



HAL
open science

Les allergies cutanées aux fragrances : mécanisme d'action et rôle du facteur de transcription Nrf2. Du modèle 2D au modèle 3D.

Chloé Raffalli

► To cite this version:

Chloé Raffalli. Les allergies cutanées aux fragrances : mécanisme d'action et rôle du facteur de transcription Nrf2. Du modèle 2D au modèle 3D.. Toxicologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS045 . tel-02069839

HAL Id: tel-02069839

<https://theses.hal.science/tel-02069839>

Submitted on 16 Mar 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Les allergies cutanées aux fragrances : mécanisme d'action et rôle du facteur de transcription Nrf2. Du modèle 2D au modèle 3D

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud
Faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry
Inserm UMR 996
Inflammation, Chimiokines et Immunopathologie

École doctorale n°569 Innovation Thérapeutique, du fondamental à
l'appliqué
Spécialité de doctorat: Pharmacologie-Toxicologie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 15 février 2018, par

Chloé Raffalli

Composition du Jury :

| | |
|---|---------------------|
| Pr. Oliver Nüsse Professeur des Universités, Université Paris-Saclay, Orsay, France (U1174) | Président du jury |
| Pr. Brunhilde Blömeke Professeur des Universités, Université de Trèves, Allemagne | Rapporteur |
| Dr. Michel Simon Directeur de Recherche, Université de Toulouse Midi-Pyrénées, France (U1056) | Rapporteur |
| Dr. Sophie Achard Maitre de conférence, Université Paris-Descartes, France (EA 4064) | Examineur |
| Pr. Jean-Pierre Lepoittevin Professeur des Universités, Université de Strasbourg, France (UMR 7177) | Examineur |
| Pr. Franck Morel Professeur des Universités, Université de Poitiers, France (EA4331) | Examineur |
| Pr. Saadia Kerdine-Römer Professeur des Universités, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France (UMR 996) | Directrice de thèse |

Table des matières

| | |
|--|----|
| Table des matières..... | 5 |
| Liste des figures | 8 |
| Liste des tableaux..... | 11 |
| Liste des abréviations..... | 13 |
| Avant-propos..... | 15 |
| Introduction..... | 19 |
| Partie I : La peau et l'immunité cutanée | 21 |
| 1. Structure de la peau..... | 23 |
| 1.1. L'épiderme..... | 24 |
| 1.2. Le derme | 30 |
| 1.3. L'hypoderme..... | 32 |
| 1. Les acteurs et effecteurs de l'immunité cutanée | 32 |
| 2.1. Les kératinocytes | 32 |
| 2.2. Les cellules dendritiques..... | 34 |
| 2.3. Les lymphocytes T..... | 36 |
| 2.4. Rôle des autres cellules cutanées | 37 |
| 2. Fonction barrière de l'épiderme | 40 |
| 2.1. Généralités sur la fonction barrière..... | 40 |
| 2.2. Rôle des lipides dans la fonction barrière..... | 41 |
| 2.3. La différenciation épidermique et la kératinisation | 42 |
| 2.4. Les jonctions..... | 44 |
| 3. Les modèles biologiques d'étude de la peau..... | 47 |
| 3.1. Cellules en monocouche et co-cultures de lignées cellulaires..... | 48 |
| 3.2. Epidermes reconstruits..... | 50 |
| 3.3. Tissus <i>ex vivo</i> | 51 |
| Partie II : La dermatite allergique de contact aux fragrances | 53 |
| 1. Définition et épidémiologie | 55 |
| 2. Les molécules allergisantes cutanées | 58 |
| 2.1. Pénétration percutanée..... | 58 |
| 2.2. Les différents haptènes | 58 |



| | |
|--|-----|
| 2.3. Les pré-haptènes | 62 |
| 3. Le métabolisme cutané..... | 67 |
| 3.1. La détoxification | 67 |
| 3.2. Les pro-haptènes..... | 68 |
| 4. La dermatite allergique de contact | 69 |
| 4.1. La phase de sensibilisation | 70 |
| 4.2. La phase d'élicitation..... | 75 |
| 5. Les méthodes de détection des sensibilisants potentiels..... | 76 |
| 5.1. Historique des tests et évolution..... | 76 |
| 5.2. Description de « l'Adverse Outcome Pathway »..... | 77 |
| 5.3. Les modèles validés et en cours de validation pour mesurer le potentiel sensibilisant des molécules | 79 |
| Partie III : Stress oxydant et voie Nrf2/Keap1 | 81 |
| 1. Les radicaux libres et leur origine..... | 83 |
| 1.1. Le radical hydroxyle | 86 |
| 1.2. Le radical superoxyde..... | 88 |
| 1.3. Le radical peroxyde | 88 |
| 1.4. Le monoxyde d'azote | 89 |
| 2. Les molécules anti-oxydantes | 90 |
| 2.1. Les antioxydants non enzymatiques | 90 |
| 2.2. Les antioxydants enzymatiques | 93 |
| 3. Nrf2 et peau..... | 99 |
| 3.1. Peau et espèces réactives | 99 |
| 3.2. La voie Nrf2/Keap1 | 100 |
| 3.3. Organisation de Nrf2 dans la peau..... | 103 |
| 3.4. Nrf2 et différenciation des kératinocytes..... | 104 |
| 3.5. Nrf2, UVs et vieillissement | 104 |
| 3.6. Nrf2 et polymorphisme..... | 109 |
| 3.7. Etude d'un gain de fonction de Nrf2 sur la peau | 111 |
| 3.8. Nrf2 et sensibilisation cutanée..... | 113 |
| Objectifs..... | 115 |
| Présentation du travail Partie I..... | 119 |
| Résultats Partie I | 123 |
| Article I..... | 125 |



| | |
|--|-----|
| Résultats complémentaires Article I | 127 |
| Autres résultats complémentaires Partie I..... | 131 |
| Présentation du travail Partie II..... | 135 |
| Résultats Partie II..... | 141 |
| Article II..... | 143 |
| Résultats complémentaires Partie II..... | 174 |
| Discussion | 183 |
| Conclusion et perspectives..... | 195 |
| Bibliographie..... | 199 |
| Communications scientifiques | 224 |
| Communications orales..... | 226 |
| Posters | 227 |



Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1. Les différentes couches de la peau | 24 |
| Figure 2. Peau fine versus peau épaisse..... | 26 |
| Figure 3. Les couches de l'épiderme | 27 |
| Figure 4. Stratification de l'épiderme..... | 29 |
| Figure 5. Les couches du derme | 30 |
| Figure 6. Les kératinocytes, senseurs du danger..... | 34 |
| Figure 7. Les cytokines produites par les cellules de l'immunité entraînent la différenciation des macrophages avec des physiologies distinctes | 38 |
| Figure 8. Photo de la couche épineuse de l'épiderme avec les filaments intermédiaires de kératines | 42 |
| Figure 9. Architecture de l'épiderme..... | 45 |
| Figure 10. Les jonctions intercellulaires de l'épiderme..... | 47 |
| Figure 11. Différence entre une peau de souris et une peau humaine | 48 |
| Figure 12. Exemples de coupes histologiques transversales (coloration hematoxyline - eosine) de modèle de peau reconstruits en 3D | 51 |
| Figure 13. Exemples de complexes de coordination des métaux | 59 |
| Figure 14. Formation de liaisons covalentes par réaction électrophile-nucléophile (a) et radicalaire (b) | 60 |
| Figure 15. Les différents types d'haptènes..... | 62 |
| Figure 16. Produits d'autoxydation de terpènes insaturés | 63 |
| Figure 17. Mécanisme général de l'autoxydation | 64 |
| Figure 18. Autoxydation des molécules insaturées..... | 64 |
| Figure 19. Action du dioxygène sur le R-limonène : formation de deux hydroperoxydes allyliques très réactifs | 65 |
| Figure 20. Cas du linalol : formation de deux hydroperoxydes allyliques précurseurs hautement réactifs... | 66 |
| Figure 21. Mécanisme proposé pour la formation d'un adduit entre l'hydroperoxyde de linalol et le N-acetyl-cysteine methyl ester | 66 |
| Figure 22. Processus de détoxification..... | 67 |



| | |
|--|-----|
| Figure 23. Métabolisation de l'alcool cinnamique | 69 |
| Figure 24. Mécanismes d'activation de la réponse cellulaire par un haptène..... | 70 |
| Figure 25. Voies d'internalisation de l'antigène et association aux molécules du CMH de classe II | 72 |
| Figure 26. Les étapes clé de la migration des DCs vers les ganglions lymphatiques..... | 74 |
| Figure 27. La synapse immunologique entre DC et LT | 75 |
| Figure 28. Représentation schématique de l'AOP pour la sensibilisation cutanée et la nécessité de suivre la stratégie de test intégrée depuis l'interdiction du LLNA pour couvrir les événements clés..... | 78 |
| Figure 29. Schéma simplifié représentant les mécanismes de la chaîne respiratoire et de la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative..... | 84 |
| Figure 30. Réaction des radicaux hydroxyles avec la guanine, par addition sur les doubles liaisons..... | 86 |
| Figure 31. Action des radicaux hydroxyles sur l'acide linoléique, par arrachement d'un atome d'hydrogène | 87 |
| Figure 32. Molécule de glutathion | 91 |
| Figure 33. Structure de l'ion urate | 92 |
| Figure 34. Transformation du peroxyde d'hydrogène en eau via la glutathion peroxydase et recyclage du GSH par la glutathion réductase..... | 94 |
| Figure 35. Les sites catalytiques et régulateurs de deux cystéines peroxyrédoxines | 95 |
| Figure 36. La synthèse du GSH | 97 |
| Figure 37. Cross-talk de la dégradation de l'hème et le métabolisme cellulaire | 98 |
| Figure 38. Interaction de Keap1 et Nrf2..... | 102 |
| Figure 39. Nrf2 protège les kératinocytes des couches suprabasales des dommages générés par les ROS | 103 |
| Figure 40. Modèle d'une protection des KCs des UVB médiée par Nrf2..... | 107 |
| Figure 41. La formation de rides est augmentée chez les souris Nrf2 ko | 108 |
| Figure 42. Les mutations de Nrf2 dans les cancers chez l'homme..... | 109 |
| Figure 43. La régulation de l'IL-36 γ et de l'IL-36 α par Nrf2 dans les kératinocytes et leur effet sur la prolifération des kératinocytes | 112 |
| Figure 44. Keap1 est modifié de façon covalente par le cinnamaldehyde..... | 113 |
| Figure 45. Major constituents of colophony and their allylic hydroperoxides | 131 |
| Figure 46. Simplified compounds of colophony constituents and their allylic hydroperoxides | 132 |
| Figure 47. Effect of terpenes and hydroperoxides on Nrf2/Keap1 signaling pathway | 133 |



| | |
|---|-----|
| Figure 48. Effect of terpenes and hydroperoxides on Nrf2 target genes..... | 134 |
| Figure 49. Repeated-exposure model of THP-1 cells | 176 |
| Figure 50. Repeated-exposure model of co-culture HaCaT and THP-1..... | 176 |
| Figure 51. Repeated exposure model – coculture with or without HaCaT supernatant | 177 |
| Figure 52. Effect of repeated-exposure of NiSO ₄ on THP-1 monoculture model..... | 179 |
| Figure 53. Effect of repeated-exposure of NiSO ₄ on THP-1 in co-culture model. | 180 |
| Figure 54. Effect of HaCaT repeated exposure of NiSO ₄ on THP-1 suspended in HaCaT supernatant (A) or suspend in fresh medium but put on HaCaT (B). | 181 |
| Figure 55. Les protéines membranaires exposent les groupements thiols au milieu extracellulaire..... | 186 |
| Figure 56. Les différents produits de réaction des hydroperoxydes allyliques et d'un dérivé de l'histidine (N-acetylhistidinemethyl)..... | 189 |



Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1. La nomenclature des kératines humaines..... | 44 |
| Tableau 2. Les différences clés entre les caractéristiques et les processus cellulaires des systèmes de culture en 3 et en 2 dimensions | 49 |
| Tableau 3. Liste des vingt-six allergènes qui sont spécifiés sur l'emballage des produits cosmétiques..... | 56 |
| Tableau 4. Fonctions chimiques électrophiles des haptènes..... | 61 |
| Tableau 5. Nature des différentes espèces radicalaires impliquées dans le stress oxydant. R désigne un substrat organique | 83 |
| Tableau 6. Liste non exhaustive des différentes protéines contrôlées par Nrf2 | 101 |
| Tableau 7. Régulation de Nrf2 par la lumière UV..... | 105 |





Liste des abréviations

Ag : Antigène
AOP : Adverse outcome pathway
BMDC : Bone-marrow derived dendritic cells
CinA : CinA
CLA : Cutaneous lymphocyte-associated antigen
CLR : C-type lectin receptor
CMH : Complex major histocompatibility
DAC : Dermatite allergique de contact
DAMP : Danger-associated molecular pattern
DC : Dendritic cell
DDC : Cellule dendritique dermale
DNCB : 1-chloro-2,4-dinitrobenzene
ECVAM : European centre for the validation of alternative methods
EGFR : Epidermal growth factor receptor
ERO : Espèce réactive de l'oxygène
GPx : Glutathione peroxidase
GSH : Glutathion sous forme réduite
GSSG : Glutathion sous forme oxydée
ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule-1
IG : Immunoglobuline
INCI : International nomenclature of cosmetic ingredients
IFN : Interferon
LC : Langerhans cell
LLNA : Local lymph node assay
LT : Lymphocyte T
MAPK : Mitogen-activated protein kinase



MEC : Matrice extracellulaire

MEST : Mouse ear swelling test

MoDC : Monocyte-derived dendritic cells

NF- κ B : Nuclear factor-kappa B

NHEK : Normal human epidermal keratinocytes

NIKS : Near-diploid human keratinocytes

NiSO₄ : Sulfate de nickel

NLR : Leucine rich repeat containing

OCDE : Organisation de coopération et de développement économique

PAMP : Pathogen-associated molecular pattern

RFI : Intensité relative de fluorescence

RPE : Résonance paramagnétique électronique

SOD : Superoxyde dismutase

SPRR: Small proline-rich protein

SSCPNFP : Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food products

tBHP : Tertio-butyl hydroperoxyde

TCR : T-cell antigen receptor

TLR : Toll-like receptor

TNF- α : Tumor necrosis factor α

TGF- β : Transforming growth factor β

UV : Ultraviolet



Avant-propos





Les substances parfumantes, ou fragrances, sont des composés organiques ayant une odeur plaisante, qui peuvent provenir de sources naturelles ou être le résultat d'une synthèse chimique. Leur nombre est estimé à plus de 2500. De nombreux cas d'allergies de contact aux substances parfumantes ont été recensés et la prévalence estimée dans la population générale est de 1,7 à 4,1%. Il est difficile pour les patients allergiques d'éviter leur contact car ces substances sont omniprésentes dans les produits du quotidien. Elles sont utilisées dans les parfums et les biens de consommation parfumés tels que les détergents et autres produits à usage domestique, mais aussi dans les produits cosmétiques. Depuis 1999, afin d'informer les consommateurs, 26 substances doivent être mentionnées sur le packaging des produits cosmétiques.

La plupart des molécules allergisantes ont un poids moléculaire inférieur à 1000 Da. Elles sont référées comme des haptènes car elles ne sont pas antigéniques par elles-mêmes, mais vont se conjuguer avec des protéines de l'épiderme ou du derme. Il y a formation d'un complexe antigénique haptène-protéine. Ces haptènes directement réactifs avec les protéines et qui peuvent former un complexe sans modification préalable sont appelés haptènes vrais. C'est le cas du cinnamaldéhyde (CinA), une molécule capable d'induire une réaction allergique, qui est retrouvée dans la cannelle et abondamment présente en tant que substance parfumante dans les produits cosmétiques. Les pré-haptènes sont activés par oxydation avant le contact avec la peau et les pro-haptènes sont activés de façon enzymatique sur la peau.

Plusieurs fragrances s'auto-oxydent facilement au contact de l'air ambiant, menant à la formation d'allergènes potentiels. C'est le cas du linalol et du limonène, deux terpènes insaturés, dont l'autoxydation mène à la formation de différents produits, dont certains sont des allergènes forts. Ces produits d'oxydation peuvent être primaires, comme des hydroperoxydes allyliques, ou secondaires, comme des alcools allyliques, des époxydes, ou encore des aldéhydes et des cétones α,β -insaturés. Les hydroperoxydes allyliques sont considérés comme des allergisants forts d'après les résultats du test de sensibilisation sur la souris LLNA.

Les cellules dendritiques (DC) cutanées jouent un rôle primordial dans la génération d'une allergie de contact : dès le premier contact avec la molécule allergisante, les DCs prennent en charge le complexe haptène-protéine et migrent jusqu'aux ganglions drainants pour induire une réponse lymphocytaire T primaire spécifique de l'haptène. Par ailleurs, les molécules allergisantes génèrent



un stress oxydant détecté par le facteur de transcription Nrf2, protéine majeure dans la détoxification des xénobiotiques.

Au cours de la première partie de ce travail, nous avons étudié le mécanisme d'action de ces terpènes et leurs hydroperoxydes allyliques sur la lignée cellulaire THP-1, en tant que substitut aux cellules dendritiques. Le rôle du facteur de transcription Nrf2 a également été investigué en réponse à ces produits.

Les KCs jouent également un rôle dans l'allergie de contact : ce sont les premières cellules qui vont rencontrer la molécule allergisante dans la peau. Ils contiennent des enzymes, telles que les cytochromes P450, qui possèdent une activité métabolique requise pour la conversion des prohaptènes en haptène biologiquement actif. Cet haptène va ensuite se lier aux protéines pour former le complexe antigénique.

Les consommateurs de produits cosmétiques sont exposés à de faibles concentrations de molécules allergisantes, mais plusieurs fois par jour ou par semaine. Or dans la plupart des tests *in vitro*, les molécules allergisantes sont utilisées à des concentrations subtoxiques et les cellules exposées une seule fois.

Le deuxième objectif de ce travail consiste à étudier l'impact de l'exposition répétée d'une molécule allergisante, le CinA, sur la différenciation de l'épiderme.



Introduction



Partie I : La peau et l'immunité cutanée



La peau, appelée aussi tégument (du latin *tegumentum*, couverture) pèse 4 kg et a une superficie pouvant aller jusqu'à 2m². C'est l'organe le plus lourd et le plus étendu de l'organisme (Mélissopoulos and Levacher, 2012). L'épaisseur de la peau est de 2 mm en moyenne, mais elle peut être d'1 mm au niveau des paupières et de 4 mm au niveau de la paume des mains. Elle est le siège de nombreuses fonctions : de protection, de thermorégulation, sensorielle, d'échanges et de métabolisme. Elle est imperméable à l'eau et aux composés hydrophiles grâce à son intégrité structurale et ce malgré de fréquents traumatismes mécaniques (Bos, 1997).

1. Structure de la peau

La peau doit sa grande résistance aux propriétés physicochimiques de sa couche la plus superficielle, le *stratum corneum* ou couche cornée. Cette couche permet également de maintenir l'homéostasie du milieu intérieur car elle prévient le dessèchement cutané. Sa résistance physique dépend du tissu vivace et dynamique connecté appelé le derme, qui est majoritairement composé de fibres de collagène et d'élastine (McLafferty *et al.*, 2012).

Sur le plan structural, la peau est constituée de trois tissus superposés : le tissu le plus externe est l'épiderme (du grec « epi » dessus, et « derma », la peau), le tissu intermédiaire est le derme et le tissu le plus profond est l'hypoderme (du grec « hypo », en dessous) (**Figure 1**).

L'épiderme est un épithélium de revêtement. Sa fonction principale est la protection de l'organisme contre les agressions extérieures. Cette fonction de protection est assurée par la cohésion des cellules épithéliales et leur production de protéines fibreuses et résistantes, les kératines. Les cellules de l'épiderme sont attachées entre elles par des structures intercellulaires, les desmosomes, et attachées au derme par la jonction dermo-épidermique. L'épiderme n'est pas vascularisé ; les nutriments proviennent du derme et y pénètrent par diffusion.

Le derme est un tissu conjonctif constitué d'une substance fondamentale dans laquelle baignent des cellules appelées fibroblastes, qui synthétisent des fibres de collagène et d'élastine. Contrairement à l'épiderme, le derme est traversé par un grand nombre de vaisseaux et, outre son rôle de soutien, il joue un rôle nutritif.

En dessous du derme se trouve une couche de tissu adipeux formant l'hypoderme.



Enfin, dans la peau se trouvent des annexes comprenant des glandes et des phanères. Il existe deux sortes de glandes : les glandes sudoripares qui excrètent de la sueur et les glandes sébacées qui excrètent le sébum. Les phanères, du mot grec « phaneros » signifiant apparent, sont les poils et les ongles (Fuchs, 2016).

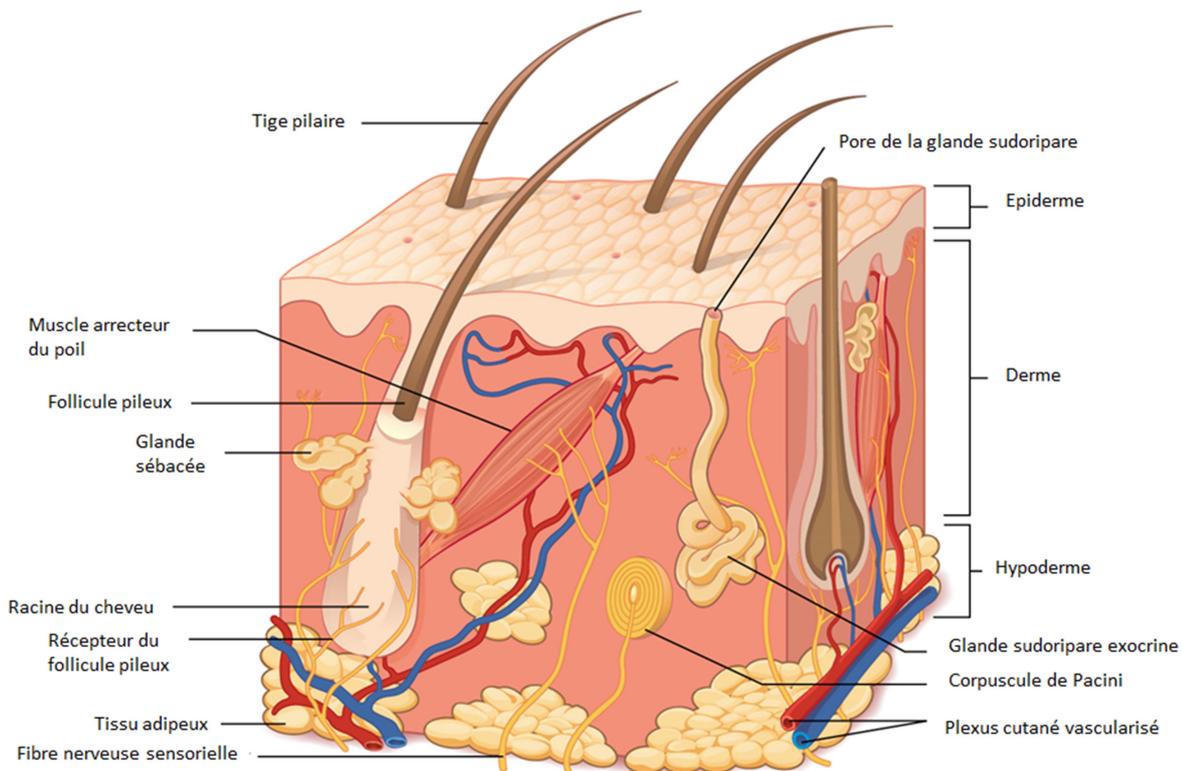


Figure 1. Les différentes couches de la peau

La peau est constituée de trois couches principales. L'épiderme est composé de cellules épithéliales étroitement liées ensemble. Le derme est composé de tissus conjonctifs denses, irréguliers qui abritent les vaisseaux sanguins, les follicules pileux, les glandes sudoripares et d'autres structures. Sous le derme repose l'hypoderme, qui est principalement constitué de tissus adipeux et de tissu conjonctif lâche. D'après OpenStax, 2016.

