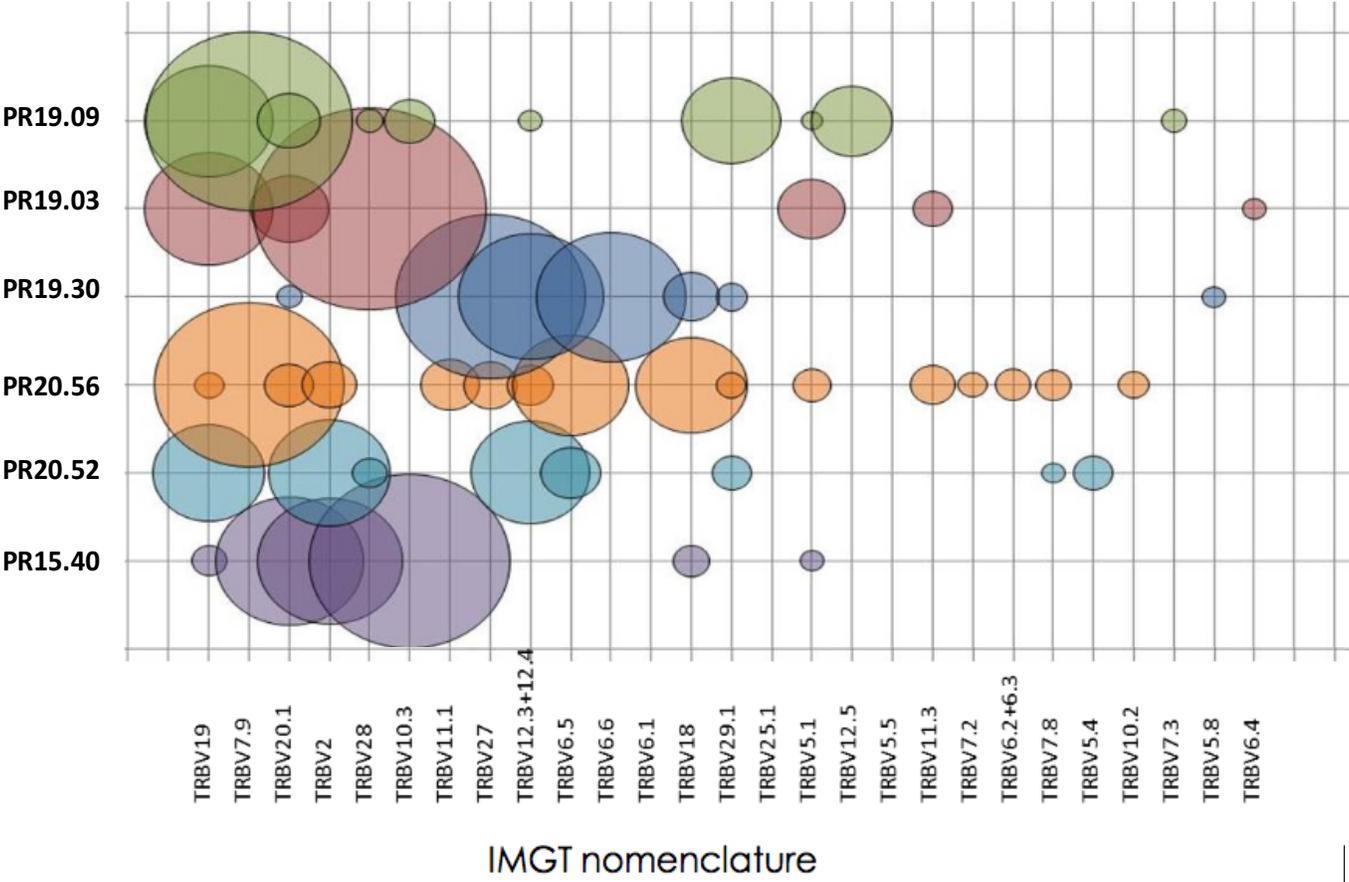
## Supplementary data 2 Spot count for nickel-recognizing naïve CD4+ T cells



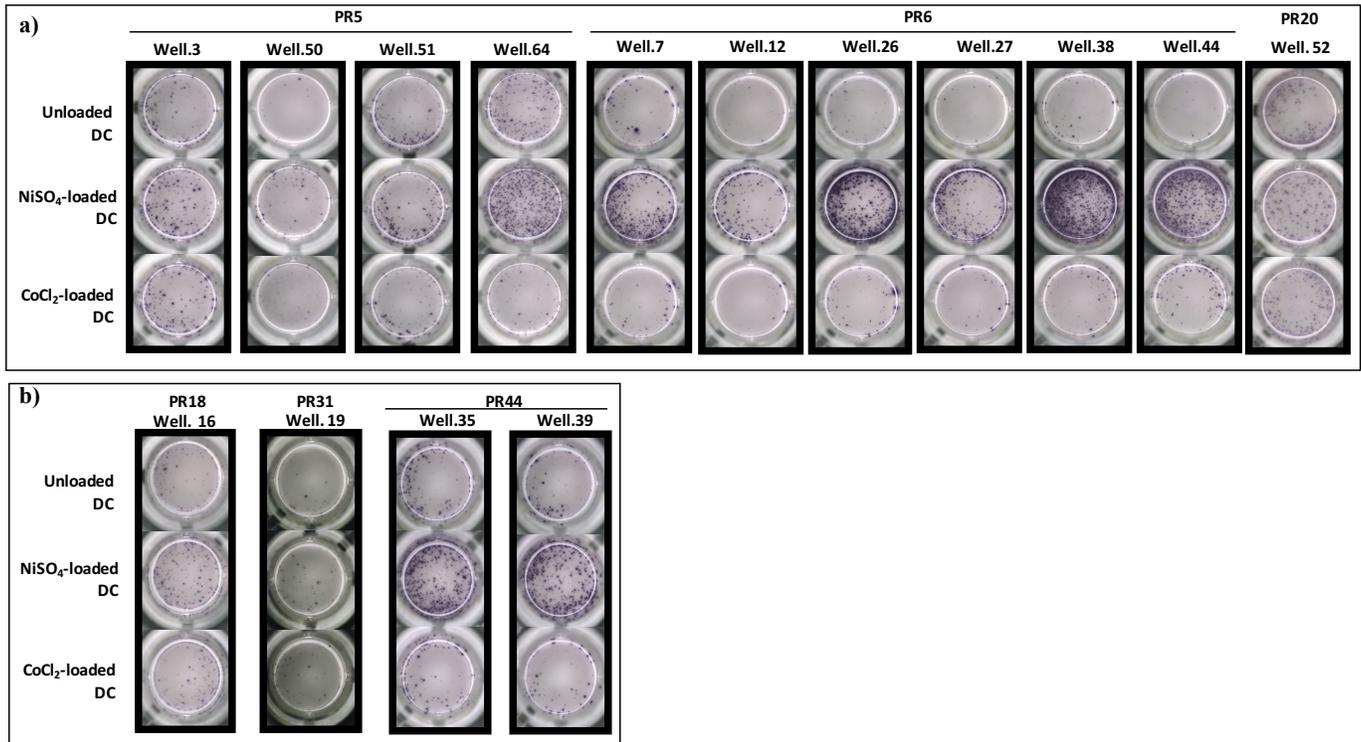
### Supplementary data 3 Spot count for nickel-recognizing naïve CD8+ T cells



Supplementary data 4 TCRβ V gene usage of HECs based on clonal frequency



## Supplementary data 5 IFN- $\gamma$ ELISPOT response of naïve T-cells





## Résultats complémentaires

# Etude des mécanismes de l'immunisation contre la benzylpénicilline : identification d'un répertoire de LT naïfs CD8+ spécifiques de la benzylpénicilline

### 1. Introduction

Plusieurs études ont montré que des PBMC isolés à partir du sang périphérique de patients allergiques aux médicaments sont capables de proliférer *in vitro* en présence du médicament libre impliqué (Brander et al. 1995; Padovan et al. 1997; Schnyder et al. 2000; Meng et al. 2011) ou du bioconjugué HSA-médicament (Brander et al. 1995; El-Ghaiesh et al. 2012; Meng et al. 2017).

Notre objectif est donc de mieux comprendre le mécanisme de l'immunisation contre la BP et le rôle des LT dans le développement des allergies médicamenteuses. Des travaux précédents réalisés dans notre équipe ont mis en évidence qu'il est possible de détecter des LT naïfs CD4+ spécifiques de la BP chez des donneurs non allergiques (Nhim et al. 2013). En raison du rôle majeur des LT CD8+ dans certaines réactions allergiques (ex : exanthème bulleux à la pénicilline), un des enjeux de ce projet est de mettre en évidence la présence de LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP chez des donneurs sains. De plus, nous chercherons à étudier les mécanismes moléculaires permettant l'activation de ces LT naïfs CD8+.

Selon la théorie de l'haptène, la BP a besoin de se fixer à une protéine pour former un complexe immunogène qui sera reconnu par le système immunitaire. C'est pourquoi, des bioconjugués HSA-BP ont été synthétisés à pH basique, afin de fixer un maximum de BP par molécule d'HSA. Le bioconjugué HSA-BP présente ainsi en moyenne 15 molécules de BP fixées. En utilisant un modèle de co-culture DC/LT autologue (**Figure 37**), nous avons vérifié en premier lieu que les MoDC sont capables de présenter un antigène exogène (KLH) aux LT naïfs CD8+ et que cette

présentation nécessite les molécules du CMH de classe I et passe par le protéasome. Cependant, nous n'avons pu détecter un répertoire de LT naïfs CD8+ spécifiques d'au moins un peptide dérivant du bioconjugué HSA-BP que chez un seul des cinq donneurs testés. Nous avons ensuite émis l'hypothèse que la BP pourrait hapténiser des protéines intracellulaires dans les MoDC et des peptides intracellulaires hapténisés par la BP seraient donc présentés aux LT CD8+ selon la voie classique de présentation par les molécules du CMH de classe I. La forte mortalité, évaluée par IP, des MoDC dans un milieu dépourvu de protéine [RPMI 0% sérum de veau fœtale (SVF) ; *protein free*], nous a obligé à travailler avec l'AIM-V, un milieu dépourvu de sérum humain et de SVF (*serum free*). Après identification de la concentration de BP à utiliser lors du chargement des MoDC et en utilisant le même modèle de co-culture DC/LT, nos résultats montrent la présence de LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP chez les deux donneurs sains testés. Cette activation des LT, évaluée par le nombre de spots IFN- $\gamma$ , est proportionnelle à la concentration de BP utilisée lors du chargement et donc au taux de protéines hapténisées par la BP. De plus, nous avons montré l'implication du protéasome et des molécules du CMH de classe I dans cette activation. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour étudier l'origine cellulaire des protéines hapténisées par la BP.

## **2. Matériels et Méthodes**

### **2.1. Synthèse et caractérisation du bioconjugué HSA-BP**

Le bioconjugué HSA-BP a été synthétisé en mélangeant 100 mg de HSA avec 229 mg de BP dans 6 mL de tampon carbonate (0.1 M, pH=11) pendant 18 heures à 37°C. Le bioconjugué est ensuite dialysé en présence du tampon de bicarbonate d'ammonium et lyophilisé. Un contrôle négatif a été synthétisé en utilisant 100 mg de HSA dans les mêmes conditions. La caractérisation

du bioconjugué a été réalisée par spectrométrie de masse comme précédemment décrite (Scornet et al. 2016).

## **2.2. Modèle cellulaire : co-culture autologue cellule dendritique/ lymphocyte T**

Les cellules sont isolées d'un prélèvement de sang périphérique de donneurs sains dont le taux d'IgE spécifiques anti-pénicilline G évalué par la technique ImmunoCAP est inférieur à 0.1KU/L. Les monocytes sont isolés par purification magnétique (Miltenyi Biotec) et différenciés en MoDC en présence d'IL-4 et de GM-CSF pendant cinq jours. Les LT naïfs CD8+ sont aussi isolés par purification magnétique (Miltenyi Biotec). La pureté du tri CD8+ CD45RA+ CCR7+ évaluée par cytométrie est supérieure à 92%. Les MoDC sont maturées en présence du LPS (1 µg/mL ; Sigma-Aldrich), de la β-2 microglobuline (5 µg/mL; Sigma-Aldrich) et chargées pendant la nuit avec le bioconjugué HSA-BP (10 µM) synthétisé à pH basique dans de l'AIM-V (Gibco). Les MoDC chargées sont ensuite lavées et mises en culture avec les LT naïfs CD8+ au ratio 1/10 en présence de 10000 U/mL d'IL-6 (R&D Systems), 10 ng/mL d'IL-12 (R&D Systems), et 5 µg/mL de primocine (Invitrogen) (**Figure 35**). Dans certaines expériences, les MoDC sont chargées avec la BP (2 mM; P3032 Sigma Aldrich) ou la KLH (1.2 µM; Sigma-Aldrich). Trois restimulations des LT naïfs CD8+ sont réalisées avec des MoDC autologues chargées avec l'antigène, maturées avec du LPS et en présence de cocktail cytokinique: IL-2 (10 U/mL) et IL-7 (5 ng/mL) (R&D Systems). Lors de la troisième stimulation 25 ng/mL d'IL-15 (R&D Systems) sont ajoutés.

### 2.3. Elispot IFN- $\gamma$

Une semaine après la dernière restimulation, un ELISpot IFN- $\gamma$  est réalisé et les lignées lymphocytaires spécifiques de la BP sont détectées. Des plaques de nitrocellulose (96 puits ; Millipore) ont été incubées avec un anticorps de capture IgG1 humain anti-IFN- $\gamma$  (1-D1K; Mabtech). Les plaques sont ensuite saturées avec de l'IMDM 10% albumine sérique humaine. Après 16 heures de co-culture entre les LT CD8+ et les MoDC chargées avec les antigènes (KLH ou HSA-BP ou BP) ou leurs contrôles négatifs correspondants, un anticorps secondaire biotinylée IgG1 murin-anti-IFN- $\gamma$  (7B6-1; Mabtech) est ajouté pour 2 heures à 37°C. Dans certaines expériences, les MoDC ont été prétraitées pendant une heure avec un anticorps anti-CMH de classe I (10  $\mu$ g/mL, HLA-ABC clone DX17 ; BD bioscience) ou un pool d'anticorps anti-CMH de classe II (DP, DQ, DR chacun à 10  $\mu$ g/mL) ou par un inhibiteur pharmacologique du protéasome: MG-132 (0.5  $\mu$ M ; Calbiochem) ou un modulateur du pH de l'endosome : chloroquine (12.5  $\mu$ M ; Sigma-Aldrich). La cytotoxicité des produits a été vérifiée par un marquage des DC à l'IP, et n'excède pas les 25%. Les spots ont été révélés après ajout d'extravidine et du substrat BCIP (Sigma-Aldrich). Les spots ont été comptés avec un lecteur de plaque Elispot du Type AID. Une lignée de LT est considérée spécifique et donc positive lorsque le nombre de spots est au moins le double que celui des conditions contrôles (MoDC non chargées ou MoDC chargées avec la HSA) avec un minimum de 30 spots. La fréquence des LT spécifiques de la BP est alors calculée en utilisant la loi statistique de Poisson.

$$\text{Fréquence} = \frac{-\ln(\text{nombre de puits négatifs} / \text{nombre total de puits testés})}{\text{nombre de LT déposés par puit}}$$

## 2.4. Détection des protéines hapténisées par la BP par western-blot

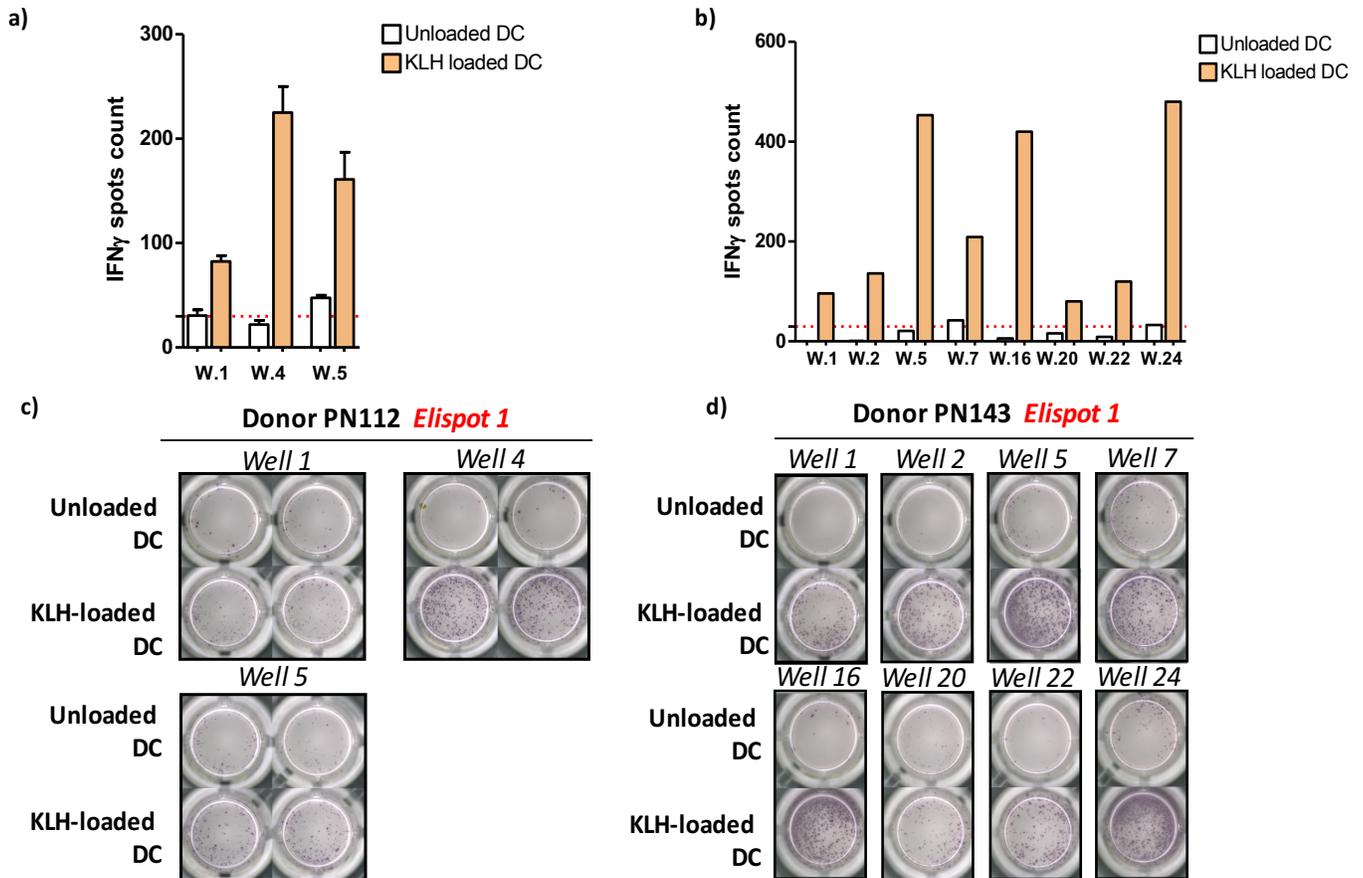
Après 4 heures de stimulation des MoDC par la BP dans de l'AIM-V ou le RPMI (0% SVF), les protéines totales sont obtenues par lyse des cellules dans un tampon composé de : 20 mM Tris HCl pH7,4, 137 mM de NaCl, 2 mM d'EDTA, 1% triton, 2 mM de pyrophosphate de sodium, 10% de glycérol 1 mg/ml aprotinine, 1 mg/ml leupeptine, 0.1 M PMSF, 100 µM orthovanadate de sodium, 1 M DTT, 10 mg/ml pepstatine, et H<sub>2</sub>O. Les lysats sont centrifugés à 15000 rpm à 4°C pendant 20 minutes. Les extraits protéiques sont ensuite isolés et dosés avec la méthode BCA (Bicinchoninic acid Assay) (Sigma, St Louis, MO). 30 µg de protéines dénaturées sont séparés sur gel SDS-PAGE 10%, puis transférés sur une membrane de polyvinylidone difluoride (PVDF, Biorad, Marnes-la-Coquette, France). La membrane est saturée avec du TBS (Tris Buffer Saline) 1X supplémenté de 5% de lait pendant 1 heure à température ambiante. La membrane est ensuite incubée toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire murin anti-pénicilline (Pen-9 ; #ab69234 ; abcam). Après lavages dans une solution de TBS 1X 0.2% Tween, la membrane est incubée 45 minutes avec un anticorps secondaire couplé à la peroxidase. Les protéines hapténisées par la BP sont révélées par chimioluminescence (ECL, Biorad).

## 3. Résultats

### 3.1. Mise au point du modèle de co-culture DC/LT

Afin de vérifier si les MoDC générées *in vitro* sont capables de présenter des antigènes exogènes aux LT CD8+, les MoDC ont été chargées avec la KLH et ensuite mises en culture avec des LT naïfs CD8+ (**Figure 37**). Deux donneurs (PN112 et PN143) sont représentés dans la **Figure 53**. Sur les 7 lignées de LT naïfs CD8+ testées du donneur PN112, 3 sont capables de reconnaître au moins un peptide dérivé de la KLH. Quant au donneur PN143, 8 lignées de LT naïfs CD8+ sont

spécifiques de la KLH parmi les 24 lignées testées. Nos résultats montrent que les MoDC générées *in vitro* sont capables de présenter un antigène exogène aux LT naïfs CD8+.

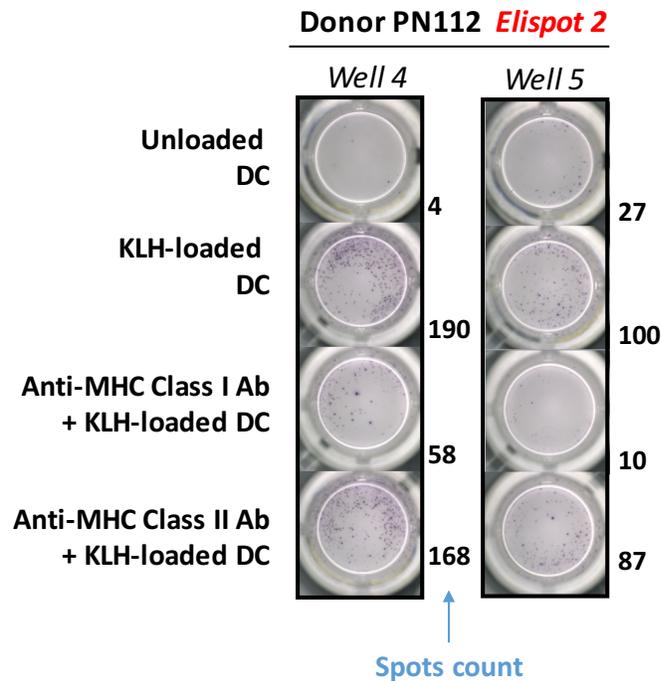


**Figure 53: Détection de LT naïfs CD8+ spécifiques de la KLH**

Nombre de spots IFN- $\gamma$  pour les lignées positives du donneur PN112 (a) et PN143 (b). L'axe des abscisses représente les puits (well désigné par w.) qui contiennent les lignées positives. (c) et (d) images des puits positifs obtenues grâce à un lecteur de plaque *Elispot AID*.

Afin de vérifier l'implication des molécules du CMH de classe I dans l'activation des LT naïfs CD8+ spécifiques de la KLH, nous avons réalisé un *Elispot 2* sur des lignées positives détectées durant l'*Elispot 1*. Ainsi, les MoDC ont été prétraitées avec des anticorps bloquants des molécules du CMH de classe I (A, B et C) ou II (DP, DQ et DR) et ensuite chargées avec la KLH. Nos

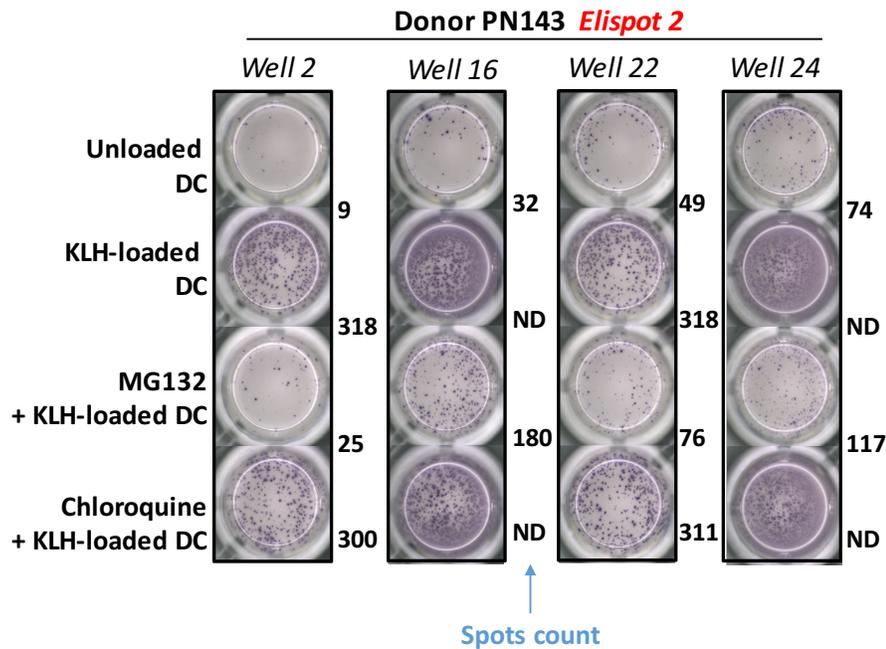
résultats montrent l'implication des molécules du CMH de classe I dans l'activation des LT CD8+ spécifiques (**Figure 54**).



**Figure 54: Implication des molécules du CMH de classe I dans l'activation des LT naïfs CD8+ spécifiques de la KLH**

*Images et nombre de spots IFN- $\gamma$  de l'Elispot 2 réalisé sur les lignes 4 et 5 du donneur PN112.*

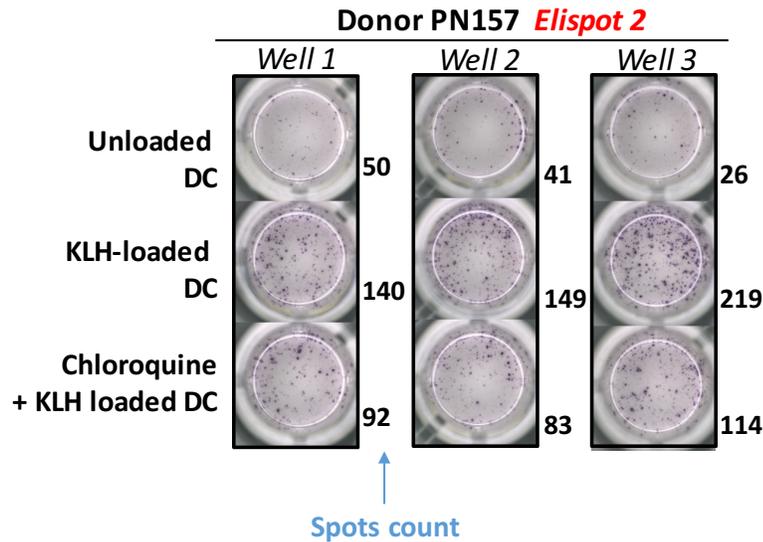
D'une manière générale, les DC peuvent présenter un antigène exogène aux LT CD8+ *via* un mécanisme de présentation croisée dont une partie peut être médiée par le protéasome. Pour cela et afin de vérifier l'implication du protéasome, dans l'activation des LT naïfs CD8+ spécifiques de la KLH, nous avons réalisé un Elispot 2 sur des lignées positives détectées durant l'Elispot 1. Ainsi, les MoDC ont été prétraitées avec un inhibiteur pharmacologique du protéasome (MG132) ou un modulateur du pH de l'endosome (Chloroquine) et ensuite chargées avec la KLH. Nos résultats montrent l'implication du protéasome dans l'activation des LT CD8+ spécifiques de la KLH (**Figure 55**).



**Figure 55: Implication du protéasome dans l'activation des LT naïfs CD8+ spécifiques de la KLH**

*Images et nombre de spots IFN- $\gamma$  de l'Elispot 2 réalisé sur les lignes 2, 16, 22 et 24 du donneur PN143. ND : non déterminé*

En effet, la chloroquine augmente le pH des endosomes et inhibe ainsi la présentation des antigènes qui utilisent la voie endocyttaire tels que les antigènes exogènes présentés aux LT CD4+. Afin de vérifier que la chloroquine, à la concentration non toxique utilisée (12.5  $\mu$ M), est toujours efficace, nous avons généré des lignées de LT naïfs CD4+ spécifiques de la KLH du donneur PN157 (comme décrit dans la figure 35). Après la détection de lignées spécifiques par l'Elispot 1, les MoDC ont été prétraitées avec la chloroquine et ensuite chargées avec la KLH (**Figure 56**). Nos résultats montrent que la chloroquine est efficace à la concentration utilisée et diminue l'activation des LT CD4+ spécifiques de la KLH mais pas des LT CD8+.

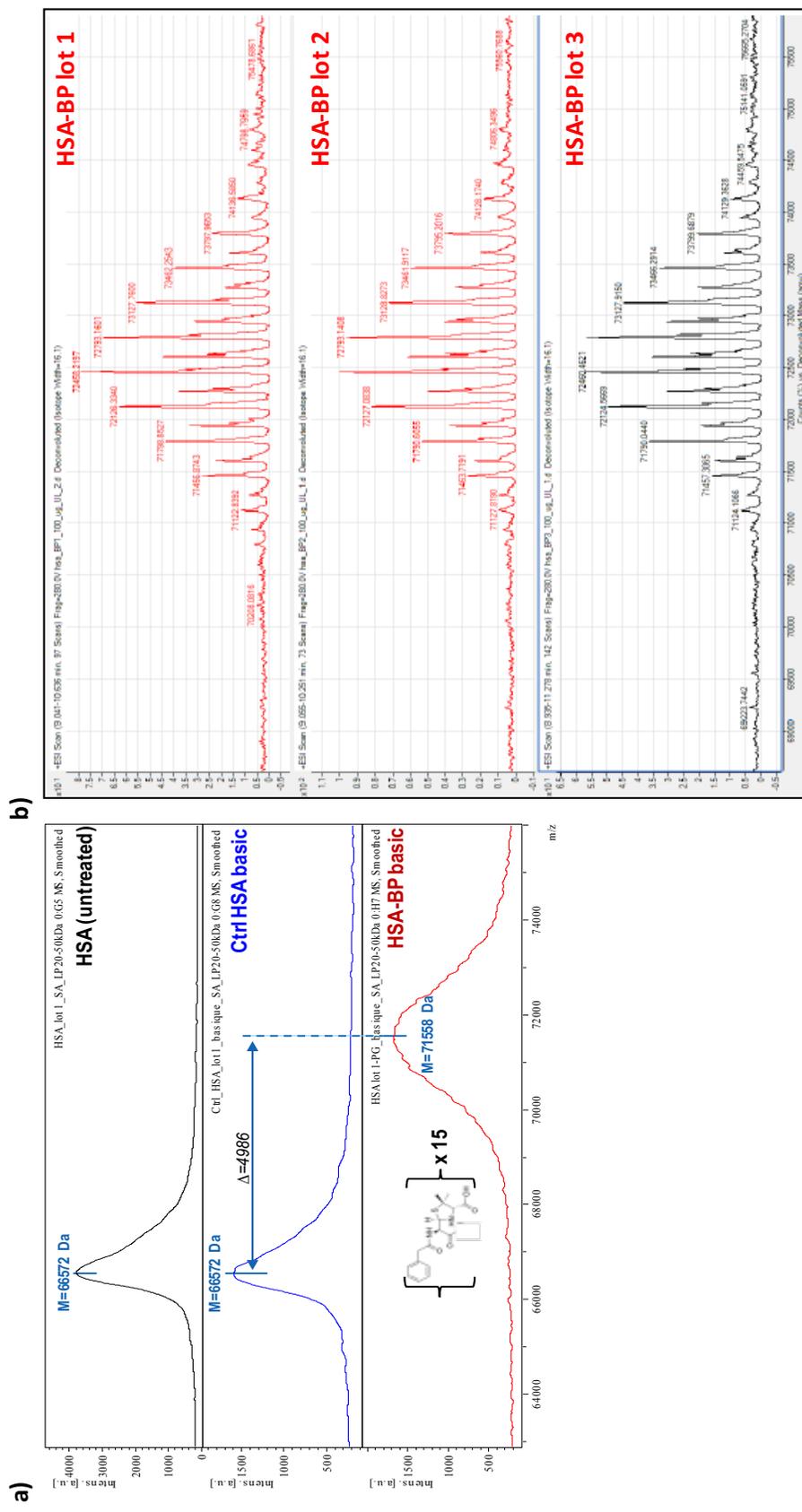


**Figure 56: Implication de l'endosome dans l'activation des LT naïfs CD4+ spécifiques de la KLH**

*Images et nombre de spots IFN- $\gamma$  de l'Elispot 2 réalisé sur les lignes 1, 2, et 3 du donneur PN157.*

### 3.2. Caractérisation du bioconjugué HSA-BP

Le bioconjugué HSA-BP a été synthétisé à pH basique et caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Il présente une masse moléculaire de 71558 Da alors que la masse moléculaire de la HSA seule est 66572 Da. Ceci correspond à un écart de 4986 Da. Sachant que la masse molaire de la BP est de 332 Da, 15 molécules de BP sont donc en moyenne fixées par molécule de HSA. Une autre technique d'analyse par masse (spectromètre de masse Impact HD (ESI) équipé d'un Q-TOF) a été aussi employée et a montré la reproductibilité du nombre de molécules BP fixées entre les différents lots du bioconjugué HSA-BP synthétisés (**Figure 57**).

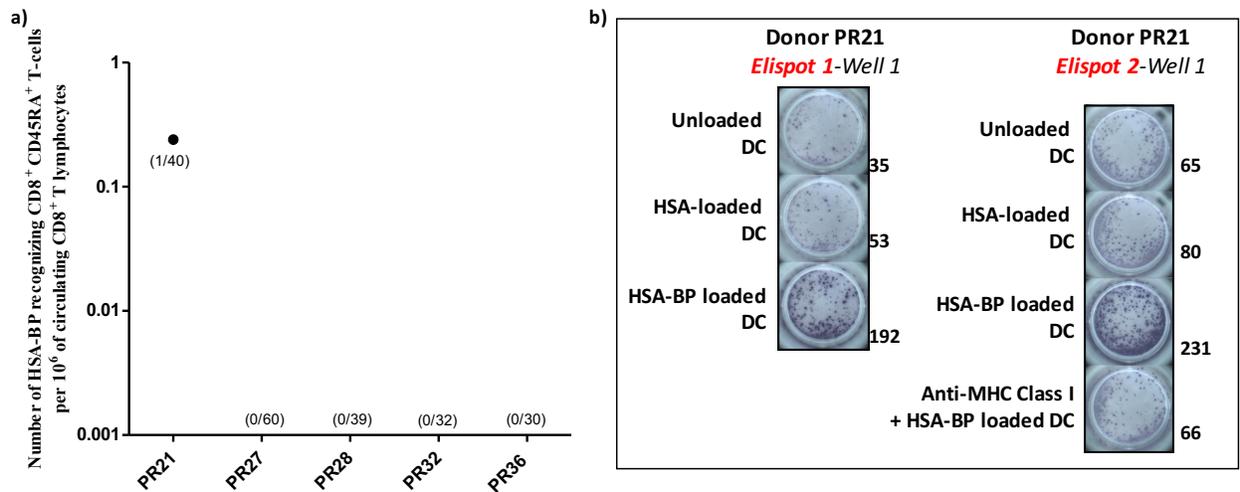


**Figure 57: Spectre de masse et de déconvolution du bioconjugué HSA-BP**

*(a) Les spectres de masse sont acquis à l'aide d'un spectromètre de masse autoflex MALDI-TOF. (b) Les spectres de masse sont acquis à l'aide d'un spectromètre de masse ESI-Q-TOF. L'axe des abscisses correspond au rapport masse sur la charge ( $m/z$ ) et celui des ordonnées à l'intensité.*

### 3.3. Détection d'un répertoire de LT naïfs CD8+ spécifiques de la HSA-BP

Afin d'identifier un répertoire de LT naïfs CD8+ spécifiques de la HSA-BP, les MoDC ont été chargées avec le bioconjugué HSA-BP. Nous avons détecté une lignée de LT CD8+ spécifiques de la HSA-BP chez un donneur (PR21) parmi les cinq donneurs testés (**Figure 58**). L'activation de la lignée 1 du donneur PR21 dépend des molécules du CMH de classe I.



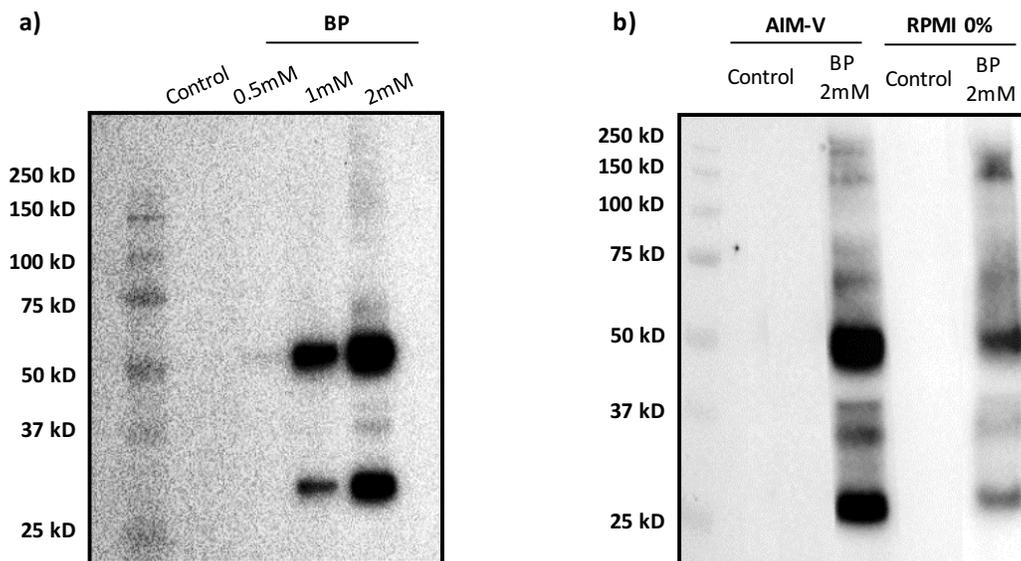
**Figure 58: Identification d'un répertoire de LT naïfs CD8+ spécifiques de la HSA-BP**

(a) Fréquence de LT naïfs CD8+ spécifiques de la HSA-BP chez 5 donneurs différents. L'axe des ordonnées représente la fréquence calculée selon la loi de Poisson et celui des abscisses représente les différents donneurs. Le nombre de lignées positives parmi celles testées pour chaque donneur est représenté entre parenthèses. (b) Images et nombre de spots IFN-γ de l'Elispot 1 et 2 réalisés sur la lignée 1 du donneur PR21

### 3.4. Détection d'un répertoire de LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP

Nos résultats précédents révèlent la difficulté d'identifier un répertoire de LT naïfs CD8+ spécifiques de la HSA-BP. Pour cela, nous avons émis l'hypothèse que la BP pourrait hapténiser des protéines cellulaires dans les DC et pourrait être présentée aux LT CD8+ spécifiques *via* le mécanisme classique de présentation par les molécules du CMH de classe I. La concentration de BP à utiliser lors du chargement a été choisie en premier lieu grâce à des expériences préliminaires

de co-culture DC/LT qui ont montré une réponse positive des LT CD8+ avec la concentration de 2 mM. C'est une concentration non cytotoxique pour les MoDC (évaluée par IP) et est largement utilisée dans la littérature surtout dans les expériences de LTT chez des patients allergiques aux pénicillines (Whitaker et al. 2011; Meng et al. 2017). Par ailleurs, comme nous le montrons par western-blot, l'hapténisation des protéines semble être optimale à 2 mM. En effet, les MoDC ont été traitées ou non avec de la BP à de différentes concentrations et pendant 4 heures. Nos résultats montrent que l'hapténisation des protéines par la BP augmente avec la concentration de BP utilisée (Figure 59a).



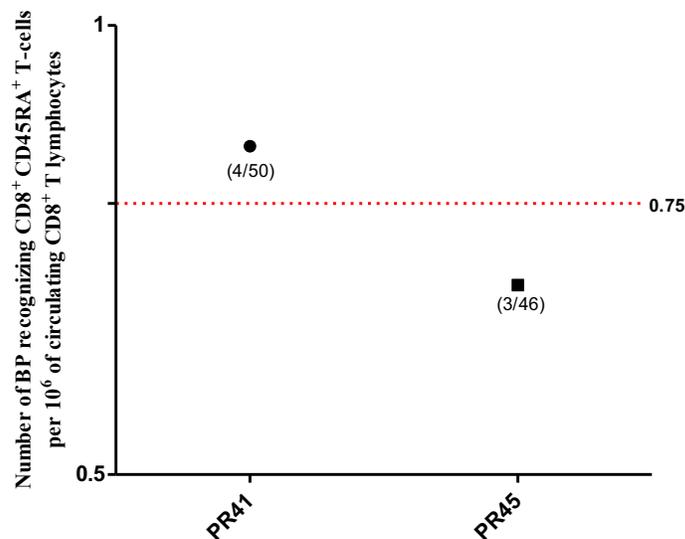
**Figure 59: Etudes des protéines hapténisées par la BP par western-blot**

*Les MoDC ont été incubées pendant 4 heures en milieu de culture seul ou en présence de la BP (a) western blot réalisé sur les MoDC dans du AIM-V. (b) Comparaison du profil de protéines hapténisées par la BP entre les deux milieux : AIM-V (dépourvu de sérum humain) et RPMI 0% (dépourvu de protéines).*

Bien que le milieu AIM-V utilisé pour le chargement des MoDC soit dépourvu de sérum humain et de SVF, il contient des protéines synthétiques qui peuvent être hapténisées par la BP. Pour cela, nous avons souhaité travailler avec un milieu dépourvu de protéines tel que le RPMI

0%. Cependant, la forte mortalité des MoDC dans le RPMI 0% nous a empêché de l'utiliser lors du chargement des MoDC. D'une manière intéressante, lorsque nous comparons le profil de protéines hapténisées par la BP entre les deux milieux et après 4 heures de traitement, nous remarquons que ce sont les mêmes protéines qui sont hapténisées par la BP laissant suggérer leur origine endogène (**Figure 59b**). Au même temps d'exposition à l'ECL, cette hapténisation est plus forte dans le milieu AIM-V probablement due à la meilleure viabilité cellulaire.

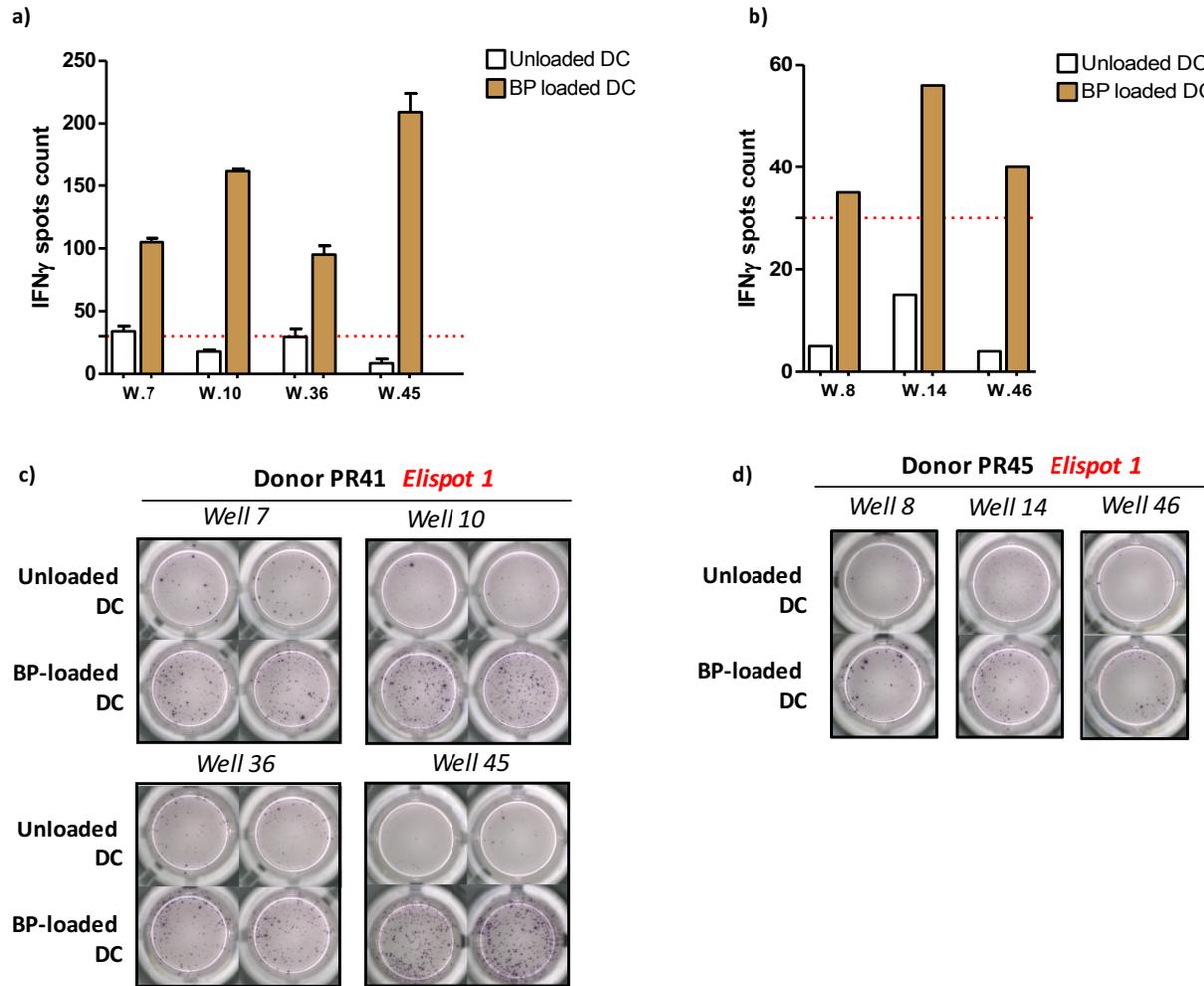
Par la suite, nous avons cherché à détecter un répertoire de LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP. Ainsi, les MoDC ont été chargées avec la BP et mises en co-culture avec des LT naïfs CD8+ comme décrit précédemment (**Figure 37**). Nos résultats montrent qu'il est possible de détecter un répertoire de LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP chez deux donneurs testés PR41 et PR45 avec une fréquence moyenne de 0.75 LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP par million de LT naïfs CD8+ circulants (**Figure 60**).



**Figure 60: Fréquence de LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP**

*Fréquence de LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP chez 2 donneurs différents. L'axe des ordonnées représente la fréquence calculée selon la loi de Poisson et celui des abscisses représente les différents donneurs. Le nombre de lignées positives parmi celles testées pour chaque donneur est représenté entre parenthèses.*

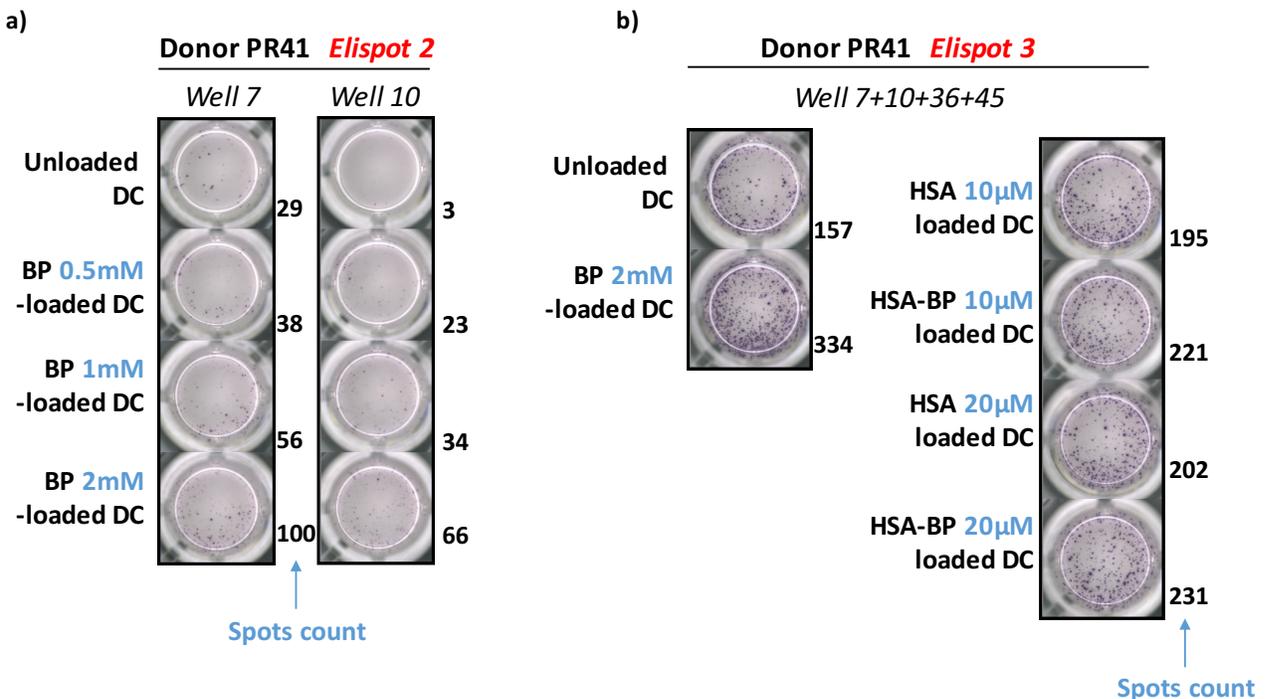
Sur les 50 lignées de LT naïfs CD8+ testées du donneur PR41, 4 sont capables de reconnaître au moins un peptide hapténisé par la BP. Quant au donneur PR45, 3 lignées de LT naïfs CD8+ sont spécifiques de la BP parmi les 46 lignées testées (**Figure 61**).



**Figure 61: Détection de LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP**

Nombre de spots IFN- $\gamma$  pour les lignées positives du donneur PR41 (a) et PR45 (b). L'axe des abscisses représente les puits (well désigné par w.) qui contiennent les lignées positives. (c) et (d) images des puits positifs obtenues grâce à un lecteur de plaque Elispot AID.

Par ailleurs, le nombre de spots IFN- $\gamma$  augmente avec la concentration de la BP utilisée lors du chargement (**Figure 62a**). Ceci est en concordance avec le niveau d'hapténisation optimale des protéines à 2 mM. De plus, les lignées positives pour la BP du donneur PR41 détectées durant l'Elispot 1 et 2, ne présentent pas de réactivité croisée avec le bioconjugué HSA-BP utilisé à deux concentrations (**Figure 62b**).



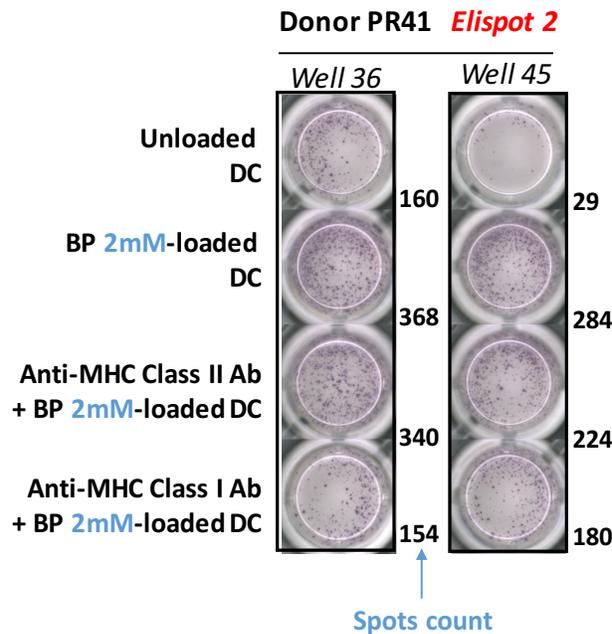
**Figure 62: Caractérisation de la réponse des LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP du donneur PR41**

(a) Images et nombre de spots IFN- $\gamma$  de l'Elispot 2 réalisé sur les lignées 7 et 10. (b) Images et nombre de spots IFN- $\gamma$  de l'Elispot 3 réalisé sur un mélange des lignées 7, 10, 36 et 45.

### 3.5. Etude des mécanismes impliqués dans l'activation des LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP

Afin de vérifier l'implication des molécules du CMH de classe I dans l'activation des LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP, nous avons réalisé un Elispot 2 sur des lignées positives détectées par

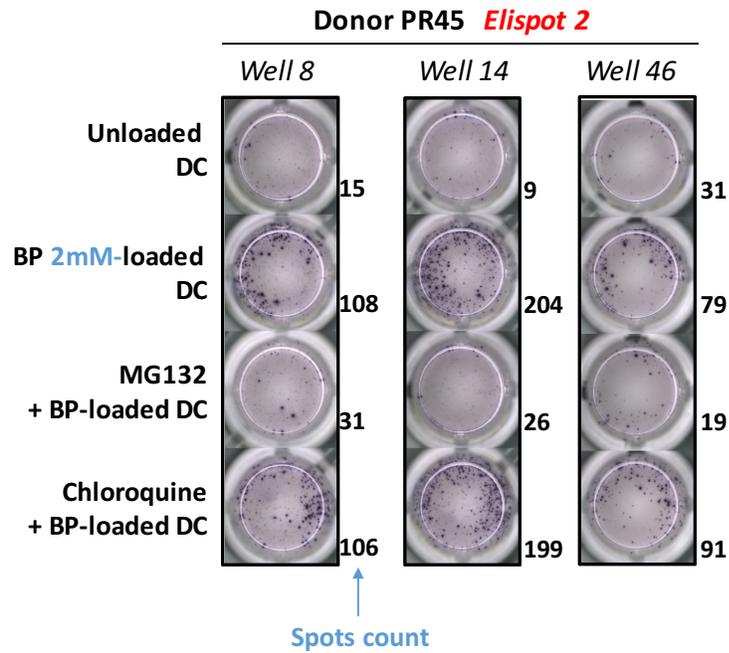
l'Elispot 1. Ainsi, les MoDC ont été prétraitées avec des anticorps bloquants des molécules du CMH de classe I (A, B et C) ou II (DP, DQ et DR) et ensuite chargées avec la BP. Nos résultats montrent l'implication des molécules du CMH de classe I dans l'activation des LT CD8+ spécifiques (**Figure 63**).



**Figure 63: Implication des molécules du CMH de classe I dans l'activation des LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP**

*Images et nombre de spots IFN- $\gamma$  de l'Elispot 2 réalisé sur les lignées 36 et 45 du donneur PR41.*

Pour la suite et afin de vérifier l'implication du protéasome, dans l'activation des LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP, nous avons réalisé un Elispot 2 sur des lignées positives détectées durant l'Elispot 1. Ainsi, les MoDC ont été prétraitées avec un inhibiteur pharmacologique du protéasome (MG132) ou un modulateur du pH de l'endosome (Chloroquine) et ensuite chargées avec la BP. Nos résultats montrent l'implication du protéasome dans l'activation des LT CD8+ spécifiques (**Figure 64**).



**Figure 64: Implication du protéasome dans l'activation des LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP**

*Images et nombre de spots IFN- $\gamma$  de l'Elispot 2 réalisé sur les lignes 8, 14, et 16 du donneur PR45.*





# **DISCUSSION**



Notre travail concerne d'une part, l'étude de l'effet des métaux allergisants sur les cytokines membres de la famille de l'IL-12 secrétées par les DC et modulant la polarisation des LT et d'autre part, l'identification d'un répertoire de LT naïfs spécifiques du nickel et de la BP dans la population générale. Ces deux aspects couvrent deux mécanismes importants nécessaires à l'immunisation des patients contre les produits chimiques et les médicaments. Notre discussion se divise en deux parties :

- I. Etude *in vitro* des effets des haptènes métalliques sur la fonction des DC humaines : régulation des cytokines membres de la famille de l'IL-12
- II. Etude des mécanismes de l'immunisation contre le nickel et la BP : identification d'un répertoire de LT naïfs spécifiques du nickel et de la BP dans la population générale

### **I. Etude *in vitro* des effets des haptènes métalliques sur la fonction des DC humaines : régulation des cytokines membres de la famille de l'IL-12**

Afin de comprendre les mécanismes responsables du développement des LT Th1/Th17 retrouvés surtout chez les patients allergiques au nickel, nous avons étudié l'effet des haptènes métalliques sur la maturation des DC et la régulation des cytokines membres de la famille de l'IL-12. Alors que l'IL-12p70 est bien connue pour induire la polarisation Th1, l'IL-23 favorise le développement des Th17 (Vignali and Kuchroo 2012). Quant à l'IL-27, son rôle dans les mécanismes allergiques reste peu documenté.

Nous avons choisi de travailler avec le nickel, le cobalt et le chrome puisqu'ils sont parmi les métaux les plus impliqués dans les réactions allergiques (Uter et al. 2017). La concentration des différents haptènes métalliques a été choisie suite à des expériences de cytotoxicité. Il s'agit de la concentration maximale non cytotoxique avec un pourcentage de viabilité  $\geq 75\%$  et est dans la

marge de celle classiquement utilisée dans la littérature (Antonios et al. 2009; Antonios et al. 2010; Adam et al. 2017).

Vu leur homologie de structure, nous avons choisi d'étudier et de discuter en premier lieu la régulation de l'IL-23, de l'IL-12p70 et de leur sous-unité commune l'IL-12p40 par les métaux allergisants. Dans un second temps, nous discutons les effets des métaux allergisants sur la production de l'IL-27.

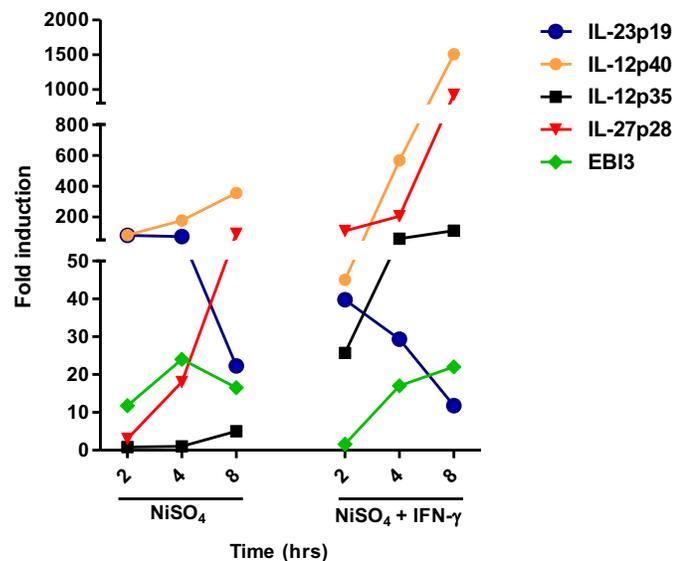
Dans ce travail, nous avons montré que le traitement des MoDC par du nickel ( $\text{NiSO}_4$  ou  $\text{NiCl}_2$ ) entraînait une augmentation de la production de l'IL-23, de l'IL-12p40 et la présence de faibles niveaux de l'IL-12p70. Ces résultats indiquent clairement que l'effet observé sur ces cytokines est médié par l'ion  $\text{Ni}^{2+}$ . Ces données mettent en relief la capacité du nickel à modifier l'équilibre IL-23/IL-12p70 en favorisant la production d'IL-23.

De plus, nous avons montré en utilisant un modèle de co-culture allogénique DC/LT que l'IL-23 produite par les MoDC activées par du nickel était fonctionnelle et impliquée dans le développement des Th17. Ce modèle de co-culture allogénique nous permet d'étudier l'effet de la maturation des DC induite par le nickel sur la polarisation des LT indépendamment de leur spécificité et donc du signal antigénique. Le choix des LT  $\text{CD4}^+$  totaux est dû à l'expression plus élevée du récepteur de l'IL-23 au niveau des LT mémoires par rapport aux LT naïfs (Oppmann et al. 2000). Nos résultats sont conformes avec le rôle de l'IL-23 dans la polarisation Th17 et avec d'autres études réalisées sur des MoDC activées par du LPS, où la neutralisation de l'IL-23 entraîne une diminution de la production de l'IL-17A à partir des LT  $\text{CD4}^+$  (Roses et al. 2008).

De la même manière, nous avons montré que les ions  $\text{Ni}^{2+}$  provenant du  $\text{NiSO}_4$  ou du  $\text{NiCl}_2$  sont capables d'induire la production de l'IL-27 par les MoDC et l'expression des sous-unités de l'IL-27 : l'IL-27p28 et l'EBI3. Nos résultats suggèrent pour la première fois une induction de la

production de l'IL-27 par une molécule allergisante dans les DC humaines. Ces résultats sont conformes avec d'autres études réalisées avec des DC ou des macrophages activés par LPS (Schaper et al. 2014; Gajanayaka et al. 2017; Hooper et al. 2017).

En comparant le niveau et la cinétique d'expression des différentes sous-unités dans les MoDC provenant d'un même donneur (**Figure 65**), nous constatons que le nickel favorise une expression précoce des deux sous-unités de l'IL-23. Ces résultats suggèrent que l'IL-23 est l'une des premières cytokines de la famille de l'IL-12 à être sécrétée par les DC activées par du nickel et suggère une polarisation précoce des LT vers le phénotype Th17. Bien que le rôle de l'IL-27 produite par les MoDC activées par le nickel reste à explorer, nous suggérons que cette cytokine pourrait compenser la faible production de l'IL-12p70 induite par le nickel et participer dans la polarisation Th1.



**Figure 65: Modulation de l'expression des sous-unités de l'IL-23, de l'IL-12p70 et de l'IL-27**

*Les MoDC ont été incubées pendant 2, 4 et 8 heures, en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> (500  $\mu$ M) et ou de l'IFN- $\gamma$  (1000 UI/mL). Les résultats de qPCR sont présentés sous forme d'index de stimulation des cellules traitées par rapport aux cellules non traitées.*

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'addition de l'IFN- $\gamma$  à une stimulation par du nickel sur la régulation de l'équilibre IL-23/IL-12p70 et la production de l'IL-27 dans les MoDC (**Tableau 7**). Nous montrons que l'IL-23 initialement produite par les MoDC stimulées par du nickel seul est fortement augmentée après l'addition de l'IFN- $\gamma$ . Ce résultat est concordant avec des travaux montrant la synergie entre le LPS et l'IFN- $\gamma$  dans la production de l'IL-23 dans les macrophages et les DC humaines (Verreck et al. 2004; Roses et al. 2008). Il appuie aussi l'hypothèse postulant que l'engagement vers la production de l'IL-23 peut persister dans des conditions pro-inflammatoires telles que l'activation des cellules NK (Butchar et al. 2007; Kim et al. 2009) ou même après l'interaction entre les DC et les LT aboutissant à une production de l'IFN- $\gamma$  dans le microenvironnement. Cependant, l'augmentation de la production de l'IL-23 dans les MoDC traitées par l'association NiSO<sub>4</sub> et IFN- $\gamma$  est associée à une plus forte production de l'IL-12p70 comme déjà démontré précédemment (Antonios et al. 2010). Ainsi, en calculant le rapport de molarité de l'IL-23 comparée à l'IL-12p70, nous remarquons que l'addition de l'IFN- $\gamma$  à une stimulation par du nickel diminue le rapport IL-23/IL-12p70 initialement augmenté lors de la stimulation par du nickel seul. Cette modulation de l'équilibre IL-23/IL-12p70 expose l'IL-12p70 comme la cytokine clé dans la régulation de la réponse lymphocytaire dans le cas des DC traitées simultanément avec du nickel et de l'IFN- $\gamma$  et est en faveur d'une polarisation Th1.

Afin de mieux comprendre la régulation de ces cytokines par l'IFN- $\gamma$ , nous avons évalué l'expression de leurs sous-unités par PCR en temps réel. Nous montrons que l'association nickel et IFN- $\gamma$  est nécessaire pour induire le facteur limitant qui est l'IL-12p35. Nos résultats sont concordants avec des travaux précédents de notre laboratoire (Antonios et al. 2010) et ceux trouvés dans la littérature. En effet, il est bien connu que la production optimale de l'IL-12p70 nécessite souvent deux signaux complémentaires comme l'association d'un *stimulus* microbien avec de

l'IFN- $\gamma$  ou du CD40L (Schulz et al. 2000). Cependant cette association inhibe l'expression de l'ARNm de l'*il-23p19* induite par le nickel et empêche ainsi la production précoce de l'IL-23. L'absence de corrélation entre l'expression de l'ARNm de l'*il-23p19* et la production de l'IL-23 dans les MoDC traitées avec le nickel et de l'IFN- $\gamma$  est probablement due à une augmentation de la production de la sous-unité IL-12p40 qui peut continuer à interagir avec la sous-unité IL-23p19 préexistante à l'état basal ou induite par l'association nickel et IFN- $\gamma$ . De plus, une quantité plus élevée de l'IL-12p40 pourrait être nécessaire pour une production efficace de l'IL-23 comme cela a été montré pour l'IL-12p70 (Jalah et al. 2013). En effet, bien que l'IL-12p70 soit formée de deux sous-unités dans le ratio 1:1, le taux de la sous-unité IL-12p40 semble être critique pour améliorer la stabilité, le trafic intracellulaire et l'exportation de la sous-unité IL-12p35 (Jalah et al. 2013). Nous avons aussi étudié l'effet de l'addition de l'IFN- $\gamma$  à une stimulation par du nickel sur la régulation des sous-unités de l'IL-27. Nous constatons que l'association des deux signaux induit un effet synergique très important sur l'expression de l'ARNm de l'*il-27p28* sans moduler celle de l'*ebi3*. Ceci résulte en une faible augmentation de la production de l'IL-27 et expose l'EBI3 comme un facteur limitant la production de l'IL-27 (**Tableau 7**). Ces résultats sont aussi conformes avec d'autres études réalisées avec des DC ou des macrophages activés par le LPS (Liu et al. 2007; Hooper et al. 2017).

En comparant le niveau et la cinétique d'expression des différentes sous-unités dans les MoDC stimulées par l'association NiSO<sub>4</sub> et IFN- $\gamma$  provenant d'un même donneur (**Figure 65**), nous constatons une nette augmentation, maintenue dans le temps, de l'expression de l'ARNm des trois sous-unités *il-12p40*, *il-12p35* et *il-27p28* mais une inhibition de l'*il-23p19*. Ceci est concordant avec l'engagement vers une polarisation Th1 dans le cas des DC traitées simultanément avec du nickel et de l'IFN- $\gamma$ . Par ailleurs, ceci montre qu'il existe une régulation différente au niveau

transcriptionnel pour chacune des sous-unités. En effet, l'association de l'IFN- $\gamma$  à une stimulation par du nickel entraîne une forte expression d'IRF-1 qui est nécessaire pour induire une expression optimale des sous-unités de l'IL-12p70 (Antonios et al. 2010). Nous suggérons que l'augmentation de l'expression de l'*il-27p28* par l'association nickel et IFN- $\gamma$  passe aussi par IRF-1. Dans des macrophages murins invalidés pour *irf-1*, l'expression de l'*il-27p28* induite par du LPS ou par l'association LPS et IFN- $\gamma$  est diminuée (Liu et al. 2007; Zhang et al. 2010b). Par contre, IRF-1 semble être un régulateur négatif de l'expression de l'*il-23p19* dans les macrophages murins stimulés par du LPS ou par l'association LPS et IFN- $\gamma$  (Sheikh et al. 2010; Sheikh et al. 2011). Ainsi nous suggérerons que l'inhibition de l'expression de l'*il-23p19* par l'association nickel et IFN- $\gamma$  passe par IRF-1. Concernant *ebi3*, son expression est indépendante d'IRF-1 (Yang et al. 2013). De plus, des mutations dans le site de liaisons d'IRF-1 (ISRE) au niveau du promoteur d'un gène rapporteur *ebi3* ne module pas son activité dans une lignée de macrophage stimulée par le LPS (Wirtz et al. 2005). Ceci pourrait expliquer l'absence de modulation d'expression de l'*ebi3* en cas de l'association nickel et IFN- $\gamma$  par rapport à une stimulation des MoDC par du nickel seul.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux voies de signalisation activées par le nickel dans les MoDC et qui sont impliquées dans la production des cytokines de la famille de l'IL-12 (**Tableau 7**). Comme le nickel est un agoniste du TLR4 (Schmidt et al. 2010b), nous avons étudié le rôle du TLR4 dans la régulation de l'équilibre IL-23/IL-12p70 et la production de l'IL-27. Nos résultats montrent l'implication du TLR4 dans la production de ces cytokines. De plus, il est bien connu que le nickel peut activer les voies de MAPK et NF- $\kappa$ B dans les DC humains (Antonios et al. 2009; Turbica et al. 2015). En utilisant des inhibiteurs pharmacologiques des voies de p38 MAPK et de NF- $\kappa$ B, nous montrons leur implication dans la production des cytokines de la famille de l'IL-12 et dans l'expression de leurs sous-unités. Seulement l'expression d'*ebi3* ne semble pas être

dépendante de la voie de p38MAPK. Ces résultats sont conformes avec d'autres études réalisées avec des DC ou des macrophages activés par LPS (Happel et al. 2003; Wirtz et al. 2005; Carmody et al. 2007; Liu et al. 2009; Qian et al. 2011; Gajanayaka et al. 2017).

**Tableau 7: Résumé de la modulation des cytokines membres de la famille de l'IL-12 et de leurs sous-unités dans les MoDC**

	Nickel	Nickel				
		+ IFN- $\gamma$	+ anti- TLR4	+ Inhibiteur de la voie p38MAPK	+ Inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B	+ Inhibiteur de la voie Jak-STAT
p35			ND			
p40			ND			
p19			ND			
p28			ND			
EBI3			ND			
IL-12p70						
IL-12p40						
IL-23						
IL-27						
Polarisation des LT	Th17 et Th1	Th17<Th1	↓ Th17 et Th1	↓ Th17 et Th1	↓ Th17 et Th1	Th17>>Th1

Moins induit  Plus induit

x 3
x 3
x 3
x 3
x 3

Les couleurs correspondent à une augmentation ou à une diminution (fold de 3) de la production des différentes cytokines ou de l'expression de leurs sous-unités par rapport à une stimulation des MoDC par le nickel seul. ND : non déterminé

D'autre part, nous avons montré que la voie Jak-STAT peut réguler l'équilibre IL-23/ IL-12p70 dans les MoDCs (**Tableau 7**). En utilisant un inhibiteur pharmacologique de la voie Jak-STAT, nous confirmons le rôle positif de cette voie dans la production de l'IL-12p70 (Antonios et al.

2010) et nous montrons que la voie Jak-STAT régule négativement la production de l'IL-23 et l'expression de ses sous-unités dans les MoDC activées par du nickel. La diminution de la production de l'IL-23, suite à l'inhibition de la voie Jak-STAT, dans les MoDC activées par l'association nickel et IFN- $\gamma$ , malgré l'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'*il-23p19*, est en faveur de l'hypothèse que l'IL-12p40 serait le facteur limitant la production optimale de l'IL-23.

Par la suite nous avons essayé d'identifier les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la production de l'IL-23 suite à l'inhibition de la voie Jak-STAT dans les MoDC activées par le nickel. La modulation de l'expression de l'*il-12p40* semblait affecter d'une manière plus significative la production de l'IL-23 par rapport à celle de l'expression de l'*il-23p19*, nous nous sommes intéressés à la régulation transcriptionnelle de la sous-unité IL-12p40 par la voie Jak-STAT et plus particulièrement au facteur de transcription NFIL-3. En effet, NFIL-3 est un facteur de transcription récemment identifié comme un répresseur transcriptionnel de l'*il-12p40* (Smith et al. 2011; Kobayashi et al. 2011). De plus, des sites de liaisons de NFIL-3 au niveau du promoteur de l'*il-12p40* ont été décrits (Kobayashi et al. 2011). Des souris invalidées pour *nfil-3* présentent une augmentation de l'expression des deux sous-unités de l'IL-23 (Kobayashi et al. 2014). Nos résultats montrent que le nickel est capable d'induire l'expression de NFIL-3 dans les MoDC et il s'agit d'une observation originale. Par une analyse transcriptomique, Gözl et al ont montré que le nickel augmente l'expression de l'ARNm de *nfil-3* dans les monocytes humains (Gözl et al. 2016). Afin de confirmer notre hypothèse et pour voir si l'inhibition de l'expression de l'*il-12p40* par la voie Jak-STAT serait due à l'expression de NFIL-3, nous avons analysé la modulation de l'expression de NFIL-3 en présence de l'inhibiteur de la voie Jak-STAT. Nous montrons que l'inhibition de la voie Jak-STAT dans les MoDC traitées par du nickel entraîne une diminution de

l'expression de NFIL-3. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de l'expression d'*il-12p40* et par conséquent la production de l'IL-23 dans les MoDC prétraitées par l'inhibiteur de la voie Jak-STAT et activées par le nickel. Simultanément, nous avons remarqué que la forte production d'IL-23 et la diminution d'IL-12p70 par les MoDC stimulées par le nickel en cas d'absence d'activité de la voie Jak-STAT pourraient déséquilibrer la polarisation Th1/Th17 initiale en faveur de la réponse Th17 observée.

Parmi les haptènes métalliques seul le nickel est capable d'induire la production des différentes cytokines de la famille d'IL-12. En revanche, le cobalt est seulement capable d'induire l'expression de l'ARNm de l'*il-12p35* (cf. *article 1 ; Figure S1-c*). et des deux sous-unités de l'IL-27. Nous avons donc cherché à comprendre pourquoi le cobalt, qui est un agoniste TLR4 comme le nickel, est incapable d'induire l'expression des deux sous-unités de l'IL-23 et la production de l'IL-12p40 et de l'IL-23. Ainsi nous nous sommes intéressés à la régulation de la sous-unité IL-12p40 qui pourrait par la suite moduler la production de l'IL-23. Nos résultats montrent que le cobalt induit l'expression de NFIL-3 dans les MoDC d'une manière plus intense que celle observée avec le nickel. Vu son rôle de répresseur transcriptionnel de l'*il-12p40*, nous suggérons que la forte expression de NFIL-3 induite par le cobalt serait responsable de l'inhibition de la production de l'IL-12p40 et de l'IL-23 dans les MoDC. Nous avons ensuite montré que l'activation de NFIL-3 est indépendante de la voie du TLR4. Ceci permet d'expliquer les effets comparés entre les deux métaux malgré le fait qu'ils soient tous les deux des agonistes du TLR4. En revanche, l'expression de NFIL-3 serait dépendante de la voie Jak-STAT et du stress oxydant. Nous avons montré que le cobalt est capable d'induire, plus fortement que le nickel, la production des espèces réactives dans les MoDC. Vu le rôle du stress oxydant dans l'activation de la voie Jak-STAT (Antonios et al. 2010), nous suggérons que l'absence de production d'IL-12p40 et d'IL-23 par le cobalt serait due

à sa capacité à générer un stress oxydant dans les MoDC qui pourrait activer la voie Jak-STAT et aboutir *in fine* à une forte expression de NFIL-3. Notre travail expose NFIL-3 comme une nouvelle voie induite par le nickel et le cobalt, indépendamment du TLR4, et qui pourrait jouer un rôle dans le phénotype et la maturation des DC.