1.1. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium stratifié et pavimenteux, car il est constitué de plusieurs assises cellulaires et les cellules de sa couche superficielle sont plates. On y retrouve quatre types de cellules : les kératinocytes (KCs), les mélanocytes, les cellules de Langerhans (LCs) et les cellules de Merkel (Kanitakis, 2002).

Les KCs (du grec « *kéras* », corne), d'origine ectoblastique, sont les cellules les plus nombreuses de l'épiderme puisqu'elles y représentent 90% des cellules.



Ces cellules assurent quatre grandes fonctions :

- de barrière entre les milieux intérieur et extérieur, grâce à leur capacité de différenciation et de synthèse de kératines. Les kératines sont des protéines fibreuses intracellulaires qui donnent aux cheveux, aux ongles et à la peau leur rigidité et leur propriété de résistance à l'eau. Au cours de la différenciation, les KCs migrent de la couche la plus profonde de l'épiderme vers la surface. A la surface, ils deviennent anucléés et sont remplacés par les cellules des couches plus profondes. L'épiderme est renouvelé environ toutes les trois semaines,
- cohésion de l'épiderme grâce aux jonctions des KCs entre eux,
- de protection contre les radiations lumineuses, en association avec les mélanocytes,
- initiation de la réponse immune de l'épiderme.

Les mélanocytes (du grec « *melas* », noir) constituent la deuxième grande population cellulaire de l'épiderme, leur nombre est estimé à 8% (Yuan and Jin, 2017). Ils proviennent des crêtes neurales et colonisent l'épiderme où, à terme, ils sont exclusivement situés dans la couche basale. Leur fonction est la synthèse de pigments, appelés mélanines (phéomélanines et eumélanines) dans des organites spécialisés, les mélanosomes qui sont ensuite transférés aux KCs. Les mélanines ont deux fonctions : elles donnent à la peau sa couleur, les phéomélanines étant des pigments jaunes-rouges et les eumélanines des pigments brun-noirs. La répartition entre les phéomélanines et les eumélanines varie suivant les individus et conditionne leur phototype cutané. Les eumélanines ont un effet photoprotecteur car elles absorbent les rayons ultraviolets du soleil et protègent ainsi les cellules (Mélissopoulos and Levacher, 2012).

Les LCs, troisième population cellulaire de l'épiderme, représentent 3 à 8 % des cellules de l'épiderme. Ce sont des cellules immunitaires, qui appartiennent au groupe des cellules dendritiques (DCs). Les LCs dérivent de cellules souches myéloïdes issues du sac vitellin, qui vont migrer à travers les tissus embryonnaires pour rejoindre l'épiderme (Collin and Milne, 2016). Elles vont s'y installer et y acquérir leur morphologie dendritique. La forme étoilée de leur corps cellulaire se prolonge par de longues dendrites qui leur permettent de capturer les corps étrangers ayant franchi la barrière cutanée.

Les cellules de Merkel constituent la quatrième population cellulaire de l'épiderme, le pourcentage de ces cellules varie de 0,5 à 5%. Ce sont des cellules neuro-épithéliales, d'origine



nerveuse, qui jouent un rôle de récepteur sensoriel. Elles sont responsables de la stimulation des nerfs sensitifs. Ces cellules sont particulièrement abondantes à la surface des mains et des pieds. L'épiderme est constitué, selon sa localisation, de quatre ou cinq couches cellulaires, ce qui explique son caractère stratifié (Fernandez-Flores, 2015). La grande majorité de la peau est considérée comme fine et composée de quatre couches de cellules. De la profondeur vers la surface, ces couches sont la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée. Une peau plus épaisse est présente sur la plante de pieds et la paume des mains. Elle est composée d'une cinquième couche, appelée la couche claire, localisée entre la couche cornée et la couche granuleuse (**Figure 2**). Cette stratification correspond aux changements de forme et d'aspects des KCs lorsqu'ils migrent en se différenciant de la profondeur vers la superficie de l'épiderme.

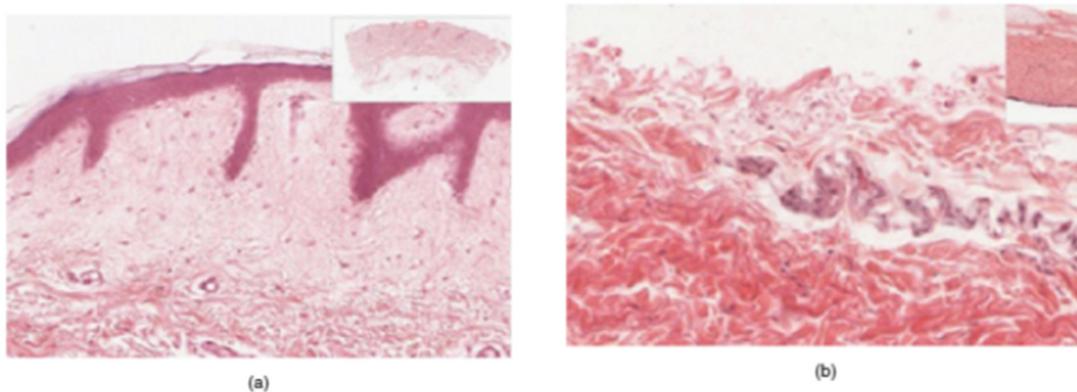


Figure 2. Peau fine versus peau épaisse

Ces lames montrent des sections de l'épiderme et du derme d'une peau fine (a) et épaisse (b).
Grossissement x 40. Photos fournies par the Regents of University of Michigan Medical School, 2012.

1.1.1. La couche basale (*stratum basale*)

La couche basale (également appelée couche germinative) de l'épiderme est formée de l'ensemble des KCs directement en contact avec la jonction dermo-épidermique sur laquelle ils s'accrochent (McLafferty *et al.*, 2012). Ils forment une seule assise de cellules cylindriques, relativement claires, au cytoplasme et au noyau allongé avec un grand axe perpendiculaire à la jonction dermo-épidermique. Les cellules de la couche basale sont liées au derme *via* l'imbrication de fibres de collagène, référées comme la membrane basale. La couche basale est une unique couche de cellules, constituée essentiellement de cellules basales. Les cellules basales sont des cellules souches de forme cuboïde et sont des précurseurs des KCs de l'épiderme. Tous les KCs



sont produits à partir de cette unique couche de cellules, qui est constamment en mitose. Au fur et à mesure que les nouvelles cellules sont formées, les cellules existantes sont poussées en surface (**Figure 3**).

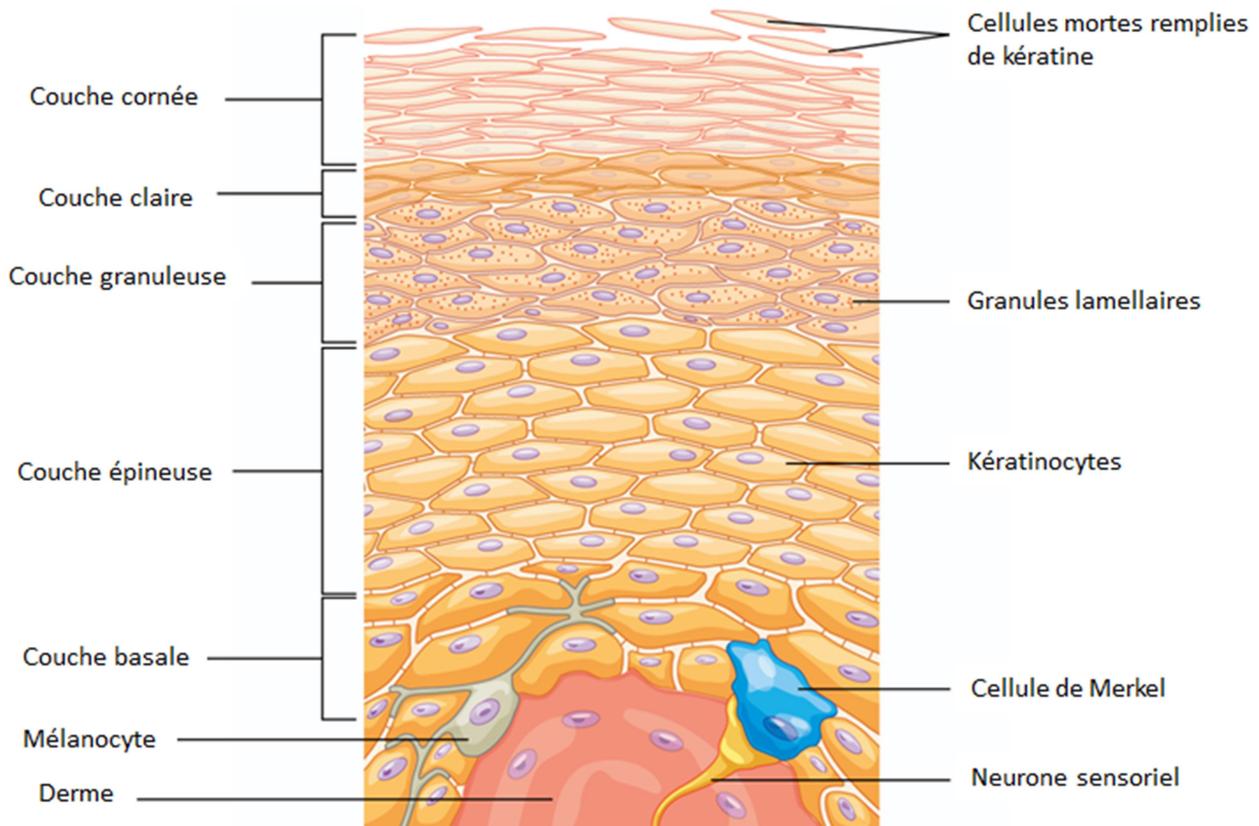


Figure 3. Les couches de l'épiderme

L'épiderme de la peau épaisse est constitué de cinq couches : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse, la couche claire et la couche cornée.

D'après OpenStax, 2016.

1.1.2. La couche épineuse (*stratum spinosum*)

Les KCs qui ont quitté la couche basale deviennent polygonaux, tandis que leur noyau s'arrondit et leur cytoplasme devient plus foncé ; la rétractation du cytoplasme due à des artéfacts de préparation en microscopie optique standard, donne un aspect épineux à ces KCs, d'où le nom de couche épineuse. Les épines correspondent aux desmosomes qui accrochent les KCs entre eux, ils assurent une grande cohésion entre les cellules. La couche épineuse est composée de huit à dix couches de KCs (**Figure 4**). Les KCs de cette couche sont pourvus d'un gros noyau vésiculeux possédant souvent deux nucléoles. Ils commencent à synthétiser des kératines et à libérer un



glycolipide hydrophobe qui prévient la perte en eau du corps. Quand les nouveaux KCs sont produits dans la couche basale, les KCs de la couche épineuse sont poussés jusqu'à la couche granuleuse.

1.1.3. La couche granuleuse (*stratum granulosum*)

Progressivement, le cytoplasme et le noyau des KCs s'aplatissent, leur grand axe devenant parallèle à la jonction dermo-épidermique (Kanitakis, 2002). La membrane des cellules s'épaissit et les cellules génèrent une grande quantité de kératines et de kératohyaline, qui forment des granulations basophiles dans leur cytoplasme. Ce qui définit la couche suivante, dite couche granuleuse (**Figure 4**). Ce sont ces deux protéines qui donnent aux KCs leur apparence granuleuse. La couche granuleuse est formée de trois couches de KCs qui possèdent un noyau ovale et dense dans lequel la chromatine se raréfie. Les noyaux et les autres organites se désintègrent au fur et à mesure que les cellules meurent. Les kératines, la kératohyaline et les membranes vont former la couche claire et la couche cornée.

1.1.4. La couche claire (*stratum lucidum*) et la couche cornée (*stratum corneum*)

La couche claire est lisse, translucide et localisée juste au-dessus de la couche granuleuse et sous la couche cornée (Fernandez-Flores, 2015). Cette fine couche de cellules est présente uniquement au niveau de la plante des pieds, du bout des doigts et de la paume des mains. Les KCs qui composent la couche claire sont riches en eleidin, une protéine dérivée de la kératohyaline, qui donne à ces cellules leur transparence (Yousef and Sharma, 2017). Le noyau se fragmente.

Finalement, les KCs perdent brutalement leur noyau ; ils deviennent des cornéocytes, cellules à part entière qui constituent la couche cornée, compacte en profondeur au contact de la couche granuleuse et desquamante en superficie. La couche cornée est un ensemble de cellules sans noyau, dites « mortes », mais fonctionnelles, réunies entre elles par un ciment, l'ensemble donnant à l'épiderme sa fonction de barrière. Le cytoplasme des cornéocytes devient floconneux, le ciment intercellulaire et les cornéodesmosomes entrent en lyse, ce qui aboutit à la desquamation des cornéocytes les plus superficiels (**Figure 4**).



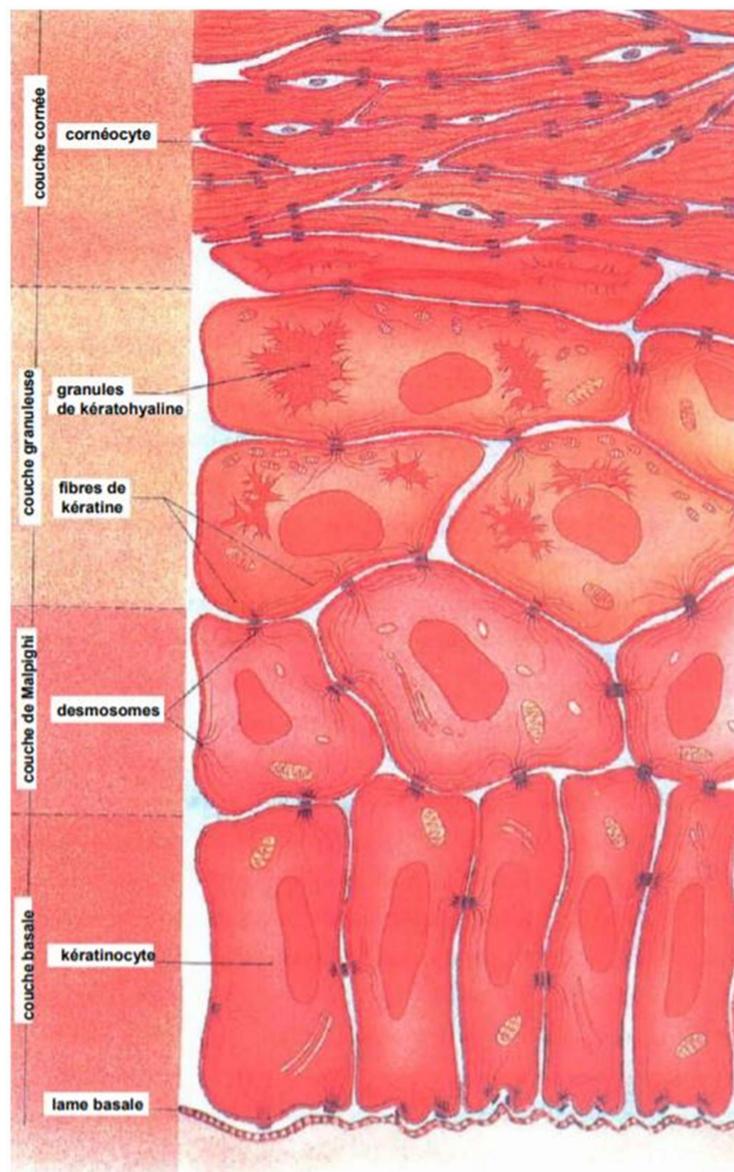


Figure 4. Stratification de l'épiderme

D'après Dubertret *et al.*, 1987.

La couche cornée est constituée, suivant sa localisation, de quinze à trente couches de cellules. La cellule est remplie de kératines qui se présentent sous forme de faisceaux de filaments enrobés dans une matrice dense constituée d'une protéine amorphe, la filaggrine. La membrane plasmique est remplacée par une coque rigide et insoluble, l'enveloppe cornée (Candi *et al.*, 2005). Elle est bordée intérieurement d'une structure protéique (involucrine) qui constitue un véritable squelette pour le cornéocyte. Une couche lipidique double la membrane à l'extérieur dans l'espace intercellulaire.



On distingue deux sous-couches :

- La couche compacte (*stratum compactum*), formée des cellules kératinisées étroitement soudées. C'est elle qui fait suite à la couche granuleuse et qui assure la fonction barrière de l'épiderme. Les desmosomes sont remplacés par des structures simplifiées, les cornéodesmosomes, qui assurent la cohésion entre les cornéocytes.
- La couche desquamante (*stratum disjunctum*) qui se trouve en surface et au niveau de laquelle se fait la desquamation des cellules cornées.

1.2. Le derme

Le derme peut être considéré comme le cœur du système tégumentaire (du grec « *derma* », peau), qui se distingue de l'épiderme (« *epi* », dessus) et de l'hypoderme (« *hypo* », dessous). Il a pour origine le mésoblaste intra-embryonnaire et son épaisseur moyenne est de 1 à 2 mm (Prost-Squarcioni, 2006). Il contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des nerfs et d'autres structures, comme les follicules pileux et les glandes sudoripares. Le derme est constitué de deux couches de tissus connectés qui composent un maillage interconnecté d'élastine et de collagène, produits par les fibroblastes (**Figure 5**).

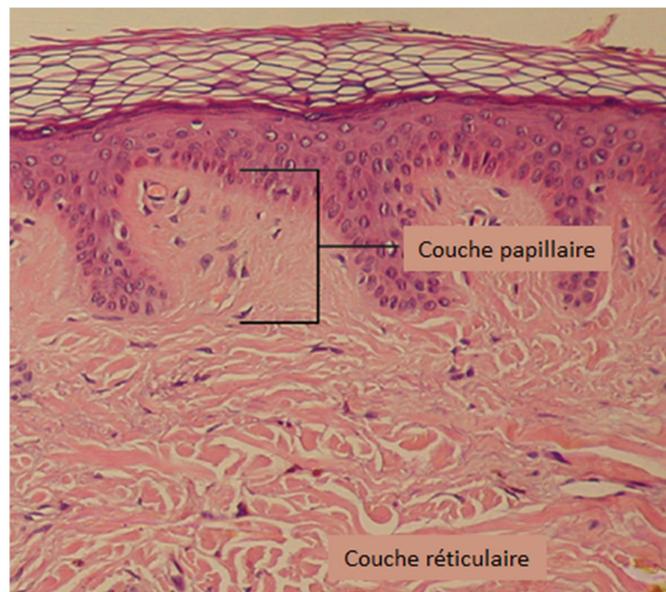


Figure 5. Les couches du derme

Les deux couches sont constituées de tissus conjonctifs avec des fibres de collagène prolongées. Les papilles dermiques étendues jusqu'à l'épiderme appartiennent au derme papillaire, les fibres de collagène denses et empaquées appartiennent au derme réticulaire.

D'après OpenStax, 2016.



Le derme comporte deux régions :

- la zone superficielle entre les crêtes épidermiques ou « derme papillaire » formée de tissu conjonctif lâche qui renferme des fibres de collagènes, fines, isolées et orientées le plus souvent perpendiculairement par rapport au plan de la membrane basale, mais aussi les anses capillaires terminales et les terminaisons nerveuses.
- la zone plus profonde ou « derme réticulaire » est formée d'un tissu conjonctif dense où les fibres de collagène plus épaisses en faisceaux et les fibres élastiques s'entrecroisent dans toutes les directions dans des plans grossièrement parallèles à la surface cutanée. Le derme réticulaire contient aussi de petites artéριοles et veinules, des petits nerfs, des follicules pilo-sébacés (sauf au niveau des paumes et des plantes) et les canaux excréteurs des glandes sudoripares.

Le collagène est une protéine fibreuse, rencontrée dans le milieu extracellulaire de la plupart des tissus conjonctifs (Mienaltowski and Birk, 2014). C'est aussi la protéine la plus abondante du corps humain et dont la fonction la plus remarquable est de stocker les forces de tension. Elle est inextensible. Dix-neuf types de collagènes ont été identifiés et sont différenciés par leur morphologie, leur séquence d'acides aminés et leurs propriétés physiques. Les composants majeurs du derme sont les collagènes de type I et III. Ils sont sécrétés dans le milieu extracellulaire sous forme de procollagène constitué de trois chaînes polypeptidiques α qui forment une structure hélicoïdale de 300 nm de long et 1,5 μ m de diamètre. Ces chaînes polypeptidiques sont riches en proline, hydroxyproline et en glycine.

Les fibres élastiques de la peau sont composées d'élastine, les molécules d'élastine étant disposées en fibres et en lames discontinues. La visualisation des fibres élastiques en microscopie optique nécessite une oxydation à l'oxone, ce qui est à l'origine de leur appellation de fibres oxytalanes. L'élastine est une protéine non glycosylée, très hydrophobe, longue d'environ 830 acides aminés, riche en proline et en glycine. Elle possède une résistance exceptionnelle aux attaques physiques et chimiques. Elle est synthétisée par les fibroblastes sous forme d'un précurseur, la tropoélastine qui va se polymériser.