## **II. Etude des mécanismes de l'immunisation contre le nickel et la BP : identification d'un répertoire de LT naïfs spécifiques du nickel et de la BP dans la population générale**

La fréquence des LT naïfs spécifiques d'un antigène donné varie en fonction de l'antigène (Moon et al. 2007). Elle est de l'ordre de 0.2 à 60 LT par million (Alanio et al. 2010; Kwok et al. 2012; Bacher and Scheffold 2013; Moon and Jenkins 2015) . Suite à une stimulation antigénique, les LT naïfs spécifiques de l'antigène subissent une expansion clonale en fonction de l'affinité du TCR au pCMH et forment le répertoire de LT mémoires de l'antigène.

L'identification et l'analyse du répertoire de LT naïfs qui reconnaît un antigène sont fondamentale pour la compréhension du processus de l'immunisation contre cet antigène. Notre travail met en relief la préexistence d'un répertoire de LT naïfs CD4+ et CD8+ spécifiques des molécules allergisantes : le nickel et la BP chez la majorité des donneurs testés. Cependant, l'incidence des allergies au nickel et à la BP n'est pas de 100%. Ceci suggère qu'en plus du répertoire de LT naïfs spécifiques de l'antigène, d'autres facteurs sont nécessaires pour déclencher l'allergie (*cf. chapitre 3 partie V*). Pourtant, il est tentant de spéculer que la taille du répertoire de LT naïfs spécifiques de ces molécules et présent chez les individus prédisposés pourrait être corrélée avec l'intensité de la réponse LT lors du processus de sensibilisation. Ainsi un répertoire large de LT naïfs chez plusieurs individus peut souligner le potentiel des molécules chimiques à être reconnues par un grand nombre de donneurs. En effet, plusieurs études suggèrent que la taille

du répertoire de LT naïfs pourrait influencer dans certains cas la vigueur de la réponse lymphocytaire ainsi que l'efficacité des LT mémoires (Moon et al. 2007; Campion et al. 2014; Kimber et al. 2012). Des études menées sur des anticorps monoclonaux ou des protéines recombinantes (érythropoïétine) suggèrent que la fréquence des LT naïfs spécifiques de ces antigènes peut être corrélée avec leurs potentiels immunogènes (Delluc et al. 2010; Delluc et al. 2011).

- **Cas du nickel**

Nos résultats ont tout d'abord montré la présence d'un répertoire de LT naïfs CD4<sup>+</sup> spécifiques du nickel dans la population générale. Ceci est en accord avec des études précédentes montrant que le nickel peut induire la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> même chez des donneurs non allergiques identifiés par un patch-test négatif (Cavani et al. 1998; Lisby et al. 1999a; Lisby et al. 1999b; Rustemeyer et al. 1999).

De même nous avons été capables d'identifier pour la première fois un répertoire de LT naïfs CD8<sup>+</sup> spécifiques du nickel dans la population générale. En effet, d'autres études basées sur des tests de prolifération lymphocytaire suite à des co-cultures LT et APC (PBMC irradiés), n'ont pas pu montrer une prolifération des LT CD8<sup>+</sup> issus de donneurs sains non allergiques en réponse au nickel (Cavani et al. 1998; Lisby et al. 1999a). Ceci pourrait être dû à une meilleure sensibilité de notre modèle de co-culture DC/LT par rapport aux tests de prolifération utilisés (Cavani et al. 1998). Plus concrètement, les restimulations successives par des MoDC autologues chargées par du nickel permettent d'expandre les LT spécifiques du nickel, présents à de faibles fréquences, et facilitent leur détection. D'autres méthodologies similaires basées sur des co-cultures DC/LT avec une restimulation des LT par des DC chargées par l'antigène ont été également développées et ont

permis de caractériser des LT naïfs spécifiques des molécules allergisantes en terme de prolifération et de sécrétions de cytokines (Vocanson et al. 2008; Martin et al. 2010; Dietz et al. 2010; Faulkner et al. 2012; Richter et al. 2013). Par ailleurs, les populations de LT naïfs CD4+ et CD8+, obtenues dans ce travail, sont respectivement déplétées en cellules CD25+ et cellules CD56+ lors du processus du tri cellulaire. Ceci pourrait contribuer aussi à une meilleure sensibilité comme démontrée dans d'autres études (Vocanson et al. 2008; Dietz et al. 2010; Vocanson et al. 2014).

En utilisant la loi de poisson attribuée aux évènements rares, nous avons calculé une fréquence moyenne de 0.49 LT naïfs CD4+ spécifiques du nickel par million de LT naïfs CD4+ circulants. Notre résultat est très proche de celui analysé par régression linéaire à partir d'une co-culture DC/LT où une fréquence de moins d'une cellule LT naïf CD4+ spécifique du nickel a été détectée pour 2 million de LT (Rustemeyer et al. 1999). Simultanément, nous avons calculé une fréquence de 0.37 LT naïfs CD8+ spécifiques du nickel par million de LT naïfs CD8+ circulants. D'une manière générale, une faible fréquence de LT naïfs spécifiques du nickel a été détectée. Elle est du même ordre de grandeur de celle trouvée pour des LT spécifiques d'un antigène donnée (anticorps thérapeutiques, BP, érythropoïétine) identifiée chez des individus non sensibilisés (Delluc et al. 2010; Delluc et al. 2011; Nhim et al. 2013). Quant à la fréquence des LT mémoires spécifiques du nickel, chez les patients allergiques, elle est de près de 100 à 1000 fois plus élevée que nos résultats (Werfel et al. 1997; Cavani et al. 1998).

Afin de comprendre les mécanismes d'activation des LT spécifiques, nous avons réalisé des expériences de blocage des molécules du CMH. Le blocage des molécules du CMH de classe II modifie la réponse des LT CD4+ mais pas celle des LT CD8+, alors que le blocage des molécules

du CMH de classe I modifie seulement la réponse des LT CD8+. Ceci est en accord avec l'activation spécifique de chaque sous-type de LT.

Nous avons aussi montré que le répertoire TCR V $\beta$  des LT naïfs CD4+ spécifiques du nickel est polyclonal avec une surreprésentation de certains clones qui expriment le TRBV19, détecté chez 5/6 des lignées testées provenant de trois donneurs différents. Nos résultats montrent aussi l'existence de clones de LT qui expriment fortement les TRBV20.1, TRBV27 et TRBV28 mais d'une manière moins constante entre les différentes lignées. Ces différents TCR V $\beta$ , surtout le TRBV19 connu sous le nom de TCR V $\beta$ 17 selon la nomenclature de Wei et *al* (Wei et al. 1994), ont été détectés dans la majorité des LT CD4+ spécifiques du nickel isolés de patients allergiques (Moulon et al. 1995; Vollmer et al. 1997; Werfel et al. 1997; Büdinger et al. 2001). De plus, il a été démontré que l'expression du TRBV19 semble être corrélé avec le résultat du patch test et l'intensité de l'EAC induit par le nickel (Moulon et al. 1995; Vollmer et al. 1997; Büdinger et al. 2001; Zhang et al. 2017).

De même, nous nous sommes intéressés à la réactivité croisée des LT naïfs spécifiques du nickel. Parmi les métaux allergisants, certaines études épidémiologiques montrent que la prévalence d'EAC au cobalt est augmentée chez les patients allergiques au nickel (Menne 1980; Rystedt and Fischer 1983; Kranke and Aberer 1996; Schwitulla et al. 2013). Nos résultats montrent que les LT naïfs spécifiques du nickel présentent une spécificité élevée pour ce dernier. En effet, environ 10% des LT naïfs spécifiques du nickel ont été capables de réagir avec le cobalt. Ces résultats sont concordants avec d'autres études réalisées sur des LT mémoires de patients allergiques (Moulon et al. 1995). En effet, une faible fréquence de LT mémoires spécifiques du nickel est capable de reconnaître le cobalt aussi (Moulon et al. 1995). Cette absence de réactivité croisée entre le nickel et le cobalt, malgré leurs propriétés chimiques et leur valence similaires, pourrait

être expliquée par leurs différentes géométries de coordination qui peuvent générer des déterminants antigéniques différents. Nous suggérons, que l'allergie concomitante au nickel et au cobalt observée *in vivo* est plutôt due à une exposition simultanée aux deux métaux présents dans le même produit et non pas à une réactivité croisée à l'échelle du LT.

D'une manière générale, nos résultats suggèrent que les LT naïfs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques du nickel présentent des caractéristiques proches (réactivité croisée et clonalité du TCR) des LT mémoires retrouvés chez des patients allergiques. Ceci montre que ce sont ces LT qui seraient responsables de l'immunisation des patients allergiques au nickel et qui joueraient un rôle dans le déclenchement des réactions allergiques chez des sujets prédisposés.

- **Cas de la BP**

Les antibiotiques de la famille des BL sont considérés comme les médicaments les plus impliqués dans les réactions allergiques (Doña et al. 2012). Notre travail a été réalisé avec la BP. Cette molécule nous sert comme prototype afin d'étendre par la suite notre étude sur d'autres molécules médicamenteuses.

Dans notre travail, nous avons utilisé le même bioconjugué (HSA-BP) caractérisé précédemment (Nhim et al. 2013; Scornet et al. 2016) et dont nous maîtrisons bien sa synthèse, afin d'essayer de détecter un répertoire de LT CD8<sup>+</sup> naïfs spécifiques de la BP. En effet, différentes études ont montré la présence de LT CD4<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup> spécifiques des molécules médicamenteuses chez des patients allergiques (Brander et al. 1995; Schnyder et al. 2000; El-Ghaiesh et al. 2012; Kim et al. 2015). Cependant le rôle du répertoire de LT naïfs spécifiques des molécules médicamenteuses n'a pas été abordé. Des travaux précédents dans notre laboratoire ont

montré la préexistence d'un répertoire de LT naïfs CD4<sup>+</sup> spécifiques de la BP en utilisant un bioconjugué HSA-BP (Nhim et al. 2013).

Le bioconjugué HSA-BP a été synthétisé à pH basique puisque les résidus nucléophiles des lysines ne sont pas protonés, ce qui conduit à l'ouverture du noyau  $\beta$ -lactame et facilite la fixation de la BP sur la HSA. Notre bioconjugué présente en moyenne 15 molécules de BP fixées par molécule d'HSA selon des liaisons covalentes et stables comme déjà décrit précédemment (Scornet et al. 2016) .

Dans la première partie du travail, nous avons montré qu'il est possible de détecter des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de la KLH *in vitro*. Bien que la KLH ne soit pas décrite pour générer des réponses LT CD8<sup>+</sup> *in vivo*, son utilisation nous a permis de vérifier que les MoDC générées *in vitro* sont capables de présenter un antigène exogène aux LT CD8<sup>+</sup>. Nous avons aussi vérifié que cette activation des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de la KLH passe par une présentation par les molécules du CMH de classe I *via* un mécanisme de présentation croisée dépendant du protéasome. Cependant, nos résultats montrent une quasi-absence d'un répertoire de LT naïfs CD8<sup>+</sup> pour la BP issus du bioconjugué HSA-BP.

Afin d'expliquer la différence de réponse entre la KLH et le bioconjugué HSA-BP, nous suggérons que l'efficacité de la présentation croisée avec le bioconjugué HSA-BP n'est pas optimale *in vitro*. En effet, la plupart des antigènes solubles nécessite d'être couplée à des adjuvants ou protéines chaperonnes pour induire une activation optimale des LT CD8<sup>+</sup> par les DC *via* le mécanisme de présentation croisée (Rock and Shen 2005; Oura et al. 2011). Alors que les antigènes particuliers ou les agrégats de protéines, qui peuvent être présents dans la KLH, sont capables d'induire de forte réponse LT CD8<sup>+</sup> (Falo et al. 1995; Rock and Shen 2005). Cette différence d'efficacité entre les deux antigènes pourrait être due au mécanisme d'internalisation

de l'antigène. Ainsi, le transfert de l'antigène du phagosome vers le cytosol semble être plus facile et permet d'obtenir une quantité intracellulaire plus élevée de l'antigène (Rock and Shen 2005). Par ailleurs, il a été aussi montré que l'efficacité de la présentation croisée dépend de la maturation des DC. Parmi plusieurs *stimuli* connus pour induire la maturation des DC et la présentation *via* les molécules du CMH de classe II, seulement le CD40L permet au DC d'entamer une présentation croisée efficace (Delamarre et al. 2003).

Comme il est généralement admis que les DC peuvent présenter aux LT CD8<sup>+</sup> des peptides dérivés essentiellement de protéines endogènes, nous avons émis l'hypothèse que la BP libre, non conjuguée, pourrait hapténiser des protéines cellulaires et être par la suite présenter aux LT CD8<sup>+</sup> *via* le processus classique de présentation par les molécules du CMH de classe I. Ainsi, en utilisant la BP libre, nous avons montré l'existence d'un répertoire de LT naïfs CD8<sup>+</sup> spécifiques de la BP. Nous avons aussi montré que l'activation des LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de la BP corrèle avec le taux d'hapténisation des protéines par la BP et est dépendante des molécules du CMH de classe I et du protéasome. Cependant l'origine des protéines hapténisées reste à démontrer. Une étude récente a montré que l'AX peut hapténiser des protéines intracellulaires au niveau des LB. Il s'agit essentiellement de l'EF-2 (96KD), de l'HSP70 (71KD), de la  $\beta$ -Actin (40KD), et de l' $\alpha$ -enolase (47KD) (Sánchez-Gómez et al. 2017).

Une fois l'origine intracellulaire des protéines hapténisées par la BP confirmée, ce travail constituera une preuve du rôle de l'hapténisation cellulaire dans les mécanismes de l'immunisation contre les médicaments.



# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



Notre travail a permis en premier lieu l'étude approfondie des mécanismes de régulation des cytokines membres de la famille de l'IL-12 au sein des DC en réponse aux haptènes métalliques. Ainsi, nous montrons que les DC activées par du nickel, sont capables de modifier l'équilibre IL-23/IL-12p70 en faveur d'une production d'IL-23 qui conduit à la polarisation Th17. Par contre, l'addition de l'IFN- $\gamma$  à une stimulation par du nickel modifie l'équilibre IL-23/IL-12p70 en faveur de l'IL-12p70. De plus, nous montrons pour la première fois *in vitro* le rôle clé de la voie Jak-STAT dans le maintien de l'équilibre IL-23/IL-12p70. En absence d'activation de la voie Jak-STAT, les DC stimulées par le nickel, produisent une grande quantité d'IL-23 et d'IL-12p40 par rapport à l'IL-12p70 permettant de maintenir une polarisation Th17. Cependant, l'activation de la voie Jak-STAT dans les DC stimulées par le nickel est indispensable pour la polarisation Th17 (**Figure 66**). Il serait intéressant de comprendre comment le nickel induit l'activation de la voie Jak-STAT. Il faudra identifier les membres de la famille Jak qui sont phosphorylés ainsi que l'ensemble des STAT activés par le nickel grâce à des anticorps spécifiques révélés par western-blot.

De plus, nous montrons pour la première fois *in vitro* une induction de l'expression de NFIL-3 dans les DC activées par du nickel *via* la voie Jak-STAT et qui pourrait jouer un rôle dans le contrôle négatif effectué par la voie Jak-STAT sur la production de l'IL-12p40 et de l'IL-23. En comparant l'effet des différents haptènes métalliques utilisés dans notre étude, nous remarquons que le cobalt est un fort inducteur des espèces réactives dans les DC, ce qui contribue à une forte expression de NFIL-3 indépendamment du TLR4 et qui pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de la production des cytokines membres de la famille de l'IL-12. Ainsi des expériences d'invalidation de *nfil-3* dans les DC activées par le nickel ou le cobalt nous permettrons de confirmer la régulation négative médiée par ce facteur sur les cytokines membres de la famille de l'IL-12. Il serait aussi

intéressant d'étudier le rôle du facteur de transcription NFIL-3 dans les réactions allergiques en évaluant l'HSC induite par des molécules allergisantes dans un modèle de souris invalidées pour *nfil-3*.

Nous avons également montré que les DC activées par du nickel produisent de l'IL-27 *via* un mécanisme dépendant des voies du TLR4 et de Jak-STAT. A ce stade, il serait intéressant d'étudier la fonctionnalité de l'IL-27 et son effet sur la polarisation des LT. Il serait aussi intéressant d'évaluer la production d'autres cytokines membres de la famille de l'IL-12 (IL-23, IL-35 et IL-36) dans les DC activées par du nickel. Ceci pourrait contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes de polarisation lymphocytaire induite par le nickel.

Notre travail a montré également la préexistence d'un répertoire de LT naïfs CD4<sup>+</sup> et, pour la première fois, LT naïfs CD8<sup>+</sup> spécifiques du nickel dans la population générale. L'activation des LT spécifiques nécessite les molécules du CMH. Cependant, l'étude approfondie des mécanismes de l'activation de ces LT spécifiques, telle que la nécessité de l'apprêtement antigénique, peut être envisagée. Ainsi, le maintien de l'activation des LT spécifiques du nickel par des DC fixées au glutaraldéhyde et chargées par du nickel serait en faveur de la fixation directe du nickel par des liaisons de coordination entre les molécules du CMH et le TCR comme décrite chez la majorité des clones isolés de patients allergiques (Gamerding et al. 2003; Lu et al. 2003).

Par ailleurs, des expériences supplémentaires seront nécessaires pour comprendre si la forte représentation de certains TCR V $\beta$ , détectée au niveau des LT spécifiques du nickel, est due à la réactivité du nickel lui-même ou bien aux conditions de cultures ou bien à une simple surexpression initiale de ces TCR à l'état basale.

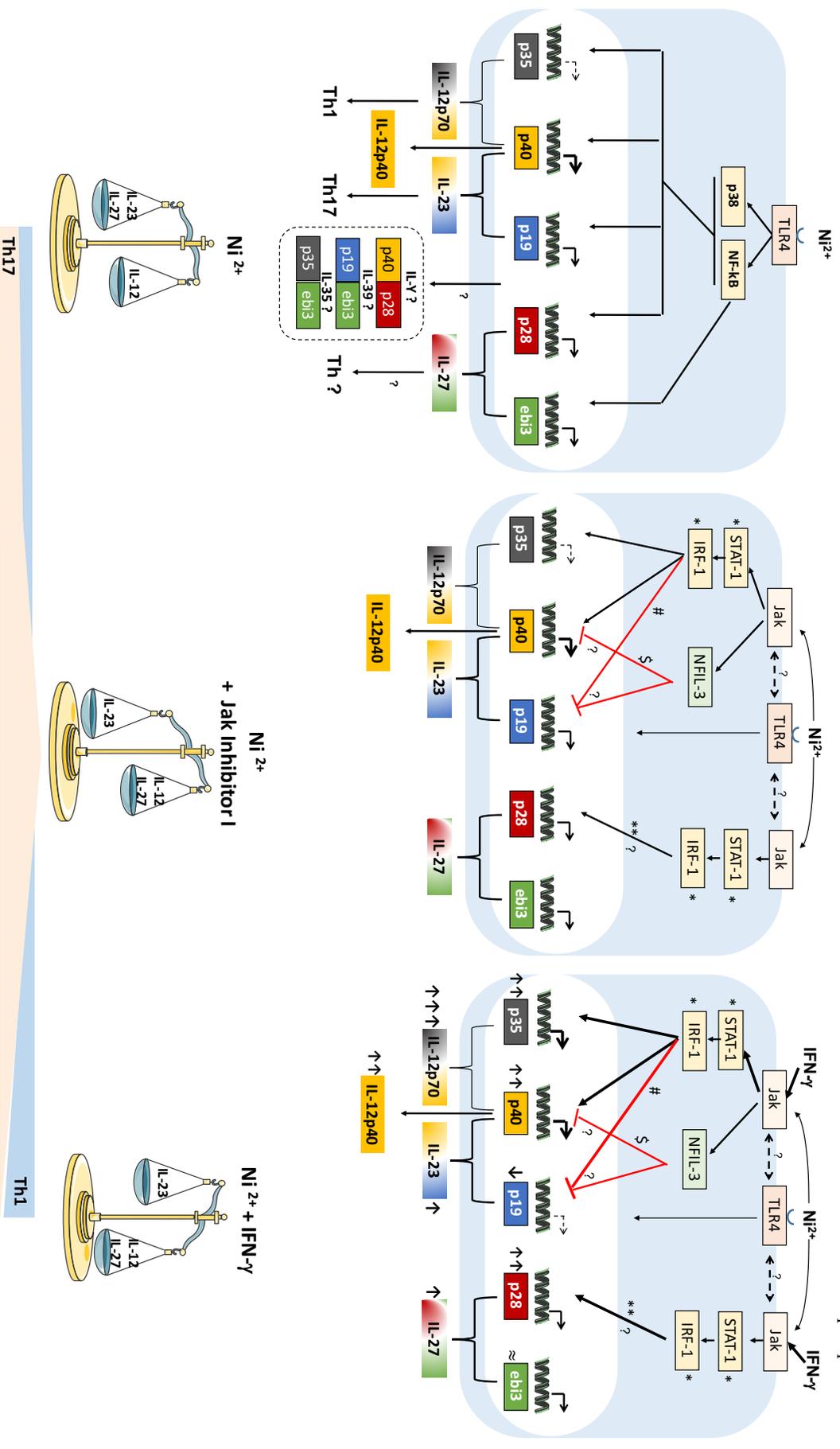
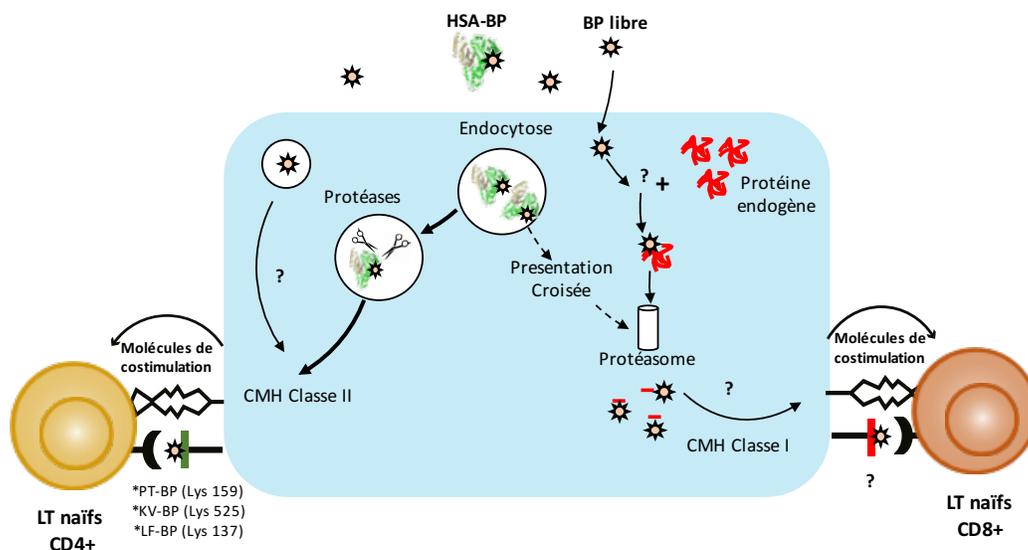


Figure 66: Schéma général de la régulation de l'IL-23, de l'IL-12p70 et de l'IL-27 par le nickel dans les cellules dendritiques

\* Antonios et al 2010 (MDC et nickel) ; # Sheikh et al. 2010, 2011 (MDC et LPS); \$ Kobayashi et al. 2011, 2014 (MDC et LPS); \*\*Liu et al. 2007 et Zhang et al. 2010 (BMDM et LPS).

Dans la dernière partie de notre travail, nos résultats montrent pour la première fois l'existence de LT naïfs CD8<sup>+</sup> spécifiques de la BP et ceci en utilisant des DC chargées avec de la BP libre (**Figure 67**). Des méthodes de protéomique nous permettront d'identifier les protéines hapténisées par la BP et nous donnerons une idée de leur origine comme démontré avec l'AX (Sánchez-Gómez et al. 2017). Par ailleurs, l'identification des épitopes T à l'origine de la réponse T naïve spécifique de la BP et de l'immunisation des patients nous permettra de mieux comprendre les mécanismes de l'allergie médicamenteuse. Une élution de peptides hapténisés à partir des molécules du CMH de classe I présentes à la surface des DC pourrait être envisagée afin d'identifier les épitopes potentiellement présentés aux LT naïfs CD8<sup>+</sup> spécifiques. Les peptides-BP identifiés pourront être synthétisés et testés dans le modèle de co-culture DC/LT.

Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier le répertoire de LT naïfs CD4<sup>+</sup> spécifiques de la BP non conjuguée. Une fois l'origine cellulaire des protéines hapténisées par la BP sera confirmée, notre projet contribuera à une meilleure compréhension du mécanisme de l'immunisation des patients allergiques contre les médicaments à travers l'hapténisation intracellulaire.



**Figure 67: Activation des LT naïfs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques de la BP**

\* *Nhim C et al. 2013 ; Scornet N et al. 2016 ; Azoury ME et al en révision*

# **BIBLIOGRAPHIE**



## A

- Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* 2007 Jun;8(6):639–46.
- Adam C, Wohlfarth J, Haußmann M, Sennefelder H, Rodin A, Maler M, et al. Allergy-Inducing Chromium Compounds Trigger Potent Innate Immune Stimulation Via ROS-Dependent Inflammasome Activation. *J. Invest. Dermatol.* 2017 Feb;137(2):367–76.
- Adam J, Eriksson KK, Schnyder B, Fontana S, Pichler WJ, Yerly D. Avidity determines T-cell reactivity in abacavir hypersensitivity. *Eur. J. Immunol.* 2012 Jul;42(7):1706–16.
- Adam J, Wuillemin N, Watkins S, Jamin H, Eriksson KK, Villiger P, et al. Abacavir induced T cell reactivity from drug naïve individuals shares features of allo-immune responses. *PloS One.* 2014;9(4):e95339.
- Ade N, Antonios D, Kerdine-Romer S, Boislevé F, Rousset F, Pallardy M. NF-kappaB plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO<sub>4</sub> but not by DNCB. *Toxicol. Sci.* 2007 Oct;99(2):488–501.
- Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZUA, Mizuashi M, Ohtani T, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl<sub>2</sub> and 2,4-dinitrochlorobenzene. *J. Invest. Dermatol.* 2003 Mar;120(3):390–9.
- Aiba S, Terunuma A, Manome H, Tagami H. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.* 1997 Nov;27(11):3031–8.
- Alanio C, Lemaitre F, Law HKW, Hasan M, Albert ML. Enumeration of human antigen-specific naïve CD8<sup>+</sup> T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood.* 2010 May 6;115(18):3718–25.
- Albanesi C, Scarponi C, Cavani A, Federici M, Nasorri F, Girolomoni G. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 2000 Jul;115(1):81–7.
- Aleksic M, Pease CK, Basketter DA, Panico M, Morris HR, Dell A. Investigating protein haptenation mechanisms of skin sensitizers using human serum albumin as a model protein. *Toxicol. Vitro.* 2007 Jun;21(4):723–33.
- Aleksic M, Pease CK, Basketter DA, Panico M, Morris HR, Dell A. Mass spectrometric identification of covalent adducts of the skin allergen 2,4-dinitro-1-chlorobenzene and model skin proteins. *Toxicol. Vitro.* 2008 Aug;22(5):1169–76.
- Alloatti A, Kotsias F, Magalhaes JG, Amigorena S. Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! *Immunol. Rev.* 2016 Jul;272(1):97–108.
- Amsler E, Soria A. [Hypersensitivity reactions to beta-lactam antibiotics]. *Rev. Med. Interne.* 2017 Jul 25; [Epub ahead of print].
- Antonios D, Ade N, Kerdine-Römer S, Assaf-Vandecasteele H, Larangé A, Azouri H, et al. Metallic haptens induce differential phenotype of human dendritic cells through activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *Toxicol. Vitro.* 2009 Mar;23(2):227–34.
- Antonios D, Rousseau P, Larangé A, Kerdine-Römer S, Pallardy M. Mechanisms of IL-12 synthesis by human dendritic cells treated with the chemical sensitizer NiSO<sub>4</sub>. *J. Immunol.* 2010 Jul 1;185(1):89–98.

- Apetoh L, Quintana FJ, Pot C, Joller N, Xiao S, Kumar D, et al. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat. Immunol.* 2010 Sep;11(9):854–61.
- Ariza A, Collado D, Vida Y, Montañez MI, Pérez-Inestrosa E, Blanca M, et al. Study of protein haptentation by amoxicillin through the use of a biotinylated antibiotic. *PloS One.* 2014;9(3):e90891.
- Ariza A, Garzon D, Abánades DR, de los Ríos V, Vistoli G, Torres MJ, et al. Protein haptentation by amoxicillin: high resolution mass spectrometry analysis and identification of target proteins in serum. *J. Proteomics.* 2012 Dec 21;77:504–20.
- Ariza A, Mayorga C, Fernandez TD, Barbero N, Martín-Serrano A, Pérez-Sala D, et al. Hypersensitivity reactions to  $\beta$ -lactams: relevance of haptent-protein conjugates. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2015;25(1):12–25.
- Arthur JC, Lich JD, Ye Z, Allen IC, Gris D, Wilson JE, et al. Cutting edge: NLRP12 controls dendritic and myeloid cell migration to affect contact hypersensitivity. *J. Immunol.* 2010 Oct 15;185(8):4515–9.
- Artik S, von Vultée C, Gleichmann E, Schwarz T, Griem P. Nickel allergy in mice: enhanced sensitization capacity of nickel at higher oxidation states. *J. Immunol.* 1999 Aug 1;163(3):1143–52.
- Ashrin MN, Arakaki R, Yamada A, Kondo T, Kurosawa M, Kudo Y, et al. A critical role for thymic stromal lymphopoietin in nickel-induced allergy in mice. *J. Immunol.* 2014 May 1;192(9):4025–31.
- Awasthi A, Carrier Y, Peron JPS, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, et al. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat. Immunol.* 2007 Dec;8(12):1380–9.
- B**
- Bacher P, Scheffold A. Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. *Cytometry.* 2013 Aug;83(8):692–701.
- Bakdash G, Sittig SP, van Dijk T, Figdor CG, de Vries IJM. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Front. Immunol.* 2013;4:53.
- Balakirski G, Merk HF. Cutaneous allergic drug reactions: update on pathophysiology, diagnostic procedures and differential diagnosis. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 2017 Apr 27;1–10.
- Baldo BA, Fisher MM, Pham NH. On the origin and specificity of antibodies to neuromuscular blocking (muscle relaxant) drugs: an immunochemical perspective. *Clin. Exp. Allergy.* 2009 Mar;39(3):325–44.
- Balmert SC, Donahue C, Vu JR, Erdos G, Falo LD, Little SR. In vivo induction of regulatory T cells promotes allergen tolerance and suppresses allergic contact dermatitis. *J. Control. Release.* 2017 Sep 10;261:223–33.
- Bangert C, Friedl J, Sary G, Stingl G, Kopp T. Immunopathologic features of allergic contact dermatitis in humans: participation of plasmacytoid dendritic cells in the pathogenesis of the disease? *J. Invest. Dermatol.* 2003 Dec;121(6):1409–18.
- Bangsgaard N, Zachariae C, Menné T, Skov L. Lack of effect of ustekinumab in treatment of allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis.* 2011 Oct;65(4):227–30.
- Basketter D, Dooms-Goossens A, Karlberg AT, Lepoittevin JP. The chemistry of contact allergy: why is a molecule allergenic? *Contact Dermatitis.* 1995 Feb;32(2):65–73.

- Basketter DA, Dearman RJ, Hilton J, Kimber I. Dinitrohalobenzenes: evaluation of relative skin sensitization potential using the local lymph node assay. *Contact Dermatitis*. 1997 Feb;36(2):97–100.
- Batten M, Ramamoorthi N, Kljavin NM, Ma CS, Cox JH, Dengler HS, et al. IL-27 supports germinal center function by enhancing IL-21 production and the function of T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* 2010 Dec 20;207(13):2895–906.
- Bending D, De la Peña H, Veldhoen M, Phillips JM, Uyttenhove C, Stockinger B, et al. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J. Clin. Invest.* 2009 Mar;119(3):565–72.
- Bennett CL, van Rijn E, Jung S, Inaba K, Steinman RM, Kapsenberg ML, et al. Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J. Cell Biol.* 2005 May 23;169(4):569–76.
- Bircher AJ, Scherer Hofmeier K. Drug hypersensitivity reactions: Inconsistency in the use of the classification of immediate and nonimmediate reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012 Jan;129(1):263-264.
- Bissonnette R, Papp KA, Poulin Y, Gooderham M, Raman M, Mallbris L, et al. Topical tofacitinib for atopic dermatitis: a phase IIa randomized trial. *Br. J. Dermatol.* 2016 Nov;175(5):902–11.
- Blumenthal K, Solensky R. Structure of penicillins and related beta-lactam drugs [Internet]. UpToDate. 2017 [cited 2017 Aug 4]. Available from: [https://ezproxy.usj.edu.lb:4555/contents/image?rank=18~115&imageKey=ALLRG%2F79230&source=graphics\\_search&search=beta%20lactam%20antibiotics](https://ezproxy.usj.edu.lb:4555/contents/image?rank=18~115&imageKey=ALLRG%2F79230&source=graphics_search&search=beta%20lactam%20antibiotics)
- Bobr A, Olvera-Gomez I, Igyarto BZ, Haley KM, Hogquist KA, Kaplan DH. Acute ablation of Langerhans cells enhances skin immune responses. *J. Immunol.* 2010 Oct 15;185(8):4724–8.
- Böhm R, Cascorbi I. Pharmacogenetics and Predictive Testing of Drug Hypersensitivity Reactions. *Front. Pharmacol.* 2016;7:396.
- Boislève F, Kerdine-Römer S, Pallardy M. Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha. *Toxicology*. 2005 Jan 15;206(2):233–44.
- Boislève F, Kerdine-Römer S, Rougier-Larzat N, Pallardy M. Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF-alpha and MAPK. *J. Invest. Dermatol.* 2004 Sep;123(3):494–502.
- von Bonin A, Ortmann B, Martin S, Weltzien HU. Peptide-conjugated hapten groups are the major antigenic determinants for trinitrophenyl-specific cytotoxic T cells. *Int. Immunol.* 1992 Aug;4(8):869–74.
- Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.* 2000 Jun;9(3):165–9.
- de Bourayne M, Gallais Y, El Ali Z, Rousseau P, Damiens M-H, Cochet C, et al. Protein kinase CK2 controls T-cell polarization through dendritic cell activation in response to contact sensitizers. *J. Leukoc. Biol.* 2017 Mar;101(3):703–15.
- Brander C, Mauri-Hellweg D, Bettens F, Rolli H, Goldman M, Pichler WJ. Heterogeneous T cell responses to beta-lactam-modified self-structures are observed in penicillin-allergic individuals. *J. Immunol.* 1995 Sep 1;155(5):2670–8.
- Bregnbak D, Johansen JD, Jellesen MS, Zachariae C, Menné T, Thyssen JP. Chromium allergy and dermatitis: prevalence and main findings. *Contact Dermatitis*. 2015 Nov;73(5):261–80.

- Breton G. [Origin and development of human dendritic cells]. *Med. Sci.* 2015 Sep;31(8–9):725–7.
- Brownlie RJ, Zamoyska R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat. Rev. Immunol.* 2013 Apr;13(4):257–69.
- Büdinger L, Neuser N, Totzke U, Merk HF, Hertl M. Preferential usage of TCR-Vbeta17 by peripheral and cutaneous T cells in nickel-induced contact dermatitis. *J. Immunol.* 2001 Nov 15;167(10):6038–44.
- Burkhardt C, Britschgi M, Strasser I, Depta JPH, von Greyerz S, Barnaba V, et al. Non-covalent presentation of sulfamethoxazole to human CD4+ T cells is independent of distinct human leucocyte antigen-bound peptides. *Clin. Exp. Allergy.* 2002 Nov;32(11):1635–43.
- Burkhardt C, von Greyerz S, Depta JP, Naisbitt DJ, Britschgi M, Park KB, et al. Influence of reduced glutathione on the proliferative response of sulfamethoxazole-specific and sulfamethoxazole-metabolite-specific human CD4+ T-cells. *Br. J. Pharmacol.* 2001 Feb;132(3):623–30.
- Bush K, Bradford PA.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016 Aug 1;6(8).
- Butchar JP, Rajaram MVS, Ganesan LP, Parsa KVL, Clay CD, Schlesinger LS, et al. *Francisella tularensis* induces IL-23 production in human monocytes. *J. Immunol.* 2007 Apr 1;178(7):4445–54.
- Buters J, Biedermann T. Chromium(VI) Contact Dermatitis: Getting Closer to Understanding the Underlying Mechanisms of Toxicity and Sensitization! *J. Invest. Dermatol.* 2017;137(2):274–7.
- Byamba D, Kim TG, Kim DH, Je JH, Lee M-G. The Roles of Reactive Oxygen Species Produced by Contact Allergens and Irritants in Monocyte-derived Dendritic Cells. *Ann. Dermatol.* 2010 Aug;22(3):269–78.
- C**
- Caixas U, Antunes AMM, Marinho AT, Godinho ALA, Grilo NM, Marques MM, et al. Evidence for nevirapine bioactivation in man: searching for the first step in the mechanism of nevirapine toxicity. *Toxicology.* 2012 Nov 15;301(1–3):33–9.
- Callan HE, Jenkins RE, Maggs JL, Lavergne SN, Clarke SE, Naisbitt DJ, et al. Multiple adduction reactions of nitroso sulfamethoxazole with cysteinyl residues of peptides and proteins: implications for hapten formation. *Chem. Res. Toxicol.* 2009 May;22(5):937–48.
- Campion SL, Brodie TM, Fischer W, Korber BT, Rossetti A, Goonetilleke N, et al. Proteome-wide analysis of HIV-specific naive and memory CD4(+) T cells in unexposed blood donors. *J. Exp. Med.* 2014 Jun 30;211(7):1273–80.
- Cardona V, Guilarte M, Luengo O, Labrador-Horrillo M, Sala-Cunill A, Garriga T. Allergic diseases in the elderly. *Clin. Transl. Allergy.* 2011 Oct 17;1(1):11.
- Carmody RJ, Ruan Q, Liou H-C, Chen YH. Essential roles of c-Rel in TLR-induced IL-23 p19 gene expression in dendritic cells. *J. Immunol.* 2007 Jan 1;178(1):186–91.
- Carra G, Gerosa F, Trinchieri G. Biosynthesis and posttranslational regulation of human IL-12. *J. Immunol.* 2000 May 1;164(9):4752–61.
- Castrejon JL, Berry N, El-Ghaiesh S, Gerber B, Pichler WJ, Park BK, et al. Stimulation of human T cells with sulfonamides and sulfonamide metabolites. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010 Feb;125(2):411–418.e4.