Il y a un plus grand nombre de cellules dans le derme papillaire que dans le derme réticulaire. Ces cellules peuvent être fixes ou mobiles et sont d'origine hématopoïétique. Les cellules fixes sont les



fibroblastes. Les cellules mobiles sont les mastocytes, les DCs et les macrophages. Dans de plus faibles proportions dans les conditions physiologiques, des plasmocytes, des lymphocytes et des granulocytes sont également présents.

1.3. L'hypoderme

L'hypoderme est une couche de cellules située directement sous le derme et qui permet de connecter la peau aux tissus fibreux situés en dessous des os et des muscles (McLafferty *et al.*, 2012). C'est un tissu conjonctif bien vascularisé, lâche et adipeux, dont la fonction est le stockage des graisses pour isoler le corps de la perte de chaleur. Il amortit le tégument tout en protégeant les structures sous-jacentes des traumatismes.

Le tissu adipeux présent dans l'hypoderme est constitué d'adipocytes, qui sont les cellules qui stockent les graisses. Ce stockage sert de réserve d'énergie.

1. Les acteurs et effecteurs de l'immunité cutanée

La fonction immune de la peau a été reconnue en 1978, lorsque le terme de tissu lymphoïde associé à la peau (« SALT », skin associated lymphoid tissue) est apparu. Ce terme permet de décrire le trajet continu des cellules immunes entre la peau, les ganglions lymphatiques la drainant et la circulation périphérique (Streilein, 1983). L'expansion de ce concept a également mené au terme de système immunitaire de la peau (« SIS », skin immune system).

Certaines cellules résidentes de la peau sont décrites comme des sentinelles de l'immunité (Nestle *et al.*, 2009; Richmond and Harris, 2014). Les KCs sont impliqués dans la détection des pathogènes et des signaux de danger, les DCs et les macrophages sont capables d'initier un éventail de réponses immunitaires. Les fibroblastes contribuent à la réponse inflammatoire locale et les LTs effectuent des fonctions effectrices cruciales.

2.1. Les kératinocytes

L'épiderme étant presque entièrement constitué de KCs, ceux-ci forment la première ligne de défense contre les menaces de l'extérieur telles que la pression mécanique, les agents pathogènes, les ultraviolets (UVs) et les molécules chimiques (Richmond and Harris, 2014). Pendant de nombreuses années, la seule mission décrite de ces cellules était de constituer une



barrière physique de la peau. Aujourd'hui, les KCs sont considérés comme des cellules actives contribuant à la préservation de la barrière immunitaire (Suter *et al.*, 2009).

Les KCs sont dotés de récepteurs, appelés pattern-recognition receptors (PRRs) qui reconnaissent plusieurs composés microbiens conservés au cours de l'évolution et appelés pathogen associated molecular patterns (PAMPs). Les PAMPs incluent les lipopolysaccharides, les peptidoglycanes et la flagelline (Janeway, 1989). Les PRRs reconnaissent également les molécules libérées en réponse à un stress oxydant ou à une blessure physique. La mort des cellules environnantes peut mener à la libération de danger-associated molecular patterns (DAMPs), qui peuvent être des fragments d'ADN, des cristaux d'acide urique ou des protéines heat shock. Parmi les PRRs, on retrouve les Toll-Like Receptors (TLRs) qui sont transmembranaires et présents à la surface cellulaire (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6) ou à la surface des compartiments endosomaux (TLR3 et TLR9) (**Figure 6**) (Lebre *et al.*, 2007). Les node-like receptors (NLRs) peuvent également reconnaître les PAMPs et les DAMPs.

Une fois activés, ces récepteurs entraînent l'assemblage d'un large complexe multiprotéique formé d'un NLR, d'une protéine adaptatrice apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) et de la pro-caspase 1, l'inflammasome (Martinon *et al.*, 2009) (**Figure 6**). L'assemblage de l'inflammasome mène à l'activation de la caspase 1, qui clive la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 pour générer des cytokines pro-inflammatoires actives.

Les chimiokines constituent une superfamille de cytokines chimiotactiques produites après stimulation par des signaux de danger. Elles régulent l'activation, la différenciation ainsi que la migration des cellules immunitaires (DCs et macrophages par exemple). Il existe 2 classes majeures de chimiokines en fonction de la distance séparant deux résidus cystéines conservés : les chimiokines α qui contiennent une séquence CXC (cystéine-résidu aléatoire-cystéine) et les chimiokines β qui ont une séquence CC (cystéine-cystéine).

Au contact d'une molécule allergisante, les KCs expriment à leur surface des chimiokines telles que CXCL8, CXCL9, CXCL10 et CXCL11 et des molécules d'adhésion telles que ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1). Ces facteurs vont attirer et activer les LCs vers la zone de peau exposée (Albanesi, 2010). Les KCs vont également exprimer des molécules inflammatoires comme le tumor



necrosis factor α (TNF- α), l'IL-1, l'IL-6 et le granulocyte-macrophage colony stimulating factor (Bonneville *et al.*, 2007; Nestle *et al.*, 2009).

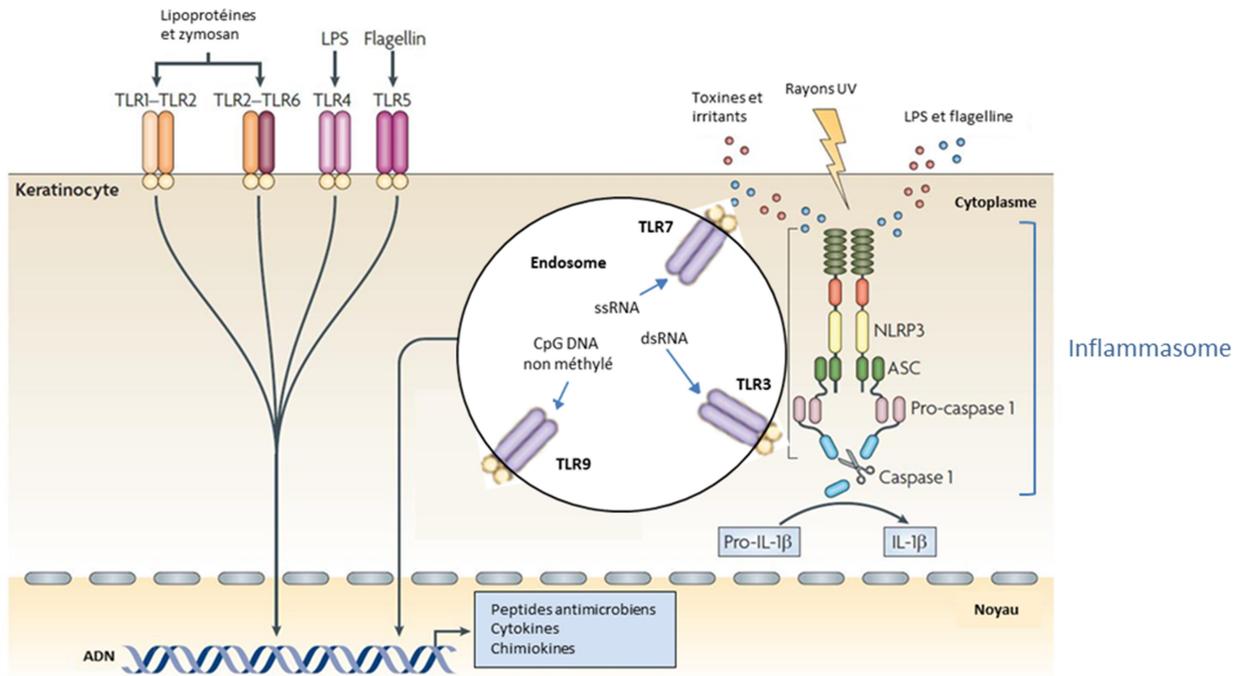


Figure 6. Les kératinocytes, senseurs du danger

Les KCs sont des sentinelles centrales de la peau qui peuvent reconnaître des agents étrangers et dangereux.

D'après Nestle *et al.*, 2009.

2.2. Les cellules dendritiques

Les DCs sont des cellules présentatrices d'antigène (Ag) professionnelles, elles vont internaliser la molécule allergisante, migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques et stimuler une réponse des LTs naïfs spécifique de cette molécule. Les DC proviennent de cellules souches myéloïdes issues de la moelle osseuse. Elles résident principalement dans les tissus périphériques et les organes lymphoïdes et forment un réseau de cellules sentinelles, notamment au sein des épithéliums muqueux (bouche, œsophage, poumons, vessie), ainsi que dans la peau (Bangert *et al.*, 2011; Fogg *et al.*, 2006; Naik *et al.*, 2007). Les DCs de la peau peuvent être classées en tenant compte de leur localisation : les LCs sont les principaux sous types de DC de l'épiderme. Elles résident constitutivement dans les couches suprabasales de l'épiderme et sont espacées par les KCs. Les cellules dendritiques dermales (DDCs) résident dans le derme immédiatement en dessous de la



jonction dermo-épidermique et sont dispersées dans tout le compartiment dermique (Nestle *et al.*, 2009).

2.2.1. Les cellules de Langerhans

En 1868, un étudiant en médecine, Paul Langerhans, alors âgé de dix-huit ans, découvre dans l'épiderme un réseau de DCs appartenant au système nerveux. Il publie des dessins originaux de ces cellules qui portent son nom (Langerhans, 1868). Quelques années plus tard, il décrira les îlots cellulaires du pancréas dits de Langerhans. Pendant plus d'un siècle, les LCs resteront mystérieuses. En 1961, Birbeck décrit l'existence d'organites cytoplasmiques, qui sont des granules caractéristiques dans les LCs (Valladeau *et al.*, 2000).

Les LCs sont caractérisées par un type d'organelle spécial connu sous le nom de granule de Birbeck, qui est un phagosome particulier. Les granules de Birbeck sont des membranes superposées, séparées par des stries répétitives en forme de fermeture éclair. Ils contiennent une vésicule à la fin de ces membranes, ce qui leur donne une forme de raquette de tennis typique (Wolff, 1967). La langérine (CD207) guide l'Ag de la surface cellulaire jusqu'à ces granules (Merad *et al.*, 2008). Il s'agit d'une molécule transmembranaire, un récepteur de type II (« C-type lectin receptor » pour CLR) (Merad *et al.*, 2008). Les CLR sont des récepteurs qui se lient au mannose et à d'autres ligands glycosylés, à travers un domaine de reconnaissance des carbohydrates (Valladeau *et al.*, 2000).

2.2.2. Les cellules dendritiques dermiques

Les DDCs constituent une autre sous-population de DCs résidentes, capables d'activer le système immunitaire après réception d'un signal de danger. Les DDCs sont dérivées d'un précurseur myéloïde commun. Elles prolifèrent *in situ* dans le derme humain quiescent. La division cellulaire en condition homéostatique contribue à la maintenance de la population de DCs dans la peau (Bogunovic *et al.*, 2006). Elles expriment à leur surface le CD1b, CD1c, CD11c et le CMH de classe II (Nestle *et al.*, 1993). Elles possèdent des fonctions communes aux LCs, à savoir la capacité de présentation de l'Ag, ainsi que la migration et la stimulation des LTs (Zaba *et al.*, 2009).



2.3. Les lymphocytes T

A l'état basal, la peau contient plus de 2×10^{10} lymphocytes T (LTs) résidents, ce qui est deux fois plus que le total de LTs dans le sang (Clark *et al.*, 2006). Après avoir terminé leur maturation dans le thymus, les LTs naïfs migrent vers les tissus lymphoïdes périphériques. Les LTs de l'épiderme sont principalement localisés dans les couches basales et suprabasales, souvent à proximité des LCs. Dans le derme, les LTs sont groupés dans les veinules post capillaires et souvent situés sous la jonction dermo-épidermique. Les LTs $CD4^+$ et $CD8^+$ sont présents en nombre égal et la plupart sont des LTs mémoires qui expriment le cutaneous lymphocyte-associated antigen (Bos and Kapsenberg, 1993; Nomura *et al.*, 2014).

Les LTs reconnaissent l'Ag étranger présenté par les DCs dans les ganglions lymphatiques *via* le T-cell antigen receptor (TCR). Le TCR est un hétérodimère composé de deux sites de fixation à des Ags (des chaînes α/β ou γ/δ) qui sont liés de façon non covalente à cinq sous unités CD3 (γ , δ , ϵ , ζ/η). Pendant la maturation des cellules T, des réarrangements s'opèrent entre les chaînes lourdes et légères des TCR (V, J, D, C) et cela résulte en une hétérogénéité et une diversité de l'unité de reconnaissance de l'Ag. Les molécules de TCR α/β ou γ/δ doivent aller de pair avec les molécules de CD3 pour être insérées dans la membrane des cellules T (Von Boehmer, 2004). Dans une peau humaine et saine, les LTs expriment de façon prédominante les TCR α/β plutôt que les γ/δ . Tandis que les LTs α/β se lient typiquement à des peptides antigéniques présentés par le CMH, les LTs γ/δ ont la capacité de se lier directement aux glycoprotéines dérivées de pathogènes (Bangert *et al.*, 2011).

2.3.1. Plasticité des lymphocytes T

Les sous-types de LTs ont des capacités fonctionnelles différentes. Les LTs $CD4^+$ ont une fonction « helper » et les LTs $CD8^+$ agissent comme des cellules effectrices par la sécrétion de granules cytotoxiques contenant des perforines ou des granzymes. Cependant, des exceptions existent. Les LTs $CD4^+$ peuvent avoir une fonction régulatrice et produire des cytokines différentes, ils sont alors classés en plusieurs sous-unités Th1, Th2, Th17, Th22 ou T régulateur (Th pour « T helper ») (Bangert *et al.*, 2011).

Les lymphocytes Th1 produisent de façon prédominante de l'IL-2, de l'IFN (interferon)- γ et du TNF- α . Ces cellules permettent de protéger l'hôte des pathogènes tels que les virus et les



mycobactéries (Gately *et al.*, 1998; Nomura *et al.*, 2014). Une étude a montré que le 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB), une molécule chimique extrêmement allergisante, entraînait une réponse Th1 chez l'homme (Pickard *et al.*, 2007).

Les lymphocytes Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-13 et de l'IL-15 (Abbas *et al.*, 1996; Mosmann *et al.*, 1986; Korn *et al.*, 2009). Les lymphocytes Th2 sont indispensables dans la défense contre les pathogènes et ils assistent les lymphocytes B dans la production d'anticorps.

Les lymphocytes Th17 constituent une sous-population de cellules T qui sont caractérisées par la sécrétion d'IL-17, d'IL-23 et l'expression de CCR6 (Korn *et al.*, 2009) (Ivanov *et al.*, 2006). L'expression du CCR6 permet de réguler la migration des cellules Th17 vers les sites épithéliaux, dépendamment de son ligand CCL20 (Kleynwietfeld *et al.*, 2005). Il a été montré qu'un infiltrat massif de LTs produisant de l'IL-17 était présent dans la peau de patients allergiques suite à une exposition au nickel (Dyring-Andersen *et al.*, 2013).

Les lymphocytes Th22 constituent une autre population de LTs associée à la production d'IL-22, mais pas d'IL-17 ni d'IFN- γ . Les cellules Th22 ont été isolées de l'épiderme de patients atteints de psoriasis et d'eczéma atopique (Boniface *et al.*, 2007; Souwer *et al.*, 2010; Fujita, 2013).

2.3.2. Les lymphocytes T régulateurs

Les LTs régulateurs contrôlent la réponse immune et étaient autrefois appelées cellules T suppressives (Shevach *et al.*, 2006). Ce sont des cellules immunosuppressives qui contrôlent l'étendue et la durée de la réponse immune aux microorganismes. Ils exercent leur fonction suppressive en sécrétant les cytokines transforming growth factor β (TGF- β) et l'IL-10.

2.4. Rôle des autres cellules cutanées

2.4.1. Les macrophages

Les macrophages sont des cellules situées de façon prédominante dans le derme (van Furth *et al.*, 1985). Ils sont caractérisés par leur habilité à phagocyter et à éliminer les pathogènes. Ils sont capables de détecter les pathogènes directement par les PRRs et ils peuvent phagocyter les microorganismes liés à ces récepteurs. Ce processus est accompagné de la libération d'enzymes antimicrobiennes comme la myeloperoxydase ou l'élastase, suivie par exemple de la production



de radicaux superoxydes O_2^- , à l'action bactéricide (Bangert *et al.*, 2011). L'une des fonctions importantes des macrophages est la production d'une large quantité de cytokines en réponse aux microorganismes, incluant l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α , l'IL-8, l'IL-12 et l'IL-10. Selon la nature du stimulus, les macrophages sont capables de produire un large panel de cytokines pro- ou anti-inflammatoires et de chimiokines, qui attirent d'autres cellules de l'immunité sur le site lésé (Mosser and Edwards, 2008).

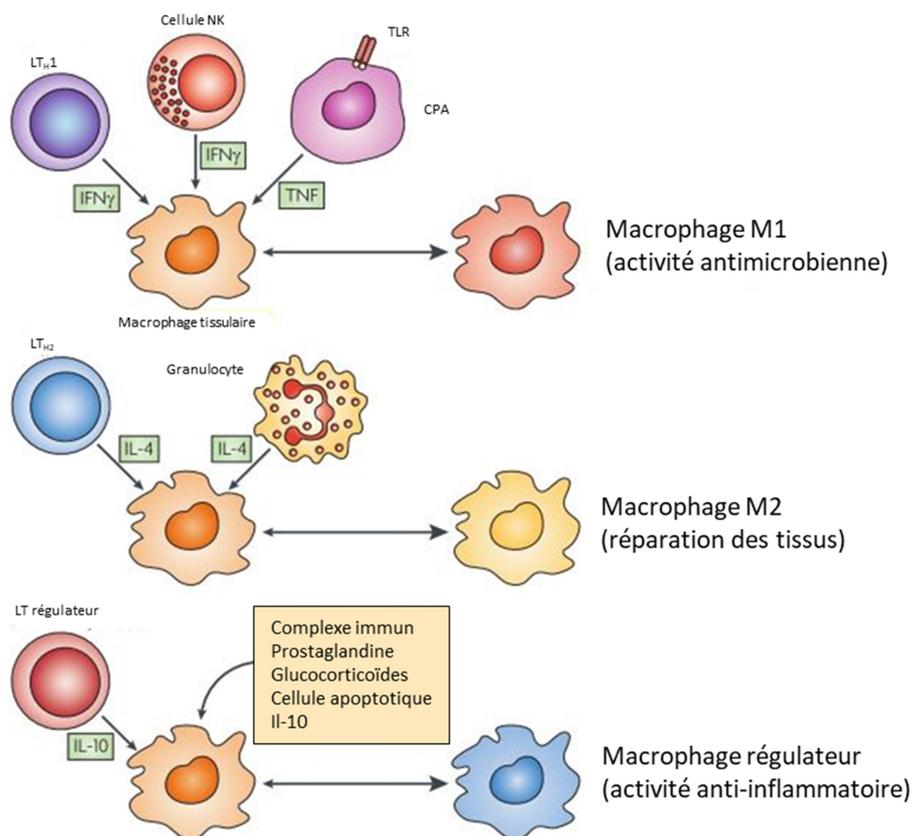


Figure 7. Les cytokines produites par les cellules de l'immunité entraînent la différenciation des macrophages avec des physiologies distinctes

Les macrophages classiquement activés apparaissent en réponse à l'IFN- γ . Les macrophages alternativement activés apparaissent en réponse à l'IL-4. Les macrophages régulateurs sont générés en réponse à des stimuli variés, incluant les complexes immunitaires, la prostaglandine, les glucocorticoïdes, les cellules apoptotiques ou l'IL-10 pour supprimer une réponse immunitaire.

D'après Mosser and Edwards, 2008.

Les cytokines sécrétées par les LTs peuvent avoir une influence sur la différenciation des macrophages. L'IFN- γ , sécrété par les Th1, entraîne la différenciation des macrophages en macrophages inflammatoires (appelés M1) avec une forte activité antimicrobienne. *A contrario*,



l'IL-4 et l'IL-13, sécrétés par les Th2, vont entraîner une différenciation des macrophages en macrophages de réparation tissulaire. Ceux-ci vont avoir un rôle dans la réparation des tissus (ils sont appelés M2). Les LTs régulateurs donnent naissance à des macrophages avec une activité anti-inflammatoire (Mosser and Edwards, 2008; Gordon and others, 2003; Murray *et al.*, 2014) (Figure 7).

2.4.2. Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules dérivées de la moelle osseuse qui deviennent matures dans les tissus périphériques. Ils résident majoritairement dans les tissus adjacents aux vaisseaux sanguins. Ce sont des cellules effectrices majeures qui possèdent des granules riches en histamine, héparine et tryptase (Metcalf *et al.*, 2016).

Les mastocytes sont activés par une molécule allergisante qui se lie aux IgE attachées à leurs récepteurs FcεRI (Amin, 2012). Une fois activés, ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-13. Leurs granules fusionnent avec la membrane plasmique et leur contenu est libéré dans l'environnement extracellulaire en quelques minutes. Les mastocytes jouent un rôle dans l'éradication des parasites, dans les infections aiguës aux bactéries et dans la guérison des blessures (Stone *et al.*, 2010).

2.4.3. Les fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules mésenchymateuses dérivées du tissu embryonnaire du mésoderme. Ils sont situés dans le tissu conjonctif, qui est le tissu le plus important du corps humain, en assurant son soutien. Les fibroblastes sont largement espacés dans une vaste matrice extracellulaire (MEC). Ils synthétisent les constituants de la MEC qui sont :

- des protéines structurales telles que le collagène et l'élastine
- des protéines adhésives telles que la laminine et la fibronectine
- de la substance fondamentale composée de glycosaminoglycanes tels que la hyaluronane et les glycoprotéines (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014).

L'activation des fibroblastes joue un rôle vital dans la guérison des blessures en permettant le recrutement des cellules immunitaires. Ces cellules sont sensibles à des cytokines telles que le TGF-β1, l'IL-1β, l'IL-6, l'IL-13 et l'IL-33 (Feghali and Wright, 1997; Scotton and Chambers, 2007). Ils



sécrètent à leur tour du TGF- β 1, de l'IL-1 β et de l'IL-33 ainsi que des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces facteurs permettent aux fibroblastes d'assister l'activation et la migration des cellules immunitaires résidentes comme les macrophages. Le recrutement des cellules immunitaires non résidentes est facilité par la production et la maintenance de la substance fondamentale de la MEC. La substance fondamentale permet leur extravasation dans le tissu conjonctif (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014).

2. Fonction barrière de l'épiderme

2.1. Généralités sur la fonction barrière

L'épiderme est un épithélium qui se renouvelle continuellement. Sa principale fonction est de protéger la peau des menaces environnementales, fournissant une barrière physique, chimique et immunologique (Baroni *et al.*, 2012). Les cellules de la couche basale sont responsables du renouvellement continu de l'épiderme, mais seulement 15% des cellules sont constamment impliquées dans ce processus car les cellules restantes sont en état de quiescence. Ces cellules quiescentes interviennent quand une augmentation de la prolifération est requise, par exemple en cas de blessure (Blanpain and Fuchs, 2006).

Afin d'assurer la fonction barrière de la peau, les KCs synthétisent et expriment des protéines structurales telles que les kératines et l'involucrine et des lipides tels que la céramide pendant leur maturation. L'étape finale de leur différenciation est associée à de profonds changements dans leur structure, ils se transforment en cellules squameuses, plates et anucléées de la couche cornée. Ils sont entourés d'une enveloppe cellulaire constituée de protéines réticulées et de lipides liés par des liaisons covalentes. Les desmosomes, qui permettent de connecter les KCs adjacents, sont importants pour la cohésion cellulaire dans les couches nucléées et sont perdus pendant le processus de desquamation. Un équilibre entre les processus de prolifération et de desquamation résulte en un renouvellement complet de l'épiderme tous les vingt-huit jours (Webb *et al.*, 2004).

Le calcium joue le rôle de régulateur dans la synthèse des protéines de l'épiderme, ainsi que pour les adhésions intercellulaires et la différenciation épidermique (Denda, 2006). Il y a des gradients de calcium dans l'épiderme : la concentration calcique est relativement faible dans la couche



basale et encore plus faible dans les couches épineuses. La concentration calcique la plus élevée est trouvée dans la couche granuleuse. Le niveau de calcium dans la couche cornée est très faible et régule l'exocytose des corps lamellaires (Lee *et al.*, 1992; Menon *et al.*, 1985).

Le manteau acide de la couche cornée semble également être important dans la fonction barrière de la peau. La peau a une surface acide qui peut être importante pour prévenir les infections (Wilhelm and Maibach, 1990). Le pH de la peau suit un gradient à travers la couche cornée, qui est probablement important dans le contrôle des activités enzymatiques et le renouvellement de la peau. Le pH de la peau est affecté par un grand nombre de facteurs endogènes, incluant l'hydratation, la sueur, le sébum, les prédispositions génétiques et l'âge (Baroni *et al.*, 2012). Les facteurs exogènes tels que les détergents, les produits cosmétiques et les antibiotiques influencent également le pH.

2.2. Rôle des lipides dans la fonction barrière

Les lipides de l'épiderme forment un ciment entre les KCs et la couche cornée qui tiennent ensemble pour former des cornéocytes. Les protéines de l'enveloppe cornée et les lipides liés de façon covalente sont importants pour la résistance chimique des cornéocytes.

Ces lipides sont synthétisés par les KCs à partir de produits intermédiaires du métabolisme ou d'acides gras essentiels exogènes. La plupart de ces lipides sont empaquetés dans des petits organites qui sont des corps lamellaires. En réponse à certains signaux, probablement une augmentation de la concentration en calcium pendant la transition de la couche granuleuse à la couche cornée, les corps lamellaires bougent de l'apex au plus haut de la couche granulaire, fusionnent avec la membrane plasmique et sécrètent leur contenu dans les espaces intercellulaires par exocytose. Les lipides polaires dérivés des corps lamellaires sont convertis par des enzymes en produits apolaires, réarrangés dans les espaces intercellulaires et positionnés approximativement de façon parallèle à la surface cellulaire (Baroni *et al.*, 2012).

L'hydrolyse des glycosphingolipides génère des céramides et des phospholipides qui sont convertis en acides gras libres. Ces changements dans la composition lipidique résultent en la formation d'une structure très dense empaquetée dans les interstices de la couche cornée (Bouwstra *et al.*, 2006; Landmann, 1988). La céramide est l'un des principaux lipides de la couche cornée, en



représentant 30 à 40%. Ce haut taux de céramide est absent des couches basale, granuleuse et épineuse, ce qui suggère que la différenciation terminale est un facteur clé pour l'accumulation de la céramide (Proksch and Jensen, 2008).

2.3. La différenciation épidermique et la kératinisation

Les kératines sont les principales protéines structurales synthétisées par les KCs. Elles s'assemblent en un réseau de filaments intermédiaires qui émanent d'un noyau périnucléaire, s'étendent à travers le cytoplasme et se terminent par des jonctions de desmosomes et d'hémidesmosomes (**Figure 8**).

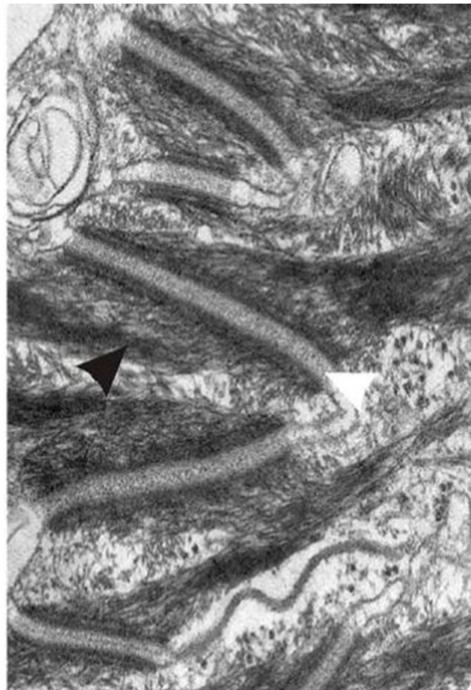


Figure 8. Photo de la couche épineuse de l'épiderme avec les filaments intermédiaires de kératines
Filaments intermédiaires de kératines (flèche noire) insérés à des desmosomes (flèche blanche) dans un contact entre deux KCs de la couche épineuse de l'épiderme (microscopie électronique).
Ouvrage collectif, 2005.

Pendant les étapes finales de la différenciation, les kératines sont alignées en un réseau condensé et ordonné qui interagit avec la filaggrine. La filaggrine est synthétisée sous la forme d'un précurseur de grande taille, la profilaggrine, qui va être phosphorylée et stockée dans le cytoplasme des KCs granuleux sous la forme de granules de kératohyaline. Ce précurseur de haut poids moléculaire est composé de 10 à 12 sous-unités de filaggrine répétées en tandem (McGrath



and Uitto, 2008). La filaggrine permet l'agrégation des filaments de kératines en un paquet étanche. Ceci permet l'effondrement de la cellule en une forme plate, qui est caractéristique des cornéocytes. Ensemble, les kératines et la filaggrine constituent 85% de la masse protéique de l'épiderme des mammifères (Roop, 1995; Nemes and Steinert, 1999).

Lors du processus de cornification, la profilaggrine est déphosphorylée puis protéolysée en sous-unités monomériques de filaggrine. Celles-ci s'associent aux filaments intermédiaires de kératines permettant la formation de la matrice fibreuse intra-cornéocytaire. Au sein des assises cellulaires profondes de la couche cornée, ces sous-unités subissent une modification post-traductionnelle appelée désimination. Les résidus arginyl sont transformés en résidus citrullyl par la peptidylarginine désiminase. La filaggrine désiminée, alors acide, perd son affinité pour les filaments intermédiaires de kératines avant d'être complètement dégradée, générant les acides aminés qui constituent le natural moisturizing factor (Cau *et al.*, 2017). Cette filaggrine s'agrège et joue un rôle dans la stabilisation du réseau de kératines en permettant l'agrégation des filaments intermédiaires de kératines (Simpson *et al.*, 2011; Candi *et al.*, 2005).

La famille des gènes des kératines est constituée de cinquante-quatre gènes fonctionnels distincts chez l'homme (Moll *et al.*, 2008). Les kératines sont séparées en deux types : type I (acide) et type II (basique à neutre) (**Tableau 1**). Les kératines s'assemblent en une paire hétéropolymérique de molécules de type I et de type II. Il s'agit d'une propriété unique qui les distingue des autres filaments intermédiaires.

Les autres protéines structurales comme l'involucrine, la loricine et la keratolinin sont contenues dans les KCs dans la partie la plus haute de la couche épineuse (Baroni *et al.*, 2012). Les protéines SPRR (Small proline-rich protein) sont synthétisées et ultérieurement réticulées par les transglutaminases pour renforcer l'enveloppe cornifiée sous la membrane plasmique (Hitomi, 2005).



Tableau 1. La nomenclature des kératines humaines
D'après Schweizer *et al.*, 2006

| Type de kératines | Type I | Type II |
|--|--------|---------|
| Kératines épithéliales | K9 | K1 |
| | K10 | K2 |
| | K12 | K3 |
| | K13 | K4 |
| | K14 | K5 |
| | K15 | K6a |
| | K16 | K6b |
| | K17 | K6c |
| | K18 | K7 |
| | K19 | K8 |
| | K20 | K76 |
| | K23* | K77 |
| | K24* | K78* |
| | | K79* |
| | K80* | |
| Kératines épithéliales spécifiques des follicules pileux | K25 | K71 |
| | K26 | K72 |
| | K27 | K73 |
| | K28 | K74 |
| | | K75 |
| Kératines des cheveux | K31 | K81 |
| | K32 | K82 |
| | K33a | K83 |
| | K33b | K84 |
| | K34 | K85 |
| | K35 | K86 |
| | K36 | |
| | K37 | |
| | K38 | |
| | K39 | |
| K40 | | |

2.4. Les jonctions

Des protéines du cytosquelette contrôlent la capacité de régénération de l'épiderme en affectant la maintenance des cellules souches qui résident principalement dans les follicules pileux et la couche basale (McGrath and Uitto, 2008).



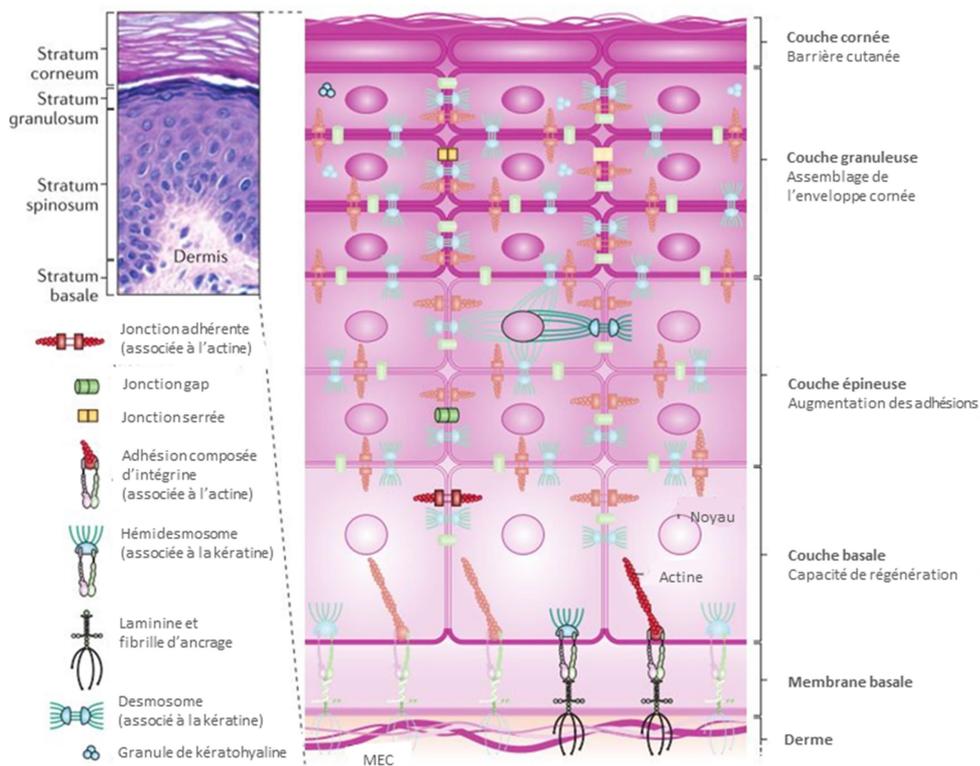


Figure 9. Architecture de l'épiderme
D'après Simpson *et al.*, 2011.

La couche basale, en constante prolifération, est en contact avec le derme à travers les hémidesmosomes et des adhésions composées d'intégrine. Pendant la différenciation des KCs, une architecture cellulaire unique est élaborée dans chacune des couches de l'épiderme. Cela comprend un cytosquelette spécifique et des types de jonctions cellulaires, incluant les jonctions adhérentes, les jonctions serrées, les desmosomes et les jonctions gap (**Figure 9**).

Les KCs de la couche basale sont polarisés et leur surface la plus basse est ancrée à la membrane basale par les intégrines. Leurs récepteurs transmembranaires, qui consistent en des sous-unités d'intégrine α et β , se lient spécifiquement aux composants de la MEC *via* leur domaine extracellulaire (Watt, 2002). Au moins onze dimères d'intégrine ont été décrits dans les KCs épidermiques. Du côté intracellulaire, la plupart des intégrines sont associées à l'actine *via* des protéines adaptatrices. Cependant, l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ a un rôle unique dans l'organisation de larges complexes d'intégrine appelés hémidesmosomes, qui sont connectés à des filaments intermédiaires par des protéines qui lient les cellules qui s'appellent plectine (Simpson *et al.*, 2011).



Les jonctions serrées forment une ceinture du côté apical des KCs de la couche granuleuse, fournissant une barrière additionnelle sous la couche cornée qui contrôle la perte en fluides et qui protège des pathogènes. Ils sont constitués de protéines transmembranaires qui sont les claudines, les occludines et les molécules d'adhésion jonctionnelles et sont échafaudées par des protéines cytoplasmiques appelées zonula occludens : ZO1, ZO2 et ZO3 (**Figure 10**). Ces protéines lient également ces jonctions avec l'actine du cytosquelette (Niessen, 2007).

Les jonctions adhérentes sont des connections intercellulaires qui coordonnent l'assemblage et l'organisation du cytosquelette d'actine cortical à travers l'épiderme. Les cadhérines classiques (comme l'E-cadhérine épithéliale et la P-cadhérine placentaire) composent le noyau adhésif des jonctions, dont la conformation est régulée par le calcium (Simpson *et al.*, 2011). Leur extrémité cytoplasmique recrute la caténine p120 et la β -caténine. L' α -caténine est associée à l'actine (**Figure 10**).

Les desmosomes sont la troisième classe d'adhésions intercellulaires ; en contraste avec les jonctions adhérentes, les desmosomes sont liés au réseau intracellulaire des filaments intermédiaires de kératines. Les desmosomes des cellules environnantes sont connectés par des membres de la famille des cadhérines, qui sont les desmogléines et les desmocollines. Les plakoglobines et les plakophilines se lient à la desmoplakine qui ancre les filaments de kératines à la plaque desmosomale (**Figure 10**).

Les jonctions gap sont uniques dans leur habilité à fournir des connexions directes entre les cellules voisines. Ces jonctions sont formées par des connexons, qui sont composés d'oligomères de six connexines. Ces connexons forment un canal ouvert, qui permet le transport d'ions et d'autres petites molécules qui aident dans la transmission du signal entre les cellules (**Figure 10**).



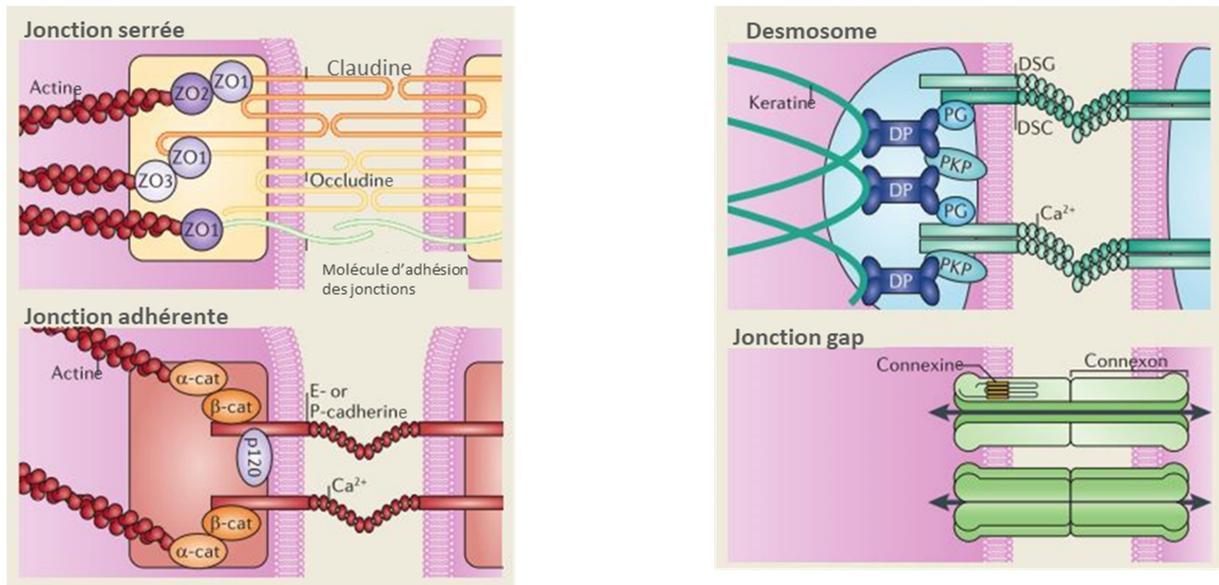


Figure 10. Les jonctions intercellulaires de l'épiderme.

ZO : Zonula occludens ; DP : desmoplakine ; PG : plakoglobine ; PKP : plakophiline ; DSG : desmogléine ;
α-cat : α-caténine ; β-cat : β-caténine
D'après Simpson *et al.*, 2011.

3. Les modèles biologiques d'étude de la peau

Les animaux, et en particulier les souris, sont abondamment utilisés pour la recherche en biologie cutanée. Cependant, les modèles animaux peuvent être inadéquats, car de vastes différences ont été reportées entre l'architecture de la peau des souris et des hommes par exemple.

L'épithélium couvert de pelage des souris est riche en follicule pileux, alors que les humains possèdent des follicules espacés. De plus, le derme des souris est fin et l'épiderme est composé de trois couches seulement, alors que le derme humain est épais et l'épiderme est généralement constitué de 6 à 10 couches de cellules (**Figure 11**) (Brohem *et al.*, 2011).



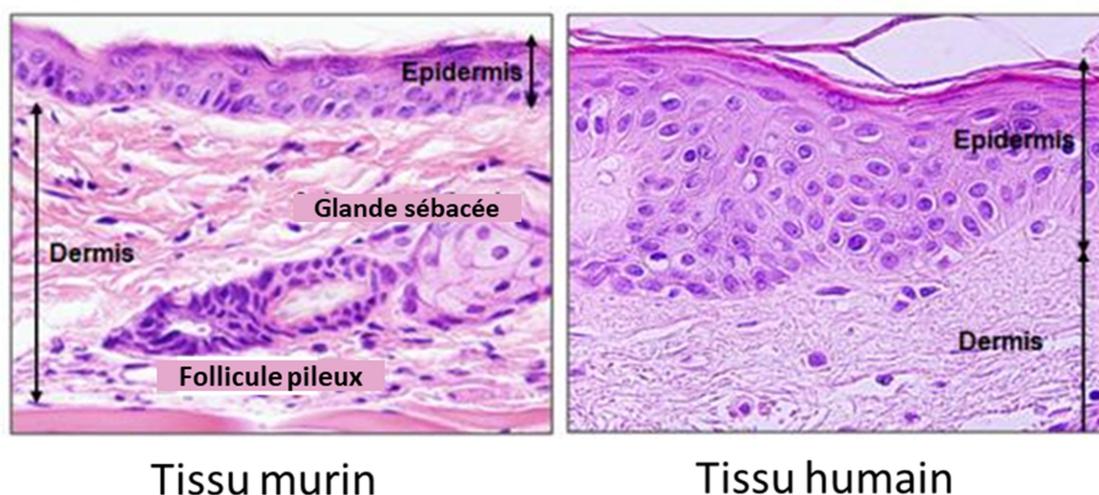


Figure 11. Différence entre une peau de souris et une peau humaine
Coloration hématoxyline éosine. Grossissement x60 au microscope optique.
Brohem *et al.*, 2011.

3.1. Cellules en monocouche et co-cultures de lignées cellulaires

Les fibroblastes primaires peuvent être cultivés en monocouche sur du plastique ou bien sur du collagène faisant office de MEC, ce qui favorise leur attachement (Ehrmann and Gey, 1956). Les KCs primaires en monoculture, quant à eux, produisent seulement un épiderme fin et sans le support mésenchymateux, ils entrent en apoptose après 2 semaines. Ceci s'explique par le fait que les fibroblastes du derme permettent la prolifération et la différenciation des KCs (Lau, Nicole F. Villeneuve, *et al.*, 2008). Les KCs peuvent être mis en culture sur une couche de cellules nourricières, comme les fibroblastes 3T3 afin qu'ils puissent rester plus longtemps en culture (Rheinwald and Green, 1975; Reijnders *et al.*, 2015).

Des lignées de KCs immortalisées, comme les HaCATs, ou des KCs primaires, sont utilisées en co-culture avec d'autres types cellulaires dans le but de reproduire des réponses biologiques *in vivo* de la peau (Régner et al., 1999; Hennen et al., 2011). Les KCs primaires peuvent être mis en culture avec des DCs dérivées de monocytes extraits du sang (MoDC pour monocyte-derived dendritic cells) (Schreiner et al., 2007). Des co-cultures entre deux lignées cellulaires sont également possibles. Par exemple entre les HaCATs, qui sont des KCs humains spontanément immortalisés et des THP-1 qui sont des cellules pro-monocytaires (Hennen et al., 2011; Hennen and Blömeke, 2016). Les THP-1 sont considérées comme des substituts des DCs. La présence des



KCs permet d'améliorer la prédiction du potentiel allergisant des molécules chimiques. Les co-cultures permettent de favoriser les interactions entre les cellules.