- Caterina MJ, Pang Z. TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology. *Pharm. Basel Switz.* 2016 Dec 14;9(4).
- Cavani A, Mei D, Guerra E, Corinti S, Giani M, Pirrotta L, et al. 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.* 1998 Oct;111(4):621–8.
- Cavani A, Nasorri F, Ottaviani C, Sebastiani S, De Pità O, Girolomoni G. Human CD25+ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals. *J. Immunol.* 2003 Dec 1;171(11):5760–8.
- Cerny A, Bertoli R. Drug Allergic Liver Injury. In Pichler WJ: *Drug Hypersensitivity.* Basel, Karger, 2007;278–94.
- Chaabane A, Aouam K, Boughattas NA, Chakroun M. [Allergy to betalactams: myth and realities]. *Médecine Mal. Infect.* 2009 May;39(5):278–87.
- Chantarangsu S, Mushiroda T, Mahasirimongkol S, Kiertiburanakul S, Sungkanuparph S, Manosuthi W, et al. HLA-B\*3505 allele is a strong predictor for nevirapine-induced skin adverse drug reactions in HIV-infected Thai patients. *Pharmacogenet. Genomics.* 2009 Feb;19(2):139–46.
- Chen X, Tharmanathan T, Mannargudi B, Gou H, Uetrecht JP. A study of the specificity of lymphocytes in nevirapine-induced skin rash. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009 Dec;331(3):836–41.
- Chen Y-C, Chiang H-H, Cho Y-T, Chang C-Y, Chen K-L, Yang C-W, et al. Human herpes virus reactivations and dynamic cytokine profiles in patients with cutaneous adverse drug reactions --a prospective comparative study. *Allergy.* 2015 May;70(5):568–75.
- Chessman D, Kostenko L, Lethborg T, Purcell AW, Williamson NA, Chen Z, et al. Human leukocyte antigen class I-restricted activation of CD8+ T cells provides the immunogenetic basis of a systemic drug hypersensitivity. *Immunity.* 2008 Jun;28(6):822–32.
- Chiriac AM, Demoly P. Drug allergy diagnosis. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2014 Aug;34(3):461–471, vii.
- Chiriac A-M, Demoly P. [Allergy to neuromuscular blocking agents]. *Presse Medicale Paris Fr.* 1983. 2016 Sep;45(9):768–73.
- Chiriac AM, Wang Y, Schrijvers R, Bousquet PJ, Mura T, Molinari N, et al. Designing Predictive Models for Beta-Lactam Allergy Using the Drug Allergy and Hypersensitivity Database. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2017 Jul 21. [Epub ahead of print].
- Cho T, Uetrecht J. How Reactive Metabolites Induce an Immune Response That Sometimes Leads to an Idiosyncratic Drug Reaction. *Chem. Res. Toxicol.* 2017 17;30(1):295–314.
- Cho Y-T, Yang C-W, Chu C-Y. Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS): An Interplay among Drugs, Viruses, and Immune System. *Int. J. Mol. Sci.* 2017 Jun 9;18(6).
- Chung CH, Mirakhor B, Chan E, Le Q-T, Berlin J, Morse M, et al. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N. Engl. J. Med.* 2008 Mar 13;358(11):1109–17.
- Chung W-H, Chang W-C, Stocker SL, Juo C-G, Graham GG, Lee M-HH, et al. Insights into the poor prognosis of allopurinol-induced severe cutaneous adverse reactions: the impact of renal insufficiency, high plasma levels of oxypurinol and granulysin. *Ann. Rheum. Dis.* 2015 Dec;74(12):2157–64.

- Chung W-H, Hung S-I, Hong H-S, Hsieh M-S, Yang L-C, Ho H-C, et al. Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature*. 2004 Apr 1;428(6982):486.
- Clayton GM, Wang Y, Crawford F, Novikov A, Wimberly BT, Kieft JS, et al. Structural basis of chronic beryllium disease: linking allergic hypersensitivity and autoimmunity. *Cell*. 2014 Jul 3;158(1):132–42.
- Colagiovanni A, Di Renzo L, Sarlo F, Schiavino D, De Lorenzo A. Role of TNF-alpha polymorphism in patients with nickel allergy: a marker of susceptibility to contact polysensitization. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. 2016 Jun;20(12):2663–6.
- Comerford I, Harata-Lee Y, Bunting MD, Gregor C, Kara EE, McColl SR. A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013 Jun;24(3):269–83.
- Cooper AM, Khader SA. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol*. 2007 Jan;28(1):33–8.
- Corsini E, Galbiati V, Esser PR, Pinto A, Racchi M, Marinovich M, et al. Role of PKC- $\beta$  in chemical allergen-induced CD86 expression and IL-8 release in THP-1 cells. *Arch. Toxicol*. 2014 Feb;88(2):415–24.
- Corsini E, Galbiati V, Nikitovic D, Tsatsakis AM. Role of oxidative stress in chemical allergens induced skin cells activation. *Food Chem. Toxicol*. 2013 Nov;61:74–81.
- Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J. Exp. Med*. 2008 Aug 4;205(8):1903–16.
- Coulter EM, Jenkinson C, Farrell J, Lavergne SN, Pease C, White A, et al. Measurement of CD4+ and CD8+ T-lymphocyte cytokine secretion and gene expression changes in p-phenylenediamine allergic patients and tolerant individuals. *J. Invest. Dermatol*. 2010 Jan;130(1):161–74.
- Cousen PJ, Gawkrödger DJ. Metal allergy and second-generation metal-on-metal arthroplasties. *Contact Dermatitis*. 2012 Feb;66(2):55–62.
- Coutant KD, de Fraissinette AB, Cordier A, Ulrich P. Modulation of the activity of human monocyte-derived dendritic cells by chemical haptens, a metal allergen, and a staphylococcal superantigen. *Toxicol. Sci*. 1999 Dec;52(2):189–98.
- Cowell IG, Skinner A, Hurst HC. Transcriptional repression by a novel member of the bZIP family of transcription factors. *Mol. Cell. Biol*. 1992 Jul;12(7):3070–7.
- D**
- Dai R, Streilein JW. Naïve, hapten-specific human T lymphocytes are primed in vitro with derivatized blood mononuclear cells. *J. Invest. Dermatol*. 1998 Jan;110(1):29–33.
- Daly AK, Donaldson PT, Bhatnagar P, Shen Y, Pe'er I, Floratos A, et al. HLA-B\*5701 genotype is a major determinant of drug-induced liver injury due to flucloxacillin. *Nat. Genet*. 2009 Jul;41(7):816–9.
- De Nardo D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine*. 2015 Aug;74(2):181–9.
- De Smedt AC, Van Den Heuvel RL, Zwi Berneman N, Schoeters GE. Modulation of phenotype, cytokine production and stimulatory function of CD34+-derived DC by NiCl(2) and SDS. *Toxicol. Vitro*. 2001 Oct;15(4–5):319–25.

- Dearman RJ, Basketter DA, Kimber I. Characterization of chemical allergens as a function of divergent cytokine secretion profiles induced in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996 Jun;138(2):308–16.
- Dearman RJ, Kimber I. Cytokine fingerprinting: characterization of chemical allergens. *Methods San Diego Calif.* 1999 Sep;19(1):56–63.
- Decuyper II, Mangodt EA, Van Gasse AL, Claesen K, Uyttbroek A, Faber M, et al. In Vitro Diagnosis of Immediate Drug Hypersensitivity Anno 2017: Potentials and Limitations. *Drugs RD.* 2017;17(2):265.
- Deenick EK, Ma CS, Brink R, Tangye SG. Regulation of T follicular helper cell formation and function by antigen presenting cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2011 Feb;23(1):111–8.
- Delamarre L, Holcombe H, Mellman I. Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *J. Exp. Med.* 2003 Jul 7;198(1):111–22.
- Delluc S, Ravot G, Maillere B. Quantification of the preexisting CD4 T-cell repertoire specific for human erythropoietin reveals its immunogenicity potential. *Blood.* 2010 Nov 25;116(22):4542–5.
- Delluc S, Ravot G, Maillere B. Quantitative analysis of the CD4 T-cell repertoire specific to therapeutic antibodies in healthy donors. *FASEB.* 2011 Jun;25(6):2040–8.
- Demoly P, Adkinson NF, Brockow K, Castells M, Chiriac AM, Greenberger PA, et al. International Consensus on drug allergy. *Allergy.* 2014 Apr;69(4):420–37.
- Dempsey A, Bowie AG. Innate immune recognition of DNA: A recent history. *Virology.* 2015 May;479–480:146–52.
- Depta JPH, Altnauer F, Gamedinger K, Burkhart C, Weltzien HU, Pichler WJ. Drug interaction with T-cell receptors: T-cell receptor density determines degree of cross-reactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004 Mar;113(3):519–27.
- Descotes J, Choquet-Kastylevsky G. Gell and Coombs's classification: is it still valid? *Toxicology.* 2001 Feb 2;158(1–2):43–9.
- Deshayes S, Coquerel A, Verdon R. Neurological Adverse Effects Attributable to  $\beta$ -Lactam Antibiotics: A Literature Review. *Drug Saf.* 2017 Jul 28; [Epub ahead of print].
- Deslée G, Charbonnier A-S, Hammad H, Angyalosi G, Tillie-Leblond I, Mantovani A, et al. Involvement of the mannose receptor in the uptake of Der p 1, a major mite allergen, by human dendritic cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002 Nov;110(5):763–70.
- Dhingra N, Shemer A, Correa da Rosa J, Rozenblit M, Fuentes-Duculan J, Gittler JK, et al. Molecular profiling of contact dermatitis skin identifies allergen-dependent differences in immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014 Aug;134(2):362–72.
- Diepgen TL, Ofenloch RF, Bruze M, Bertuccio P, Cazzaniga S, Coenraads P-J, et al. Prevalence of contact allergy in the general population in different European regions. *Br. J. Dermatol.* 2016 Feb;174(2):319–29.
- Diepgen TL, Scheidt R, Weisshaar E, John SM, Hieke K. Cost of illness from occupational hand eczema in Germany. *Contact Dermatitis.* 2013 Aug;69(2):99–106.

- Dietz L, Esser PR, Schmucker SS, Goette I, Richter A, Schnölzer M, et al. Tracking human contact allergens: from mass spectrometric identification of peptide-bound reactive small chemicals to chemical-specific naive human T-cell priming. *Toxicol. Sci.* 2010 Oct;117(2):336–47.
- Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce-Shaikh B, et al. IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J. Immunol.* 2009 May 1;182(9):5748–56.
- Divkovic M, Pease CK, Gerberick GF, Basketter DA. Hapten-protein binding: from theory to practical application in the in vitro prediction of skin sensitization. *Contact Dermatitis.* 2005 Oct;53(4):189–200.
- Doña I, Blanca-Lopez N, Torres MJ, García-Campos J, García-Núñez I, Gómez F, et al. 7 Drug Hypersensitivity Reactions: Response Patterns, Drug Involved, and Temporal Variations in a Large Series of Patients. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2012;22(5):363.
- Dubin K, Callahan MK, Ren B, Khanin R, Viale A, Ling L, et al. Intestinal microbiome analyses identify melanoma patients at risk for checkpoint-blockade-induced colitis. *Nat. Commun.* 2016 Feb 2;7:10391.
- Dubois B, Chapat L, Goubier A, Papiernik M, Nicolas J-F, Kaiserlian D. Innate CD4+CD25+ regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8+ T cells mediating skin inflammation. *Blood.* 2003 Nov 1;102(9):3295–301.
- Dwivedi A, Tikku T, Khanna R, Maurya RP, Verma G, Murthy RC. Release of nickel and chromium ions in the saliva of patients with fixed orthodontic appliance: An in-vivo study. *Natl. J. Maxillofac. Surg.* 2015 Jun;6(1):62–6.
- Dyring-Andersen B, Skov L, Løvendorf MB, Bzorek M, Søndergaard K, Lauritsen J-PH, et al. CD4(+) T cells producing interleukin (IL)-17, IL-22 and interferon- $\gamma$  are major effector T cells in nickel allergy. *Contact Dermatitis.* 2013 Jun;68(6):339–47.
- E**
- Edelson BT, Kc W, Juang R, Kohyama M, Benoit LA, Klekotka PA, et al. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 $\alpha$ + conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2010 Apr 12;207(4):823–36.
- El Ali Z, Deloménie C, Botton J, Pallardy M, Kerdine-Römer S. Dendritic cells' death induced by contact sensitizers is controlled by Nrf2 and depends on glutathione levels. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2017 May 1;322:41–50.
- El Ali Z, Gerbeix C, Hemon P, Esser PR, Martin SF, Pallardy M, et al. Allergic skin inflammation induced by chemical sensitizers is controlled by the transcription factor Nrf2. *Toxicol. Sci.* 2013 Jul;134(1):39–48.
- El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur. J. Med. Chem.* 2017 May 5;131:185–95.
- El-Ghaiesh S, Monshi MM, Whitaker P, Jenkins R, Meng X, Farrell J, et al. Characterization of the antigen specificity of T-cell clones from piperacillin-hypersensitive patients with cystic fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012 Jun;341(3):597–610.
- Elsheikh A, Castrejon L, Lavergne SN, Whitaker P, Monshi M, Callan H, et al. Enhanced antigenicity leads to altered immunogenicity in sulfamethoxazole-hypersensitive patients with cystic fibrosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011 Jun;127(6):1543–1551.e3.

Elsheikh A, Lavergne SN, Castrejon JL, Farrell J, Wang H, Sathish J, et al. Drug antigenicity, immunogenicity, and costimulatory signaling: evidence for formation of a functional antigen through immune cell metabolism. *J. Immunol.* 2010 Dec 1;185(11):6448–60.

Esser PR, Wölfle U, Dürr C, von Loewenich FD, Schempp CM, Freudenberg MA, et al. Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation. *PLoS One.* 2012;7(7):e41340.

Eyler JT, Squires S, Fraga GR, Liu D, Kestenbaum T. Two cases of acute generalized exanthematous pustulosis related to oral terbinafine and an analysis of the clinical reaction pattern. *Dermatol. Online J.* 2012 Nov 15;18(11):5.

## F

Falo LD, Kovacovics-Bankowski M, Thompson K, Rock KL. Targeting antigen into the phagocytic pathway in vivo induces protective tumour immunity. *Nat. Med.* 1995 Jul;1(7):649–53.

Faulkner L, Gibson A, Sullivan A, Tailor A, Usui T, Alfirevic A, et al. Detection of Primary T Cell Responses to Drugs and Chemicals in HLA-Typed Volunteers: Implications for the Prediction of Drug Immunogenicity. *Toxicol. Sci.* 2016 Dec;154(2):416–29.

Faulkner L, Martinsson K, Santoyo-Castelazo A, Cederbrant K, Schuppe-Koistinen I, Powell H, et al. The development of in vitro culture methods to characterize primary T-cell responses to drugs. *Toxicol. Sci.* 2012 May;127(1):150–8.

Faulkner L, Meng X, Park BK, Naisbitt DJ. The importance of hapten-protein complex formation in the development of drug allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2014 Aug;14(4):293–300.

Fili L, Cardilicchia E, Severino MG, Testi S, Matucci A, Vultaggio A, et al. Hapten-specific TH17 cells in the peripheral blood of  $\beta$ -lactam-induced AGEP. *Allergol.* 2014 Mar;63(1):129–31.

Florvaag E, Johansson SGO. The pholcodine story. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2009 Aug;29(3):419–27.

Förster R, Braun A, Worbs T. Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics. *Trends Immunol.* 2012 Jun;33(6):271–80.

Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell.* 1999 Oct 1;99(1):23–33.

Franchi L, Muñoz-Planillo R, Núñez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat. Immunol.* 2012 Apr;13(4):325–32.

Franco V, Perucca E. CYP2C9 polymorphisms and phenytoin metabolism: implications for adverse effects. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2015;11(8):1269–79.

Franken A, Eloff FC, Du Plessis J, Du Plessis JL. In Vitro Permeation of Metals through Human Skin: A Review and Recommendations. *Chem. Res. Toxicol.* 2015 Dec 21;28(12):2237–49.

Frey N, Jossi J, Bodmer M, Bircher A, Jick SS, Meier CR, et al. The Epidemiology of Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis in the UK. *J. Invest. Dermatol.* 2017;137(6):1240–7.

Fullerton A, Hoelgaard A. Binding of nickel to human epidermis in vitro. *Br. J. Dermatol.* 1988 Nov;119(5):675–82.

## G

- Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat. Rev. Immunol.* 2014 Sep;14(9):585–600.
- Gagliani N, Amezcuca Vesely MC, Iseppon A, Brockmann L, Xu H, Palm NW, et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature.* 2015 Jul 9;523(7559):221–5.
- Gajanayaka N, O'Hara S, Konarski Y, Fernandes J, Muthumani K, Kozlowski M, et al. HIV and HIV-Tat inhibit LPS-induced IL-27 production in human macrophages by distinct intracellular signaling pathways. *J. Leukoc. Biol.* 2017 Sep;102(3):925–39.
- Galbiati V, Papale A, Galli CL, Marinovich M, Corsini E. Role of ROS and HMGB1 in contact allergen-induced IL-18 production in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 2014 Nov;134(11):2719–27.
- Gamboa PM. The epidemiology of drug allergy-related consultations in Spanish Allergology services: Alergológica-2005. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2009;19 Suppl 2:45–50.
- Gamerding K, Moulon C, Karp DR, Van Bergen J, Koning F, Wild D, et al. A new type of metal recognition by human T cells: contact residues for peptide-independent bridging of T cell receptor and major histocompatibility complex by nickel. *J. Exp. Med.* 2003 May 19;197(10):1345–53.
- Garg S, Thyssen JP, Uter W, Schnuch A, Johansen JD, Menné T, et al. Nickel allergy following European Union regulation in Denmark, Germany, Italy and the U.K. *Br. J. Dermatol.* 2013 Oct;169(4):854–8.
- Garzon D, Ariza A, Regazzoni L, Clerici R, Altomare A, Sirtori FR, et al. Mass spectrometric strategies for the identification and characterization of human serum albumin covalently adducted by amoxicillin: ex vivo studies. *Chem. Res. Toxicol.* 2014 Sep 15;27(9):1566–74.
- Gascoyne DM, Long E, Veiga-Fernandes H, de Boer J, Williams O, Seddon B, et al. The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. *Nat. Immunol.* 2009 Oct;10(10):1118–24.
- Gaspard I, Guinépain MT, Laurent J, Bachot N, Kerdine S, Bertoglio J, et al. Il-4 and IFN-gamma mRNA induction in human peripheral lymphocytes specific for beta-lactam antibiotics in immediate or delayed hypersensitivity reactions. *J. Clin. Immunol.* 2000 Mar;20(2):107–16.
- Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.* 2005 Oct 14;353(1):38–52.
- Gibson A, Faulkner L, Lichtenfels M, Oge M, Al-Attar Z, Alfirevic A, et al. The Effect of Inhibitory Signals on the Priming of Drug Hapten-Specific T Cells That Express Distinct V $\beta$  Receptors. *J. Immunol.* 2017 Aug 15;199(4):1223–37.
- Gibson A, Kim S-H, Faulkner L, Evelyn J, Pirmohamed M, Park KB, et al. In Vitro Priming of Naïve T-cells with p-Phenylenediamine and Bandrowski's Base. *Chem. Res. Toxicol.* 2015 Oct 19;28(10):2069–77.
- Gibson A, Oge M, Sullivan A, Wang E, Saide K, Whitaker P, et al. Negative regulation by PD-L1 during drug-specific priming of IL-22-secreting T cells and the influence of PD-1 on effector T cell function. *J. Immunol.* 2014 Mar 15;192(6):2611–21.
- Gilissen L, Goossens A. Frequency and trends of contact allergy to and iatrogenic contact dermatitis caused by topical drugs over a 25-year period. *Contact Dermatitis.* 2016 Nov;75(5):290-302

- Gillessen S, Carvajal D, Ling P, Podlaski FJ, Stremlo DL, Familletti PC, et al. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur. J. Immunol.* 1995 Jan;25(1):200–6.
- Gillis CM, Jönsson F, Mancardi DA, Tu N, Beutier H, Van Rooijen N, et al. Mechanisms of anaphylaxis in human low-affinity IgG receptor locus knock-in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017 Apr;139(4):1253–1265.e14.
- Gölz L, Buerfent BC, Hofmann A, Rühl H, Fricker N, Stamminger W, et al. Genome-wide transcriptome induced by nickel in human monocytes. *Acta Biomater.* 2016 Oct 1;43:369–82.
- Gomes ER, Demoly P. Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2005 Aug;5(4):309–16.
- Goriely S, Molle C, Nguyen M, Albarani V, Haddou NO, Lin R, et al. Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. *Blood.* 2006 Feb 1;107(3):1078–84.
- Goriely S, Neurath MF, Goldman M. How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members. *Nat. Rev. Immunol.* 2008 Jan;8(1):81–6.
- Goubier A, Vocanson M, Macari C, Poyet G, Herbelin A, Nicolas J-F, et al. Invariant NKT cells suppress CD8(+) T-cell-mediated allergic contact dermatitis independently of regulatory CD4(+) T cells. *J. Invest. Dermatol.* 2013 Apr;133(4):980–7.
- Griem P, Panthel K, Kalbacher H, Gleichmann E. Alteration of a model antigen by Au(III) leads to T cell sensitization to cryptic peptides. *Eur. J. Immunol.* 1996 Feb;26(2):279–87.
- Griem P, von Vultée C, Panthel K, Best SL, Sadler PJ, Shaw CF. T cell cross-reactivity to heavy metals: identical cryptic peptides may be presented from protein exposed to different metals. *Eur. J. Immunol.* 1998 Jun;28(6):1941–7.
- Guéant-Rodriguez R-M, Romano A, Béri-Dexheimer M, Viola M, Gaeta F, Guéant J-L. Gene-gene interactions of IL13 and IL4RA variants in immediate allergic reactions to betalactam antibiotics. *Pharmacogenet. Genomics.* 2006 Oct;16(10):713–9.
- Guglielmi L, Fontaine C, Gougat C, Avinens O, Eliaou J-F, Guglielmi P, et al. IL-10 promoter and IL4-Ralpha gene SNPs are associated with immediate beta-lactam allergy in atopic women. *Allergy.* 2006 Aug;61(8):921–7.
- Guilliams M, Henri S, Tamoutounour S, Ardouin L, Schwartz-Cornil I, Dalod M, et al. From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets. *Eur. J. Immunol.* 2010 Aug;40(8):2089–94.
- Guironnet G, Dalbiez-Gauthier C, Rousset F, Schmitt D, Péguet-Navarro J. In vitro human T cell sensitization to haptens by monocyte-derived dendritic cells. *Toxicol. Vitro.* 2000 Dec;14(6):517–22.

## H

- Hamann CR, Hamann D, Hamann C, Thyssen JP, Lidén C. The cost of nickel allergy: a global investigation of coin composition and nickel and cobalt release. *Contact Dermatitis.* 2013 Jan;68(1):15–22.
- Happel KI, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ, et al. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J. Immunol.* 2003 May 1;170(9):4432–6.

- Harbour SN, Maynard CL, Zindl CL, Schoeb TR, Weaver CT. Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015 Jun 2;112(22):7061–6.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 2005 Nov;6(11):1123–32.
- Hasegawa H, Mizoguchi I, Chiba Y, Ohashi M, Xu M, Yoshimoto T. Expanding Diversity in Molecular Structures and Functions of the IL-6/IL-12 Heterodimeric Cytokine Family. *Front. Immunol.* 2016 Nov 4;7:479.
- He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmetts CA, Xu H. CD8<sup>+</sup> IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J. Immunol.* 2006 Nov 15;177(10):6852–8.
- Heiss K, Junkes C, Guerreiro N, Swamy M, Camacho-Carvajal MM, Schamel WWA, et al. Subproteomic analysis of metal-interacting proteins in human B cells. *Proteomics.* 2005 Sep;5(14):3614–22.
- Helft J, Anjos-Afonso F, van der Veen AG, Chakravarty P, Bonnet D, Reis E Sousa C. Dendritic Cell Lineage Potential in Human Early Hematopoietic Progenitors. *Cell Rep.* 2017 Jul 18;20(3):529–37.
- Henderson CA, Ilchyshyn A. Vitiligo complicating diphenylpicrylhydrazyl sensitization therapy for alopecia universalis. *Br. J. Dermatol.* 1995 Sep;133(3):496–7.
- Hirata K, Takagi H, Yamamoto M, Matsumoto T, Nishiya T, Mori K, et al. Ticlopidine-induced hepatotoxicity is associated with specific human leukocyte antigen genomic subtypes in Japanese patients: a preliminary case-control study. *Pharmacogenomics J.* 2008 Feb;8(1):29–33.
- Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat. Immunol.* 2011 Mar;12(3):255–63.
- Hirota K, Turner J-E, Villa M, Duarte JH, Demengeot J, Steinmetz OM, et al. Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. *Nat. Immunol.* 2013 Apr;14(4):372–9.
- Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, et al. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J. Exp. Med.* 2007 Nov 26;204(12):2803–12.
- Hitzler M, Majdic O, Heine G, Worm M, Ebert G, Luch A, et al. Human Langerhans cells control Th cells via programmed death-ligand 1 in response to bacterial stimuli and nickel-induced contact allergy. *PLoS One.* 2012;7(10):e46776.
- Holland CJ, Cole DK, Godkin A. Re-Directing CD4(+) T Cell Responses with the Flanking Residues of MHC Class II-Bound Peptides: The Core is Not Enough. *Front. Immunol.* 2013;4:172.
- Honda T, Egawa G, Grabbe S, Kabashima K. Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 2013 Feb;133(2):303–15.
- Hooper KM, Yen J-H, Kong W, Rahbari KM, Kuo P-C, Gamero AM, et al. Prostaglandin E2 Inhibition of IL-27 Production in Murine Dendritic Cells: A Novel Mechanism That Involves IRF1. *J. Immunol.* 2017 Feb 15;198(4):1521–30.
- Hoving JC, Wilson GJ, Brown GD. Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell. Microbiol.* 2014 Feb;16(2):185–94.

- Hughes AR, Mosteller M, Bansal AT, Davies K, Haneline SA, Lai EH, et al. Association of genetic variations in HLA-B region with hypersensitivity to abacavir in some, but not all, populations. *Pharmacogenomics*. 2004 Mar;5(2):203–11.
- Hung S-I, Chung W-H, Liou L-B, Chu C-C, Lin M, Huang H-P, et al. HLA-B\*5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005 Mar 15;102(11):4134–9.
- Huynh V-A, Lungoci E, Villani A, Said BB, Hacard F, Nicolas J-F, et al. Érythème pigmenté fixe à la clarithromycine: importance des tests de provocation pour le diagnostic. *Ann. Dermatol. Vénérologie*. Elsevier; 2016. p. 852–5.

## I

- Ibler KS, Jemec GBE, Garvey LH, Agner T. Prevalence of delayed-type and immediate-type hypersensitivity in healthcare workers with hand eczema. *Contact Dermatitis*. 2016 Oct;75(4):223–9.
- Igea JM. The history of the idea of allergy. *Allergy*. 2013 Aug;68(8):966–73.
- Illing PT, Vivian JP, Dudek NL, Kostenko L, Chen Z, Bharadwaj M, et al. Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire. *Nature*. 2012 Jun 28;486(7404):554–8.
- Imaeda AB, Watanabe A, Sohail MA, Mahmood S, Mohamadnejad M, Sutterwala FS, et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J. Clin. Invest.* 2009 Feb;119(2):305–14.
- Ireland R, Wang R, Alinger JB, Small P, Bosio CM. Francisella tularensis SchuS4 and SchuS4 lipids inhibit IL-12p40 in primary human dendritic cells by inhibition of IRF1 and IRF8. *J. Immunol.* 2013 Aug 1;191(3):1276–86.
- Islam SA, Luster AD. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat. Med.* 2012 May;18(5):705–15.
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006 Sep 22;126(6):1121–33.

## J

- Jalah R, Rosati M, Ganneru B, Pilkington GR, Valentin A, Kulkarni V, et al. The p40 subunit of interleukin (IL)-12 promotes stabilization and export of the p35 subunit: implications for improved IL-12 cytokine production. *J. Biol. Chem.* 2013 Mar 1;288(9):6763–76.
- Jenkins RE, Meng X, Elliott VL, Kitteringham NR, Pirmohamed M, Park BK. Characterisation of flucloxacillin and 5-hydroxymethyl flucloxacillin haptenated HSA in vitro and in vivo. *Proteomics Clin. Appl.* 2009 Jun;3(6):720–9.
- Jenkins RE, Yaseen FS, Monshi MM, Whitaker P, Meng X, Farrell J, et al.  $\beta$ -Lactam antibiotics form distinct haptenic structures on albumin and activate drug-specific T-lymphocyte responses in multiallergic patients with cystic fibrosis. *Chem. Res. Toxicol.* 2013 Jun 17;26(6):963–75.
- Jenkinson C, Jenkins RE, Aleksic M, Pirmohamed M, Naisbitt DJ, Park BK. Characterization of p-phenylenediamine-albumin binding sites and T-cell responses to hapten-modified protein. *J. Invest. Dermatol.* 2010 Mar;130(3):732–42.
- Jiménez-Lamana J, Szpunar J. Analytical approaches for the characterization of nickel proteome. *Met. Integr. Biometal Sci.* 2017 Jul 7;
- Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2012 Jul 13;12(8):557–69.

- Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 2001 Sep;56(9):813–24.
- Johnson J, Molle C, Aksoy E, Goldman M, Goriely S, Willems F. A conventional protein kinase C inhibitor targeting IRF-3-dependent genes differentially regulates IL-12 family members. *Mol. Immunol.* 2011 Jul;48(12–13):1484–93.
- Johnson LA, Jackson DG. The chemokine CX3CL1 promotes trafficking of dendritic cells through inflamed lymphatics. *J. Cell Sci.* 2013 Nov 15;126(Pt 22):5259–70.
- Joint Task Force on Practice Parameters, American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, American College of Allergy, Asthma and Immunology, Joint Council of Allergy, Asthma and Immunology. Drug allergy: an updated practice parameter. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* 2010 Oct;105(4):259–73.
- Jönsson F, Daëron M. Mast cells and company. *Front. Immunol.* 2012;3:16.
- Jönsson F, Mancardi DA, Kita Y, Karasuyama H, Iannascoli B, Van Rooijen N, et al. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J. Clin. Invest.* 2011 Apr;121(4):1484–96.
- K**
- Kabashima K, Shiraishi N, Sugita K, Mori T, Onoue A, Kobayashi M, et al. CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells. *Am. J. Pathol.* 2007 Oct;171(4):1249–57.
- Kaplan DH, Igyártó BZ, Gaspari AA. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat. Rev. Immunol.* 2012 Feb;12(2):114–24.
- Kaplan DH, Jenison MC, Saeland S, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity*. 2005 Dec;23(6):611–20.
- Karlberg A-T, Bergström MA, Börje A, Luthman K, Nilsson JLG. Allergic contact dermatitis—formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers. *Chem. Res. Toxicol.* 2008 Jan;21(1):53–69.
- Kashiwada M, Levy DM, McKeag L, Murray K, Schröder AJ, Canfield SM, et al. IL-4-induced transcription factor NFIL3/E4BP4 controls IgE class switching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010 Jan 12;107(2):821.
- Kashiwada M, Pham N-LL, Pewe LL, Harty JT, Rothman PB. NFIL3/E4BP4 is a key transcription factor for CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cell development. *Blood*. 2011 Jun 9;117(23):6193–7.
- Kavasi R-M, Berdiaki A, Spyridaki I, Corsini E, Tsatsakis A, Tzanakakis G, et al. HA metabolism in skin homeostasis and inflammatory disease. *Food Chem. Toxicol.* 2017 Jan 18;101:128–38.
- Keller M, Lerch M, Britschgi M, Tâche V, Gerber BO, Lüthi M, et al. Processing-dependent and -independent pathways for recognition of iodinated contrast media by specific human T cells. *Clin. Exp. Allergy*. 2010 Feb;40(2):257–68.
- Khan DA. Pharmacogenomics and adverse drug reactions: Primetime and not ready for primetime tests. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016 Oct;138(4):943–55.
- Kim JH, Hu Y, Yongqing T, Kim J, Hughes VA, Le Nours J, et al. CD1a on Langerhans cells controls inflammatory skin disease. *Nat. Immunol.* 2016 Oct;17(10):1159–66.

- Kim JY, Huh K, Lee KY, Yang JM, Kim TJ. Nickel induces secretion of IFN-gamma by splenic natural killer cells. *Exp. Mol. Med.* 2009 Apr 30;41(4):288–95.
- Kim S-H, Saide K, Farrell J, Faulkner L, Tailor A, Ogese M, et al. Characterization of amoxicillin- and clavulanic acid-specific T cells in patients with amoxicillin-clavulanate-induced liver injury. *Hepatology.* 2015 Sep;62(3):887–99.
- Kimber I, Maxwell G, Gilmour N, Dearman RJ, Friedmann PS, Martin SF. Allergic contact dermatitis: a commentary on the relationship between T lymphocytes and skin sensitising potency. *Toxicology.* 2012 Jan 27;291(1–3):18–24.
- Kitajima M, Ziegler SF. Cutting edge: identification of the thymic stromal lymphopoietin-responsive dendritic cell subset critical for initiation of type 2 contact hypersensitivity. *J. Immunol.* 2013 Nov 15;191(10):4903–7.
- Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* 2014 Jun;14(6):377–91.
- Kloetzel PM, Ossendorp F. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 2004 Feb;16(1):76–81.
- Ko T-M, Chung W-H, Wei C-Y, Shih H-Y, Chen J-K, Lin C-H, et al. Shared and restricted T-cell receptor use is crucial for carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011 Dec;128(6):1266–1276.e11.
- Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1989 Sep 1;170(3):827–45.
- Kobayashi T, Matsuoka K, Sheikh SZ, Elloumi HZ, Kamada N, Hisamatsu T, et al. NFIL3 is a regulator of IL-12 p40 in macrophages and mucosal immunity. *J. Immunol.* 2011 Apr 15;186(8):4649–55.
- Kobayashi T, Steinbach EC, Russo SM, Matsuoka K, Nochi T, Maharshak N, et al. NFIL3-deficient mice develop microbiota-dependent, IL-12/23-driven spontaneous colitis. *J. Immunol.* 2014 Feb 15;192(4):1918–27.
- Koch C, Hjelt K, Pedersen SS, Jensen ET, Jensen T, Lanng S, et al. Retrospective clinical study of hypersensitivity reactions to aztreonam and six other beta-lactam antibiotics in cystic fibrosis patients receiving multiple treatment courses. *Rev. Infect. Dis.* 1991 Jun;13 Suppl 7:S608-611.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010 Jun;8(6):423–35.
- Kong K-F, Schnepfer L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 2010 Jan;118(1):1–36.
- Kranke B, Aberer W. Multiple sensitivities to metals. *Contact Dermatitis.* 1996 Mar;34(3):225.
- Krasteva M, Peguet-Navarro J, Moulon C, Courtellemont P, Redziniak G, Schmitt D. In vitro primary sensitization of hapten-specific T cells by cultured human epidermal Langerhans cells—a screening predictive assay for contact sensitizers. *Clin. Exp. Allergy.* 1996 May;26(5):563–70.
- Krebs CF, Schmidt T, Riedel J-H, Panzer U. T helper type 17 cells in immune-mediated glomerular disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 2017 Oct;13(10):647-659.

Kuroishi T, Bando K, Tanaka Y, Shishido K, Kinbara M, Ogawa T, et al. CXCL4 is a novel nickel-binding protein and augments nickel allergy. *Clin. Exp. Allergy*. 2017 Aug;47(8):1069–78.

Kwok WW, Tan V, Gillette L, Littell CT, Soltis MA, LaFond RB, et al. Frequency of epitope-specific naive CD4(+) T cells correlates with immunodominance in the human memory repertoire. *J. Immunol*. 2012 Mar 15;188(6):2537–44.

## L

Landsteiner K, Jacobs J. STUDIES ON THE SENSITIZATION OF ANIMALS WITH SIMPLE CHEMICAL COMPOUNDS. *J. Exp. Med*. 1935 Apr 30;61(5):643–56.

Larsen JM, Bonefeld CM, Poulsen SS, Geisler C, Skov L. IL-23 and T(H)17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2009 Feb;123(2):486–92.

Larson RP, Zimmerli SC, Comeau MR, Itano A, Omori M, Iseki M, et al. Dibutyl phthalate-induced thymic stromal lymphopoietin is required for Th2 contact hypersensitivity responses. *J. Immunol*. 2010 Mar 15;184(6):2974–84.

Lavergne SN, Wang H, Callan HE, Park BK, Naisbitt DJ. “Danger” conditions increase sulfamethoxazole-protein adduct formation in human antigen-presenting cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2009 Nov;331(2):372–81.

Lepoittevin J-P. Metabolism versus chemical transformation or pro- versus prehapten? *Contact Dermatitis*. 2006 Feb;54(2):73–4.

Leyssens L, Vinck B, Van Der Straeten C, Wuyts F, Maes L. Cobalt toxicity in humans-A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology*. 2017 Jul 15;387:43–56.