Tableau 2. Les différences clés entre les caractéristiques et les processus cellulaires des systèmes de culture en 3 et en 2 dimensions

| Caractéristiques cellulaires | 2D | 3D | Références |
|---|---|--|-----------------------------------|
| Morphologie | Cellules en monocouches, aplaties et étirées | Cellules avec leur forme naturelle, avec des structures sphéroïdes et agrégées | (Baker and Chen, 2012; Kim, 2005) |
| Prolifération | Prolifération plus rapide qu'en condition <i>in vivo</i> | Prolifération plus lente qu'en culture 2D | (Gurski <i>et al.</i> , 2010) |
| Exposition au milieu et aux substances chimiques | Les cellules sont exposées de façon homogène aux nutriments/facteurs de croissance/molécules chimiques qui sont distribuées dans le milieu de culture | Les nutriments/facteurs de croissance/molécules chimiques peuvent ne pas être capables de pénétrer complètement le tissu et d'atteindre les cellules du centre | (Yip and Cho, 2013) |
| Phase du cycle cellulaire | La plupart des cellules vont se trouver au même stade de cycle cellulaire car elles sont exposées au milieu de culture de la même façon | Les cultures 3D contiennent des cellules en prolifération, quiescentes, en apoptose et en nécrose | (Tibbitt and Anseth, 2010) |
| Expression génique/protéique | Niveaux d'expression des gènes et des protéines différents en comparaison aux modèles <i>in vivo</i> | Niveaux d'expression des gènes et des protéines plus proches des tissus <i>in vivo</i> | (Price <i>et al.</i> , 2012) |
| Sensibilité aux molécules chimiques | Les traitements administrés aux cellules semblent être très efficaces | Les cellules en culture 3D sont plus résistantes aux traitements et sont de meilleurs prédicteurs de la réponse aux molécules chimiques <i>in vivo</i> | (Sun <i>et al.</i> , 2006) |

Les cellules qui sont cultivées en monocouches en 2D ne parviennent pas à reproduire l'environnement complexe et dynamique des tissus *in vivo*. Elles sont forcées de s'adapter à une surface plate, rigide et artificielle, menant à des différences dans leurs compétences métaboliques (Mazzoleni *et al.*, 2009). Pour mimer la peau dans un environnement *in vitro*, des modèles ont été développés pour reproduire une structure 3D. Les principales différences entre les modèles 2D et 3D sont exposées dans le **tableau 2**.



3.2. Epidermes reconstruits

Le développement de modèle de peau 3D *in vitro* remonte à plus de trente ans. L'une des avancées technologiques les plus importantes a été la méthode développée par Pruniéras et al. (1983). A partir d'explants de peau dont on a ôté l'épiderme, les KCs primaires humains ont été déposés sur le derme. La culture des KCs a résulté en un épiderme entièrement différencié avec les caractéristiques d'un épiderme humain *in vivo* (Bell et al., 1983).

Les modèles de peau reconstruits sont disponibles dans le commerce : le plus utilisé est le modèle EpiskinTM. Ce modèle a été développé par Tinois *et al.* en 1991 et est composé d'une matrice de collagène contenant des fibroblastes humains, revêtu d'un film de collagène de type IV. Le tout est recouvert de KCs humains complètement différenciés (**Figure 12**) (Tinois *et al.*, 1991). Ces modèles étaient initialement produits par la société Imedex (Lyon, France), qui a été acquise par L'Oréal en 1997. Le modèle SkinEthicTM a été développé en 1990. Dans ce modèle, l'épiderme est généré par la culture de KCs sur des filtres synthétiques inertes, qui sont exposés à une interface air-liquide et maintenus en culture dans un milieu précis (Rosdy and Clauss, 1990).

Des études récentes ont montré que la couche cornée des modèles *in vitro* était différente de la peau native en terme de composition et d'organisation spatiale des lipides (Thakoersing *et al.*, 2012). Les lipides des tissus *in vitro* étant empaquetés de façon hexagonale et non orthorhombique comme l'est l'épiderme humain à l'exception de la couche cornée. Cependant, les propriétés de barrières sont maintenues ainsi que l'expression de plusieurs marqueurs de différenciation, à l'exception de l'involucrine et des kératines 16 qui sont davantage exprimés dans les modèles *in vitro*. Les modèles EpiskinTM et SkinEthicTM ont été validés pour l'évaluation de la corrosivité (Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) 431) et l'irritation (OCDE 439) des produits chimiques sur la peau par l'ECVAM (European centre for the validation of alternative methods).



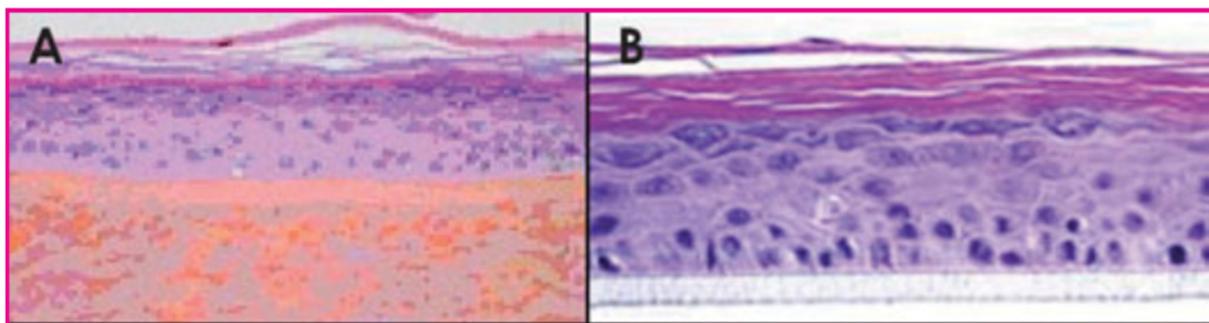


Figure 12. Exemples de coupes histologiques transversales (coloration hématoxyline - eosine) de modèle de peau reconstruits en 3D
(A) Episkin, (B) SkinEthic RHE.

D'autres modèles de culture organotypiques ont été développés, dans le but de répliquer l'action du virus humain papillomavirus. Des cellules de la lignée de KCs NIKS (Normal immortal KCs) sont cultivées sur une matrice de collagène avec des fibroblastes humains pendant dix-huit jours (Meuris *et al.*, 2016).

Certains équivalents de peau contiennent également des LCs. La lignée cellulaire humaine acute myeloid leukemia MUTZ-3 a été utilisée. Cette lignée monocytaire peut être différenciée en LC, de façon TGF- β dépendante. Les MUTZ-LC expriment la langérine et contiennent des granules de Birbeck (Masterson *et al.*, 2002; Santegoets *et al.*, 2006). Dans ce modèle, des KCs primaires et des MUTZ-LC sont déposés sur un gel de collagène contenant des fibroblastes primaires. Cet épiderme reconstruit a été exposé par voie topique à un panel d'allergènes et d'irritants, résultant en une migration des LCs de l'épiderme jusqu'à l'équivalent dermique (Kosten *et al.*, 2015, 2016).

3.3. Tissus *ex vivo*

L'excision de peau humaine est communément obtenue à partir de chirurgie plastique ou de cadavres et dans les deux cas, une approbation éthique est requise pour les utiliser. Les peaux de l'abdomen, de la poitrine ou du dos sont les plus pratiques à utiliser, en raison de la large surface disponible. Cependant, il existe des différences d'absorption des produits chimiques en fonction des parties du corps (Rougier *et al.*, 1987), en raison de l'épaisseur de la couche cornée (Sandby-Møller *et al.*, 2003; Marrakchi and Maibach, 2007), de l'hydratation et de la composition lipidique (Lampe *et al.*, 1983). Ce paramètre doit être pris en compte dans l'évaluation de l'absorption des



produits chimiques. De plus, les conditions de culture ne sont pas encore optimisées et leur applicabilité est encore limitée (Tammi and Maibach, 1987; Holbrook *et al.*, 1993; Moll, 2003).

Les explants de peau peuvent être conservés jusqu'à six mois sans perte de leur fonction barrière (Küchler *et al.*, 2013), particulièrement s'ils sont conservés dans 10% de glycérol (Barbero and Frasch, 2016). Nielsen *et al.* ont conclu que trois semaines de congélation à -20°C avait peu d'effet sur les explants de peau, avec ou sans polyéthylène glycol comme conservateur. En congelant les explants à -80°C, les dommages étaient significatifs, car la cryoconservation de la peau humaine dégrade presque complètement les enzymes stéroïdogéniques.

L'utilisation d'explants de peau pour la recherche et le diagnostic d'études *in vitro* requière une grande quantité de peau fraîchement excisée, ce qui est couteux, difficile d'un point de vue logistique et qui peut induire des variations de donneurs.

Des modèles de peau ex-vivo prêts à l'emploi brevetés appelés NativeSkin® sont des biopsies de peau humaine avec toute leur épaisseur. Ils sont obtenus à partir de donneurs ayant subits une chirurgie de l'abdomen. Ces tissus sont fixés à des inserts de culture cellulaire et chargés sur une plaque de culture multi-puits. Une matrice semi solide nourrit constamment la partie dermique du tissu avec un milieu de culture optimisé, sans sérum et sans hydrocortisone. Ce modèle d'explant de peau peut être gardé en culture jusqu'à sept jours (De Wever *et al.*, 2015).



Partie II : La dermatite allergique de contact aux fragrances





1. Définition et épidémiologie

Les substances parfumantes, ou fragrances, sont des composés organiques ayant une odeur plaisante, qui peuvent provenir de sources naturelles ou être le résultat d'une synthèse chimique. De nombreux cas d'allergies de contact aux substances parfumantes ont été recensés et la prévalence estimée dans la population générale est de 1,7 à 4,1% (Johansen, 2003; Schnuch *et al.*, 2002). Il est difficile pour les patients allergiques d'éviter leur contact car ces substances sont omniprésentes dans les produits du quotidien. Elles sont utilisées dans les parfums et les biens de consommation parfumés tels que les détergents et autres produits à usage domestique, mais aussi dans les produits cosmétiques.

Un produit cosmétique est défini comme étant : toute substance ou tout mélange destiné à être mis en contact avec les parties superficielles du corps humain (épiderme, systèmes pileux et capillaire, ongles, lèvres et organes génitaux externes) ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles (European Commission, 1976).

Il est possible que la sévérité et la fréquence de l'allergie de contact décroissent si le contact avec l'allergène est réduit ou évité. Le consommateur doit connaître avec exactitude le contenu des produits cosmétiques afin d'éviter l'utilisation de substances auxquelles il est allergique.

Jusqu'en 2003, les parfums et les composés aromatiques des produits cosmétiques, alors régis par la directive 76/768/EEC, pouvaient être référés par les termes « parfums » et « arômes », sans fournir d'information sur leur composition exacte. C'est la raison pour laquelle en 1999, le SSCPNFP (Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food products) a identifié 26 fragrances allergéniques dont la présence dans les produits cosmétiques doit être indiquée aux consommateurs. Ces 26 substances ont été introduites dans l'annexe III du septième amendement de la directive cosmétique (2003/15/EC). Elles doivent être inscrites sur le packaging des produits si leur concentration est supérieure à 10 ppm dans les produits non rincés et à 100 ppm dans les produits rincés (**Tableau 3**) (European Commission, 1976).



Tableau 3. Liste des vingt-six allergènes qui sont spécifiés sur l'emballage des produits cosmétiques
D'après le septième amendement de la directive européenne des produits cosmétiques.

Liste A : fragrances qui sont les plus fréquemment reportées dans la littérature

| Nom INCI | Numéro CAS |
|---|------------|
| Amyl cinnamal | 122-40-7 |
| Amylcinnamyl alcohol | 101-85-9 |
| Benzyl alcohol | 100-51-6 |
| Benzyl salicylate | 118-58-1 |
| Cinnamyl alcohol | 104-54-1 |
| Cinnamal | 104-55-2 |
| Citral | 5392-40-5 |
| Coumarin | 91-64-5 |
| Eugenol | 97-53-0 |
| Geraniol | 106-24-1 |
| Hydroxycitronellal | 107-75-5 |
| Hydroxymethylpentyl-cyclohexenecarboxaldehyde | 31906-04-4 |
| Isoeugenol | 97-54-1 |

Liste B : fragrances qui sont moins fréquemment reportées

| Nom INCI | Numéro CAS |
|--|------------|
| Anisyl alcohol | 105-13-5 |
| Farnesol | 4602-84-0 |
| Benzyl benzoate | 120-51-4 |
| Hexyl cinnamaldehyde | 101-86-0 |
| Benzyl cinnamate | 103-41-3 |
| Linalool | 78-70-6 |
| Citronellol | 106-22-9 |
| Methyl heptine carbonate | 111-12-6 |
| Lilial | 80-54-6 |
| d-Limonene | 5989-27-5 |
| 3-Methyl-4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)-3-buten-2-one | 127-51-5 |

Liste C : fragrances rajoutées

| Nom INCI | Numéro CAS |
|-----------|------------|
| Oak moss | 90028-68-5 |
| Tree moss | 90028-67-4 |

Dans le but de diagnostiquer les patients potentiellement allergiques, il existe des tests épicutanés ou « patch test ». Ces tests permettent de reproduire la lésion en appliquant diverses molécules suspectées de provoquer une allergie chez le patient. Pour tester les allergies aux fragrances, plusieurs mélanges sont utilisés :

- le premier est appelé « **fragrance mix I** », c'est le mélange le plus relevant pour le diagnostic des allergies aux substances parfumantes (Mortz and Andersen, 2010). Il contient 1 % de



chacune des substances suivantes : amyl cinnamal, cinnamyl alcohol, hydroxycitronellal, geraniol, eugenol, isoeugenol et extrait de mousse de chêne. La prévalence estimée pour ce mélange dans la population générale est de 7,2 % à 11,5 %.

- le deuxième mélange de fragrances ou « **fragrance mix II** » inclut 6 fragrances : lylal, citral, farnesol, hexyl cinnamic aldehyde, coumarin et citronellol (Krautheim *et al.*, 2010). Sa prévalence est de 5% dans la population générale et il est considéré comme le deuxième marqueur pour la détection des allergies aux fragrances. Le lylal est un allergène très commun en Europe, avec une prévalence estimée de 1 % à 3 %. En 2003, la législation a limité sa concentration maximale dans les cosmétiques à 1,5 % (Braendstrup and Johansen, 2008) et dès lors, une diminution de la sensibilisation a été observée (Schnuch *et al.*, 2012).
- le **baume du Pérou** est également un marqueur pour la détection des allergies aux fragrances. Il s'agit d'une résine naturelle extraite de l'arbre *myroxylon pereirae*. Il contient approximativement 250 substances chimiques différentes, la plupart étant non identifiées. Certaines de ces substances sont des fragrances telles que l'alcool cinnamique, le CinA, l'eugenol et l'isoeugenol. Il est positif chez environ 50 % des patients suspectés d'être allergiques aux substances parfumantes (Eguino *et al.*, 2006).

Une étude menée en 2013 et 2014 sur plus de 30 000 patients allergiques dans près de 12 pays européens a montré que la prévalence pour les fragrances restait inchangée depuis 2004 (Uter *et al.*, 2017). Pour les fragrances mix I, II et le baume du Pérou, la prévalence est de 7,3 %, 3,8 % et 5,3 % respectivement. Les fragrances ont longtemps été considérées comme les premières causes d'allergie aux produits cosmétiques. Mais les cas d'allergie aux conservateurs ont considérablement augmenté ces dernières années, passant de 1,7 % en 1996 à 11 % en 2013, ce qui classe maintenant les fragrances à la deuxième position.

Cette augmentation de cas d'allergie aux conservateurs peut s'expliquer entre autres par la haute fréquence de tests positifs à la méthylisothiazolinone, utilisée dans les produits cosmétiques, dont la prévalence est passée de 3,5 % en 2012 à 8,8 % en 2013 (Zaragoza-Ninet *et al.*, 2016).

En comparaison, les allergies de contact aux métaux tels que le nickel, le cobalt et le chrome semblent stables avec 18,1 %, 5,9 % et 3,2 % respectivement et le nickel reste la première cause d'allergie de contact en Europe (Uter *et al.*, 2017).



2. Les molécules allergisantes cutanées

2.1. Pénétration percutanée

Il y a une série d'événements fondamentaux qui mènent à une reconnaissance de la molécule allergisante par le système immunitaire. La première étape est la pénétration percutanée à travers la couche cornée, qui est imperméable à l'eau. Les composés doivent être inférieurs à 1000 daltons pour une pénétration efficace.

Les caractéristiques physico-chimiques des molécules influencent leur pénétration : un faible poids moléculaire et une lipophilie élevée vont entraîner une meilleure absorption. Une substance chimique peut pénétrer dans l'épiderme *via* deux voies :

- la voie **intercellulaire**, le passage entre les cellules ;
- la voie **transcellulaire**, le passage au travers des cellules, qui est plus rapide (Milpied-Homsy *et al.*, 2009).

Les molécules de faible poids moléculaire traversent l'épiderme en passant par les glandes sudoripares et les follicules pilo-sébacés.

2.2. Les différents haptènes

La plupart des molécules allergisantes ont un poids moléculaire inférieur à 1000 Da (Bos and Meinardi, 2000). Elles sont référées comme des haptènes car elles ne sont pas antigéniques par elles-mêmes, mais vont se conjuguer avec des protéines de l'épiderme ou du derme (Rustemeyer *et al.*, 2006). Il y a formation d'un complexe antigénique haptène-protéine. Les liaisons formées entre l'haptène et les protéines peuvent être des liaisons covalentes ou des liaisons de coordination (Basketter *et al.*, 1995).



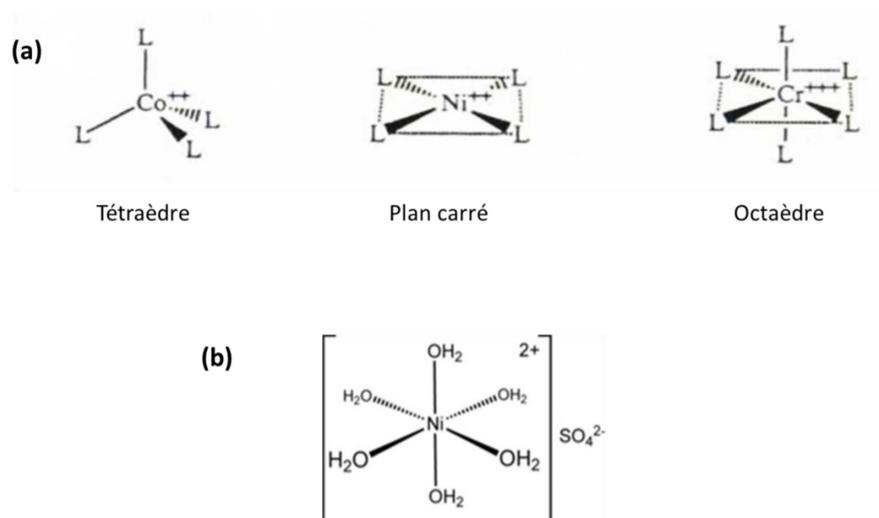


Figure 13. Exemples de complexes de coordination des métaux

(A) Le cobalt (Co^{2+}) forme un tétraèdre, le nickel (Ni^{2+}) forme un complexe en plan carré et le chrome (Cr^{3+}) forme un octaèdre. L = ligand. (b) Le sulfate de nickel NiSO_4 .

D'après Basketter et al., 1995.

- **Les liaisons de coordination** : elles mettent en jeu des énergies de l'ordre de 50 kJ par mole. Ce sont des liaisons relativement fortes, qui se produisent entre des métaux et des atomes riches en électrons, comme l'azote, l'oxygène ou le soufre. Elles sont généralement observées dans le cas des allergies de contact aux métaux : le nickel, le cobalt ou le chrome. Les liaisons de coordination se caractérisent par le nombre de ligands et la géométrie qu'ils adoptent autour du centre métallique. Ces deux paramètres dépendent de la nature du métal et de son degré d'oxydation (Lepoittevin, 2011). Le cobalt (II) (Co^{2+}) forme préférentiellement des édifices tétraédriques avec quatre ligands alors que le nickel (II) (Ni^{2+}), qui peut également interagir avec quatre ligands, forme des structures plan-carré. Le chrome (III) (Cr^{3+}), quant à lui, forme principalement des édifices octaédriques avec six ligands (**Figure 13**).
- **Les liaisons de covalence** : leur énergie, supérieure à 400 kJ par mole, en font des liaisons très stables (Lepoittevin, 2011). Elles résultent de la mise en commun de deux électrons par deux atomes. Le passage par un mécanisme de type radicalaire peut également être proposé (**Figure 14**).



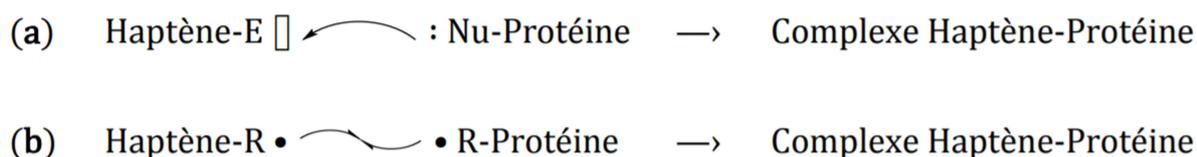


Figure 14. Formation de liaisons covalentes par réaction électrophile-nucléophile (a) et radicalaire (b)
D'après Aptula *et al.*, 2007.

Dans les protéines, les chaînes latérales de nombreux acides aminés comportent des hétéroatomes riches en électrons. De part leur propriété nucléophile, ils sont susceptibles de réagir avec des haptènes électrophiles (Guengerich *et al.*, 1985). Les acides aminés contenant des hétéroatomes riches en électrons sont les plus susceptibles de réagir avec les haptènes, les plus cités sont la lysine et la cystéine. Mais la méthionine, l'arginine, la sérine, la tyrosine, l'histidine, le tryptophane, l'asparagine, la glutamine et la thréonine en font également partie (Moss *et al.*, 2016).

Une grande variété de fonctions chimiques électrophiles présentes sur les haptènes est actuellement répertoriée. Le **tableau 4** représente les mécanismes réactionnels auxquels ces haptènes sont soumis.

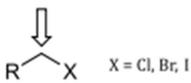
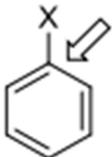
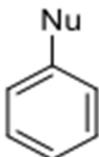
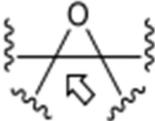
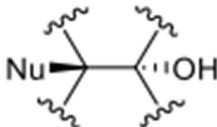
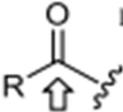
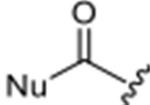
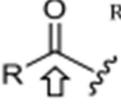
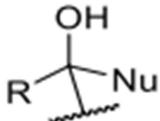
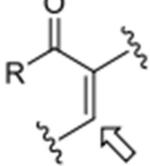
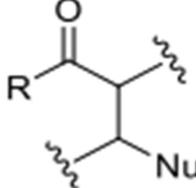
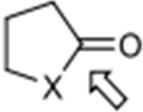
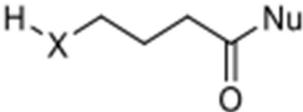
Ces haptènes directement réactifs avec les protéines et qui peuvent former un complexe sans modification préalable sont appelés haptènes vrais (**Figure 15**). C'est le cas du CinA, une molécule capable d'induire une réaction allergique, qui est retrouvée dans la cannelle et abondamment présente en tant que substance parfumante dans les produits cosmétiques. Les pré-haptènes sont activés par oxydation avant le contact avec la peau et les pro-haptènes sont activés de façon enzymatique sur la peau (Kaplan *et al.*, 2012).



Tableau 4. Fonctions chimiques électrophiles des haptènes

Les flèches indiquent les sites réactifs électrophiles.

Lepoittevin and Cribier, 1998.

| Sites réactifs électrophiles | Mécanismes de réaction | Adduits formés |
|--|---|---|
|  <p>X = Cl, Br, I</p> <p>Dérivé halogéné</p> | Substitution nucléophile sur un centre saturé |  |
|  <p>X = Cl, Br, I, F</p> <p>Dérivé halogéné aromatique</p> | Substitution nucléophile aromatique (SNAr) |  |
|  <p>Epoxyde</p> | Substitution nucléophile sur un centre saturé |  |
|  <p>R = OR' ou NHR'</p> <p>Ester ou Amide</p> | Substitution nucléophile sur un centre insaturé |  |
|  <p>R = H, alkyle ou aryle</p> <p>Aldehyde ou Cétone</p> | Addition nucléophile |  |
|  <p>R = H, R' ou OR'</p> <p>Systèmes carbonyle α-β insaturés</p> | Addition nucléophile de type Michael |  |
|  <p>X = O ou NH</p> <p>Lactone, lactame</p> | Substitution sur un centre insaturé |  |



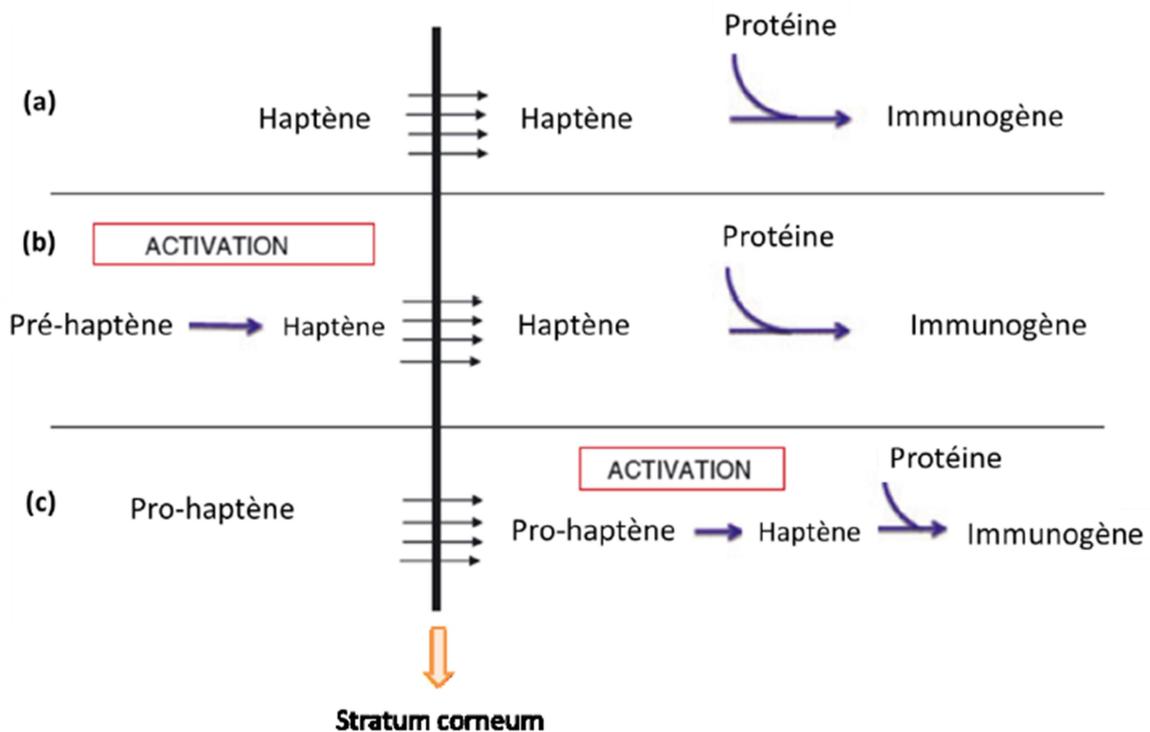


Figure 15. Les différents types d'haptènes

D'après Kaplan, 2012.

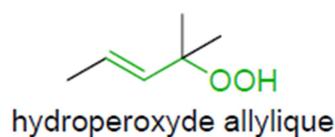
2.3. Les pré-haptènes

En 2006, Lepoittevin introduit le concept de pré-haptène, en référence aux substances inertes qui deviennent des allergènes dans leur environnement. Il s'agit de molécules au départ non réactives vis-à-vis des protéines épidermiques et dermiques et qui peuvent acquérir, après transformation, la capacité d'interagir avec ces dernières. Ces transformations sont provoquées par des facteurs externes tels que la chaleur, la lumière ou l'oxygène et ont lieu avant le contact avec la peau (Lepoittevin, 2006).

Plusieurs fragrances s'autoxydent facilement au contact de l'air ambiant, menant à la formation d'allergènes potentiels. C'est le cas des terpènes insaturés, dont l'autoxydation mène à la formation de différents produits, dont certains sont des allergènes forts. Ces produits d'oxydation peuvent être primaires, comme des hydroperoxydes allyliques, ou secondaires, comme des alcools allyliques, des époxydes, ou encore des aldéhydes et des cétones α,β -insaturés (Figure 16) (Kao, 2010).



Produit primaire d'oxydation



Produits secondaires d'oxydation

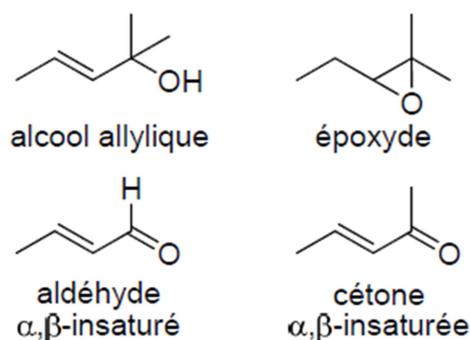


Figure 16. Produits d'autoxydation de terpènes insaturés

D'après la thèse de D. Kao, 2010.

Le mécanisme dirigeant les réactions d'autoxydation le plus courant est celui de type radicalaire en chaîne, qui conduit à la formation primaire d'hydroperoxydes allyliques. Dans une première étape, l'initiation, qui peut être provoquée par la chaleur, la lumière, ou bien une quantité catalytique de métal, des radicaux R^\bullet sont générés à partir des composés organiques. Durant une deuxième étape, appelée propagation, ces radicaux R^\bullet peuvent réagir de façon très rapide avec l'oxygène moléculaire à l'état triplet 3O_2 pour donner des radicaux peroxydes ROO^\bullet . Ces derniers sont capables d'abstraire un atome d'hydrogène porté par d'autres molécules organiques afin de produire un hydroperoxyde. En créant un nouveau radical R^\bullet , ceci permet en même temps de propager l'oxydation en chaîne. L'abstraction d'hydrogène est lente et, en conséquence, sélective des atomes d'hydrogène les plus faiblement liés. Finalement, une étape de terminaison s'effectue quand deux radicaux R^\bullet , ou un radical R^\bullet et un radical peroxyde ROO^\bullet , ou deux radicaux peroxydes ROO^\bullet se rencontrent pour former un produit non radicalaire (**Figure 17**).



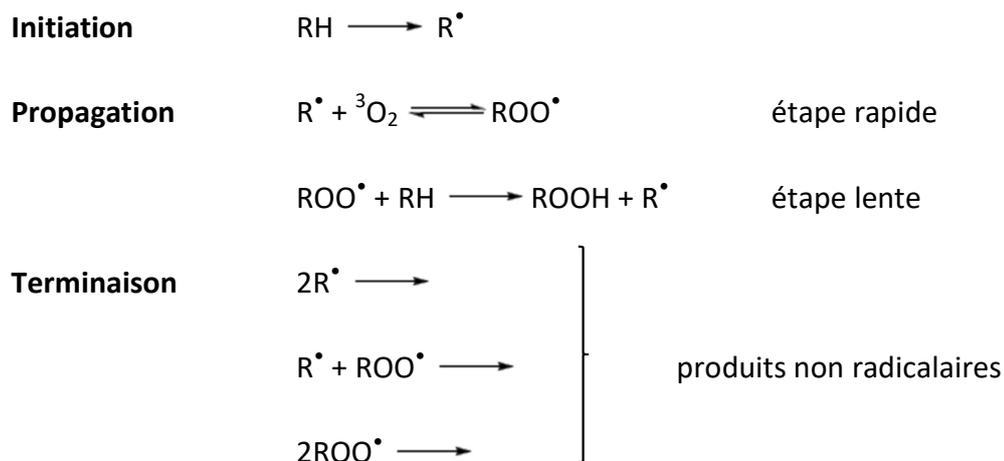


Figure 17. Mécanisme général de l'autoxydation

Lorsqu'il s'agit de molécules insaturées, le centre radicalaire généré dans l'étape d'initiation se trouve préférentiellement en position adjacente à une double liaison, après abstraction d'un hydrogène allylique. De cette manière, le radical R^\bullet est stabilisé par résonance. Pendant l'étape de propagation, l'oxygène à l'état triplet 3O_2 peut alors s'additionner sur différentes positions radicalaires (Figure 18). La distribution des produits est déterminée par la stabilité relative des radicaux peroxy ROO^\bullet formés, qui à son tour, est dépendante de la structure du substrat de départ.

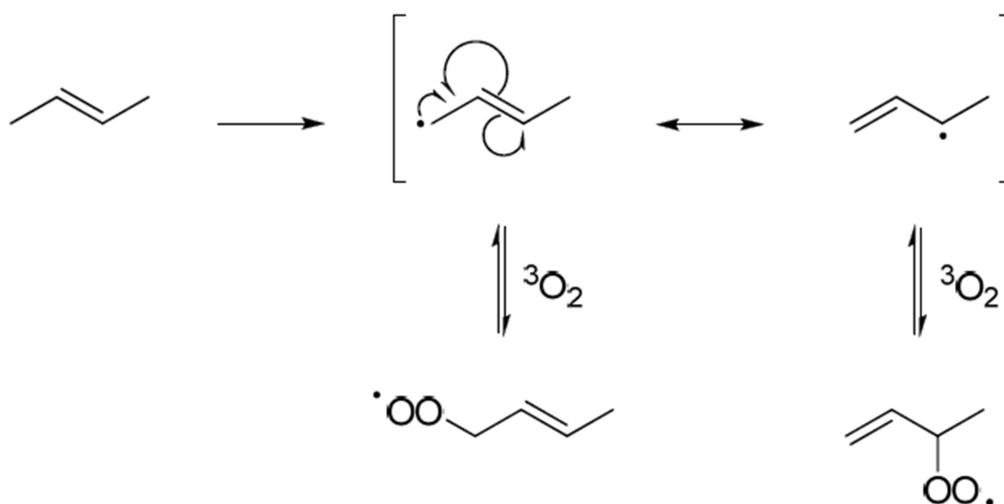


Figure 18. Autoxydation des molécules insaturées

D'après la thèse de D. Kao, 2010.

Le limonène et le linalol sont deux terpènes qui sont des ingrédients parfumants présents dans une grande variété de produits cosmétiques (Yazar *et al.*, 2011).



- Le **R-limonène** est obtenu en tant que sous-produit de l'industrie du jus de citron. En plus d'être utilisé dans l'industrie cosmétique et dans les produits ménagers, il est également trouvé dans les nettoyants pour les mains (avec une concentration allant de 5 à 15%). Il est utilisé dans certains systèmes thérapeutiques d'administration transdermique en tant qu'activateur de pénétration. Il est également utilisé en tant que solvant et agent de dégraissage parfois à une concentration allant de 80 % à 100% (Bråred Christensson *et al.*, 2016). Le limonène peut être oxydé par le dioxygène moléculaire pour donner des hydroperoxydes allyliques très réactifs (**Figure 19**).

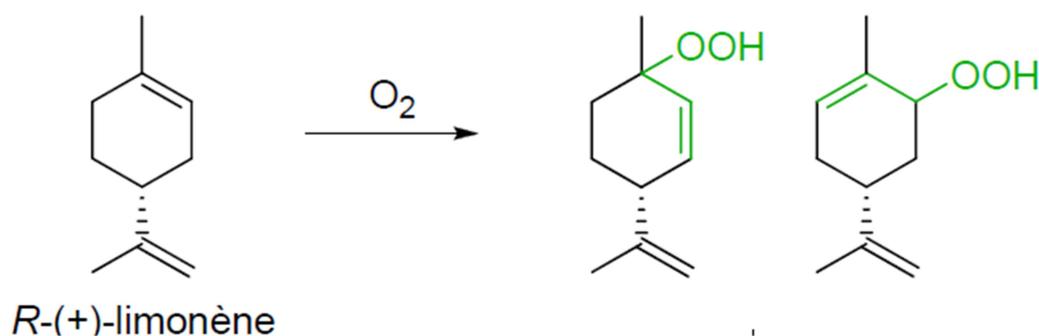


Figure 19. Action du dioxygène sur le R-limonène : formation de deux hydroperoxydes allyliques très réactifs

D'après la thèse de D. Kao, 2010.

- Le **linalol** est largement utilisé dans l'industrie cosmétique et dans les produits ménagers. Il s'observe en larges quantités dans diverses plantes comme la lavande, et constitue d'ailleurs la majeure partie de son huile essentielle. C'est un alcool terpénique insaturé à l'odeur de muguet qui devient allergisant suite à son oxydation par le dioxygène, par formation d'hydroperoxydes allyliques (**Figure 20**) (Bråred Christensson *et al.*, 2016).



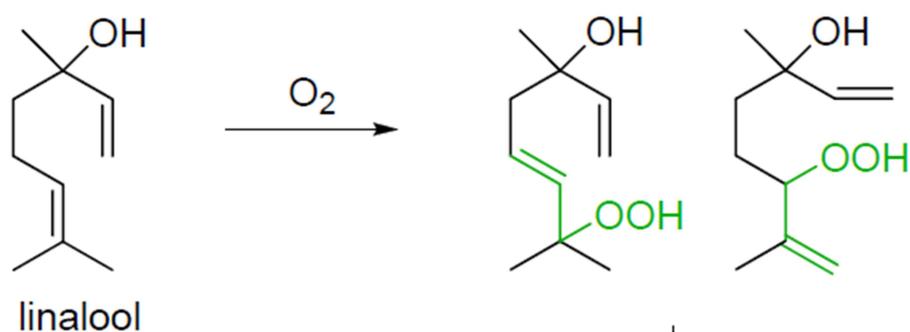


Figure 20. Cas du linalool : formation de deux hydroperoxydes allyliques précurseurs hautement réactifs
D'après la thèse de D. Kao, 2010.

Les énergies de dissociation des liaisons O-O et O-H sont relativement faibles, 175 et 368 kJ.mol⁻¹ respectivement, ce qui rend leur clivage facile. Des radicaux alkoxy RO[•] et peroxy ROO[•] sont rapidement formés, ce qui peut entraîner la formation de radicaux R[•] carbone-centrés *via* cyclisation intramoléculaire, fragmentation ou abstraction de l'hydrogène. Ces radicaux vont pouvoir réagir avec les protéines afin de former un adduit (**Figure 21**).

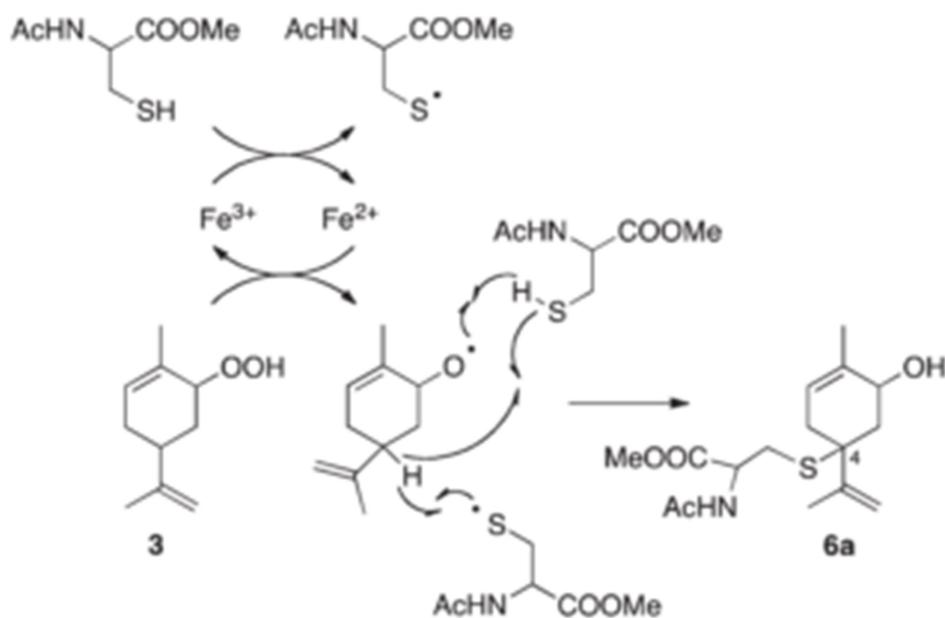


Figure 21. Mécanisme proposé pour la formation d'un adduit entre l'hydroperoxyde de linalool et le N-acetyl-cysteine methyl ester
D'après la thèse de D. Kao, 2010.



3. Le métabolisme cutané

3.1. La détoxification

Les molécules lipophiles peuvent aisément pénétrer la barrière cutanée et s'accumuler dans l'épiderme et le derme. Des systèmes enzymatiques de détoxification sont capables de métaboliser des xénobiotiques, soit un composé chimique étranger à un système biologique donné, afin de modifier leur structure chimique. Les modifications sont les suivantes : transformer une molécule lipophile en une molécule hydrosoluble facilement éliminable, *via* une ou plusieurs étapes de métabolisation classées en deux catégories (**Figure 22**) (Karlberg *et al.*, 2013).

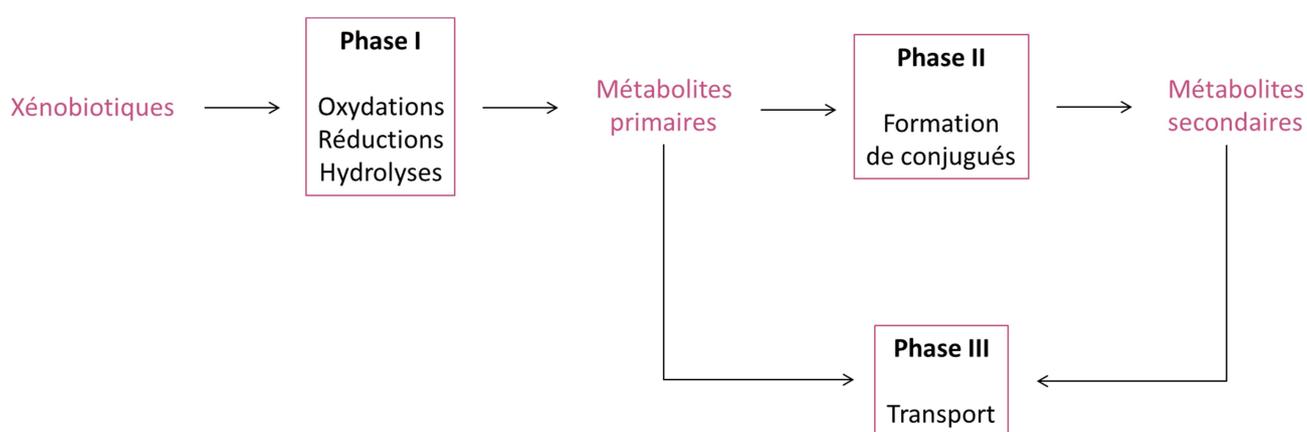


Figure 22. Processus de détoxification.

Moss and Lepoittevin, 2016.

Le métabolisme des xénobiotiques peut être divisé en deux catégories :

- Les transformations **de phase I** sont connues comme étant des réactions d'activation et de fonctionnalisation, qui introduit des groupes fonctionnels hydrophiles. Si le métabolite est rendu suffisamment polaire, il sera éliminé. Les enzymes cutanées qui catalysent ces transformations sont généralement des enzymes membranaires de la famille des oxydoréductases, qui assurent donc des réactions d'oxydation et/ou de réduction. Parmi elles, les mono-oxygénases à cytochrome P450 (Park *et al.*, 1995), les flavines mono-oxygénases (Krueger and Williams, 2005), les alcools et aldéhydes déshydrogénases (Cheung *et al.*, 1999), les monoamines oxydases (Weyler *et al.*, 1990), les peroxydases (Hollenberg, 1992), les estérases (Prusakiewicz *et al.*, 2006), azo-réductases (Levine, 1991) et les enzymes hydrolytiques (Martin *et al.*, 1987) sont retrouvées.



- Dans le cas où le métabolite n'est pas suffisamment hydrophile pour être éliminé, il devra subir une transformation subséquente **de phase II**. Les enzymes de phase II présentes dans la peau sont essentiellement des transférases : les UDP-glucuronyl transférases (Tukey and Strassburg, 2000), N-acétyltransférases (Kawakubo *et al.*, 2000), les glutathione-S-transférases (Giralt *et al.*, 1996) et les sulfotransférases (Coughtrie *et al.*, 1998).
- Après fonctionnalisation, les transporteurs **de phase III**, tels que la P-glycoprotéine ou la multi-drug resistance proteins (Kruh *et al.*, 2001; Picchianti-Diamanti *et al.*, 2014), transportent au travers de la membrane plasmique les dérivés des xénobiotiques pour qu'ils puissent être éliminés par la cellule.