Li X, Zhong F. Nickel induces interleukin-1 $\beta$  secretion via the NLRP3-ASC-caspase-1 pathway. *Inflammation*. 2014 Apr;37(2):457–66.

Lin C-H, Chen J-K, Ko T-M, Wei C-Y, Wu J-Y, Chung W-H, et al. Immunologic basis for allopurinol-induced severe cutaneous adverse reactions: HLA-B\*58:01-restricted activation of drug-specific T cells and molecular interaction. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2015 Apr;135(4):1063–1065.e5.

Lisby S, Hansen LH, Menn T, Baadsgaard O. Nickel-induced proliferation of both memory and naive T cells in patch test-negative individuals. *Clin. Exp. Immunol*. 1999a Aug;117(2):217–22.

Lisby S, Hansen LH, Skov L, Menné T, Baadsgaard O. Nickel-induced activation of T cells in individuals with negative patch test to nickel sulphate. *Arch. Dermatol. Res*. 1999b May;291(5):247–52.

Liu B, Escalera J, Balakrishna S, Fan L, Caceres AI, Robinson E, et al. TRPA1 controls inflammation and pruritogen responses in allergic contact dermatitis. *FASEB*. 2013 Sep;27(9):3549–63.

Liu J, Guan X, Ma X. Regulation of IL-27 p28 gene expression in macrophages through MyD88- and interferon-gamma-mediated pathways. *J. Exp. Med*. 2007 Jan 22;204(1):141–52.

Liu J, Harberts E, Tammaro A, Girardi N, Filler RB, Fischelevich R, et al. IL-9 regulates allergen-specific Th1 responses in allergic contact dermatitis. *J. Invest. Dermatol*. 2014 Jul;134(7):1903–11.

Liu W, Ouyang X, Yang J, Liu J, Li Q, Gu Y, et al. AP-1 activated by toll-like receptors regulates expression of IL-23 p19. *J. Biol. Chem*. 2009 Sep 4;284(36):24006–16.

- Lochmatter P, Beeler A, Kawabata TT, Gerber BO, Pichler WJ. Drug-specific in vitro release of IL-2, IL-5, IL-13 and IFN-gamma in patients with delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy*. 2009 Sep;64(9):1269–78.
- Lombardi G, Germain C, Uren J, Fiorillo MT, du Bois RM, Jones-Williams W, et al. HLA-DP allele-specific T cell responses to beryllium account for DP-associated susceptibility to chronic beryllium disease. *J. Immunol*. 2001 Mar 1;166(5):3549–55.
- López CB, Kalergis AM, Becker MI, Garbarino JA, De Ioannes AE. CD8+ T cells are the effectors of the contact dermatitis induced by urushiol in mice and are regulated by CD4+ T cells. *Int. Arch. Allergy Immunol*. 1998 Nov;117(3):194–201.
- Lopez S, Gomez E, Torres MJ, Pozo D, Fernandez TD, Ariza A, et al. Betalactam antibiotics affect human dendritic cells maturation through MAPK/NF-kB systems. Role in allergic reactions to drugs. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2015 Nov 1;288(3):289–99.
- Lu L, Vollmer J, Moulon C, Weltzien HU, Marrack P, Kappler J. Components of the ligand for a Ni<sup>++</sup> reactive human T cell clone. *J. Exp. Med*. 2003 Mar 3;197(5):567–74.
- Lu W, Li X, Uetrecht JP. Changes in gene expression induced by carbamazepine and phenytoin: testing the danger hypothesis. *J. Immunotoxicol*. 2008 Apr;5(2):107–13.
- Lucas A, Lucas M, Strhyn A, Keane NM, McKinnon E, Pavlos R, et al. Abacavir-reactive memory T cells are present in drug naïve individuals. *PloS One*. 2015;10(2):e0117160.
- Lucassen M, Sarkar B. Nickel(II)-binding constituents of human blood serum. *J. Toxicol. Environ. Health*. 1979 Sep;5(5):897–905.
- Luis A, Martins JD, Silva A, Ferreira I, Cruz MT, Neves BM. Oxidative stress-dependent activation of the eIF2 $\alpha$ -ATF4 unfolded protein response branch by skin sensitizer 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene modulates dendritic-like cell maturation and inflammatory status in a biphasic manner [corrected]. *Free Radic. Biol. Med*. 2014 Dec;77:217–29.
- Lyakh L, Trinchieri G, Provezza L, Carra G, Gerosa F. Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans. *Immunol. Rev*. 2008 Dec;226:112–31.

## M

- Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, et al. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J. Exp. Med*. 1996 Jan 1;183(1):147–57.
- MacFadden DR, LaDelfa A, Leen J, Gold WL, Daneman N, Weber E, et al. Impact of Reported Beta-Lactam Allergy on Inpatient Outcomes: A Multicenter Prospective Cohort Study. *Clin. Infect. Dis*. 2016 Oct 1;63(7):904–10.
- Magi B, Marzocchi B, Bini L, Cellesi C, Rossolini A, Pallini V. Two-dimensional electrophoresis of human serum proteins modified by ampicillin during therapeutic treatment. *Electrophoresis*. 1995 Jul;16(7):1190–2.
- Male V, Nisoli I, Kostrzewski T, Allan DSJ, Carlyle JR, Lord GM, et al. The transcription factor E4bp4/Nfil3 controls commitment to the NK lineage and directly regulates Eomes and Id2 expression. *J. Exp. Med*. 2014 Apr 7;211(4):635–42.
- Malissen B, Bongrand P. Early T cell activation: integrating biochemical, structural, and biophysical cues. *Annu. Rev. Immunol*. 2015;33:539–61.

- Malissen B, Tamoutounour S, Henri S. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat. Rev. Immunol.* 2014 Jun;14(6):417–28.
- Mallal S, Nolan D, Witt C, Masel G, Martin AM, Moore C, et al. Association between presence of HLA-B\*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet.* 2002 Mar 2;359(9308):727–32.
- Manchanda T, Hess D, Dale L, Ferguson SG, Rieder MJ. Haptenation of sulfonamide reactive metabolites to cellular proteins. *Mol. Pharmacol.* 2002 Nov;62(5):1011–26.
- Manome H, Aiba S, Tagami H. Simple chemicals can induce maturation and apoptosis of dendritic cells. *Immunology.* 1999 Dec;98(4):481–90.
- Mardivirin L, Valeyrie-Allanore L, Branlant-Redon E, Beneton N, Jidar K, Barbaud A, et al. Amoxicillin-induced flare in patients with DRESS (Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms): report of seven cases and demonstration of a direct effect of amoxicillin on Human Herpesvirus 6 replication in vitro. *Eur. J. Dermatol.* 2010 Feb;20(1):68–73.
- Martin S, Lappin MB, Kohler J, Delattre V, Leicht C, Preckel T, et al. Peptide immunization indicates that CD8+ T cells are the dominant effector cells in trinitrophenyl-specific contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 2000 Aug;115(2):260–6.
- Martin SF. Contact dermatitis: from pathomechanisms to immunotoxicology. *Exp. Dermatol.* 2012 May;21(5):382–9.
- Martin SF. Adaptation in the innate immune system and heterologous innate immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014 Nov;71(21):4115–30.
- Martin SF, Dudda JC, Bachtanian E, Lembo A, Liller S, Dürr C, et al. Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 2008 Sep 1;205(9):2151–62.
- Martin SF, Esser PR, Schmucker S, Dietz L, Naisbitt DJ, Park BK, et al. T-cell recognition of chemicals, protein allergens and drugs: towards the development of in vitro assays. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010 Dec;67(24):4171–84.
- Martin SF, Esser PR, Weber FC, Jakob T, Freudenberg MA, Schmidt M, et al. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy.* 2011 Sep;66(9):1152–63.
- Martin SF, Merfort I, Thierse H-J. Interactions of chemicals and metal ions with proteins and role for immune responses. *Mini Rev. Med. Chem.* 2006 Mar;6(3):247–55.
- Mattner F, Ozmen L, Podlaski FJ, Wilkinson VL, Presky DH, Gately MK, et al. Treatment with homodimeric interleukin-12 (IL-12) p40 protects mice from IL-12-dependent shock but not from tumor necrosis factor alpha-dependent shock. *Infect. Immun.* 1997 Nov;65(11):4734–7.
- Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 1994;12:991–1045.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002 Apr 12;296(5566):301–5.
- Matzinger P. The evolution of the danger theory. Interview by Lauren Constable, Commissioning Editor. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2012 May;8(4):311–7.
- Mauri-Hellweg D, Bettens F, Mauri D, Brander C, Hunziker T, Pichler WJ. Activation of drug-specific CD4+ and CD8+ T cells in individuals allergic to sulfonamides, phenytoin, and carbamazepine. *J. Immunol.* 1995 Jul 1;155(1):462–72.

- Mayorga C, Celik G, Rouzair P, Whitaker P, Bonadonna P, Rodrigues-Cernadas J, et al. In vitro tests for drug hypersensitivity reactions: an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper. *Allergy*. 2016;71(8):1103–34.
- Mayorga C, Obispo T, Jimeno L, Blanca M, Moscoso del Prado J, Carreira J, et al. Epitope mapping of beta-lactam antibiotics with the use of monoclonal antibodies. *Toxicology*. 1995 Mar 31;97(1–3):225–34.
- Megherbi R, Kiorpelidou E, Foster B, Rowe C, Naisbitt DJ, Goldring CE, et al. Role of protein haptentation in triggering maturation events in the dendritic cell surrogate cell line THP-1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009 Jul 15;238(2):120–32.
- Meloun B, Morávek L, Kostka V. Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS*. 1975 Oct 15;58(1):134–7.
- Meng X, Al-Attar Z, Yaseen FS, Jenkins R, Earnshaw C, Whitaker P, et al. Definition of the Nature and Hapten Threshold of the  $\beta$ -Lactam Antigen Required for T Cell Activation In Vitro and in Patients. *J. Immunol.* 2017 Jun 1;198(11):4217–27.
- Meng X, Howarth A, Earnshaw CJ, Jenkins RE, French NS, Back DJ, et al. Detection of drug bioactivation in vivo: mechanism of nevirapine-albumin conjugate formation in patients. *Chem. Res. Toxicol.* 2013 Apr 15;26(4):575–83.
- Meng X, Jenkins RE, Berry NG, Maggs JL, Farrell J, Lane CS, et al. Direct evidence for the formation of diastereoisomeric benzylpenicilloyl haptens from benzylpenicillin and benzylpenicillic acid in patients. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011 Sep;338(3):841–9.
- Meng X, Lawrenson AS, Berry NG, Maggs JL, French NS, Back DJ, et al. Abacavir forms novel cross-linking abacavir protein adducts in patients. *Chem. Res. Toxicol.* 2014 Apr 21;27(4):524–35.
- Menne T. Relationship between cobalt and nickel sensitization in females. *Contact Dermatitis*. 1980 Aug;6(5):337–40.
- Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 2013;31:563–604.
- Mertes PM, Alla F, Tréchet P, Auroy Y, Jouglu E, Groupe d'Etudes des Réactions Anaphylactoïdes Peranesthésiques. Anaphylaxis during anesthesia in France: an 8-year national survey. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011a Aug;128(2):366–73.
- Mertes P-M, Karila C, Demoly P, Auroy Y, Ponvert C, Lucas M-M, et al. [What is the reality of anaphylactoid reactions during anaesthesia? Classification, prevalence, clinical features, drugs involved and morbidity and mortality]. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 2011b Mar;30(3):223–39.
- van der Merwe PA, Dushek O. Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat. Rev. Immunol.* 2011 Jan;11(1):47–55.
- Messenheimer J, Mullens EL, Giorgi L, Young F. Safety review of adult clinical trial experience with lamotrigine. *Drug Saf.* 1998 Apr;18(4):281–96.
- Migdal C, Botton J, El Ali Z, Azoury M-E, Guldemann J, Giménez-Arnau E, et al. Reactivity of chemical sensitizers toward amino acids in cellulo plays a role in the activation of the Nrf2-ARE pathway in human monocyte dendritic cells and the THP-1 cell line. *Toxicol. Sci.* 2013 Jun;133(2):259–74.
- Minang JT, Areström I, Troye-Blomberg M, Lundeberg L, Ahlborg N. Nickel, cobalt, chromium, palladium and gold induce a mixed Th1- and Th2-type cytokine response in vitro in subjects with contact allergy to the respective metals. *Clin. Exp. Immunol.* 2006 Dec;146(3):417–26.

- Minang JT, Troye-Blomberg M, Lundeberg L, Ahlborg N. Nickel elicits concomitant and correlated in vitro production of Th1-, Th2-type and regulatory cytokines in subjects with contact allergy to nickel. *Scand. J. Immunol.* 2005 Sep;62(3):289–96.
- Moed H, von Blomberg BME, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Gibbs S, Rustemeyer T. Regulation of nickel-induced T-cell responsiveness by CD4+CD25+ cells in contact allergic patients and healthy individuals. *Contact Dermatitis.* 2005 Aug;53(2):71–4.
- Molle C, Goldman M, Goriely S. Critical role of the IFN-stimulated gene factor 3 complex in TLR-mediated IL-27p28 gene expression revealing a two-step activation process. *J. Immunol.* 2010 Feb 15;184(4):1784–92.
- Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature.* 1998 Sep 3;395(6697):82–6.
- Monshi MM, Faulkner L, Gibson A, Jenkins RE, Farrell J, Earnshaw CJ, et al. Human leukocyte antigen (HLA)-B\*57:01-restricted activation of drug-specific T cells provides the immunological basis for flucloxacillin-induced liver injury. *Hepatology.* 2013 Feb;57(2):727–39.
- Montañez MI, Mayorga C, Bogas G, Barrionuevo E, Fernandez-Santamaria R, Martin-Serrano A, et al. Epidemiology, Mechanisms, and Diagnosis of Drug-Induced Anaphylaxis. *Front. Immunol.* 2017;8:614.
- Montañez MI, Mayorga C, Torres MJ, Ariza A, Blanca M, Perez-Inestrosa E. Synthetic approach to gain insight into antigenic determinants of cephalosporins: in vitro studies of chemical structure-IgE molecular recognition relationships. *Chem. Res. Toxicol.* 2011 May 16;24(5):706–17.
- Moon JJ, Chu HH, Pepper M, McSorley SJ, Jameson SC, Kedl RM, et al. Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity.* 2007 Aug;27(2):203–13.
- Moon JJ, Jenkins MK. The human T-cell repertoire grows up. *Immunol. Cell Biol.* 2015 Aug;93(7):601–2.
- Moreno E, Laffond E, Muñoz-Bellido FJ, Gracia MT, Macías EM, Dávila I. Using beta-lactam antibiotics in patients with a history of beta-lactam allergy: current concepts. *Pol. Arch. Intern. Med.* 2017 Jul 19;
- Moss E, Debeuckelaere C, Berl V, Elbayed K, Moussallieh F-M, Namer I-J, et al. In Situ Metabolism of Cinnamyl Alcohol in Reconstructed Human Epidermis: New Insights into the Activation of This Fragrance Skin Sensitizer. *Chem. Res. Toxicol.* 2016 Jul 18;29(7):1172–8.
- Moulon C, Péguet-Navarro J, Courtellemont P, Redziniak G, Schmitt D. In vitro primary sensitization and restimulation of hapten-specific T cells by fresh and cultured human epidermal Langerhans' cells. *Immunology.* 1993 Nov;80(3):373–9.
- Moulon C, Vollmer J, Weltzien HU. Characterization of processing requirements and metal cross-reactivities in T cell clones from patients with allergic contact dermatitis to nickel. *Eur. J. Immunol.* 1995 Dec;25(12):3308–15.
- Mussotter F, Tamm JM, El Ali Z, Pallardy M, Kerdine-Römer S, Götz M, et al. Proteomics analysis of dendritic cell activation by contact allergens reveals possible biomarkers regulated by Nrf2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2016 Dec 15;313:170–9.
- Muto J, Morioka Y, Yamasaki K, Kim M, Garcia A, Carlin AF, et al. Hyaluronan digestion controls DC migration from the skin. *J. Clin. Invest.* 2014 Mar;124(3):1309–19.

## N

- Naisbitt DJ, Britschgi M, Wong G, Farrell J, Depta JPH, Chadwick DW, et al. Hypersensitivity reactions to carbamazepine: characterization of the specificity, phenotype, and cytokine profile of drug-specific T cell clones. *Mol. Pharmacol.* 2003 Mar;63(3):732–41.
- Naisbitt DJ, Farrell J, Gordon SF, Maggs JL, Burkhart C, Pichler WJ, et al. Covalent binding of the nitroso metabolite of sulfamethoxazole leads to toxicity and major histocompatibility complex-restricted antigen presentation. *Mol. Pharmacol.* 2002 Sep;62(3):628–37.
- Naisbitt DJ, Hough SJ, Gill HJ, Pirmohamed M, Kitteringham NR, Park BK. Cellular disposition of sulphamethoxazole and its metabolites: implications for hypersensitivity. *Br. J. Pharmacol.* 1999 Mar;126(6):1393–407.
- Naisbitt DJ, Natrass RG, Ogese MO. In vitro diagnosis of delayed-type drug hypersensitivity: mechanistic aspects and unmet needs. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2014 Aug;34(3):691–705, x.
- Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity.* 2002 Sep;17(3):375–87.
- Nasorri F, Sebastiani S, Mariani V, De Pittà O, Puddu P, Girolomoni G, et al. Activation of nickel-specific CD4+ T lymphocytes in the absence of professional antigen-presenting cells. *J. Invest. Dermatol.* 2002 Jan;118(1):172–9.
- Neefjes J, Jongasma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 2011 Nov 11;11(12):823–36.
- Negishi H, Fujita Y, Yanai H, Sakaguchi S, Ouyang X, Shinohara M, et al. Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006 Oct 10;103(41):15136–41.
- Nestle FO, Di Meglio P, Qin J-Z, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2009 Oct;9(10):679–91.
- Neves BM, Gonçalo M, Figueiredo A, Duarte CB, Lopes MC, Cruz MT. Signal transduction profile of chemical sensitizers in dendritic cells: an endpoint to be included in a cell-based in vitro alternative approach to hazard identification? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2011 Jan 15;250(2):87–95.
- Nhim C, Delluc S, Halgand F, de Chaisemartin L, Weaver RJ, Claude N, et al. Identification and frequency of circulating CD4(+) T lymphocytes specific to Benzylpenicillin in healthy donors. *Allergy.* 2013 Jul;68(7):899–905.
- Nikitovic D, Berdiaki A, Galbiati V, Kavasi R-M, Papale A, Tsatsakis A, et al. Hyaluronan regulates chemical allergen-induced IL-18 production in human keratinocytes. *Toxicol. Lett.* 2015 Jan 5;232(1):89–97.
- Nikolich-Zugich J, Slifka MK, Messaoudi I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 2004 Feb;4(2):123–32.
- Noirey N, Rougier N, André C, Schmitt D, Vincent C. Langerhans-like dendritic cells generated from cord blood progenitors internalize pollen allergens by macropinocytosis, and part of the molecules are processed and can activate autologous naive T lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000 Jun;105(6 Pt 1):1194–201.
- Noordegraaf M, Flacher V, Stoitzner P, Clausen BE. Functional redundancy of Langerhans cells and Langerin+ dermal dendritic cells in contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 2010 Dec;130(12):2752–9.

- Norcross MA, Luo S, Lu L, Boyne MT, Gomarteli M, Rennels AD, et al. Abacavir induces loading of novel self-peptides into HLA-B\*57: 01: an autoimmune model for HLA-associated drug hypersensitivity. *AIDS*. 2012 Jul 17;26(11):F21-29.
- Novak N, Baurecht H, Schäfer T, Rodriguez E, Wagenpfeil S, Klopp N, et al. Loss-of-function mutations in the filaggrin gene and allergic contact sensitization to nickel. *J. Invest. Dermatol.* 2008 Jun;128(6):1430–5.
- Noval Rivas M, Chatila TA. Regulatory T cells in allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016 Sep;138(3):639–52.
- Nuriya S, Enomoto S, Azuma M. The role of CTLA-4 in murine contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 2001 May;116(5):764–8.
- O**
- Oblak A, Pohar J, Jerala R. MD-2 determinants of nickel and cobalt-mediated activation of human TLR4. *PloS One*. 2015;10(3):e0120583.
- Ochiai S, Roediger B, Abtin A, Shklovskaya E, Fazekas de St Groth B, Yamane H, et al. CD326(lo)CD103(lo)CD11b(lo) dermal dendritic cells are activated by thymic stromal lymphopoietin during contact sensitization in mice. *J. Immunol.* 2014 Sep 1;193(5):2504–11.
- O'Donohue J, Oien KA, Donaldson P, Underhill J, Clare M, MacSween RN, et al. Co-amoxiclav jaundice: clinical and histological features and HLA class II association. *Gut*. 2000 Nov;47(5):717–20.
- Ogese MO, Jenkins RE, Maggs JL, Meng X, Whitaker P, Peckham D, et al. Characterization of Peroxidases Expressed in Human Antigen Presenting Cells and Analysis of the Covalent Binding of Nitroso Sulfamethoxazole to Myeloperoxidase. *Chem. Res. Toxicol.* 2015 Jan 20;28(1):144–54.
- Onami K, Kimura Y, Ito Y, Yamauchi T, Yamasaki K, Aiba S. Nonmetal haptens induce ATP release from keratinocytes through opening of pannexin hemichannels by reactive oxygen species. *J. Invest. Dermatol.* 2014 Jul;134(7):1951–60.
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000 Nov;13(5):715–25.
- Ortmann B, Martin S, von Bonin A, Schiltz E, Hoschützky H, Weltzien HU. Synthetic peptides anchor T cell-specific TNP epitopes to MHC antigens. *J. Immunol.* 1992 Mar 1;148(5):1445–50.
- Ostrov DA, Grant BJ, Pompeu YA, Sidney J, Harndahl M, Southwood S, et al. Drug hypersensitivity caused by alteration of the MHC-presented self-peptide repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012 Jun 19;109(25):9959–64.
- Oura J, Tamura Y, Kamiguchi K, Kutomi G, Sahara H, Torigoe T, et al. Extracellular heat shock protein 90 plays a role in translocating chaperoned antigen from endosome to proteasome for generating antigenic peptide to be cross-presented by dendritic cells. *Int. Immunol.* 2011 Apr;23(4):223–37.
- Ouwehand K, Santegoets SJAM, Bruynzeel DP, Scheper RJ, de Gruijl TD, Gibbs S. CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis. *Eur. J. Immunol.* 2008 Nov;38(11):3050–9.
- Ouyang X, Negishi H, Takeda R, Fujita Y, Taniguchi T, Honda K. Cooperation between MyD88 and TRIF pathways in TLR synergy via IRF5 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007 Mar 23;354(4):1045–51.
- Owaki T, Asakawa M, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 induces Th1 differentiation via p38 MAPK/T-bet- and intercellular adhesion molecule-1/LFA-1/ERK1/2-dependent pathways. *J. Immunol.* 2006 Dec 1;177(11):7579–87.

Owaki T, Asakawa M, Morishima N, Hata K, Fukai F, Matsui M, et al. A role for IL-27 in early regulation of Th1 differentiation. *J. Immunol.* 2005 Aug 15;175(4):2191–200.

## P

Padovan E, Bauer T, Tongio MM, Kalbacher H, Weltzien HU. Penicilloyl peptides are recognized as T cell antigenic determinants in penicillin allergy. *Eur. J. Immunol.* 1997 Jun;27(6):1303–7.

Pallardy M, Bechara R. Chemical or drug hypersensitivity: is the immune system clearing the danger? *Toxicol. Sci.* 2017 May 4;

Papale A, Kummer E, Galbiati V, Marinovich M, Galli CL, Corsini E. Understanding chemical allergen potency: role of NLRP12 and Blimp-1 in the induction of IL-18 in human keratinocytes. *Arch. Toxicol.* 2017 Apr;91(4):1783–94.

Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 2005 Nov;6(11):1133–41.

Park HS, Nakagawa I, Yokoyama S, Wajima D, Wada T, Motoyama Y, et al. Nickel-associated delayed multiple white matter lesions after stent-assisted coil embolization of intracranial unruptured aneurysm. *BMJ Case Rep.* 2017 Feb 20;2017.

Park WB, Choe PG, Song K-H, Lee S, Jang H-C, Jeon JH, et al. Should HLA-B\*5701 screening be performed in every ethnic group before starting abacavir? *Clin. Infect. Dis.* 2009 Feb 1;48(3):365–7.

Peña-Cruz V, McDonough SM, Diaz-Griffero F, Crum CP, Carrasco RD, Freeman GJ. PD-1 on immature and PD-1 ligands on migratory human Langerhans cells regulate antigen-presenting cell activity. *J. Invest. Dermatol.* 2010 Sep;130(9):2222–30.

Pennino D, Eyerich K, Scarponi C, Carbone T, Eyerich S, Nasorri F, et al. IL-17 amplifies human contact hypersensitivity by licensing hapten nonspecific Th1 cells to kill autologous keratinocytes. *J. Immunol.* 2010 May 1;184(9):4880–8.

Pérez Pimiento A, Gómez Martínez M, Mínguez Mena A, Trampal González A, de Paz Arranz S, Rodríguez Mosquera M. Aztreonam and ceftazidime: evidence of in vivo cross allergenicity. *Allergy.* 1998 Jun;53(6):624–5.

Perez-Inestrosa E, Suau R, Montañez MI, Rodriguez R, Mayorga C, Torres MJ, et al. Cephalosporin chemical reactivity and its immunological implications. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2005 Aug;5(4):323–30.

Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. *Immunity.* 2002 Jun;16(6):779–90.

Piccotti JR, Chan SY, Li K, Eichwald EJ, Bishop DK. Differential effects of IL-12 receptor blockade with IL-12 p40 homodimer on the induction of CD4+ and CD8+ IFN-gamma-producing cells. *J. Immunol.* 1997 Jan 15;158(2):643–8.

Pichler WJ, Yerly D. Drug hypersensitivity: we need to do more. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2017 Nov 16. [Epub ahead of print]

Pichler WJ. Drug allergy: Pathogenesis [Internet]. UpToDate. 2017 [cited 2017 Jul 28]. Available from: [https://ezproxy.usj.edu.lb:4555/contents/drug-allergy-pathogenesis?source=see\\_link](https://ezproxy.usj.edu.lb:4555/contents/drug-allergy-pathogenesis?source=see_link)

Pichler WJ. Delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann. Intern. Med.* 2003 Oct 21;139(8):683–93.

- Pichler WJ, Adam J, Daubner B, Gentinetta T, Keller M, Yerly D. Drug hypersensitivity reactions: pathomechanism and clinical symptoms. *Med. Clin. North Am.* 2010 Jul;94(4):645–664, xv.
- Pichler WJ, Adam J, Watkins S, Wullemmin N, Yun J, Yerly D. Drug Hypersensitivity: How Drugs Stimulate T Cells via Pharmacological Interaction with Immune Receptors. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2015;168(1):13–24.
- Pichler WJ, Hausmann O. Classification of Drug Hypersensitivity into Allergic, p-i, and Pseudo-Allergic Forms. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2016;171(3–4):166–79.
- Pichler WJ, Naisbitt DJ, Park BK. Immune pathomechanism of drug hypersensitivity reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011 Mar;127(3 Suppl):S74-81.
- Pickard C, Smith AM, Cooper H, Strickland I, Jackson J, Healy E, et al. Investigation of mechanisms underlying the T-cell response to the hapten 2,4-dinitrochlorobenzene. *J. Invest. Dermatol.* 2007 Mar;127(3):630–7.
- Pirmohamed M, Alfirevic A, Vilar J, Stalford A, Wilkins EG, Sim E, et al. Association analysis of drug metabolizing enzyme gene polymorphisms in HIV-positive patients with co-trimoxazole hypersensitivity. *Pharmacogenetics.* 2000 Nov;10(8):705–13.
- Pleasant RA, Walker TR, Samuelson WM. Allergic reactions to parenteral beta-lactam antibiotics in patients with cystic fibrosis. *Chest.* 1994 Oct;106(4):1124–8.
- Posadas SJ, Pichler WJ. Delayed drug hypersensitivity reactions - new concepts. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 2007 Jul;37(7):989–99.
- Pot C, Apetoh L, Awasthi A, Kuchroo VK. Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of T(H)17 cells by IL-27. *Semin. Immunol.* 2011 Dec;23(6):438–45.
- Pot C, Jin H, Awasthi A, Liu SM, Lai C-Y, Madan R, et al. Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells. *J. Immunol.* 2009 Jul 15;183(2):797–801.
- Pot LM, Scheitza SM, Coenraads P-J, Blömeke B. Penetration and haptentation of p-phenylenediamine. *Contact Dermatitis.* 2013 Apr;68(4):193–207.
- Prescott SL, Larcombe D-L, Logan AC, West C, Burks W, Caraballo L, et al. The skin microbiome: impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming. *World Allergy Organ. J.* 2017;10(1):29.

## Q

- Qian X, Ning H, Zhang J, Hoft DF, Stumpo DJ, Blackshear PJ, et al. Posttranscriptional regulation of IL-23 expression by IFN-gamma through tristetraprolin. *J. Immunol.* 2011 Jun 1;186(11):6454–64.
- Qiao H-L, Yang J, Zhang Y-W. Relationships between specific serum IgE, cytokines and polymorphisms in the IL-4, IL-4Ralpha in patients with penicillins allergy. *Allergy.* 2005 Aug;60(8):1053–9.

## R

- Rachmawati D, Alsalem IWA, Bontkes HJ, Verstege MI, Gibbs S, von Blomberg BME, et al. Innate stimulatory capacity of high molecular weight transition metals Au (gold) and Hg (mercury). *Toxicol. Vitro.* 2015 Mar;29(2):363–9.

- Rachmawati D, Bontkes HJ, Verstege MI, Muris J, von Blomberg BME, Scheper RJ, et al. Transition metal sensing by Toll-like receptor-4: next to nickel, cobalt and palladium are potent human dendritic cell stimulators. *Contact Dermatitis*. 2013 Jun;68(6):331–8.
- Raghavan B, Martin SF, Esser PR, Goebeler M, Schmidt M. Metal allergens nickel and cobalt facilitate TLR4 homodimerization independently of MD2. *EMBO Rep*. 2012 Dec;13(12):1109–15.
- Raimondo S. Exosomes as delivery vehicles: a commentary on “Amoxicillin haptens intracellular proteins that can be transported in exosomes to target cells.” *Ann. Transl. Med*. 2017 Feb;5(4):89.
- Ramnath D, Tunny K, Hohenhaus DM, Pitts CM, Bergot A-S, Hogarth PM, et al. TLR3 drives IRF6-dependent IL-23p19 expression and p19/EBI3 heterodimer formation in keratinocytes. *Immunol. Cell Biol*. 2015 Oct;93(9):771–9.
- Ratzinger G, Stoitzner P, Ebner S, Lutz MB, Layton GT, Rainer C, et al. Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *J. Immunol*. 2002 May 1;168(9):4361–71.
- Re F, Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J. Biol. Chem*. 2001 Oct 5;276(40):37692–9.
- Rehman K, Fatima F, Waheed I, Akash MSH. Prevalence of Exposure of Heavy Metals and Their Impact on Health Consequences. *J. Cell. Biochem*. 2017 Jun 23;
- Rezuke WN, Knight JA, Sunderman FW. Reference values for nickel concentrations in human tissues and bile. *Am. J. Ind. Med*. 1987;11(4):419–26.
- Richeldi L, Sorrentino R, Saltini C. HLA-DPB1 glutamate 69: a genetic marker of beryllium disease. *Science*. 1993 Oct 8;262(5131):242–4.
- Richter A, Schmucker SS, Esser PR, Traska V, Weber V, Dietz L, et al. Human T cell priming assay (hTCPA) for the identification of contact allergens based on naive T cells and DC–IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  readout. *Toxicol. Vitro*. 2013 Apr;27(3):1180–5.
- Rieder MJ, Shear NH, Kanee A, Tang BK, Spielberg SP. Prominence of slow acetylator phenotype among patients with sulfonamide hypersensitivity reactions. *Clin. Pharmacol. Ther*. 1991 Jan;49(1):13–7.
- Riemann H, Schwarz A, Grabbe S, Aragane Y, Luger TA, Wysocka M, et al. Neutralization of IL-12 in vivo prevents induction of contact hypersensitivity and induces hapten-specific tolerance. *J. Immunol*. 1996 Mar 1;156(5):1799–803.
- Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol*. 2015 Apr;15(4):203–16.
- Rock KL, Shen L. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol. Rev*. 2005 Oct;207:166–83.
- Romagnoli P, Labhardt AM, Sinigaglia F. Selective interaction of Ni with an MHC-bound peptide. *EMBO J*. 1991 Jun;10(6):1303–6.
- Romano A, Gaeta F, Arribas Poves MF, Valluzzi RL. Cross-Reactivity among Beta-Lactams. *Curr. Allergy Asthma Rep*. 2016 Mar;16(3):24.

- Romano A, Gaeta F, Valluzzi RL, Maggioletti M, Zaffiro A, Caruso C, et al. IgE-mediated hypersensitivity to cephalosporins: Cross-reactivity and tolerability of alternative cephalosporins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015 Sep;136(3):685–691.e3.
- Romano A, Torres MJ, Castells M, Sanz ML, Blanca M. Diagnosis and management of drug hypersensitivity reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011;127(3):S67–73.
- Röse L, Schneider C, Stock C, Zollner TM, Döcke W-D. Extended DNFB-induced contact hypersensitivity models display characteristics of chronic inflammatory dermatoses. *Exp. Dermatol.* 2012 Jan;21(1):25–31.
- Roses RE, Xu S, Xu M, Koldovsky U, Koski G, Czerniecki BJ. Differential production of IL-23 and IL-12 by myeloid-derived dendritic cells in response to TLR agonists. *J. Immunol.* 2008 Oct 1;181(7):5120–7.
- Rougier N, Redziniak G, Mougín D, Schmitt D, Vincent C. In vitro evaluation of the sensitization potential of weak contact allergens using langerhans-like dendritic cells and autologous T cells. *Toxicology.* 2000 Apr 7;145(1):73–82.
- Rougier N, Redziniak G, Schmitt D, Vincent C. Evaluation of the capacity of dendritic cells derived from cord blood CD34+ precursors to present haptens to unsensitized autologous T cells in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 1998 Apr;110(4):348–52.
- Roujeau J-C. Clinical heterogeneity of drug hypersensitivity. *Toxicology.* 2005;209(2):123–9.
- Roujeau J-C, Haddad C, Paulmann M, Mockenhaupt M. Management of nonimmediate hypersensitivity reactions to drugs. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2014 Aug;34(3):473–487, vii.
- Rouse BT, Sehrawat S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nat. Rev. Immunol.* 2010 Jul;10(7):514–26.
- Rowley DA, Fitch FW. The road to the discovery of dendritic cells, a tribute to Ralph Steinman. *Cell. Immunol.* 2012;273(2):95–8.
- Russo E, Teijeira A, Vaahtomeri K, Willrodt A-H, Bloch JS, Nitschké M, et al. Intralymphatic CCL21 Promotes Tissue Egress of Dendritic Cells through Afferent Lymphatic Vessels. *Cell Rep.* 2016 Feb 23;14(7):1723–34.
- Rustemeyer T, De Ligter S, Von Blomberg BM, Frosch PJ, Scheper RJ. Human T lymphocyte priming in vitro by haptenated autologous dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 1999 Aug;117(2):209–16.
- Ryan CA, Kimber I, Basketter DA, Pallardy M, Gildea LA, Gerberick GF. Dendritic cells and skin sensitization: biological roles and uses in hazard identification. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007 Jun 15;221(3):384–94.
- Rystedt I, Fischer T. Relationship between nickel and cobalt sensitization in hard metal workers. *Contact Dermatitis.* 1983 May;9(3):195–200.

## S

- Saito M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Molecular Mechanisms of Nickel Allergy. *Int. J. Mol. Sci.* 2016 Feb 2;17(2).
- Sánchez-Gómez FJ, González-Morena JM, Vida Y, Pérez-Inestrosa E, Blanca M, Torres MJ, et al. Amoxicillin haptens intracellular proteins that can be transported in exosomes to target cells. *Allergy.* 2017 Mar;72(3):385–96.
- Sanchez-Quintero MJ, Torres MJ, Blazquez AB, Gómez E, Fernandez TD, Doña I, et al. Synergistic effect between amoxicillin and TLR ligands on dendritic cells from amoxicillin-delayed allergic patients. *PloS One.* 2013;8(9):e74198.