Lors du métabolisme de phase I, les métabolites réactifs ayant subi une modification peuvent interagir avec les protéines de la peau. Ils deviennent des haptènes vrais avant d'être pris en charge par les enzymes de phase II. C'est le cas des pro-haptènes.

3.2. Les pro-haptènes

Plus d'un tiers des allergènes connus sont des pro-haptènes. L'alcool cinnamique est un composant de la cannelle et d'une variété d'huiles essentielles telles que la myrrhe et le patchouli. Il est extrêmement présent dans les fragrances. *In vivo*, l'alcool cinnamique est oxydé par une alcool déshydrogénase en aldéhyde cinnamique (Moss *et al.*, 2016). A la suite de cette métabolisation, il peut se conjuguer à une entité hydrosoluble afin d'être éliminé de l'organisme, ou bien réagir avec les protéines de l'épiderme et du derme et former un complexe antigénique (**Figure 23**) (Smith *et al.*, 2000).

Une étude récente réalisée sur de l'épiderme reconstruit a permis d'investiguer *in situ* le devenir de l'alcool cinnamique dans la peau. Les molécules potentiellement électrophiles formées sont des époxy-alcools et des sulfates allyliques. Ces résultats suggèrent que la métabolisation de l'alcool cinnamique induit la formation d'haptènes autres que l'aldéhyde cinnamique (Moss *et al.*, 2016).



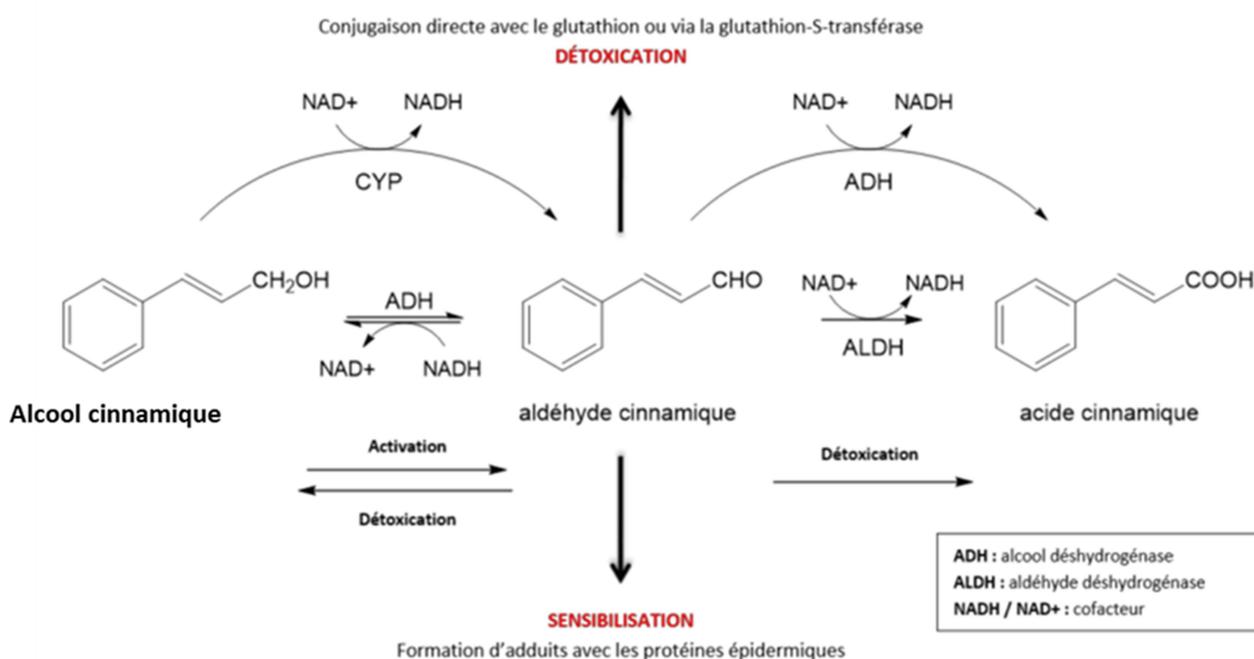


Figure 23. Métabolisation de l'alcool cinnamique

D'après Smith et al., 2000.

4. La dermatite allergique de contact

La dermatite allergique de contact (DAC) est un terme clinique utilisé pour décrire une réaction inflammatoire de la peau après exposition topique à un produit donné. Elle est caractérisée par un large éventail de symptômes tels que le prurit érythémateux, des œdèmes et des vésicules, sur les sites de la peau en contact avec les haptènes (Kaplan *et al.*, 2012). Il s'agit d'une réaction inflammatoire inappropriée de l'organisme en réponse à un xénobiotique. Elle est définie comme une hypersensibilité retardée de type IV. Elle est induite par les lymphocytes T. Après exposition à l'haptène, il y a un délai de 24 à 48 heures avant l'apparition des premiers symptômes (Coombs and Gell, 1975).

La DAC peut être divisée en deux phases : la **phase de sensibilisation**, asymptotique, et la **phase d'élicitation**, la phase clinique (**Figure 24**).



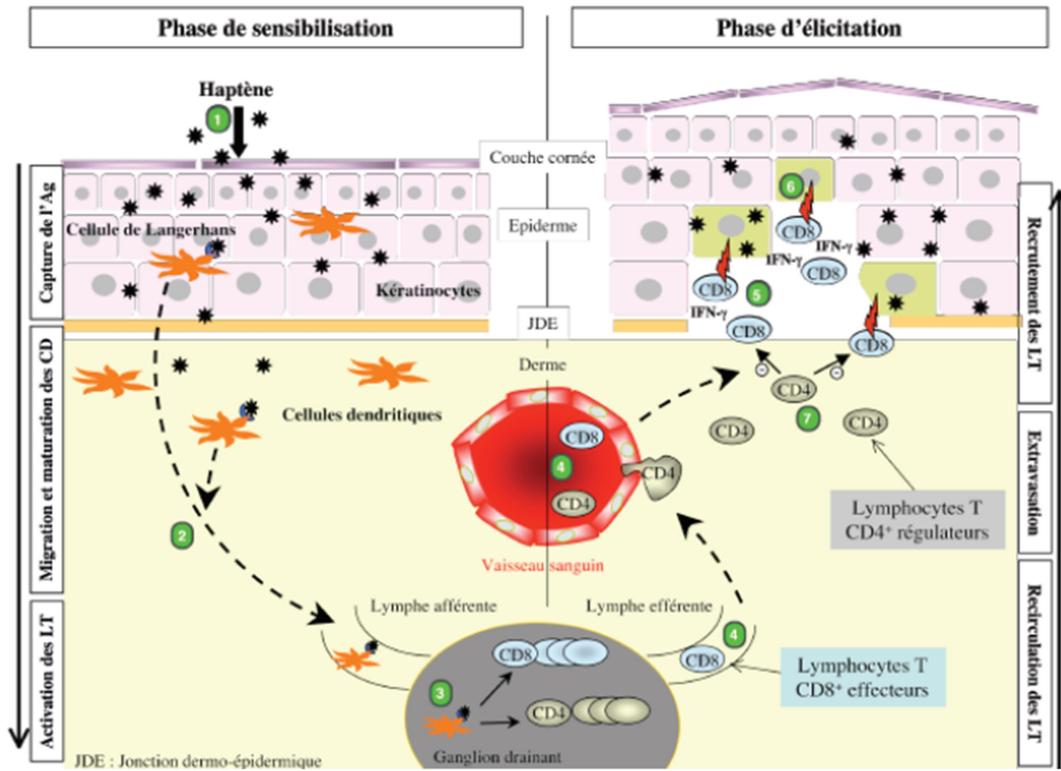


Figure 24. Mécanismes d'activation de la réponse cellulaire par un haptène

L'application épicutanée d'une molécule sensibilisante induit une activation du système immunitaire inné cutané (étape1) associée à la migration et la maturation des cellules de Langerhans (LC) et des cellules dendritiques (DC) du derme qui présentent l'haptène en tant qu'Ag aux LT dans le ganglion drainant (étape 2). Ces DC activent des populations de LT spécifiques CD8⁺ effectrices et CD4⁺ régulatrices (étape 3) qui vont ensuite re-circuler en périphérie (étape 4). Lors d'un deuxième contact avec le même haptène, les LT CD8⁺ spécifiques sont recrutés dans la peau et activés (étape 5). De par leur cytotoxicité et leur production d'IFN- γ , les LT CD8⁺ effecteurs sont responsables de la mise en place de l'inflammation et de la lésion d'eczéma (étape 6) qui va être résolue lors de l'arrivée secondaire de LT CD4⁺ régulateurs sécrétant des cytokines anti-inflammatoires (étape 7).

D'après Saint-mezard et al., 2004.

4.1. La phase de sensibilisation

Cette phase apparaît lors du premier contact de la peau avec l'haptène. Elle mène à la génération d'une réponse primaire spécifique des lymphocytes T spécifiques de cet haptène, présents dans les ganglions lymphatiques drainant la peau. Deux propriétés sont nécessaires aux haptènes pour induire la sensibilisation cutanée :

- une **propriété d'interaction** avec les protéines de la peau dans le but de former un complexe antigénique,



- une **propriété pro-inflammatoire** qui va délivrer des signaux permettant d'activer l'immunité innée de la peau.

Ces signaux sont appelés « signaux de danger », selon la théorie évoquée par Polly Matzinger (1992). Ce sont des structures moléculaires présentées sur les pathogènes ou des molécules produites par les cellules épithéliales suite à l'intrusion de xénobiotiques dans l'organisme. Ces structures seront reconnues par des récepteurs extracellulaires et intracellulaires, les PRR, du système de défense inné.

4.1.1. Activation des cellules présentatrices d'antigène par l'haptène

Les KCs étant abondamment présents dans la peau, ce sont les premières cellules qui rencontrent l'haptène. Ils sont considérés comme indispensables dans la phase de sensibilisation pour plusieurs raisons :

- ils contiennent des **enzymes** avec une activité métabolique requise pour la conversion des pro-haptènes en haptènes biologiquement actifs, telles que le cytochrome P450. Ces haptènes vont interagir avec les protéines pour former le complexe antigénique.
- ils expriment des **facteurs chimiotactiques** après exposition aux molécules allergisantes, incluant des chimiokines telles que CXCL9, CXCL10 et CXCL11. Ces chimiokines permettent d'attirer les cellules immunitaires, telles que les LCs (Van der Veen *et al.*, 2011).

Selon la théorie évoquée par Polly Matzinger (1992), les DC ont besoin non seulement de l'haptène, mais également de recevoir des « signaux de danger » exogènes ou endogènes afin d'être complètement matures et de pouvoir activer de manière efficace les LTs. Dans le cas où l'haptène est une molécule oxydante, le signal de danger correspondra aux EROs (Heil and Land, 2014).

Les LCs et les DDCs sont dotées de prolongements cytoplasmiques qui facilitent leur rencontre avec le complexe antigénique. Elles résident dans l'épiderme et le derme en tant que DCs relativement immatures, caractérisées par une haute capacité de capture de l'Ag (Streilein and Grammer, 1989). L'Ag est capturé *via* le processus d'internalisation. Il en existe différents types, selon la taille des xénobiotiques (Kumari *et al.*, 2010):



- la **phagocytose**, qui permet l'internalisation de particules de taille supérieure à 10 μm (Groves *et al.*, 2008),
- la **macropinocytose** qui permet l'internalisation des molécules de taille comprise entre 0,2 et 10 μm (Kerr and Teasdale, 2009),
- l'**endocytose** concerne les particules de taille inférieure à 500 nm (Donaldson *et al.*, 2010).

Ces mécanismes consistent en la formation de replis membranaires qui s'intègrent dans le cytoplasme sous forme de petites vésicules. Les DCs peuvent absorber l'équivalent de leur volume en l'espace d'une heure. Les KCs sont également capables de capturer des Ag, seules les DCs peuvent assurer leur transport jusqu'aux ganglions lymphatiques afin de les présenter aux LT naïfs et induire une réponse immunitaire primaire, ce sont des cellules présentatrices d'Ag professionnelles (Nestle *et al.*, 2009) (**Figure 25**).

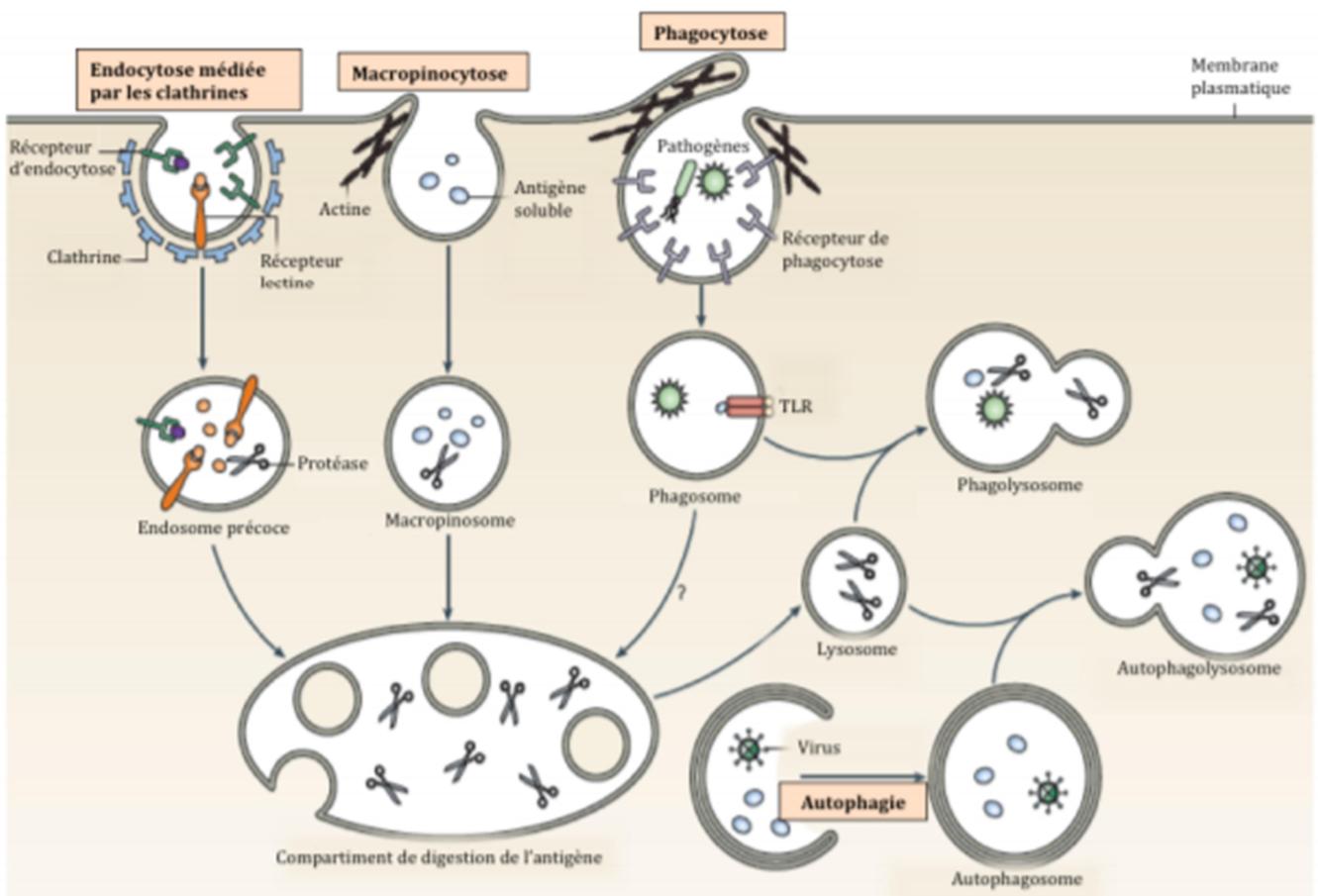


Figure 25. Voies d'internalisation de l'antigène et association aux molécules du CMH de classe II
D'après Roche and Furuta (2015).



4.1.2. Migration des cellules présentatrices d'antigène

Les DCs vont migrer à travers l'épiderme et le derme vers le système lymphatique proximal (Randolph *et al.*, 2005). Cette mobilisation est déclenchée principalement par deux cytokines : le TNF- α et l'IL-1 β (Cumberbatch *et al.*, 1997; Nedoszytko *et al.*, 2014). Elles participent à la diminution de l'expression de l'E-cadhérine à la surface des LCs, une molécule d'adhésion qui permet leur interaction avec les KCs et donc leur rétention dans l'épiderme (Tang *et al.*, 1993). Les DCs vont devenir matures et acquérir leur fonction de cellule présentatrice d'Ag. Les LCs vont donc se détacher de l'épiderme et traverser la jonction dermo-épidermique, par le biais de l'expression d'enzymes protéolytiques MMP-2 et MMP-9 qui permettent la dégradation du collagène (Ratzinger *et al.*, 2002). Cette étape est dépendante de l'axe CXCL-12-CXCR-4 : CXCL-12 est exprimé sur les fibroblastes du derme et va interagir avec CXCR-4, exprimé sur la DC (Ouwehand *et al.*, 2008). Les DCs vont ensuite exprimer le CCR-7, récepteur des chimiokines CCL-19 et CCL-21 (Jiang *et al.*, 2007). CCL-21 est exprimé par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques et CCL-19 par les zones T des ganglions drainant la peau. Ces deux chimiokines concourent donc à attirer les DCs au niveau des ganglions lymphatiques où elles vont pouvoir interagir avec des LT naïfs. Une fois dans les vaisseaux lymphatiques, les DCs sont transportées par le flux de lymphe afférente et arrivent au niveau du sinus sous-capsulaire du ganglion lymphatique. A l'intérieur du ganglion, leur localisation sera déterminée par deux gradients distincts de chimiokines : CXCL-13, synthétisée par les DCs folliculaires, oriente les DCs vers les follicules B, tandis que les fibroblastes réticulaires sécrètent CCL-19/CCL-21 orientant les DCs vers le paracortex riche en LT (**Figure 26**) (Förster *et al.*, 2012).

Des modifications phénotypiques s'opèrent également au cours de la migration des cellules présentatrices d'Ag. Elles perdent leur caractère de capture de l'Ag et acquièrent la capacité de stimuler les LTs naïfs.



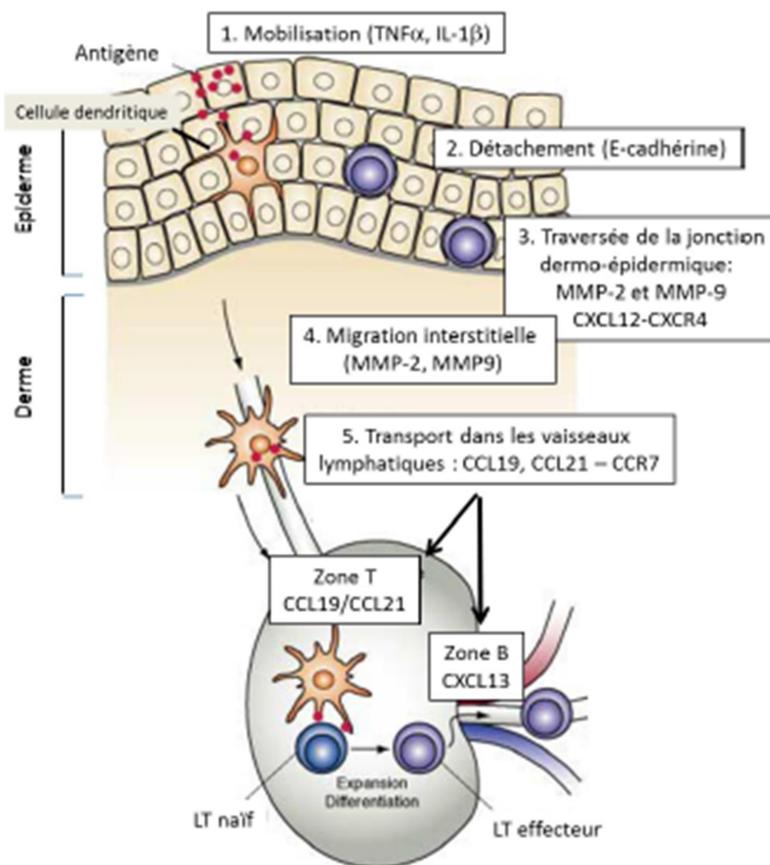


Figure 26. Les étapes clé de la migration des DCs vers les ganglions lymphatiques

D'après la thèse de B. Todorova, 2014.

4.1.3. Présentation antigénique et expansion clonale

Après avoir rejoint les ganglions lymphatiques drainant la peau, les DCs vont pouvoir interagir avec les LTs *via* leur CMH (Martins and Reis, 2011). Mais pour induire l'activation des LTs, l'interaction entre le CMH et le TCR est insuffisante. Les cellules présentatrices d'Ags doivent également fournir des signaux de co-stimulation et sécréter des cytokines nécessaires à la différenciation des LT naïfs en LTs effecteurs ou en LTs mémoires. C'est une synapse immunologique qui se crée entre les DCs et les LTs (**Figure 27**). De façon autocrine, les DCs vont activer les LTs naïfs, qui vont produire plusieurs cytokines, dont l'IL-2, qui est un puissant facteur de croissance (Gómez *et al.*, 1998). Les LTs vont proliférer selon un processus appelé l'expansion clonale. Cette expansion permet la formation d'un grand nombre de LTs spécifiques de l'haptène. Des ganglions lymphatiques, les LTs spécifiques de l'haptène vont rejoindre la circulation sanguine en exprimant le cutaneous lymphocyte-associated antigen, qui va leur permettre de rejoindre le



lieu de l'inflammation cutanée.