- Sanderson JP, Naisbitt DJ, Farrell J, Ashby CA, Tucker MJ, Rieder MJ, et al. Sulfamethoxazole and its metabolite nitroso sulfamethoxazole stimulate dendritic cell costimulatory signaling. *J. Immunol.* 2007 May 1;178(9):5533–42.
- Santarasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Querci V, De Palma R, et al. TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur. J. Immunol.* 2009 Jan;39(1):207–15.
- Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* 2012 Dec;13(12):1145–54.
- Schaefer L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J. Biol. Chem.* 2014 Dec 19;289(51):35237–45.
- Schaper K, Kietzmann M, Bäumer W. Sphingosine-1-phosphate differently regulates the cytokine production of IL-12, IL-23 and IL-27 in activated murine bone marrow derived dendritic cells. *Mol. Immunol.* 2014 May;59(1):10–8.
- Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J. Immunol.* 2006 Jul 15;177(2):1272–81.
- Schmidt JD, Ahlström MG, Johansen JD, Dyring-Andersen B, Agerbeck C, Nielsen MM, et al. Rapid allergen-induced interleukin-17 and interferon- $\gamma$  secretion by skin-resident memory CD8(+) T cells. *Contact Dermatitis.* 2017 Apr;76(4):218–227.
- Schmidt M, Goebeler M. Nickel allergies: paying the Toll for innate immunity. *J. Mol. Med.* 2011 Oct;89(10):961–70.
- Schmidt M, Hupe M, Endres N, Raghavan B, Kavuri S, Geserick P, et al. The contact allergen nickel sensitizes primary human endothelial cells and keratinocytes to TRAIL-mediated apoptosis. *J. Cell. Mol. Med.* 2010a Jun;14(6B):1760–76.
- Schmidt M, Raghavan B, Müller V, Vogl T, Fejer G, Tchaptchet S, et al. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat. Immunol.* 2010b Sep;11(9):814–9.
- Schmidt RJ, Chung LY. Perturbation of glutathione status and generation of oxidative stress in mouse skin following application of contact allergenic sesquiterpene lactones and isothiocyanates. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 1993 Aug;23(8):889–97.
- Schnyder B, Brockow K. Pathogenesis of drug allergy--current concepts and recent insights. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 2015 Sep;45(9):1376–83.
- Schnyder B, Burkhart C, Schnyder-Frutig K, von Greyerz S, Naisbitt DJ, Pirmohamed M, et al. Recognition of sulfamethoxazole and its reactive metabolites by drug-specific CD4+ T cells from allergic individuals. *J. Immunol.* 2000 Jun 15;164(12):6647–54.
- Schnyder B, Mauri-Hellweg D, Zanni M, Bettens F, Pichler WJ. Direct, MHC-dependent presentation of the drug sulfamethoxazole to human alphabeta T cell clones. *J. Clin. Invest.* 1997 Jul 1;100(1):136–41.
- Schulz O, Edwards AD, Schito M, Aliberti J, Manickasingham S, Sher A, et al. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity.* 2000 Oct;13(4):453–62.
- Schwensen JF, Bregnbak D, Johansen JD. Recent trends in epidemiology, sensitization and legal requirements of selected relevant contact allergens. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2016;12(3):289–300.

- Schwitulla J, Gefeller O, Schnuch A, Uter W. Risk factors of polysensitization to contact allergens. *Br. J. Dermatol.* 2013 Sep;169(3):611–7.
- Scornet N, Delarue-Cochin S, Azoury ME, Le Mignon M, Chemelle J-A, Nony E, et al. Bioinspired Design and Oriented Synthesis of Immunogenic Site-Specifically Penicilloylated Peptides. *Bioconjug. Chem.* 2016 Nov 16;27(11):2629–45.
- Scott BJ, Bradwell AR. Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nickel, and calcium. *Clin. Chem.* 1983 Apr;29(4):629–33.
- Sebastian K, Ott H, Zwadlo-Klarwasser G, Skazik-Voogt C, Marquardt Y, Czaja K, et al. Evaluation of the sensitizing potential of antibiotics in vitro using the human cell lines THP-1 and MUTZ-LC and primary monocyte-derived dendritic cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012 Aug 1;262(3):283–92.
- Sebastiani S, Allavena P, Albanesi C, Nasorri F, Bianchi G, Traidl C, et al. Chemokine receptor expression and function in CD4+ T lymphocytes with regulatory activity. *J. Immunol.* 2001 Jan 15;166(2):996–1002.
- See P, Dutertre C-A, Chen J, Günther P, McGovern N, Irac SE, et al. Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science.* 2017 Jun 9;356(6342).
- Séguin B, Uetrecht J. The danger hypothesis applied to idiosyncratic drug reactions. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2003 Aug;3(4):235–42.
- Seidel-Guyenot W, Perschon S, Dechant N, Alt R, Knop J, Steinbrink K. Low zone tolerance induced by systemic application of allergens inhibits Tc1-mediated skin inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006 May;117(5):1170–7.
- Seif F, Khoshmirsafa M, Aazami H, Mohsenzadegan M, Sedighi G, Bahar M. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Commun Signal.* 2017 Jun 21;15(1):23.
- Seyfizadeh N, Muthuswamy R, Mitchell DA, Nierkens S, Seyfizadeh N. Migration of dendritic cells to the lymph nodes and its enhancement to drive anti-tumor responses. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2016 Nov;107:100–10.
- Sharma AM, Klarskov K, Uetrecht J. Nevirapine bioactivation and covalent binding in the skin. *Chem. Res. Toxicol.* 2013a Mar 18;26(3):410–21.
- Sharma AM, Novalen M, Tanino T, Uetrecht JP. 12-OH-nevirapine sulfate, formed in the skin, is responsible for nevirapine-induced skin rash. *Chem. Res. Toxicol.* 2013b May 20;26(5):817–27.
- Sheikh SZ, Kobayashi T, Matsuoka K, Onyiah JC, Plevy SE. Characterization of an interferon-stimulated response element (ISRE) in the IL23a promoter. *J. Biol. Chem.* 2011 Jan 14;286(2):1174–80.
- Sheikh SZ, Matsuoka K, Kobayashi T, Li F, Rubinas T, Plevy SE. Cutting edge: IFN-gamma is a negative regulator of IL-23 in murine macrophages and experimental colitis. *J. Immunol.* 2010 Apr 15;184(8):4069–73.
- Shimozato O, Ugai S, Chiyo M, Takenobu H, Nagakawa H, Wada A, et al. The secreted form of the p40 subunit of interleukin (IL)-12 inhibits IL-23 functions and abrogates IL-23-mediated antitumor effects. *Immunology.* 2006 Jan;117(1):22–8.
- Shiohara T, Iijima M, Ikezawa Z, Hashimoto K. The diagnosis of a DRESS syndrome has been sufficiently established on the basis of typical clinical features and viral reactivations. *Br. J. Dermatol.* 2007 May;156(5):1083–4.
- Shiohara T, Kano Y. A complex interaction between drug allergy and viral infection. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2007 Oct;33(1–2):124–33.

- Shulman ST. Clemens von Pirquet: A Remarkable Life and Career. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* 2016 Oct 28; [Epub ahead of print].
- Sidoroff A. Acute generalized exanthematous pustulosis. *Chem. Immunol. Allergy.* 2012;97:139–48.
- Silva CR, Oliveira SM, Rossato MF, Dalmolin GD, Guerra GP, da Silveira Prudente A, et al. The involvement of TRPA1 channel activation in the inflammatory response evoked by topical application of cinnamaldehyde to mice. *Life Sci.* 2011 Jun 20;88(25–26):1077–87.
- Sinigaglia F, Scheidegger D, Garotta G, Scheper R, Pletscher M, Lanzavecchia A. Isolation and characterization of Ni-specific T cell clones from patients with Ni-contact dermatitis. *J. Immunol.* 1985 Dec;135(6):3929–32.
- Smith AM, Qualls JE, O'Brien K, Balouzian L, Johnson PF, Schultz-Cherry S, et al. A distal enhancer in *Il12b* is the target of transcriptional repression by the STAT3 pathway and requires the basic leucine zipper (B-ZIP) protein NFIL3. *J. Biol. Chem.* 2011 Jul 1;286(26):23582–90.
- Smith CK, Moore CA, Elahi EN, Smart AT, Hotchkiss SA. Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde, and cinnamic alcohol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2000 Nov 1;168(3):189–99.
- Smith Pease CK, Basketter DA, Patlewicz GY. Contact allergy: the role of skin chemistry and metabolism. *Clin. Exp. Dermatol.* 2003 Mar;28(2):177–83.
- Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat. Immunol.* 2002 Jul;3(7):673–80.
- Sousa-Pinto B, Correia C, Gomes L, Gil-Mata S, Araújo L, Correia O, et al. HLA and Delayed Drug-Induced Hypersensitivity. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2016;170(3):163–79.
- Spanou Z, Keller M, Britschgi M, Yawalkar N, Fehr T, Neuweiler J, et al. Involvement of drug-specific T cells in acute drug-induced interstitial nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006 Oct;17(10):2919–27.
- Spinelli V, Boniface S, Lehucher-Michel MP, Vervloet D, Magnan A. L'asthme au nickel. *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.* 2005 Mar 1;45(2):103–7.
- Spraggs CF, Budde LR, Briley LP, Bing N, Cox CJ, King KS, et al. HLA-DQA1\*02:01 is a major risk factor for lapatinib-induced hepatotoxicity in women with advanced breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2011 Feb 20;29(6):667–73.
- Stallmach A, Marth T, Weiss B, Wittig BM, Hombach A, Schmidt C, et al. An interleukin 12 p40-IgG2b fusion protein abrogates T cell mediated inflammation: anti-inflammatory activity in Crohn's disease and experimental colitis in vivo. *Gut.* 2004 Mar;53(3):339–45.
- Steenholdt C, Svenson M, Bendtzen K, Thomsen OØ, Brynskov J, Ainsworth MA. Acute and delayed hypersensitivity reactions to infliximab and adalimumab in a patient with Crohn's disease. *J. Crohns Colitis.* 2012 Feb;6(1):108–11.
- Stone SF, Phillips EJ, Wiese MD, Heddle RJ, Brown SGA. Immediate-type hypersensitivity drug reactions. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2014 Jul;78(1):1–13.
- Strandt H, Pinheiro DF, Kaplan DH, Wirth D, Gratz IK, Hammerl P, et al. Neoantigen Expression in Steady-State Langerhans Cells Induces CTL Tolerance. *J. Immunol.* 2017 Jul 24;

Strzępa A, Majewska-Szczepanik M, Lobo FM, Wen L, Szczepanik M. Broad spectrum antibiotic enrofloxacin modulates contact sensitivity through gut microbiota in a murine model. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017 Jul;140(1):121–133.e3.

Sullivan A, Wang E, Farrell J, Whitaker P, Faulkner L, Peckham D, et al.  $\beta$ -Lactam hypersensitivity involves expansion of circulating and skin-resident TH22 cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017 Feb 20; [Epub ahead of print].

## T

Taylor A, Faulkner L, Naisbitt DJ, Park BK. The chemical, genetic and immunological basis of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Hum. Exp. Toxicol.* 2015 Dec;34(12):1310–7.

Takahashi H, Kinbara M, Sato N, Sasaki K, Sugawara S, Endo Y. Nickel allergy-promoting effects of microbial or inflammatory substances at the sensitization step in mice. *Int. Immunopharmacol.* 2011 Oct;11(10):1534–40.

Takahashi R, Kano Y, Yamazaki Y, Kimishima M, Mizukawa Y, Shiohara T. Defective regulatory T cells in patients with severe drug eruptions: timing of the dysfunction is associated with the pathological phenotype and outcome. *J. Immunol.* 2009 Jun 15;182(12):8071–9.

Tang A, Judge TA, Nickoloff BJ, Turka LA. Suppression of murine allergic contact dermatitis by CTLA4Ig. Tolerance induction of Th2 responses requires additional blockade of CD40-ligand. *J. Immunol.* 1996 Jul 1;157(1):117–25.

Tang MLK. Probiotics and prebiotics: immunological and clinical effects in allergic disease. *Nestle Nutr. Workshop Ser. Paediatr. Programme.* 2009;64:219-235; discussion 235-238, 251–7.

Tanno LK, Calderon MA, Demoly P, Joint Allergy Academies. New Allergic and Hypersensitivity Conditions Section in the International Classification of Diseases-11. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2016 Jul;8(4):383–8.

Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, et al. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 2002 Jan 7;195(1):99–111.

Thierse H-J, Gamberdinger K, Junkes C, Guerreiro N, Weltzien HU. T cell receptor (TCR) interaction with haptens: metal ions as non-classical haptens. *Toxicology.* 2005 Apr 15;209(2):101–7.

Thierse H-J, Moulon C, Allespach Y, Zimmermann B, Doetze A, Kuppig S, et al. Metal-protein complex-mediated transport and delivery of Ni<sup>2+</sup> to TCR/MHC contact sites in nickel-specific human T cell activation. *J. Immunol.* 2004 Feb 1;172(3):1926–34.

Thong BY-H, Tan T-C. Epidemiology and risk factors for drug allergy: Epidemiology and risk factors for drug allergy. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2011 May;71(5):684–700.

Thyssen JP, Johansen JD, Linneberg A, Menné T, Nielsen NH, Meldgaard M, et al. The association between null mutations in the filaggrin gene and contact sensitization to nickel and other chemicals in the general population. *Br. J. Dermatol.* 2010 Jun;162(6):1278–85.

Toksoy A, Sennefelder H, Adam C, Hofmann S, Trautmann A, Goebeler M, et al. Potent NLRP3 Inflammasome Activation by the HIV Reverse Transcriptase Inhibitor Abacavir. *J. Biol. Chem.* 2017 Feb 17;292(7):2805–14.

Torres MJ, Ariza A, Fernández J, Moreno E, Laguna JJ, Montañez MI, et al. Role of minor determinants of amoxicillin in the diagnosis of immediate allergic reactions to amoxicillin. *Allergy.* 2010 May;65(5):590–6.

- Torres MJ, Romano A, Celik G, Demoly P, Khan DA, Macy E, et al. Approach to the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: similarities and differences between Europe and North America. *Clin. Transl. Allergy*. 2017;7:7.
- Traidl C, Sebastiani S, Albanesi C, Merk HF, Puddu P, Girolomoni G, et al. Disparate cytotoxic activity of nickel-specific CD8+ and CD4+ T cell subsets against keratinocytes. *J. Immunol*. 2000 Sep 15;165(6):3058–64.
- Tsan M-F, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J. Leukoc. Biol*. 2004 Sep;76(3):514–9.
- Turbica I, Gallais Y, Gueguen C, Tharinger H, Al Sabbagh C, Gorges R, et al. Ectosomes from neutrophil-like cells down-regulate nickel-induced dendritic cell maturation and promote Th2 polarization. *J. Leukoc. Biol*. 2015 Apr;97(4):737–49.
- Tuschl H, Kovac R, Weber E. The expression of surface markers on dendritic cells as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Toxicol. Vitro*. 2000 Dec;14(6):541–9.

## U

- Uter W, Amario-Hita JC, Balato A, Ballmer-Weber B, Bauer A, Belloni Fortina A, et al. European Surveillance System on Contact Allergies (ESSCA): results with the European baseline series, 2013/14. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol*. 2017 Jun 19;

## V

- Valitutti S, Coombs D, Dupré L. The space and time frames of T cell activation at the immunological synapse. *FEBS Lett*. 2010 Dec 15;584(24):4851–7.
- Vandebriel RJ, Pennings JLA, Baken KA, Pronk TE, Boorsma A, Gottschalk R, et al. Keratinocyte gene expression profiles discriminate sensitizing and irritating compounds. *Toxicol. Sci*. 2010 Sep;117(1):81–9.
- Veerappan Ganesan AP, Eisenlohr LC. The elucidation of non-classical MHC class II antigen processing through the study of viral antigens. *Curr. Opin. Virol*. 2017 Feb;22:71–6.
- Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2004 Mar 30;101(13):4560–5.
- de Verteuil D, Muratore-Schroeder TL, Granados DP, Fortier M-H, Hardy M-P, Bramoullé A, et al. Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules. *Mol. Cell. Proteomics*. 2010 Sep;9(9):2034–47.
- Viemann D, Schmidt M, Tenbrock K, Schmid S, Müller V, Klimmek K, et al. The contact allergen nickel triggers a unique inflammatory and proangiogenic gene expression pattern via activation of NF-kappaB and hypoxia-inducible factor-1alpha. *J. Immunol*. 2007 Mar 1;178(5):3198–207.
- Vignali DAA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat. Immunol*. 2012 Aug;13(8):722–8.
- Villarino AV, Kanno Y, O’Shea JJ. Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nat. Immunol*. 2017 Mar 22;18(4):374–84.

- Vocanson M, Achachi A, Mutez V, Cluzel-Tailhardat M, Varlet BL, Rozières A, et al. Human T cell priming assay: depletion of peripheral blood lymphocytes in CD25(+) cells improves the in vitro detection of weak allergen-specific T cells. *EXS*. 2014;104:89–100.
- Vocanson M, Cluzel-Tailhardat M, Poyet G, Valeyrie M, Chavagnac C, Levarlet B, et al. Depletion of human peripheral blood lymphocytes in CD25+ cells allows for the sensitive in vitro screening of contact allergens. *J. Invest. Dermatol.* 2008 Aug;128(8):2119–22.
- Vocanson M, Hennino A, Rozières A, Poyet G, Nicolas J-F. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*. 2009 Dec;64(12):1699–714.
- Vocanson M, Rozieres A, Hennino A, Poyet G, Gaillard V, Renaudineau S, et al. Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010 Aug;126(2):280–9, 289.e1-7.
- Vollmer J, Fritz M, Dormoy A, Weltzien HU, Moulon C. Dominance of the BV17 element in nickel-specific human T cell receptors relates to severity of contact sensitivity. *Eur. J. Immunol.* 1997 Aug;27(8):1865–74.
- Vollmer J, Weltzien HU, Dormoy A, Pistor F, Moulon C. Functional expression and analysis of a human HLA-DQ restricted, nickel-reactive T cell receptor in mouse hybridoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 1999 Aug;113(2):175–81.
- Vollmer J, Weltzien HU, Gamedinger K, Lang S, Choleva Y, Moulon C. Antigen contacts by Ni-reactive TCR: typical alphass chain cooperation versus alpha chain-dominated specificity. *Int. Immunol.* 2000 Dec;12(12):1723–31.
- W**
- Waisman A, Lukas D, Clausen BE, Yogev N. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. *Semin. Immunopathol.* 2017 Feb;39(2):153–63.
- Wang B-J, Sheu H-M, Guo Y-L, Lee Y-H, Lai C-S, Pan M-H, et al. Hexavalent chromium induced ROS formation, Akt, NF-kappaB, and MAPK activation, and TNF-alpha and IL-1alpha production in keratinocytes. *Toxicol. Lett.* 2010 Oct 5;198(2):216–24.
- Wang D, Curtis A, Papp AC, Koletar SL, Para MF. Polymorphism in glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) is associated with sulfamethoxazole-induced hypersensitivity in HIV/AIDS patients. *BMC Med. Genomics.* 2012a Jul 23;5:32.
- Wang R-X, Yu C-R, Mahdi RM, Ekwuagu CE. Novel IL27p28/IL12p40 cytokine suppressed experimental autoimmune uveitis by inhibiting autoreactive Th1/Th17 cells and promoting expansion of regulatory T cells. *J. Biol. Chem.* 2012b Oct 19;287(43):36012–21.
- Wang X, Wei Y, Xiao H, Liu X, Zhang Y, Han G, et al. A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in Lupus-like mice. *Eur. J. Immunol.* 2016 Jun;46(6):1343–50.
- Watanabe H, Gaide O, Pétrilli V, Martinon F, Contassot E, Roques S, et al. Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 2007 Aug;127(8):1956–63.
- Watts C, Amigorena S. Antigen traffic pathways in dendritic cells. *Traffic.* 2000 Apr;1(4):312–7.
- Weber FC, Esser PR, Müller T, Ganesan J, Pellegatti P, Simon MM, et al. Lack of the purinergic receptor P2X(7) results in resistance to contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 2010 Nov 22;207(12):2609–19.

- Wei C-Y, Chung W-H, Huang H-W, Chen Y-T, Hung S-I. Direct interaction between HLA-B and carbamazepine activates T cells in patients with Stevens-Johnson syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012 Jun;129(6):1562–1569.e5.
- Wei S, Charmley P, Robinson MA, Concannon P. The extent of the human germline T-cell receptor V beta gene segment repertoire. *Immunogenetics.* 1994;40(1):27–36.
- Welsch K, Holstein J, Laurence A, Ghoreschi K. Targeting JAK/STAT signalling in inflammatory skin diseases with small molecule inhibitors. *Eur. J. Immunol.* 2017 Jul;47(7):1096–107.
- Werfel T, Hentschel M, Kapp A, Renz H. Dichotomy of blood- and skin-derived IL-4-producing allergen-specific T cells and restricted V beta repertoire in nickel-mediated contact dermatitis. *J. Immunol.* 1997 Mar 1;158(5):2500–5.
- Wheatley LM, Plaut M, Schwaninger JM, Banerji A, Castells M, Finkelman FD, et al. Report from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases workshop on drug allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015 Aug;136(2):262–271.e2.
- Whitaker P, Meng X, Lavergne SN, El-Ghaiesh S, Monshi M, Earnshaw C, et al. Mass spectrometric characterization of circulating and functional antigens derived from piperacillin in patients with cystic fibrosis. *J. Immunol.* 2011 Jul 1;187(1):200–11.
- White KD, Chung W-H, Hung S-I, Mallal S, Phillips EJ. Evolving models of the immunopathogenesis of T cell-mediated drug allergy: The role of host, pathogens, and drug response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015 Aug;136(2):219–234; quiz 235.
- Wilson JM, Schuyler AJ, Schroeder N, Platts-Mills TAE. Galactose- $\alpha$ -1,3-Galactose: Atypical Food Allergen or Model IgE Hypersensitivity? *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2017 Jan;17(1):8.
- Wirtz S, Becker C, Fantini MC, Nieuwenhuis EE, Tubbe I, Galle PR, et al. EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation. *J. Immunol.* 2005 Mar 1;174(5):2814–24.
- Wittmann M, Zeitvogel J, Wang D, Werfel T. IL-27 is expressed in chronic human eczematous skin lesions and stimulates human keratinocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009 Jul;124(1):81–9.
- Wu Y, Farrell J, Pirmohamed M, Park BK, Naisbitt DJ. Generation and characterization of antigen-specific CD4+, CD8+, and CD4+CD8+ T-cell clones from patients with carbamazepine hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007 Apr;119(4):973–81.
- Wuillemain N, Adam J, Fontana S, Krähenbühl S, Pichler WJ, Yerly D. HLA haplotype determines hapten or p-i T cell reactivity to flucloxacillin. *J. Immunol.* 2013 May 15;190(10):4956–64.

## Y

- Yamamoto-Kasai E, Yasui K, Shichijo M, Sakata T, Yoshioka T. Impact of TRPV3 on the development of allergic dermatitis as a dendritic cell modulator. *Exp. Dermatol.* 2013 Dec;22(12):820–4.
- Yang C-WO, Hung S-I, Juo C-G, Lin Y-P, Fang W-H, Lu I-H, et al. HLA-B\*1502-bound peptides: implications for the pathogenesis of carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007 Oct;120(4):870–7.
- Yang H, Lee S-M, Gao B, Zhang J, Fang D. Histone deacetylase sirtuin 1 deacetylates IRF1 protein and programs dendritic cells to control Th17 protein differentiation during autoimmune inflammation. *J. Biol. Chem.* 2013 Dec 27;288(52):37256–66.

- Yasukawa S, Miyazaki Y, Yoshii C, Nakaya M, Ozaki N, Toda S, et al. An ITAM-Syk-CARD9 signalling axis triggers contact hypersensitivity by stimulating IL-1 production in dendritic cells. *Nat. Commun.* 2014;5:3755.
- Yerly D, Pompeu YA, Schutte RJ, Eriksson KK, Strhyn A, Bracey AW, et al. Structural Elements Recognized by Abacavir-Induced T Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2017 Jul 7;18(7).
- Yin L, Crawford F, Marrack P, Kappler JW, Dai S. T-cell receptor (TCR) interaction with peptides that mimic nickel offers insight into nickel contact allergy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012 Nov 6;109(45):18517–22.
- Yip VLM, Meng X, Maggs JL, Jenkins RE, Marlot PT, Marson AG, et al. Mass Spectrometric Characterization of Circulating Covalent Protein Adducts Derived from Epoxide Metabolites of Carbamazepine in Patients. *Chem. Res. Toxicol.* 2017 Jul 17;30(7):1419–35.
- Yılmaz Ç, Özcengiz G. Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. *Biochem. Pharmacol.* 2017 Jun 1;133:43–62.
- Yu L, Wang L, Chen S. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J. Cell. Mol. Med.* 2010 Nov;14(11):2592–603.
- Yu X, Wang Y, Deng M, Li Y, Ruhn KA, Zhang CC, et al. The basic leucine zipper transcription factor NFIL3 directs the development of a common innate lymphoid cell precursor. *eLife.* 2014 Oct 13;3.
- Yuen AW, Land G, Weatherley BC, Peck AW. Sodium valproate acutely inhibits lamotrigine metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1992 May;33(5):511–3.
- Yun J, Cai F, Lee FJ, Pichler WJ. T-cell-mediated drug hypersensitivity: immune mechanisms and their clinical relevance. *Asia Pac. Allergy.* 2016 Apr;6(2):77–89.
- Yun J, Marcaida MJ, Eriksson KK, Jamin H, Fontana S, Pichler WJ, et al. Oxypurinol directly and immediately activates the drug-specific T cells via the preferential use of HLA-B\*58:01. *J. Immunol.* 2014 Apr 1;192(7):2984–93.
- Yun J, Mattsson J, Schnyder K, Fontana S, Largiadèr CR, Pichler WJ, et al. Allopurinol hypersensitivity is primarily mediated by dose-dependent oxypurinol-specific T cell response. *Clin. Exp. Allergy.* 2013 Nov;43(11):1246–55.
- Yvon M, Anglade P, Wal JM. Binding of benzyl penicilloyl to human serum albumin. Evidence for a highly reactive region at the junction of domains 1 and 2 of the albumin molecule. *FEBS Lett.* 1989 Apr 24;247(2):273–8.
- Yvon M, Anglade P, Wal JM. Identification of the binding sites of benzyl penicilloyl, the allergenic metabolite of penicillin, on the serum albumin molecule. *FEBS Lett.* 1990 Apr 24;263(2):237–40.

## Z

- Zanni MP, von Greyerz S, Schnyder B, Brander KA, Frutig K, Hari Y, et al. HLA-restricted, processing- and metabolism-independent pathway of drug recognition by human alpha beta T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 1998a Oct 15;102(8):1591–8.
- Zanni MP, von Greyerz S, Schnyder B, Wendland T, Pichler WJ. Allele-unrestricted presentation of lidocaine by HLA-DR molecules to specific alphabeta+ T cell clones. *Int. Immunol.* 1998b Apr;10(4):507–15.
- Zarnitsyna VI, Evavold BD, Schoettle LN, Blattman JN, Antia R. Estimating the diversity, completeness, and cross-reactivity of the T cell repertoire. *Front. Immunol.* 2013 Dec 26;4:485.

- Zhang H, Kong H, Zeng X, Guo L, Sun X, He S. Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. *J. Transl. Med.* 2014 May 12;12:125.
- Zhang J, Qian X, Ning H, Yang J, Xiong H, Liu J. Activation of IL-27 p28 gene transcription by interferon regulatory factor 8 in cooperation with interferon regulatory factor 1. *J. Biol. Chem.* 2010 Jul 9;285(28):21269–81.
- Zhang X, Sharma AM, Uetrecht J. Identification of danger signals in nevirapine-induced skin rash. *Chem. Res. Toxicol.* 2013 Sep 16;26(9):1378–83.
- Zhang Y, Wang Y, Anderson K, Novikov A, Liu Z, Pacheco K, et al. Using DR52c/Ni(2+) mimotope tetramers to detect Ni(2+) reactive CD4(+) T cells in patients with joint replacement failure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2017 Sep 15;331:69–75.
- Zhang Y, Wilcox DE. Thermodynamic and spectroscopic study of Cu(II) and Ni(II) binding to bovine serum albumin. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2002 Mar;7(3):327–37.
- Zhao Y, Balato A, Fischelevich R, Chapoval A, Mann DL, Gaspari AA. Th17/Tc17 infiltration and associated cytokine gene expression in elicitation phase of allergic contact dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 2009 Dec;161(6):1301–6.
- Zhou L, Chong MMW, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity.* 2009 May;30(5):646–55.
- Zhou P, Zhang S, Wang Y, Yang C, Huang J. Structural modeling of HLA-B\*1502/peptide/carbamazepine/T-cell receptor complex architecture: implication for the molecular mechanism of carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2016 Aug;34(8):1806–17.



# **ANNEXES**



## CONTEMPORARY REVIEW

# Chemical or Drug Hypersensitivity: Is the Immune System Clearing the Danger?

Marc Pallardy<sup>1</sup> and Rami Bechara

Inflammation, Chimiokines et Immunopathologie, INSERM, Faculté de Pharmacie - Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92290 Châtenay-Malabry, France

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. Fax: +33 1 46 83 57 35. E-mail: marc.pallardy@u-psud.fr.**ABSTRACT**

Hypersensitivity reaction or allergy, initially perceived as a secondary disorder, is now believed to be a major public health concern. For instance, contact dermatitis is a type IV delayed-type hypersensitivity reaction to skin allergens. An estimated 15%–20% of the general population has acquired contact allergy. To maintain immune tolerance, our immune system needs to differentiate between harmful non-self and innocuous non-self. Living organisms have developed during their evolution a set of biological mechanisms to protect them from the “outside”: physical barrier, inflammation, cell-based mechanisms, metabolism and elimination, and biochemical pathways such as glutathione. The innate and adaptive immune systems are also involved in the protection from the “outside” by mounting specific or non-specific responses leading to the clearance of dangerous triggers such as viruses, bacteria, or parasites. In the case of chemical or drug allergy, is our immune system clearing the danger resulting from environmental exposure to these harmful chemicals with a true immune response? Is the immune system then triggered specifically for its role: clearing a specific problem? Alternatively, should we perceive chemical or drug hypersensitivity as an accident with uncontrolled consequences leading to immunopathology?

**Key words:** chemical allergy; immunotoxicology; immunotoxicity; immunotoxicology; immunopathology; hypersensitivity.

Hypersensitivity reactions can be classified into 2 categories depending on if they are mediated by the immune system or not. When mediated by the immune system, hypersensitivity reactions are termed allergy. Allergy is a major public health concern, pushing specialists to suggest a worldwide epidemic problem (Tanno *et al.*, 2016a). When provoked by exposure to chemicals or drugs, “Allergy” is defined as a clinical manifestation due to an “inappropriate” immune response provoked by the exposure to low-molecular weight chemicals (<1000 Da). Clinical manifestations are very diverse with systemic reactions such as the anaphylactic shock and involve a diversity of target organs. These target organs are mainly the respiratory track (rhinitis, asthma), the liver (immune-mediated hepatitis) and the skin (allergic contact dermatitis [ACD]; Stevens-Johnson syndrome [SJS]; toxic epidermal necrolysis [TEN]; drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms [DRESS]) (Peiser *et al.*, 2012; Tanno *et al.*, 2016b). Allergic reactions can be potentially life-threatening, such as anaphylactic shock, DRESS, SJS, and

TEN (White *et al.*, 2015). ACD is an allergic reaction to chemical sensitizers that encounter the skin. An estimated 15%–20% of the general population has acquired contact allergy (Kaplan *et al.*, 2012). It is also a major cause of occupational skin disease affecting the life of exposed individuals with an estimated newly reported annual incident of 0.5–1.9% in Europe (Kaplan *et al.*, 2012; Peiser *et al.*, 2012). The highest incidence is found in hairdressers, metal workers, healthcare workers, food industry workers, construction workers, cleaners, and painters (Diepgen, 2012). Common contact allergens may be inorganic chemicals, such as nickel, and organic chemicals, such as those found in fragrances and dyes (*p*-phenylenediamine [PPD] or methylisothiazolinone) (Kaplan *et al.*, 2012).

The original Gell and Coomb’s classification divided hypersensitivity allergic reactions into four subtypes according to the type of immune response and the effector mechanism responsible for cell and tissue injury (Uzzaman and Cho, 2012). Type I reactions are mediated by IgE antibodies and mediators released

from mast cells and basophils and the onset of the clinical outcome is rapid (immediate hypersensitivity). Type IV reactions are delayed T-cell-mediated reactions. Nevertheless, whatever is the type of clinical manifestations there are always 2 phases necessary for an allergic reaction to occur. The first phase is the sensitization phase characterized by the appearance of a specific immune reaction directed to the chemical in most cases involving specific T lymphocytes and antibodies but without clinical manifestation; it is common and dose dependent. The second phase is the elicitation phase characterized by the clinical manifestation and occurring in a small percentage of patients (Kaplan *et al.*, 2012).

Living organisms have developed during their evolution a set of biological mechanisms to protect them from the “outside”: physical barrier, inflammation, cell-based mechanisms, metabolism and elimination, and biochemical pathways such as glutathione. The innate and adaptive immune systems are also involved in the protection from the “outside” by mounting specific or non-specific responses leading to the clearance of dangerous triggers such as viruses, bacteria, or parasites. To this attempt, it is now well established that our immune system must be able to distinguish self from non-self and to differentiate harmful non-self from innocuous non-self. Maintaining an immune tolerance in the latter case is mandatory to avoid uncontrolled consequences leading to immunopathology (Aliberti, 2016; Matzinger, 2012, 1994).

However, in the case of chemical or drug hypersensitivity, is our immune system clearing the danger linked to the exposure to harmful chemical entities? Should we perceive chemical or drug hypersensitivity as an accident with uncontrolled consequences leading to immunopathology or as a true immune response with the immune system being triggered specifically for its role: clearing a problem?

## THE DANGER MODEL: HOW THE IMMUNE SYSTEM CAN DISTINGUISH BETWEEN HARMFUL AND NON-HARMFUL ANTIGENS?

The immune system being triggered by continuous exposure to antigens from outside it is important to recognize what is dangerous and needs to be eliminated from what can be tolerated in the body, ie, food and environmental antigens. In 1994, the immunologist Polly Matzinger came up with a controversial idea: “Alarm signals released from injured and dying cells can kick our immune system into high gear even when no microbial threat is evident” (Matzinger, 1994). These “Alarm signals” are now termed “danger signals.” They are necessary for the dendritic cells (DC), the pivotal antigen-presenting cell (APC), to recognize a “harmful” cellular environment created by the antigen or in which the antigen is present, thus informing that an effector immune response needs to be mounted for clearing the “danger.” One major consequence of the recognition of the danger signals by DC is the acquisition of an “effector” phenotype versus a “tolerogenic” one. The latter will be adopted by DC when the antigen is present in the absence of danger signals (Matzinger, 1994, 2012). These danger signals can be exogenous (pathogen-associated molecular patterns, eg, lipopolysaccharide [LPS]) or endogenous (damage-associated molecular patterns [DAMP]), constitutive or inducible, intracellular (heat shock proteins [HSP]), or secreted (low-molecular weight hyaluronic acid [MWH] and high-mobility group box 1 [HMGB-1]) from distressed and injured cells (Tsan and Gao, 2004). Other danger signals include the inflammasome and proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor [TNF]- $\alpha$ , interleukin [IL]-1) (Franchi *et al.*, 2012; Man and Kanneganti, 2015; Ryan *et al.*, 2007).

Multiple “innate immune receptors” exist inside and outside the DC or other innate immune cells. They constitute the pattern recognition receptor (PRR) such as Toll-like receptor (TLR), NOD-like receptors (NLR), C-type lectin receptors, and RIG-I-like receptors (Iwasaki and Medzhitov, 2015; Kawai and Akira, 2010; Leifer and Medvedev, 2016; Walsh and Mills, 2013). Indeed, each PRR can bind to many different kinds of molecules deriving from the outside environment (bacteria, virus, fungus, etc.) or from dying cells (Iwasaki and Medzhitov, 2015; Kawai and Akira, 2010; Martin, 2014, 2015). For instance, TLR4 is a receptor for LPS, HSP70, and low MWH (Matzinger and Kamala, 2011).

## HOW CHEMICALS ARE CREATING A «DANGER» RECOGNIZED BY DCs LEADING TO AN ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE?

**Hypothesis 1: Can chemical allergens directly activate dendritic cells and play the role of danger signals?**

In addition to their ability to present the processed antigen to T cells, DCs should express costimulatory molecules and release soluble factors that drive T cells from a naive to an effector phenotype, thus promoting sensitization to the chemical (Kaplan *et al.*, 2012; Walsh and Mills, 2013)

**A. Modifications of DC phenotype.** Chemical allergens can directly modify DC phenotype leading to different extracellular receptor changes, including co-stimulatory molecules (CD86, CD80, and CD40), chemokine receptors (CCR7) and adhesion molecules (CD54). Major histocompatibility complex (MHC) class II molecules (Human leukocyte antigen-antigen D related, HLA-DR) expression is also augmented in addition to cytokine production (IL-12, IL-6, and TNF- $\alpha$ ). These modifications allow DC migration from peripheral tissues to regional lymph nodes and clonal expansion of specific T cells. For instance, using human CD34<sup>+</sup>-derived DC, nickel and dinitrochlorobenzene (DNCB) induced CCR7 expression and DC migration in response to CCL19 (Boislève *et al.*, 2004). DNCB, trinitrochlorobenzene (TNCB), nickel, cobalt, eugenol (eu), and cinnamaldehyde (cin) induced CD54 expression in human monocyte-derived DC (mo-DC) (Coutant *et al.*, 1999; de Bourayne *et al.*, 2017; Manome *et al.*, 1999; Tuschl *et al.*, 2000). Furthermore, all these chemical sensitizers upregulated the expression of at least one costimulatory molecule, CD83 protein, and HLA-DR in different in vitro human DCs models (Antonios *et al.*, 2009; Boislève *et al.*, 2005; Coutant *et al.*, 1999; Manome *et al.*, 1999; Tuschl *et al.*, 2000). DNCB and nickel were also able to induce IL-6, IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$ , and IL-12p40 production in human DCs (Ade *et al.*, 2007; Aiba *et al.*, 1997; Antonios *et al.*, 2009, 2010; de Bourayne *et al.*, 2017; De Smedt *et al.*, 2001; Manome *et al.*, 1999; Rachmawati *et al.*, 2013). The case of drugs is more complex because most drugs are not chemically reactive. Sulfamethoxazole (SMX) and its protein-reactive metabolite nitroso-SMX increased CD40 expression, but not CD80, CD83, or CD86, on the surface of human DCs (Sanderson *et al.*, 2007). Interestingly, DCs-metabolism inhibition prevented the increase in CD40 expression with SMX, but not with nitroso-SMX demonstrating a link with the intracellular metabolism. In vitro, a danger environment significantly increased the formation of SMX-protein adducts in APC, illustrating that danger signals can enhance the formation of intracellular SMX-protein adducts in human APC (Lavergne *et al.*, 2009). Same results have been found for beta-lactams (Sebastian *et al.*, 2012). Nevirapine (NVP) treatment, a non-nucleoside reversed transcriptase inhibitor indicated for the

**Allergic and hypersensitivity reactions to chemicals and drugs****1- A true immune response with the immune system being triggered for its role: clearing a problem?**

- Reactive chemicals and metals are dangerous entities
  - Important to avoid prolonged contact that could lead to serious health problems
- Very diverse entities are able to induce chemical allergy
  - There are some evidences that chemicals have found very specific ways to activate the immune system: direct TLR activation, modification of the cellular microenvironment (low MWhA, ATP, HMGB-1, cytokines, etc.)
- Hapten-protein complexes are processed and specifically associated to HLA molecules
  - Specific T-cell antigen receptors for chemicals exist

**2- An accident with uncontrolled consequences leading to immunopathology?**

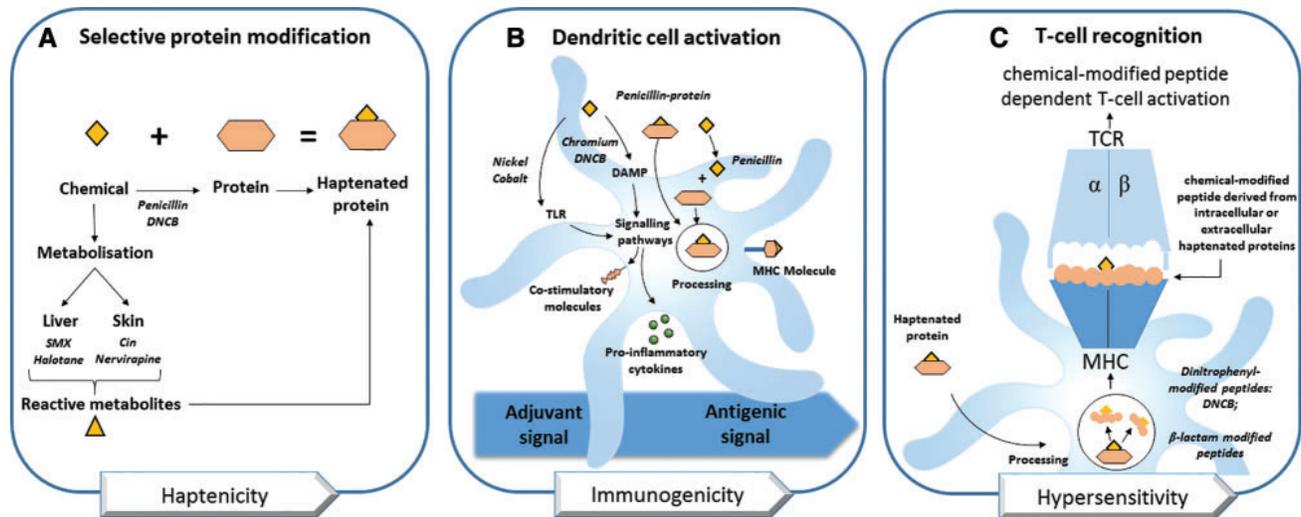
- Role for inflammation = nonspecific inflammation gives a sufficient trigger to provide necessary “danger signals” for the DC playing a role in response to a bystander antigen (chemical, drugs)
- Chemicals are reactive = bind to peptides present in the HLA pocket creating new antigens (self-modified) without any specificity
- Drugs possess off-target activity on HLA and TCR: pharmacological reactions can lead to severe hypersensitivity reactions

treatment of HIV, is associated not only with idiosyncratic liver toxicity but also with mild-to-severe skin rashes. Interestingly, NVP metabolites can covalently bind in the liver but the 12-OH-NVP sulfate formed in the skin provoked NVP-induced skin rashes (Sharma *et al.*, 2013). Recent work showed that 12-OH-NVP is a necessary reactive intermediate and also provided danger signals (Zhang *et al.*, 2013).

**B. Activation of specific cell signaling pathways in DC.** How chemical sensitizers can directly modulate human DC phenotype? It is well established that DC phenotype is tightly regulated by signaling pathways as exemplified with danger signals and TLR agonists. The existing literature clearly shows that chemical allergens can mobilize specific signaling pathways. Nickel and DNCB can rapidly activate mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in human DC known to be highly involved in costimulatory molecule expression and cytokine production (Aiba *et al.*, 2003; Antonios *et al.*, 2009; Boislève *et al.*, 2004, 2005). Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) is another transcription factor shown to be activated by numerous chemical sensitizers and implicated in the DC maturation process (Ade *et al.*, 2007; Antonios *et al.*, 2009, 2010; Neves *et al.*, 2011). A very interesting and new observation is that chemical sensitizers can activate upstream kinases such as CK2 (casein kinase 2), PKC (protein kinase C) or Syk (spleen tyrosine kinase). Using a peptide array approach, nickel and DNCB have been found to activate CK2 in DCs and inhibition of its activity altered DCs phenotype in response to these chemicals (de Bourayne *et al.*, 2017). Interestingly, CK2 activity can regulate pro-inflammatory cytokines production in DCs leading to Th1 cells polarization (de Bourayne *et al.*, 2016). PKC was initially shown to be involved in DC migration from the epidermis in response to DNCB and recent data suggested that PKC- $\beta$  was essential for PPD and DNCB-induced CD86 expression in human DCs (Corsini *et al.*, 2014). Furthermore, chemical allergens such as 2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) and fluorescein isothiocyanate can activate Syk in DCs leading to pro-IL1 $\beta$  synthesis (Yasukawa *et al.*, 2014). Recently, Lopez *et al.* showed in mo-DCs from amoxicillin (AX)-delayed allergic patients that MAPKs and NF- $\kappa$ B, the main signaling pathways involved in DC maturation, were involved in Amoxicillin (AX)-induced DC phenotype modifications (Lopez *et al.*, 2015).

How can chemical sensitizers be “recognized” by DCs? Metals such as nickel and cobalt can bind to the imidazole groups of two histidine residues (His456 and His458) of the human TLR4. These metals and palladium were recently shown to potentially activate DCs via the TLR4 pathway (Rachmawati *et al.*, 2013; Raghavan *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2010; Schmidt and Goebeler, 2015). These histidine residues are absent in mice explaining why nickel is a poor sensitizer in mice and leading to the question of the relevance of these differences across species (Schmidt *et al.*, 2010). Gold can cause a modest DCs maturation depending on the TLR3 pathway (Rachmawati *et al.*, 2015). On the other hand, organic contact sensitizers can induce reactive oxygen species (ROS) production in human DCs (Byamba *et al.*, 2010; Corsini *et al.*, 2013), and this was linked to intracellular signaling (Neves *et al.*, 2011; Corsini *et al.*, 2013). ROS production is believed to act as second messengers mediating cellular responses and leading to immune cell activation (Kaplan *et al.*, 2012; Martin, 2012; Martin *et al.*, 2011). Adding the antioxidant N-acetyl-L-cysteine decreases p38MAPK phosphorylation and CD86 expression in response to contact sensitizers (DNCB, thiomersal) in DCs (Neves *et al.*, 2011). Moreover, using a proteomic approach, cinn and DNCB upregulated many proteins involved in oxidative stress (Mussotter *et al.*, 2016). Furthermore, TNBS (Yasukawa *et al.*, 2014), nickel (Li and Zhong, 2014), and chromium (VI) (Adam *et al.*, 2017) activated NLRP3 inflammasome via ROS production leading to caspase-1 activation and IL-1 $\beta$  production. 2,4-dinitrofluorobenzene triggers, in a ROS-dependent manner, the activation of the PERK-eIF $\alpha$ -ATF4 unfolded protein response (UPR) branch and thus modulates human monocytic leukemia cells (THP-1) phenotype suggesting a link between ROS production, endoplasmic reticulum, and activation of UPR in chemical-induced inflammation (Luis *et al.*, 2014).

In resume, the hypothesis number 1 “Can haptens directly activate DC and play the role of danger signals?” is fully supported by the literature and it is now admitted that chemical sensitizers and some drugs following the hapten/prohapten concept can directly activate DCs in vitro through activation of specific signaling pathways leading to their maturation. Direct activation of DCs can be mediated either by specific recognition through TLRs in the case of some metals or by cellular stress leading to the activation of specific signaling pathways.



**Figure 1.** Chemical or drug allergy perceived as a true immune response. (A) Chemically reactive molecules or their metabolites can bind covalently and in a selective manner to self-proteins forming hapten-protein complexes. (B) The hapten-protein complex is then internalized and processed in dendritic cells leading to antigen formation. Chemicals or drugs can also bind to intracellular proteins in antigen-presenting cells. Some chemicals can also provide danger signals to dendritic cells through a direct or indirect mechanism that lead to costimulatory molecules expression and cytokine production. Both signals 1 and 2 are required for immunogenicity and effective T-cell priming. (C) T-cell receptor (TCR) recognizing peptide-chemical complexes may exist and pre-existing naive T-cell repertoire for some chemicals/drugs exist. TCR recognizes the hapten/self-peptide complex derived from the haptenated self-protein. Abbreviations: Cin, cinnamaldehyde; DAMP, damage-associated molecule patterns; DNCB, dinitrochlorobenzene; MHC, major histocompatibility complex; SMX: sulfamethoxazole.

#### Hypothesis 2: Can haptens modify the cellular microenvironment providing danger signals to dendritic cells?

The hypothesis that chemical allergens can indirectly activate DCs through modification of the microenvironment leading to generation of danger signals came from a striking observation that some contact allergens such as TNCB cannot induce a complete DC maturation *in vitro* (Martin *et al.*, 2008). In fact, TNCB-treated DCs upregulated costimulatory molecules, *in vitro*, but did not trigger cytokine production (Martin *et al.*, 2008). The observation that TNCB failed to induce contact dermatitis in mice lacking TLR2 and TLR4 but not in wild-type mice or even germ-free mice illustrated, one more time, the importance of TLR in contact dermatitis and strongly suggested that chemical sensitizers can induce the production of endogenous activators of PRR (DAMP) in the skin (Esser *et al.*, 2012; Kaplan *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2008; Tsan and Gao, 2004). Indeed, chemical allergens were found to trigger oxidative stress, glutathione status perturbation (Schmidt and Chung, 1993), ROS production in the skin (Esser *et al.*, 2012; Galbiati *et al.*, 2014; Onami *et al.*, 2014; Vandebriel *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010) and also the release of low MWHA (Esser *et al.*, 2012; Kavasi *et al.*, 2017; Nikitovic *et al.*, 2015), ATP (Onami *et al.*, 2014) and HMGB1 (Galbiati *et al.*, 2014) *in vivo*. Low MWHA can activate DCs through TLR2 and TLR4 (Scheibner *et al.*, 2006; Termeer *et al.*, 2002) and blocking hyaluronidase (HYAL) function, responsible for high MWHA degradation into low MWHA, prior to sensitization significantly reduced contact dermatitis in response to TNCB (Martin *et al.*, 2008). The increase in the skin HYAL activity in mice is mediated by ROS and p38MAPK-dependent mechanisms (Esser *et al.*, 2012). DNCB and PPD enhanced hyaluronan, an unsulfated glycosaminoglycan, degradation in keratinocytes leading to IL-18 production via oxidative stress (Nikitovic *et al.*, 2015). Constitutive overexpressing of human HYAL1 in mice skin resulted in an increase in low MWHA release and exacerbated contact dermatitis (Muto *et al.*, 2014).

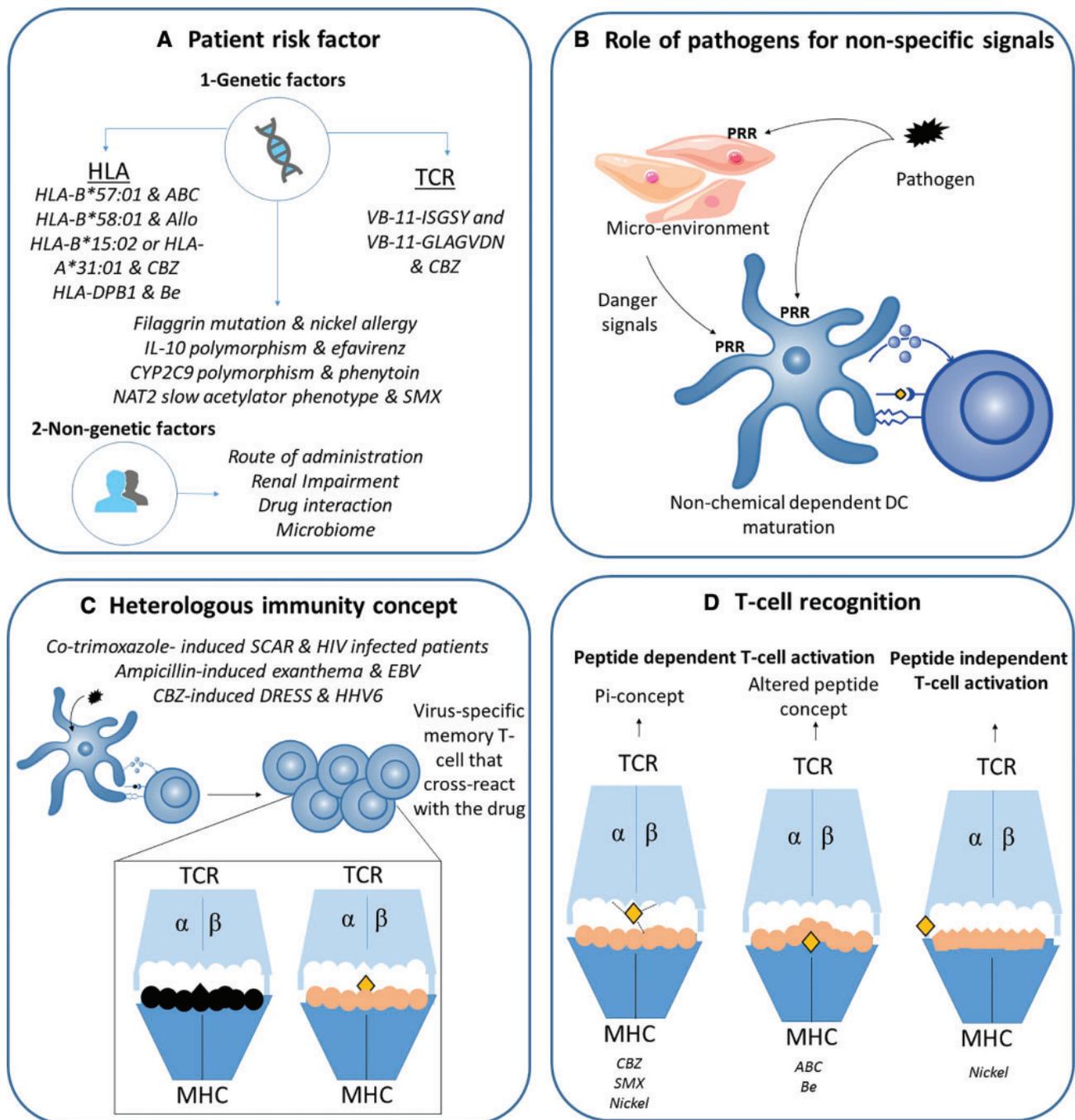
ATP, released by stressed and damaged cells, can modulate immune responses through the transmembrane purinergic receptor P2X7 leading to NLRP3 inflammasome activation and IL-1 and IL-18 production (Kaplan *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 2007). TNCB can trigger ATP release from skin mice *in vivo* and P2X7-deficient mice are resistant to contact dermatitis (Weber *et al.*, 2010). Recently, it has been found that non-metal contact sensitizers induced ATP release from keratinocytes via ROS-mediated opening of pannexin 1 hemichannels (Onami *et al.*, 2014).

HMGB-1, a TLR4 agonist, is also released into the extracellular environment by damaged cells. Contact sensitizers can induce the release of HMGB-1 from keratinocytes provoking IL-18 production via a TLR-4-dependent mechanism (Galbiati *et al.*, 2014).

In resume, the hypothesis number 2 “Can haptens modify the cellular microenvironment providing danger signals to DCs?” is supported by recent reports showing that increase in skin ROS production by chemical sensitizer is the key for triggering *in situ* release of soluble factors known to be involved in the creation of a danger environment. This danger environment can modify the epimicrobiome leading to an effector immune response to environmental chemicals.

### CHEMICAL OR DRUG HYPERSENSITIVITY: A TRUE IMMUNE RESPONSE WITH THE IMMUNE SYSTEM BEING TRIGGERED FOR ITS ROLE THAT IS CLEARING A DANGER OR AN ACCIDENT WITH UNCONTROLLED CONSEQUENCES LEADING TO IMMUNOPATHOLOGY?

Living organisms are constantly exposed to environmental products including chemicals. In such, detoxification mechanisms have evolved allowing survival of these living organisms in a stressed environment. The immune system is a host defense system protecting against disease and must detect a



**Figure 2.** Chemical or drug hypersensitivity perceived as an accident with uncontrolled consequences leading to immunopathology. (A) Chemical/drug-induced allergic reactions may depend on patient risk factors such as genetic factors or non-genetic factors related to the drug formula, dosage, administration, or presence of a concomitant disease. (B) Pathogens can deliver the adjuvant signal needed for dendritic cell (DC) modifications and efficient T-cell priming independently of the chemical/drug. (C) Moreover, unrelated antigens can bind to the same T-cell receptor (TCR) as proposed by the heterologous immunity concept. Virus-specific memory T cells that were generated during a previous infection may cross-react with the chemical or the drug. (D) Chemicals or drugs can bind accidentally to the TCR or to HLA molecules outside of the antigen-binding groove through non-covalent interactions (pi-concept). Other chemicals or drugs can bind accidentally within the antigen-binding groove of specific HLA molecules altering the repertoire of endogenous peptide ligands presented by this major histocompatibility complex (MHC) (abacavir [ABC]). Other chemicals can activate the TCR accidentally with the correct MHC haplotype, but independently of any peptide. Abbreviations: Allo, allopurinol; Be, beryllium; CBZ, carbamazepine; CYP, cytochrome P; NAT2: N-acetyltransferase 2; PRR, pattern recognition receptor; SCAR, severe cutaneous adverse drug reactions; SMX, sulfamethoxazole.

wide variety of agents and distinguish them from the organism's own healthy tissue. Consequently, the immune system is as a protective system avoiding dangerous pathogens to develop in the infected organism. Disorders of the immune system can result in autoimmune diseases, inflammatory diseases,

infections and cancer. Autoimmunity results from a hyperactive immune system attacking normal tissues as if they were foreign organisms. In this instance, dysfunction in regulatory mechanisms are at the origin of these diseases. Hypersensitivity is an immune response that damages the body's own tissues and it is

the consequence of exposure to foreign antigens. However, is hypersensitivity an accident resulting in an uncontrolled immune response to foreign antigens or does hypersensitivity have a role in protecting living organism from environmental triggers including reactive chemicals?

Concerning chemical and drug allergy, three models describing how small molecules can elicit T-cell reactivity leading to hypersensitivity reactions are proposed: the hapten/prohaptent model, the pharmacological interaction model (p-i), and the altered peptide repertoire model. In the hapten/prohaptent model, chemical reactivity is the key step for a chemical to be an allergen leading to clinical manifestations. It allows chemicals to bind to proteins and to deliver danger signals to DCs leading to their maturation. Indeed, chemical allergens have found very specific ways to activate the immune system through TLR activation or modification of the cellular microenvironment at the site of exposure. Furthermore, chemical-protein complexes are processed and specifically associated to HLA peptides (Martin *et al.*, 2010). When presented in the context of MHC, these modified peptides will be recognized as “foreign” by T cells eliciting a “true immune response” directed to the peptide-chemical complex; this immune response can also involve B cells (Amali *et al.*, 2017). The multiplicity of binding sites on proteins generated by these chemicals expand the repertoire of haptenized peptides to be recognized by T cells and consequently no strict HLA association has been described in this context. This latter mechanism concern many people strongly suggesting a true immune response directed to a reactive foreign entity possessing the likely characteristics of a harmful chemical. In light of these observations, hypersensitivity reactions are supported by a specific immune response and could be considered as a defense mechanism avoiding prolonged exposure to dangerous reactive chemicals (Figure 1).

On the other hand, there are cases where the incidence of allergy to a product is very low suggesting that specific conditions associated with the patients or the environment (genetic factors, viral infections, health status, etc) need to be present (Figure 2A and 2B). Interestingly, priming of naive T cells failed for some chemicals in healthy donors (Faulkner *et al.*, 2016; Gibson *et al.*, 2015), illustrating the presence of individual predisposition factors that could promote sensitization independently of specific T cells. Some hypersensitivity reactions are mainly associated with genetic susceptibility (ie, filaggrin mutation) (Kezic, 2011) and MHC molecules (Falta *et al.*, 2013; Usui and Naisbitt, 2017). The case of abacavir, a guanosine analog inhibiting HIV-1 reverse transcriptase enzyme, is at the origin of the “altered peptide repertoire model” where the drug occupies a position in the peptide-binding groove of the MHC protein changing the peptide specificity of the MHC binding. The abacavir hypersensitivity syndrome occurs exclusively in patients carrying the HLA-B57\*01 allele suggesting that abacavir allergy is an accident concerning a very restricted number of people (Figure 2D). Moreover, the allo-immune stimulation provided by the abacavir-peptide-HLA B57:01 complex is stimulatory enough without need of “danger” as a cofactor reinforcing the unique feature of abacavir allergy. In other cases, a nonspecific inflammation independent of chemical exposure can be sufficient to provide necessary danger signals provoking an effector immune response to a bystander antigen present at the site of inflammation. In this case, chemical-protein complexes are the bystander antigens processed by DCs, thus, creating haptenized peptides presented to T cells (Figure 2B). Recently, some T cell-

mediated hypersensitivity reactions have been described to represent a good example of heterologous immunity (4). In this model, cross-reactive T-cell responses stem from activation of pathogen-specific memory T cells that recognize the neoantigen created by drug exposure; to this extent, HHVs are a likely source of persistent antigens (Figure 2C).

Particular features of chemical and drug hypersensitivity are the diverse mechanisms of T cell activation (Figure 2D). Chemicals, mostly metals, can bind to peptides already present in the HLA pocket or modify the structure of these pockets, creating new antigens (self-modified) (Falta *et al.*, 2013; Thierse *et al.*, 2005). The p-i concept has emerged over the past 2 decades and describes situations where drugs can stimulate T cells via noncovalent direct interaction with T-cell receptor (TCR) and/or peptide-MHC complex (Pichler and Hausmann, 2016). In the p-i TCR the drug fits into some of the different TCR available. Sulfomethoxazole interacts with the CDR3 regions of the TCR, which usually interacts with the peptide-HLA complex. In p-i HLA the drug binds directly to the HLA molecule (Pichler and Hausmann, 2016). For these latter situations, it can be hypothesized that due to coincidence, the drug binds to the CDR3 region of the TCR or to the HLA molecule, and due to particular situations, this may be at the origin of the drug-induced hypersensitivity.

## CONCLUSION

Chemical or drug allergy may be the consequence of different key steps that allow DCs to prompt an adaptive immune system. Despite the presence of numerous chemical sensitizers, extremely diverse in weight and structure, most of them share a particular feature: “chemical stress.” In fact, intrinsic protein reactivity (or after their oxidation/metabolism), mainly electrophilicity, is important for protein haptentation allowing chemical allergens to become immunogenic. Moreover, chemical reactivity can be translated into an activation of the innate immune system and a biological response. Our hypothesis is that allergic reactions involving drug or chemical specific T cells are the consequences of a biological determinism that has developed to protect living organisms eliminating dangerous chemicals provoking acute or chronic toxicity.

However, in some rare cases, hypersensitivity reactions can be an accident due to genetic predispositions or specific features of the molecule of concern. In these situations, the immune system is fooled by drugs or chemicals leading to immunopathological reactions mostly mediated by T cells.

Questions are also still open concerning specific T cell repertoires for chemicals and drugs. Due to the artificial nature of chemical-T cell epitopes, it is not clear whether the selection of chemical-specific T cells is a common phenomenon or remains limited to few donors. A large T cell repertoire found in multiple donors would underline the potential of chemical to be recognized by many donors accounting for the “protective” and “detoxication” effect of the immune system.

Nevertheless, more research is needed to understand the mechanisms allowing the translation from the sensitization phase to the allergic reaction. What are the mechanisms dictating the fate of the response from sensitization, controlled by immune tolerance, to immunopathology? Can the situations in which the immune system is fooled generate an immunological memory?

## REFERENCES

- Adam, C., Wohlfarth, J., Haußmann, M., Sennfelder, H., Rodin, A., Maler, M., et al. (2017). Allergy-inducing chromium compounds trigger potent innate immune stimulation via ROS-dependent inflammasome activation. *J. Invest. Dermatol.* **137**, 367–376.
- Ade, N., Antonios, D., Kerdine-Romer, S., Boisleve, F., Rousset, F., and Pallardy, M. (2007). NF-kappaB plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO(4) but not by DNCB. *Toxicol. Sci.* **99**, 488–501.
- Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, Z. U. A., Mizuashi, M., Ohtani, T., et al. (2003). p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl<sub>2</sub> and 2,4-dinitrochlorobenzene. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 390–399.
- Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., and Tagami, H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of costimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.* **27**, 3031–3038.
- Aliberti, J. (2016). Immunity and tolerance induced by intestinal mucosal dendritic cells. *Mediators Inflamm.* **2016**, 3104727.
- Amali, M. O., Sullivan, A., Jenkins, R. E., Farrell, J., Meng, X., Faulkner, L., et al. (2017). Detection of drug-responsive B lymphocytes and antidrug IgG in patients with  $\beta$ -lactam hypersensitivity. *Allergy* **72**, 896–907.
- Antonios, D., Ade, N., Kerdine-Römer, S., Assaf-Vandecasteele, H., Larangé, A., Azouri, H., et al. (2009). Metallic haptens induce differential phenotype of human dendritic cells through activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *Toxicol. Vitro* **23**, 227–234.
- Antonios, D., Rousseau, P., Larangé, A., Kerdine-Römer, S., and Pallardy, M. (2010). Mechanisms of IL-12 synthesis by human dendritic cells treated with the chemical sensitizer NiSO<sub>4</sub>. *J. Immunol.* **185**, 89–98.
- Boislève, F., Kerdine-Römer, S., and Pallardy, M. (2005). Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha. *Toxicology* **206**, 233–244.
- Boislève, F., Kerdine-Römer, S., Rougier-Larzat, N., and Pallardy, M. (2004). Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF-alpha and MAPK. *J. Invest. Dermatol.* **123**, 494–502.
- de Bourayne, M., Gallais, Y., El Ali, Z., Rousseau, P., Damiens, M.-H., Cochet, C., et al. (2017). Protein kinase CK2 controls T-cell polarization through dendritic cell activation in response to contact sensitizers. *J. Leukoc. Biol.* **101**, 703–715.
- Byamba, D., Kim, T. G., Kim, D. H., Je, J. H., and Lee, M.-G. (2010). The roles of reactive oxygen species produced by contact allergens and irritants in monocyte-derived dendritic cells. *Ann. Dermatol.* **22**, 269–278.
- Corsini, E., Galbiati, V., Esser, P. R., Pinto, A., Racchi, M., Marinovich, M., et al. (2014). Role of PKC- $\beta$  in chemical allergen-induced CD86 expression and IL-8 release in THP-1 cells. *Arch. Toxicol.* **88**, 415–424.
- Corsini, E., Galbiati, V., Nikitovic, D., and Tsatsakis, A. M. (2013). Role of oxidative stress in chemical allergens induced skin cells activation. *Food Chem. Toxicol.* **61**, 74–81.
- Coutant, K. D., de Fraissinette, A. B., Cordier, A., and Ulrich, P. (1999). Modulation of the activity of human monocyte-derived dendritic cells by chemical haptens, a metal allergen, and a staphylococcal superantigen. *Toxicol. Sci.* **52**, 189–198.
- De Smedt, A. C., Van Den Heuvel, R. L., Zwi Berneman, N., and Schoeters, G. E. (2001). Modulation of phenotype, cytokine production and stimulatory function of CD34<sup>+</sup>-derived DC by NiCl<sub>2</sub>(2) and SDS. *Toxicol. Vitro* **15**, 319–325.
- Diepgen, T. L. (2012). Occupational skin diseases. *J. Dtsch. Dermatol.* **10**, 297–313. 315.
- Esser, P. R., Wölfle, U., Dürr, C., von Loewenich, F. D., Schempp, C. M., Freudenberg, M. A., et al. (2012). Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation. *PLoS One* **7**, e41340.
- Falta, M. T., Pinilla, C., Mack, D. G., Tinega, A. N., Crawford, F., Giulianotti, M., et al. (2013). Identification of beryllium-dependent peptides recognized by CD4<sup>+</sup> T cells in chronic beryllium disease. *J. Exp. Med.* **210**, 1403–1418.
- Faulkner, L., Gibson, A., Sullivan, A., Taylor, A., Usui, T., Alfirevic, A., et al. (2016). Detection of primary T cell responses to drugs and chemicals in HLA-typed volunteers: implications for the prediction of drug immunogenicity. *Toxicol. Sci.* **154**, 416–429.
- Franchi, L., Muñoz-Planillo, R., and Núñez, G. (2012). Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat. Immunol.* **13**, 325–332.
- Galbiati, V., Papale, A., Galli, C. L., Marinovich, M., and Corsini, E. (2014). Role of ROS and HMGB1 in contact allergen-induced IL-18 production in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2719–2727.
- Gibson, A., Kim, S.-H., Faulkner, L., Evely, J., Pirmohamed, M., Park, K. B., et al. (2015). In vitro priming of naïve T-cells with p-phenylenediamine and Bandrowski's base. *Chem. Res. Toxicol.* **28**, 2069–2077.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* **16**, 343–353.
- Kaplan, D. H., Igyártó, B. Z., and Gaspari, A. A. (2012). Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 114–124.
- Kavasi, R.-M., Berdiaki, A., Spyridaki, I., Corsini, E., Tsatsakis, A., Tzanakakis, G., et al. (2017). HA metabolism in skin homeostasis and inflammatory disease. *Food Chem. Toxicol.* **101**, 128–138.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384.
- Kezic, S. (2011). Genetic susceptibility to occupational contact dermatitis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **24**, 73S–78S.
- Laverge, S. N., Wang, H., Callan, H. E., Park, B. K., and Naisbitt, D. J. (2009). 'Danger' conditions increase sulfamethoxazole-protein adduct formation in human antigen-presenting cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **331**, 372–381.
- Leifer, C. A., and Medvedev, A. E. (2016). Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. *J. Leukoc. Biol.* **100**, 927–941.
- Li, X., and Zhong, F. (2014). Nickel induces interleukin-1 $\beta$  secretion via the NLRP3-ASC-caspase-1 pathway. *Inflammation* **37**, 457–466.
- Lopez, S., Gomez, E., Torres, M. J., Pozo, D., Fernandez, T. D., Ariza, A., et al. (2015). Betalactam antibiotics affect human dendritic cells maturation through MAPK/NF-kB systems. Role in allergic reactions to drugs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **288**, 289–299.
- Luis, A., Martins, J. D., Silva, A., Ferreira, I., Cruz, M. T., Neves, B. M., et al. (2014). Oxidative stress-dependent activation of the eIF2 $\alpha$ -ATF4 unfolded protein response branch by skin sensitizer 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene modulates dendritic-like cell maturation and inflammatory status in a biphasic manner [corrected]. *Free Radic. Biol. Med.* **77**, 217–229.

- Man, S. M., and Kanneganti, T. D. (2015). Regulation of inflammatory activation. *Immunol. Rev* **265**, 6–21.
- Manome, H., Aiba, S., and Tagami, H. (1999). Simple chemicals can induce maturation and apoptosis of dendritic cells. *Immunology* **98**, 481–490.
- Martin, S. F. (2014). Adaptation in the innate immune system and heterologous innate immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 4115–4130.
- Martin, S. F. (2012). Contact dermatitis: from pathomechanisms to immunotoxicology. *Exp. Dermatol.* **21**, 382–389.
- Martin, S. F. (2015). New concepts in cutaneous allergy. *Contact Dermat.* **72**, 2–10.
- Martin, S. F., Dudda, J. C., Bachtanian, E., Lembo, A., Liller, S., Dürr, C., et al. (2008). Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* **205**, 2151–2162.
- Martin, S. F., Esser, P. R., Schmucker, S., Dietz, L., Naisbitt, D. J., Park, B. K., et al. (2010). T-cell recognition of chemicals, protein allergens and drugs: towards the development of in vitro assays. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 4171–4184.
- Martin, S. F., Esser, P. R., Weber, F. C., Jakob, T., Freudenberg, M. A., Schmidt, M., et al. (2011). Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy* **66**, 1152–1163.
- Matzinger, P. (2012). The evolution of the danger theory. Interview by Lauren Constable, Commissioning Editor. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **8**, 311–317.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991–1045.
- Matzinger, P., and Kamala, T. (2011). Tissue-based class control: the other side of tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 221–230.
- Mussotter, F., Tomm, J. M., El Ali, Z., Pallardy, M., Kerdine-Römer, S., Götz, M., et al. (2016). Proteomics analysis of dendritic cell activation by contact allergens reveals possible biomarkers regulated by Nrf2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **313**, 170–179.
- Muto, J., Morioka, Y., Yamasaki, K., Kim, M., Garcia, A., Carlin, A. F., et al. (2014). Hyaluronan digestion controls DC migration from the skin. *J. Clin. Invest.* **124**, 1309–1319.
- Neves, B. M., Gonçalo, M., Figueiredo, A., Duarte, C. B., Lopes, M. C., Cruz, M. T., et al. (2011). Signal transduction profile of chemical sensitizers in dendritic cells: an endpoint to be included in a cell-based in vitro alternative approach to hazard identification?. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **250**, 87–95.
- Nikitovic, D., Berdiaki, A., Galbiati, V., Kavasi, R.-M., Papale, A., Tsatsakis, A., et al. (2015). Hyaluronan regulates chemical allergen-induced IL-18 production in human keratinocytes. *Toxicol. Lett.* **232**, 89–97.
- Onami, K., Kimura, Y., Ito, Y., Yamauchi, T., Yamasaki, K., and Aiba, S. (2014). Nonmetal haptens induce ATP release from keratinocytes through opening of pannexin hemichannels by reactive oxygen species. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 1951–1960.
- Peiser, M., Tralau, T., Heidler, J., Api, A. M., Arts, J. H. E., Basketter, D. A., et al. (2012). Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 763–781.
- Pichler, W. J., and Hausmann, O. (2016). Classification of drug hypersensitivity into allergic, p-i, and pseudo-allergic forms. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **171**, 166–179.
- Rachmawati, D., Alsalem, I. W. A., Bontkes, H. J., Verstege, M. I., Gibbs, S., von Blomberg, B. M. E., et al. (2015). Innate stimulatory capacity of high molecular weight transition metals Au (gold) and Hg (mercury). *Toxicol. Vitro* **29**, 363–369.
- Rachmawati, D., Bontkes, H. J., Verstege, M. I., Muris, J., von Blomberg, B. M. E., Scheper, R. J., et al. (2013). Transition metal sensing by Toll-like receptor-4: next to nickel, cobalt and palladium are potent human dendritic cell stimulators. *Contact Dermat.* **68**, 331–338.
- Raghavan, B., Martin, S. F., Esser, P. R., Goebeler, M., Schmidt, M., et al. (2012). Metal allergens nickel and cobalt facilitate TLR4 homodimerization independently of MD2. *EMBO Rep.* **13**, 1109–1115.
- Ryan, C. A., Kimber, I., Basketter, D. A., Pallardy, M., Gildea, L. A., and Gerberick, G. F. (2007). Dendritic cells and skin sensitization: biological roles and uses in hazard identification. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **221**, 384–394.
- Sanderson, J. P., Naisbitt, D. J., Farrell, J., Ashby, C. A., Tucker, M. J., Rieder, M. J., et al. (2007). Sulfamethoxazole and its metabolite nitroso sulfamethoxazole stimulate dendritic cell costimulatory signaling. *J. Immunol.* **178**, 5533–5542.
- 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.
- Schmidt, R. J., and Chung, L. Y. (1993). Perturbation of glutathione status and generation of oxidative stress in mouse skin following application of contact allergenic sesquiterpene lactones and isothiocyanates. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* **23**, 889–897.
- Schmidt, M., and Goebeler, M. (2015). Immunology of metal allergies. *J. Dtsch. Dermatol.* **13**, 653–660.
- Schmidt, M., Raghavan, B., Müller, V., Vogl, T., Fejer, G., Tchaptchet, S., et al. (2010). Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat. Immunol.* **11**, 814–819.
- Sebastian, K., Ott, H., Zwadlo-Klarwasser, G., Skazik-Voogt, C., Marquardt, Y., Czaja, K., et al. (2012). Evaluation of the sensitizing potential of antibiotics in vitro using the human cell lines THP-1 and MUTZ-LC and primary monocyte-derived dendritic cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **262**, 283–292.
- Sharma, A. M., Novalen, M., Tanino, T., Uetrecht, J. P., et al. (2013). 12-OH-nevirapine sulfate, formed in the skin, is responsible for nevirapine-induced skin rash. *Chem. Res. Toxicol.* **26**, 817–827.
- Tanno, L. K., Calderon, M. A., and Demoly, P. (2016a). New allergic and hypersensitivity conditions section in the International Classification of Diseases-11. *Allergy Asthma Immunol. Res.* **8**, 383–388.
- Tanno, L. K., Calderon, M. A., and Demoly, P. (2016b). Supporting the validation of the new allergic and hypersensitivity conditions section of the World Health Organization International Classification of Diseases-11. *Asia Pac. Allergy* **6**, 149–156.
- Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., et al. (2002). Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **195**, 99–111.
- Thierse, H.-J., Gamberdinger, K., Junkes, C., Guerreiro, N., Weltzien, H. U., et al. (2005). T cell receptor (TCR) interaction with haptens: metal ions as non-classical haptens. *Toxicology* **209**, 101–107.
- Tsan, M.-F., and Gao, B. (2004). Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 514–519.
- Tuschl, H., Kovac, R., and Weber, E. (2000). The expression of surface markers on dendritic cells as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Toxicol. Vitro* **14**, 541–549.
- Usui, T., and Naisbitt, D. J. (2017). Human leukocyte antigen and idiosyncratic adverse drug reactions. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **32**, 21–30.
- Uzzaman, A., and Cho, S. H. (2012). Chapter 28: Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma* **33(Suppl 1)**, S96–S99.
- Vandebriel, R. J., Pennings, J. L. A., Baken, K. A., Pronk, T. E., Boersma, A., Gottschalk, R., et al. (2010). Keratinocyte gene

- expression profiles discriminate sensitizing and irritating compounds. *Toxicol. Sci.* **117**, 81–89.
- Walsh, K. P., and Mills, K. H. G. (2013). Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends Immunol.* **34**, 521–530.
- Wang, B.-J., Sheu, H.-M., Guo, Y.-L., Lee, Y.-H., Lai, C.-S., Pan, M.-H., et al. (2010). Hexavalent chromium induced ROS formation, Akt, NF-kappaB, and MAPK activation, and TNF-alpha and IL-1alpha production in keratinocytes. *Toxicol. Lett.* **198**, 216–224.
- Watanabe, H., Gaide, O., Pétrilli, V., Martinon, F., Contassot, E., Roques, S., et al. (2007). Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 1956–1963.
- Weber, F. C., Esser, P. R., Müller, T., Ganesan, J., Pellegatti, P., Simon, M. M., et al. (2010). Lack of the purinergic receptor P2X(7) results in resistance to contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* **207**, 2609–2619.
- White, K. D., Chung, W.-H., Hung, S.-I., Mallal, S., and Phillips, E. J. (2015). Evolving models of the immunopathogenesis of T cell-mediated drug allergy: The role of host, pathogens, and drug response. *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 219–234.
- Yasukawa, S., Miyazaki, Y., Yoshii, C., Nakaya, M., Ozaki, N., Toda, S., et al. (2014). An ITAM-Syk-CARD9 signalling axis triggers contact hypersensitivity by stimulating IL-1 production in dendritic cells. *Nat. Commun.* **5**, 3755.
- Zhang, X., Sharma, A. M., and Uetrecht, J. (2013). Identification of danger signals in nevirapine-induced skin rash. *Chem. Res. Toxicol.* **26**, 1378–1383.



## Annexe 2

# Effets des métaux allergisants sur la lignée monocyttaire THP-1 et les kératinocytes humains : implication dans l'eczéma allergique aux métaux

## 1. Introduction

Dans ce projet, réalisé au sein de l'Inserm UMR-996 (Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France) et du laboratoire de Toxicologie (Université Saint-Joseph, Faculté de Pharmacie, Beyrouth, Liban), nous nous sommes intéressés à la phase de sensibilisation de l'EAC causée par les métaux (nickel et cobalt) et plus particulièrement à la réponse des cellules dendritiques et des kératinocytes humains.

Nous avons montré précédemment une production des cytokines membres de la famille de l'IL-12 par les cellules dendritiques dérivées de monocyte humains (MoDC) activées par le nickel. Afin de pouvoir étudier de nouvelles voies de signalisation activées par les métaux et impliquées dans la production des cytokines membres de la famille de l'IL-12, nous avons choisi de travailler avec une lignée cellulaire THP-1. Ce sont des cellules myéloïdes pro-monocytaires immortalisées issues de patients leucémiques et utilisées dans le test h-CLAT validés par l'ECVAM (European Center for Validation of Alternative Methods) pour déterminer le pouvoir sensibilisant des molécules en mesurant l'augmentation de deux marqueurs de maturation de la DC, CD86 et CD54, après 24h de stimulation par la molécule à tester (Ashikaga et al. 2006).

Cependant, le nickel et le cobalt n'étaient pas capables d'induire la production des cytokines : IL-12p40 et IL-23 par les THP-1. Seul une induction de l'expression d'*ebi3* a été détectée dans les THP-1 activées par le nickel. Ainsi, nous avons voulu voir s'il existe une synergie entre le nickel et d'autres signaux pro-inflammatoires permettant la production des cytokines membres de la famille de l'IL-12. Dans un premier temps, nous avons ajouté du TNF- $\alpha$  à une stimulation par du

nickel et dans un deuxième temps du cycloheximide (CHX). Nos résultats montrent une induction de l'expression de l'ARNm de l'*il-12p40* par les THP-1 prétraitées par du CHX et activées par le nickel ou le cobalt. Pour cela nous suggérons que la CHX exerce un effet inhibiteur sur une protéine non identifiée pour le moment et qui pourrait inhiber l'expression de l'*il-12p40*.

Parallèlement, nous avons caractérisé la réponse des kératinocytes suite à une stimulation par du nickel en utilisant une lignée de cellules spontanément immortalisées (HaCaT). Nos résultats ont montré une faible induction de l'IL-8 par le NiSO<sub>4</sub> dans les HaCaT. Cependant aucune induction d'expression des autres cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-12p40, IL-23p19) et chimiokines (CCL20) n'a été détectée dans les kératinocytes stimulés par du NiSO<sub>4</sub>.

Nos résultats montrent une différence dans la réponse inflammatoire induite par les métaux allergisants entre les différents modèles cellulaires : MoDC, THP-1 et HaCaT.

## 2. Matériels et Méthodes

### • Traitement des cellules THP-1

Les cellules THP-1 ont été gracieusement offertes par le laboratoire d'immuno-toxicologie de l'INSERM UMR-S 996. Les cellules sont cultivées à la concentration de 2 à 4×10<sup>5</sup> cellules/ml et sontensemencées avec du  $\beta$ -mercaptoéthanol (50 $\mu$ M). Les cellules sont entretenues dans un milieu de culture RPMI enrichi avec 10% de SVF décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes, 1% pénicilline-streptomycine et 1% de sodium pyruvate. Les THP-1 (10<sup>6</sup> cellules/ml) ont été incubées en milieu RPMIc, en présence du NiSO<sub>4</sub> à 500  $\mu$ M ou du CoCl<sub>2</sub> à 500  $\mu$ M en présence ou non du TNF- $\alpha$  (1 ng/ml et 10 ng/ml) pendant le temps indiqué. Le LPS est utilisé comme contrôle positif à la concentration de 1  $\mu$ g/ml. Dans certaines expériences, les cellules THP-1 ont été prétraitées pendant 1 heure avec la cycloheximide (CHX) à 1  $\mu$ g/ml et 10  $\mu$ g/ml et ensuite stimulées par du

nickel ou du cobalt. La cytotoxicité des produits a été vérifiée après 24 heures de stimulation par un comptage au bleu de trypan et par un test colorimétrique MTT [(bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)], et n'excède pas les 25%.

- **Traitement des cellules HaCaT**

Les cellules de la lignée HaCaT ont été gracieusement offertes par Dr Joël Raingeaud du laboratoire « signalisation Rh GTPases et progression tumorale » U749 Gustave Roussy. Ces cellules sont mises en culture dans du DMEM qui sera complété par : 10% de SVF inactivé, 1% de sodium pyruvate et 0.1 mg/ml de streptomycine et 100 U/ml de pénicilline (Sigma® SLBH 5008V). En entretien, les cellules HaCaT sontensemencées à une densité de  $1.2 \times 10^6$  cellules par flacon de 75 cm<sup>2</sup>. Lorsque les cellules arrivent à 70-80% de confluence, elles sont détachées de leur support afin d'être de nouveauensemencées. Pour cela, le tapis cellulaire est, dans un premier temps, « lavé » avec du PBS, puis les cellules sont recouvertes par 3 ml d'une solution de trypsine-EDTA pendant 10 à 15 minutes. Après décollement des cellules, l'action de la trypsine est inhibée par ajout de DMEM complet. Pour nos différentes expériences, les cellules sontensemencées dans des plaques de 6 puits à raison d'environ 50000 cellules/cm<sup>2</sup>. Elles seront ensuite stimulées en présence du NiSO<sub>4</sub> à 500 µM pendant le temps indiqué. Le LPS est utilisé comme contrôle positif à la concentration de 1 µg/ml. La cytotoxicité des produits a été vérifiée après 24 heures de stimulation par un test colorimétrique MTT [(bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)], et n'excède pas les 25%.

- **Isolement des ARN, transcription inverse et PCR semi-quantitative**

Les cellules HaCaT ou THP-1 sont récupérées et lavées en PBS. Les ARN totaux sont ensuite extraits à l'aide du kit KIT Qiagen RNeasy<sup>®</sup> Plus MiniKit, dosés et contrôlés pour leur intégrité. Le premier brin d'ADNc est synthétisé à partir d'1 µg d'ARN total avec des amorces oligo (dT), 2 U/µl d'inhibiteurs d'ARNases et 0,2 U/µl de la transcriptase reverse AMV en suivant le protocole du fournisseur de l'enzyme. Toutes les PCR ont été effectuées au niveau du thermocycleur en ajoutant au volume d'ADNc (2.5-5µl), 12.5 µl du PCR Master Mix qui est un mélange renfermant la Taq polymérase à raison de 0.05 unité/µl, 4mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.04mM de chacun des dNTP et un tampon spécifique de la Taq polymérase, 2µM d'amorces sens et anti-sens spécifiques pour chaque gène et un volume d'eau afin d'avoir un volume final de 25µl. La révélation des amplicons se fait par migration électrophorétique des différents échantillons sur un gel d'agarose 2%. Le gel est préparé en mélangeant à chaud 2.5g de d'agarose à 125 ml de TBE (Tris- Borate-EDTA) 1X, auxquels 5 µl de bromure d'ethidium ou BET sont ajoutés. Ce mélange est laissé refroidir. Parallèlement, les échantillons sont préparés en mélangeant 20 µl d'ADNc (15µl pour la β-actine) à 4 µl (3 µl pour la β-actine) de loading dye 6X. Une fois le gel refroidi, les échantillons y sont déposés avec le ladder ou échelle d'ADN et ils migrent à une vitesse de 100 V pendant 40-50 minutes. Après migration, la révélation de fait sous lampe ultraviolet UV à l'aide du programme UMP.

- **PCR en temps-réel (RT-qPCR)**

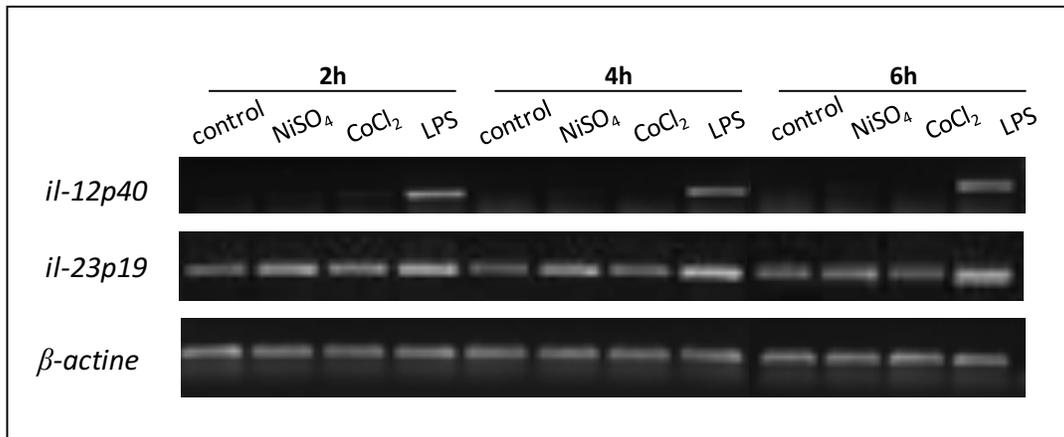
Les qPCR sont réalisées en utilisant la technique du SYBR Green sur un appareil CFX96 (Biorad). Chaque milieu réactionnel de 10 µl est constitué de : 4 µl d'une dilution 1:50 de cDNA, amorces sens et anti-sens (0.5 µM), préparation de Sso Advanced Supermix (Biorad, France).

Après activation de l'ADN polymérase à 95°C pendant 30 secondes, la réaction PCR est réalisée sur 44 cycles de 5 secondes à 95°C et 5 secondes à 60°C ; la lecture du signal SYBR Green est faite à la fin de chaque cycle. A la fin de la réaction, la dénaturation des amplicons en ADNdb est effectuée pour connaître leur homogénéité, indicatrice de la spécificité de la réaction d'amplification.

### 3. Résultats

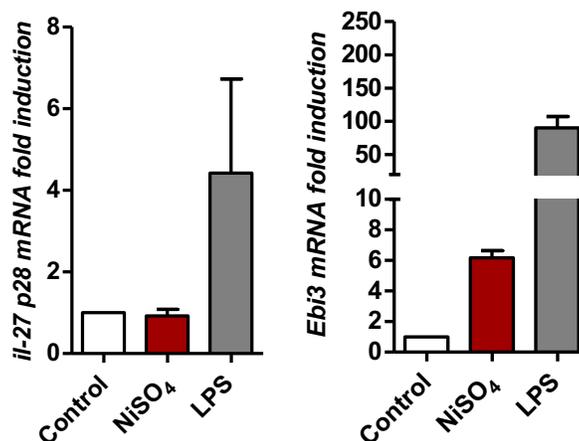
- **Cellules THP-1**

Nos résultats ont mis en évidence une absence d'induction de l'expression de l'*il-12p40* et de l'*il-23p19* par le nickel et le cobalt durant les 3 cinétiques (**Figure 1**). Cependant le nickel était capable d'induire l'expression d'*ebi3* après 4 heures de stimulation (**Figure 2**). Par ailleurs, l'ajout du TNF- $\alpha$  (1et 10ng/ml) aux cellules THP-1 en présence du nickel a faiblement induit l'expression de l'*il-12p40* avec une induction plus importante à la dose de 10ng/ml (**Figure 3**). Ceci n'était pas observé avec l'association cobalt+TNF- $\alpha$ . Cependant l'expression de l'ARNm de l'*il-12p40* a été fortement induite suite au prétraitement des THP-1 par la CHX suivie par la stimulation avec le nickel ou le cobalt (**Figure 4**). Ceci suggère qu'il existerait une voie de signalisation, activée par les métaux allergisants, et qui semble inhiber l'expression de l'*il-12p40*.



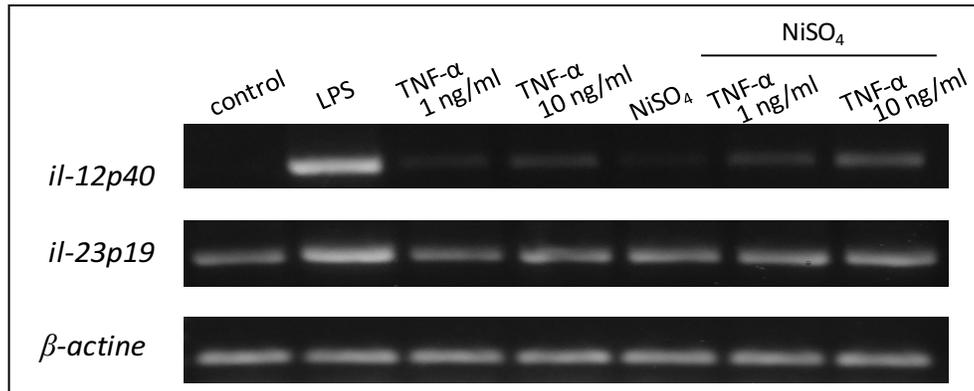
**Figure 1 : Cinétique d’expression des sous-unités de l’IL-23 dans les cellules THP-1 activées par les métaux allergisants**

*Les cellules THP-1 ont été incubées pendant 2, 4 et 6 heures en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> (500 μM) ou du CoCl<sub>2</sub> (500 μM) ou du LPS (1 μg/ml). L’expression des ARNm de l’il-12p40 et de l’il-23p19 a été évaluée par PCR suivie par une migration électrophorétique sur gel d’agarose. Ce résultat est représentatif de 3 expériences indépendantes*



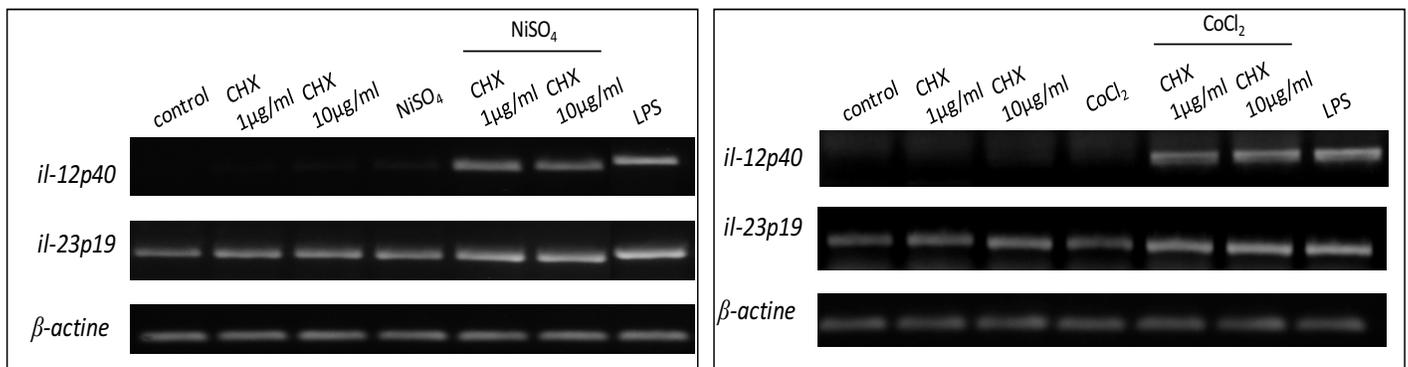
**Figure 2 : Expression des deux sous-unités de l’IL-27 dans les cellules THP-1 activées par le nickel**

*Les cellules THP-1 ont été incubées pendant 4 heures en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> (500 μM) ou du LPS (1 μg/ml). L’expression des ARNm de l’il-27p28 et de l’ebi3 a été évaluée par PCR en temps-réel. Les résultats de qPCR sont présentés sous forme d’index de stimulation des cellules traitées par rapport aux cellules non traitées. (n=2)*



**Figure 3 : Expression des sous-unités de l'IL-23 dans les cellules THP-1 activées par l'association nickel+TNF- $\alpha$**

*Les cellules THP-1 ont été incubées pendant 4 heures en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> et/ou du TNF- $\alpha$ . L'expression des ARNm de l'il-12p40 et de l'il-23p19 a été évaluée par PCR suivie par une migration électrophorétique sur gel d'agarose. Ce résultat est représentatif de 3 expériences indépendantes*

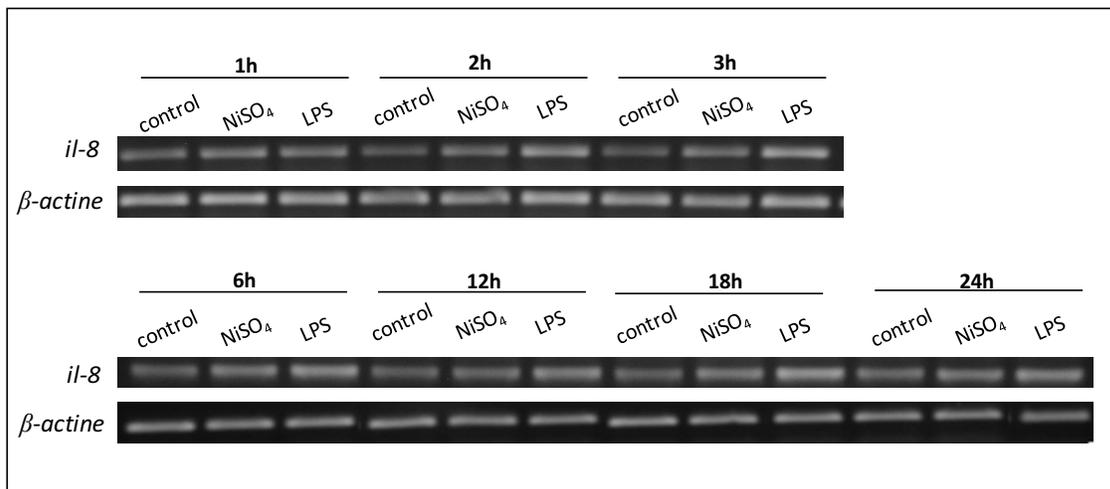


**Figure 4 : Expression des sous-unités de l'IL-23 dans les cellules THP-1 prétraitées par la CHX et activées par l'association nickel ou le cobalt.**

*Les cellules THP-1 ont été prétraitées pendant 1 heure avec la CHX et ensuite stimulées pendant 4 heures en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> ou du CoCl<sub>2</sub>. L'expression des ARNm de l'il-12p40 et de l'il-23p19 a été évaluée par PCR suivie par une migration électrophorétique sur gel d'agarose. Ce résultat est représentatif de 3 expériences indépendantes*

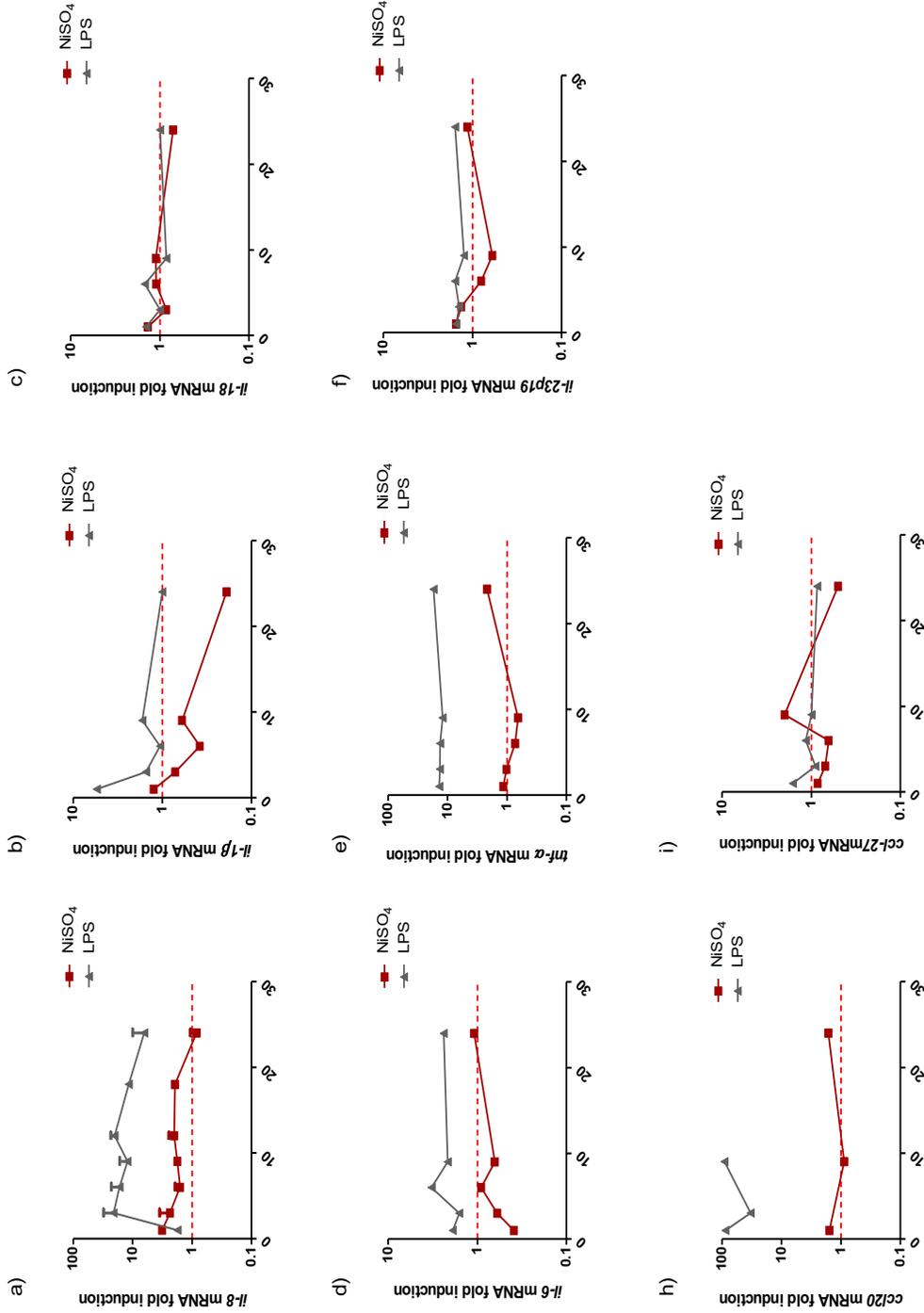
- **Cellules HaCaT**

Nos résultats ont montré une induction faible et précoce de l'expression de l'*il-8* par les cellules HaCaT activées par le nickel (Figure 5 et 6). Cependant nos résultats n'ont mis en évidence aucune induction par le nickel de l'expression des cytokines d'intérêt : IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, IL-23p19, TNF- $\alpha$ , CCL20 et CCL 27.



**Figure 5 : Cinétique d'expression de l'*il-8* dans les cellules HaCaT activées par le nickel**

*Les cellules HaCaT ont été incubées en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> ou du LPS. L'expression des ARNm a été évaluée par PCR suivie par une migration électrophorétique sur gel d'agarose. Ce résultat est représentatif de 3 expériences indépendantes*



**Figure 6 : Cinétique d'expression des cytokines dans les cellules HaCaT activées par le nickel**

*Les cellules HaCaT ont été incubées en milieu de culture seul ou en présence du NiSO<sub>4</sub> ou du LPS. L'expression des ARNm de l'IL-27p28 et de l'eb13 a été évaluée par PCR en temps-réel. Les résultats de qPCR sont présentés sous forme d'index de stimulation des cellules traitées par rapport aux cellules non traitées.*



## Annexe 3

### PUBLICATIONS

---

**Nickel Sulfate Promotes IL-17A Producing CD4+ T-Cells by an IL-23-Dependent Mechanism Regulated by TLR4 and Jak-STAT Pathways.**

Rami Bechara, Diane Antonios, Hayat Azouri and Marc Pallardy  
Journal of Investigative Dermatology. 2017 Oct;137(10):2140-2148

**Chemical or Drug Hypersensitivity: is the Immune System Clearing the Danger?**

Marc pallardy, Rami Bechara  
Toxicological Sciences. 2017 Jul 1;158(1):14-22

**Identification of T-cell epitopes from benzylpenicillin conjugated to human serum albumin and implication in penicillin allergy.**

Marie Eliane Azoury, Lucia Fili, Rami Bechara, Noémie Scornet, Luc de Chaisemartin, Richard Weaver, Nancy Claude, Bernard Maillère, Paola Parronchi, Delphine Joseph and Marc Pallardy.  
(en révision dans Allergy)

### COMMUNICATIONS ORALES

---

**The chemical sensitizer nickel sulfate triggers the production of interleukin-23 by human dendritic cells.**

Rami Bechara, Diane Antonios, Hayat Azouri and Marc Pallardy  
*26<sup>th</sup> congress of the European Research group on contact dermatitis, Milan, Italy; Nov 2015.*  
*(Young Investigator Award)*

**Nickel sulfate induces IL-23 production in human dendritic cells leading to Th17 cells development: Implication of p38MAPK, NF-kB and JAK-STAT signaling pathways.**

Rami Bechara, Diane Antonios, Hayat Azouri and Marc Pallardy  
*The annual CFCD meeting, Paris, France, Sept 2016.*

**Role of T-cells in drug and chemical allergy.**

Rami Bechara, Marie-Eliane Azouri, Lucia Fili, Noemie Scornet, Delphine Joseph, Bernard Maillere, Paola Parronchi and Marc Pallardy  
*8th meeting of the Immunotoxicology and chemical allergy specialty section, Châtenay-Malabry, France; Nov 2016.*

**Updates in Nickel allergy: identification of naïve T-cells recognizing nickel and regulation of IL-12 cytokine family in human dendritic cells.**

Rami Bechara, Diane Antonios, Hayat Azouri and Marc Pallardy  
*38th annual meeting of the American College of Toxicology, Baltimore, Maryland, USA; Nov 2016.*  
*(International Travel Grant Award + Best short oral presentation)*

**Metallic haptens regulate IL-12 cytokine family in human dendritic cells modulating T-cell polarization.**

Rami Bechara, Diane Antonios, Hayat Azouri and Marc Pallardy

27<sup>th</sup> congress of the European Research group on contact dermatitis, *Kemptthal, Switzerland; May 2017*

**Understanding the mechanism of metals allergy: is there anything missing?**

Rami Bechara, Diane Antonios, Hayat Azouri and Marc Pallardy

17th Meeting of the Doctoral School ED569 Innovation thérapeutique: du fondamental à l'appliqué; *Châtenay-Malabry, France; June 2017*

**Nickel Sulfate Promotes IL-17A Producing CD4+ T-Cells by an IL-23-Dependent Mechanism Regulated by TLR4 and Jak-STAT Pathways.**

Rami Bechara, Diane Antonios, Hayat Azouri and Marc Pallardy

Congrès Annuel de la Société Française d'Immunologie; *Reims, France; Nov 2017*

*(Bourse de voyage)*

**COMMUNICATIONS AFFICHEES**

---

**Effect of nickel sulfate on interleukin-12 cytokine family in human monocyte derived dendritic cells.**

Rami Bechara, Diane Antonios, Hayat Azouri and Marc Pallardy

\*Annual congress of SPTC (Société de Pharmacologie-Toxicologie Cellulaire) - *Rennes, France ; Nov 2014*

\*54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT) - *San Diego, California; March 2015*

**The chemical sensitizer nickel sulfate triggers the production of interleukin-23 by human dendritic cells.**

Rami Bechara, Diane Antonios, Hayat Azouri and Marc Pallardy

\*6th annual YRLS (Young Researchers in Life Sciences) Conference - *Paris, France; May 2015.*

\*XV<sup>èmes</sup> Journées de l'Ecole Doctorale ED425 - *Châtenay-Malabry, France ; June 2015.*

*(Prix Meilleur Poster)*

**The chemical sensitizer nickel sulfate triggers the production of interleukin-23 by human dendritic cells: involvement of p38 MAPK and NF-kB pathways.**

Rami Bechara, Diane Antonios, Hayat Azouri and Marc Pallardy

\*51th Annual Meeting of the European Societies of Toxicology (EUROTOX) - *Porto, Portugal; Sept 2015.*

*(Bourse de voyage SFT)*

\*Journées de Recherche de la Faculté de Pharmacie, *Châtenay-Malabry, France ; Nov 2015*

**Characterization of naïve T-cell response specific to penicillin: Implication in Drug-allergy.**

Marie Eliane Azouri, Noemie Scornet, Rami Bechara, Cathy Nhim, Bernard Maillere, Delphine Joseph and Marc Pallardy.

Journées de Recherche de la Faculté de Pharmacie, *Châtenay-Malabry, France ; Nov 2015*

**Identification of penicillin-bound peptides responsible for naive T cell activation and immunization of allergic patients to penicillin.**

Marie Eliane Azouri, Lucia Fili, Rami Bechara, Noemie Scornet, Cathy Nhim, Richard Weaver, Delphine Josphe, Bernard Maillere, Paola Parronchi and Marc Pallardy.

*Drug hypersensitivity meeting 7 (DHM 7), Malaga, Spain ; Apr 2016*

**T-cell Recognition of Chemicals: Towards the Identification of Naïve T-cells Specific to Nickel.**

Rami Bechara, Marie-Eliane Azouri, Bernard Maillere and Marc Pallardy

*XVI<sup>èmes</sup> Journées de l'Ecole Doctorale ED425 - Châtenay-Malabry, France ; June 2015.*

*(Prix Meilleur Poster)*

**Nickel sulfate and interleukine-12 cytokine family: Shedding light on interleukine-27.**

Rami Bechara, Sofia Berrabah, Diane Antonios, Hayat Azouri and Marc Pallardy

*52th Annual Meeting of the European Societies of Toxicology (EUROTOX) - Seville, Spain; Sept 2016.*

**Regulation of the Interleukine-12 cytokine family in dendritic cells by the Jak-STAT signaling pathway: Implication in nickel allergy.**

Rami Bechara, Diane Antonios, Hayat Azouri and Marc Pallardy

*19th International Congress on In Vitro Toxicology ESTIV, Juan-les-Pins, France; Oct 2016.*

*(Prix Meilleur Poster)*

**Updates in nickel allergy: in vitro regulation of interleukin-12 cytokine family in human dendritic cells and identification of naïve T-cells specific to nickel.**

Rami Bechara, Diane Antonios, Marie-Eliane Azoury, Hayat Azouri and Marc Pallardy

*Journées de Recherche de la Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France; Dec 2016*

**Nickel sulfate promotes IL-23 production in human dendritic cells leading to Th17 cells differentiation.**

Rami Bechara, Diane Antonios, Hayat Azouri and Marc Pallardy

*56th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT) - Baltimore, Maryland; March 2017*

**Identification and frequency of circulating naïve CD4+ and CD8+ T cells recognizing penicillin: Implication in drug allergy.**

Rami Bechara, Marie-Eliane Azouri, Delphine Joseph, Bernard Maillere and Marc Pallardy

*56th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT) - Baltimore, Maryland; March 2017*

**Nickel sulfate regulates IL-12 cytokine family in human dendritic cells impacting T-cell polarization: novel role for Jak-STAT and NFIL-3 pathways.**

Rami Bechara, Diane Antonios, Hayat Azouri and Marc Pallardy

*53th Annual Meeting of the European Societies of Toxicology (EUROTOX) - Bratislava, Slovakia; Sept 2017.*





**Titre : Étude de la coopération entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T dans les allergies aux produits chimiques et aux médicaments**

**Mots clés :** Allergie, Cellules dendritiques; Lymphocytes T; Molécules allergisantes; Interleukine-23; Interleukine-12

**Résumé :** Les allergies aux produits chimiques et aux médicaments constituent un problème majeur de santé publique. L'objectif de ce travail est de mieux comprendre l'interaction entre les cellules dendritiques (DC) et les lymphocytes T (LT) dans les allergies induites par les haptènes métalliques (nickel et cobalt) et les médicaments [benzylpénicilline (BP)]. En présence des signaux de danger, les DC acquièrent un phénotype dit « mature » et présentent l'antigène apprêté aux LT spécifiques de cet antigène. Les LT représentent les cellules effectrices responsables d'une manière directe ou non des symptômes observés lors des réactions allergiques. Dans un premier temps, nous montrons que le nickel est capable d'induire un ratio d'interleukines (IL) IL-23/IL-12p70 élevé dans les DC favorisant ainsi la polarisation Th17 qui est détectée chez la majorité des patients allergiques au nickel. Nous montrons aussi pour la première fois une production de l'IL-27 par les DC activées par le nickel. Nous avons ensuite montré l'implication du TLR4 et de la voie Jak-STAT dans la régulation des cytokines membres de la famille de l'IL-12. L'activation de la voie Jak-STAT est nécessaire pour la réponse Th1 en favorisant la production de l'IL-12p70 et en inhibant la production de l'IL-23 par les DC activées par du nickel.

Par ailleurs, nous avons identifié et, pour la première fois, une activation du facteur de transcription NFIL-3, au sein des DC, par le nickel et le cobalt voire d'une manière plus intense avec ce dernier. D'autre part, nous avons mis en évidence l'existence d'un répertoire de LT naïfs CD4+ et CD8+, provenant de la population générale, spécifiques du nickel. L'activation de ces LT requiert les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et ils présentent un faible taux de réactivité croisée avec le cobalt. Simultanément, nous avons mis en évidence la possibilité de détecter des LT naïfs CD8+ spécifiques de la BP. L'activation de ces LT dépend des molécules du CMH de classe I et du protéasome. D'une manière générale, notre travail contribue à une meilleure compréhension des mécanismes des réactions allergiques d'une part, en montrant la fine régulation des cytokines membres de la famille de l'IL-12 dans les DC et d'autre part en élucidant les mécanismes de l'immunisation contre les molécules allergisantes.

**Title : Study of dendritic cells and T-lymphocytes cooperation in drug and chemical allergy**

**Keywords :** Allergy, Dendritic cells, T-cells, Haptens, Interleukin-23, Interleukin-12

**Abstract :** Drug and chemical allergy is a major public health concern. The aim of this work was to understand the interaction between dendritic cells (DCs) and T-lymphocytes (LT) in allergic manifestations induced by metallic haptens (nickel and cobalt) and benzylpenicillin (BP). DCs capture the antigen, start maturation, migrate to the regional lymph node and activate hapten-specific T-cells. The latter will represent the effector cells responsible directly or not for the symptoms observed during allergic reactions. We showed that nickel induced a high ratio of interleukin (IL) IL-23 compared to IL-12p70 in DCs leading to Th17 polarization as seen in allergic patients. We also showed for the first time the production of IL-27 by nickel-activated DCs. Moreover, we showed the involvement of TLR4 and Jak-STAT pathways in IL-12 cytokine family regulation. The activation of the Jak-STAT pathway seems to maintain the IL-23/IL-12p70 balance by limiting IL-23 production and promoting Th1 polarization.

Furthermore, we identified for the first time the activation of NFIL-3 in DC by nickel and cobalt, more intensely with the latter. In addition, nickel-recognizing CD4+ and CD8+ naïve T-cells repertoire was identified from the general population. These positive T-cells were shown to recognize nickel in the context of major histocompatibility complex (MHC) molecules. We also showed that a low frequency of nickel-recognizing CD4+ naïve T-cells cross-reacted with cobalt. Simultaneously, we showed the possibility of detecting a naïve CD8+ T-cells repertoire for BP. The activation of these specific T-cells requires MHC class I molecules and proteasome. In resume, our work contributes to a better understanding of allergic reactions, on one hand, by studying the fine regulation of the IL-12 cytokines family in DCs and on the other hand, by clarifying the mechanisms of immunization against drugs and chemicals.