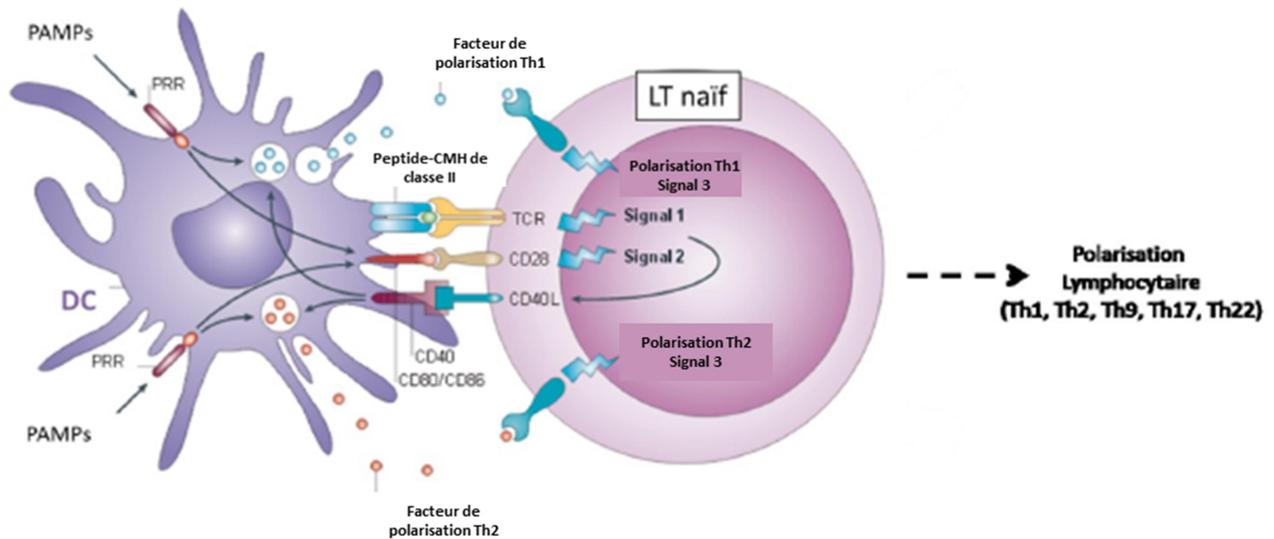


Figure 27. La synapse immunologique entre DC et LT
D'après Kapsenberg, 2003.

4.2. La phase d'élicitation

Une fois sensibilisés, les individus peuvent développer une DAC après réexposition à l'allergène de contact. Ce contact induit une réaction inflammatoire qui dure au maximum 2 à 3 jours et qui disparaît s'il n'y a pas de nouveau contact. Les haptènes diffusent dans la peau et sont pris en charge par les KCs qui vont capturer l'Ag et exprimer le CMH de classe I ou de classe II, ainsi que des molécules de co-stimulation telles que le CD80. Les lymphocytes T spécifiques sont activés dans l'épiderme et le derme et ciblent une réponse inflammatoire responsable des lésions cutanées (Albanesi, 2010; Nestle *et al.*, 2009).

Cette phase d'élicitation, ou phase efférente, se déroule en trois étapes :

- le **recrutement précoce des LT CD8⁺** effecteurs activés au cours de la sensibilisation environ 2h après réexposition à l'haptène, *via* l'activation de l'endothélium suite à l'inflammation cutanée induite par l'haptène,
- la **production subséquente de cytokines/chimiokines** qui conduit à l'activation des cellules résidentes de la peau, engendrant la libération de nouveaux médiateurs de la réaction inflammatoire tels que l'IFN- γ ,



- le **recrutement des leucocytes**, et tout particulièrement des polynucléaires neutrophiles et des macrophages, qui induisent progressivement les changements cliniques et morphologiques caractéristiques de l'EAC (Vocanson et al., 2009).

La réponse inflammatoire atteint son maximum 24 h à 48 h après la réexposition à l'haptène. Dans les heures qui suivent l'exposition cutanée à un haptène et la libération d'interleukines pro-inflammatoires induite par l'haptène, les kératinocytes produisent des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF- β (Cavani *et al.*, 2007). La résolution de la phase inflammatoire est également médiée par le recrutement de différentes cellules telles que les LTs régulateurs CD4⁺. A l'état d'homéostasie et en l'absence d'Ag exogène, les LCs induisent la prolifération de Treg CD4⁺, maintenant ainsi une tolérance immunitaire cutanée (Seneschal *et al.*, 2009).

5. Les méthodes de détection des sensibilisants potentiels

Une fois la substance sensibilisante identifiée, le patient doit éviter d'être en contact avec la molécule. Un traitement symptomatique est également prescrit, à savoir des corticoïdes par voie topique.

Dans le but de minimiser les risques liés à l'allergie de contact, il est crucial de pouvoir déterminer avec précision le potentiel allergisant des substances chimiques avant leur commercialisation. En ce sens, de nombreuses méthodes qualitatives et quantitatives ont déjà été validées.

5.1. Historique des tests et évolution

Après avoir gradué les souffrances subies par les animaux en expérimentation dans les laboratoires anglais, Russell et Burch (1959) ont développé un programme de mise en place et de développement de lignes directrices dites "humaines", appelé la "règle des 3 R" et comprenant les points suivants :

- **reduce** (réduire) le nombre d'animaux en expérimentation,
- **refine** (raffiner) la méthodologie utilisée,
- **replace** (remplacer) les modèles animaux.

Ce concept a été progressivement adopté, notamment en 1986 lorsque la première loi de



protection des animaux pour l'expérimentation fut appliquée.

Suite à cela, l'évaluation du potentiel sensibilisant des molécules chimiques fut réalisée par le **local lymph node assay** (LLNA), décrit dans la ligne directrice 429 de l'OCDE. Le LLNA est une méthode alternative aux traditionnels tests réalisés sur le cochon d'Inde (à savoir les tests de Buehler et le test de maximisation) puisqu'il a permis de réduire de 40% le nombre d'animaux et élimine leur stress et leur souffrance (Corsini *et al.*, 2014). Ce test a été développé dans les années 90 par Kimber et Basketter (2002) et permet de mesurer la prolifération lymphocytaire après application cutanée d'une substance chimique sur l'oreille d'une souris. Toute substance capable de provoquer une prolifération de lymphocytes trois fois supérieure au témoin sera considérée comme sensibilisante. La concentration à laquelle le produit est utilisé pour induire cette prolifération lymphocytaire est appelé « EC3 ». Il est alors possible de catégoriser les composés en fonction de leur valeur d'EC3 et plus cette valeur est faible, plus le composé est sensibilisant.

5.2. Description de « l'Adverse Outcome Pathway »

En 2004, l'union européenne a banni la vente des produits cosmétiques dont les formulations finales ont été testées sur les animaux. Le 13 mars 2013, le 7^{ème} amendement de la directive cosmétique européenne interdit la mise sur le marché des ingrédients cosmétiques ayant été testés sur les animaux (Clouet *et al.*, 2017). Plusieurs méthodes qui n'utilisent pas les animaux ont été développées pour prédire le potentiel sensibilisant des substances chimiques, notamment en mesurant l'impact de ces produits sur les étapes clés de la DAC. Un rapport de l'OCDE appelé « the adverse outcome pathway (AOP) for skin sensitization initiated by covalent binding to proteins » (OECD, 2012) décrit les principales étapes de la phase de sensibilisation de la DAC et les tests *in vitro* associés, à savoir (**Figure 28**) :

- **la pénétration de la molécule sensibilisante** dans la peau. Il est donc nécessaire d'étudier sa structure chimique et ses propriétés électrophiles en amont. Plusieurs méthodes *in silico* sont disponibles pour étudier la biodisponibilité et le métabolisme d'une molécule : des bases de données (Benezra *et al.*, 1985), des logiciels informatiques tels que DEREK (Ridings *et al.*, 1996) et TOPKAT (Enslein *et al.*, 1997) et des méthodes quantitatives basées sur la relation structure-activité (QSARs, Quantitative Structure-Activity Relationships) (Roberts *et al.*, 1991).



- **l'interaction de l'haptène avec les protéines** dans le but de former un complexe antigénique. C'est l'étape moléculaire initiatrice. Des méthodes *in chemico* ont été développées pour étudier l'interaction covalente entre l'haptène et les protéines cellulaires telles que le direct peptide reactivity assay (DPRA) (Gerberick *et al.*, 2004) et le peroxydase peptide reactivity assay (PPRA), le PPRA permettant l'évaluation du pouvoir sensibilisant des pré et des pro-haptènes (Gerberick *et al.*, 2009).
- **la réponse des types cellulaires** jouant un rôle clé dans la phase de sensibilisation de la DAC, à savoir les KCs et les DCs. L'activation des KCs peut se mesurer par des méthodes *in vitro* qui sont le KeratinoSens (Natsch and Emter, 2016) et le SENS-IS. L'activation des DCs peut se mesurer par les tests h-CLAT (human cell line activation test) (Nukada *et al.*, 2011) et MUSST (Myeloid Y-937 Skin Sensitization Test) (Python *et al.*, 2007).
- la dernière étape concerne **la réponse de l'organe** et donc la prolifération lymphocytaire dans les ganglions lymphatiques. A ce jour aucun test *in vitro* n'a été validé pour le mesurer.

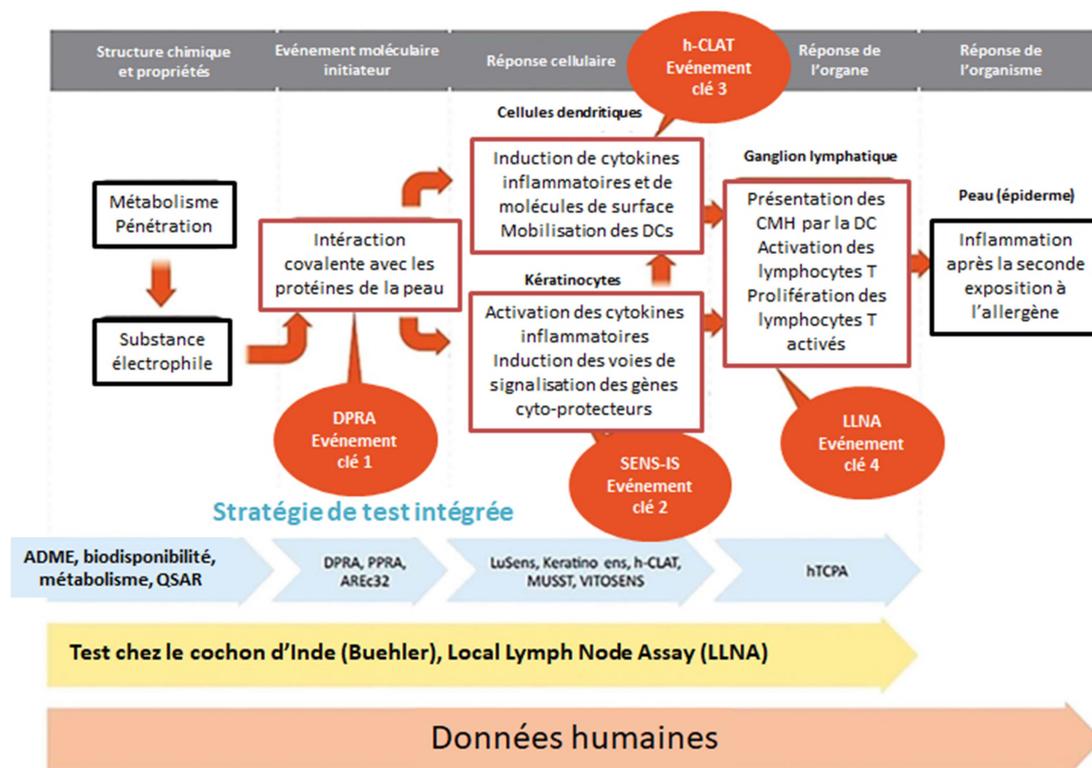


Figure 28. Représentation schématique de l'AOP pour la sensibilisation cutanée et la nécessité de suivre la stratégie de test intégrée depuis l'interdiction du LLNA pour couvrir les événements clés

D'après Clouet et al., 2017.



5.3. Les modèles validés et en cours de validation pour mesurer le potentiel sensibilisant des molécules

5.3.1. Le DPRA

Le DPRA est un test *in chemico* réalisé dans le but de mesurer la réactivité des substances chimiques potentiellement allergisantes (European Commission, 2013). Ce test a été validé par l'ECVAM en 2013 et il a été répertorié auprès de l'OCDE (442C). Le but est de mesurer la dépletion de peptides synthétiques contenant à la fois des cystéines et des lysines après 24 heures d'incubation avec la substance à tester. La dépletion du peptide dans la solution est mesurée par HPLC en utilisant une détection par les UVs. Les données de dépletion sont ensuite interprétées en utilisant un modèle de classification développé sur la base de substances chimiques avec des propriétés de réactivité connues, dans laquelle les produits sont classés en ayant une réactivité minimale, faible, moyenne ou haute. Les substances ayant une réactivité faible à forte sont classées comme ayant un potentiel sensibilisant. Le DPRA ne permet pas l'évaluation des pro et des pré-haptènes, qui requièrent une activation préalable avant leur interaction avec les protéines, contrairement au PPRA.

5.3.2. Le h-CLAT

Le h-CLAT est un test *in vitro* qui permet de discriminer les molécules sensibilisantes de celles qui ne le sont pas, en mesurant l'activation des DCs en réponse à une substance chimique. Il a été développé par Kao corporation et Shiseido (Japon) et a été validé par l'ECVAM en 2015 (European Commission, 2015). Ce test est répertorié par l'OCDE (442E). La lignée THP-1 est utilisée dans ce modèle, il s'agit d'une lignée pro-monocytaire qui joue le rôle de substitut des DCs. Les cellules sont stimulées 24h avec des substances chimiques à huit concentrations différentes, basées sur une CV75 pré déterminée avec de l'iodure de propidium (c'est à dire une concentration induisant 75% de survie cellulaire). L'activation des THP-1 est déterminée en mesurant l'expression du CD86, une molécule de co-stimulation et le CD54, une molécule d'adhésion, par cytométrie en flux. Une molécule est considérée comme sensibilisante si l'intensité relative de fluorescence (RFI) de CD86 et ou/ CD54 dépasse un certain seuil : ≥ 150 pour CD54 et ≥ 200 pour CD86.

5.3.3. Le KeratinoSens

Le KeratinoSens est un test *in vitro* de sensibilisation cutanée qui a été développé par



Givaudan et a été validé par l'ECVAM en 2012 (European Commission, 2014). Ce test est répertorié par l'OCDE (442D). C'est un test qui repose sur le facteur de transcription Nrf2, qui induit l'activation de gène codant pour des protéines cyto-protectrices (principalement des enzymes de phase II) à la suite d'un stress oxydant ou électrophile. Une lignée cellulaire immortalisée et adhérente, dérivée d'un clone de KCs humains HaCaT est transfectée avec un plasmide. Le plasmide contient un gène de luciférase sous le contrôle transcriptionnel du promoteur SV40. Ce promoteur est fusionné avec une séquence antioxidant response element (ARE) à partir du gène AKR1C2. Ce gène a été identifié comme l'un des gènes activé par les sensibilisants dans les DCs. Ceci permet de faire une mesure quantitative (par détection de luminescence) de l'induction d'un gène de luciférase, en tant qu'indicateur de l'activité de Nrf2 dans les cellules suivant l'exposition à une substance chimique. La substance est classée comme allergisante si elle induit significativement le gène de la luciférase.

5.3.4. Le SENS-IS, un test in vitro non validé d'intérêt pour la voie Nrf2/Keap1

Le SENS-IS est un test permettant de discriminer les molécules irritantes, sensibilisantes et non sensibilisantes en analysant l'expression d'un panel de 65 gènes groupés en un ensemble pour l'irritation (IRR) et en deux ensembles (SENS-IS et ARE) pour la sensibilisation (Cottrez *et al.*, 2016). Une substance est classée comme sensibilisante en fonction du nombre de gènes surexprimés en comparaison au contrôle, mesurés par RT-qPCR, après 15 minutes d'exposition sur du tissu Episkin. Ce test a été soumis à l'ECVAM en 2011 mais n'est pas encore approuvé.



Partie III : Stress oxydant et voie Nrf2/Keap1



1. Les radicaux libres et leur origine

Un radical libre est une espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons libres non appariés sur sa couche périphérique. Cet électron célibataire peut être situé sur un atome d'oxygène, on parle alors d'EROs ou sur un atome d'azote, on parle alors d'**espèce réactive de l'azote** (ERA) (Delattre *et al.*, 2005).

Les EROs peuvent avoir différentes structures dont les formules sont rassemblées dans le **tableau 5**.

Tableau 5. Nature des différentes espèces radicalaires impliquées dans le stress oxydant. R désigne un substrat organique

*Le radical perhydroxyle est la forme acide conjuguée (forme protonnée) du radical superoxyde.
D'après Delattre *et al.*, 2005

| Les radicaux libres du stress oxydant |
|--|
| $O_2^{\bullet -}$ = radical superoxyde |
| HO_2^{\bullet} = radical perhydroxyle* |
| $^{\bullet}OH$ = radical hydroxyle |
| RO_2^{\bullet} = radical peroxyde |
| RO^{\bullet} = radical alkoxyde |

Ces espèces peuvent être générées en très faible quantité au cours du métabolisme de l'oxygène. 85% de l'oxygène est métabolisé au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Figure 29**). La chaîne respiratoire correspond à une chaîne de complexes protéiques présents au sein de la membrane interne de la mitochondrie et responsables de la formation d'ATP à partir du NADH et du $FADH_2$ produits lors des différentes voies cataboliques de l'organisme (Gautheron, 1984). Cette production d'énergie est permise grâce à la formation d'un gradient électrochimique de proton dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie, lui-même formé par l'énergie des électrons provenant du NADH et du $FADH_2$. Les électrons riches en énergie récupérés seront transportés successivement via les différents complexes :

- Le complexe I a une action NADH coenzyme Q réductase, récupérant les électrons du NADH et permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.



- Le complexe II a une action succinate coenzyme Q réductase et récupère les électrons du FADH_2 .
- Le complexe III a une action Coenzyme Q cytochrome C réductase et permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.
- Le complexe IV a une action cytochrome C oxydase et permet le transport de 2 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.
- Le coenzyme Q (ou ubiquinone) permet la transition entre le complexe I ou II et le complexe III.
- Le cytochrome C permet la transition entre le complexe III et le complexe IV.

Suite à la chaîne de complexe protéique, le dernier accepteur d'électron est l'oxygène qui sera ainsi à l'origine de la formation de molécule d'eau. Le NADH permettra donc le transport de 10 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire, tandis que le FADH_2 de seulement 6. Ceux-ci repasseront vers la matrice mitochondriale via une pompe à proton que l'on appelle également ATP-synthétase et qui sera à l'origine de la formation d'ATP.

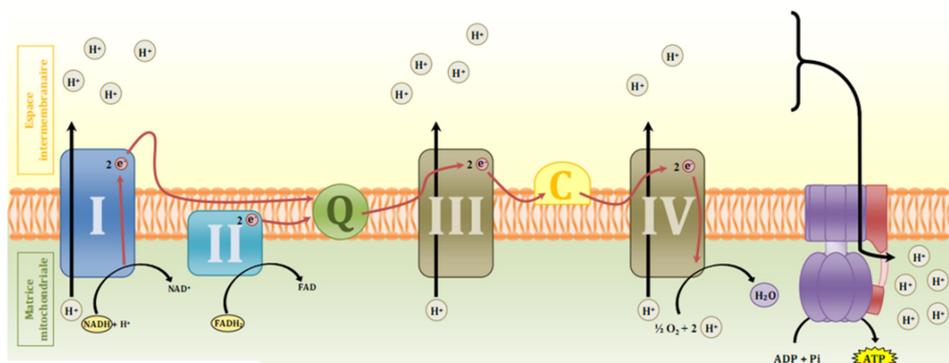
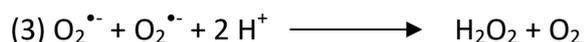


Figure 29. Schéma simplifié représentant les mécanismes de la chaîne respiratoire et de la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative
D'après Garrett, 2000.

Au cours de la chaîne respiratoire mitochondriale, se produit la réduction complète de l' O_2 , conduisant à la formation d'eau (**réaction 1**). Mais cette réaction ne peut s'effectuer que par plusieurs étapes successives. Environ 2% de l'oxygène consommé au niveau mitochondrial est transformé en radicaux superoxydes, qui sont des intermédiaires partiellement réduits (**réaction 2**). Les radicaux superoxydes étant des espèces potentiellement toxiques, les superoxydes



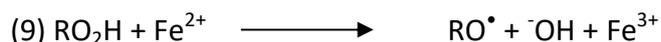
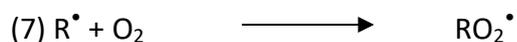
dismutases catalysent leur dismutation (**réaction 3**) (Nimse and Pal, 2015; Migdal and Serres, 2011).



Le peroxyde d'hydrogène a tout ses électrons appariés, mais il est tout de même toxique car des réactions de type « réaction de Fenton » se produisent en présence de cations métalliques comme Fe^{2+} ou Cu^+ (**réaction 4**). Au cours de cette réaction, le peroxyde d'hydrogène donne naissance à des radicaux hydroxyles $\bullet\text{OH}$ qui sont les espèces radicalaires les plus délétères. Sa dismutation est assurée par la catalase (**réaction 5**) et sa réaction avec le glutathion est catalysée par la glutathion peroxydase (**réaction 6**). Le glutathion est un tripeptide soufré (GSH) et sa forme réduite est nommée GSSG.



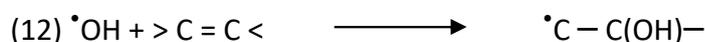
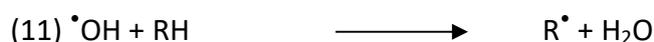
Il existe d'autres EROs telles que les radicaux peroxydes RO_2^{\bullet} formés par attachement de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le carbone (symbolisés par R^{\bullet}) (**réaction 7**), les hydroperoxydes RO_2H provenant de l'oxydation d'un substrat RH (**réaction 8**) ainsi que les radicaux alkoxydes RO^{\bullet} issus de la décomposition des hydroperoxydes (RO_2H) par des cations métalliques (**réaction 9**).



1.1. Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$ est un oxydant puissant et il peut oxyder un substrat selon trois modes d'action différents (Delattre *et al.*, 2005) :

- arrachement d'un électron (**réaction 10**)
- arrachement d'un atome d'hydrogène sur un substrat organique RH (**réaction 11**)
- addition sur une double liaison (**réaction 12**)



Les deux dernières réactions conduisent à la formation de radicaux centrés sur le carbone, qui peuvent s'effectuer sur des bases azotées de l'ADN ou sur des acides gras. Par exemple :

- le radical hydroxyle peut s'ajouter sur une base purique de l'ADN, la guanine, d'une part sur la double liaison située sur les carbones C4 et C5 (voie 1, 60%) et d'autre part sur la double liaison située entre l'azote N7 et le carbone C8 (voie 2, 40%). Ces deux voies conduisent à la formation de deux radicaux distincts, respectivement centrés sur le carbone (radical R1) et sur l'azote (radical R2). Le radical R2 donne naissance à la 8-oxo-guanine qui est l'un des principaux marqueurs du stress oxydant dans l'ADN (**Figure 30**).

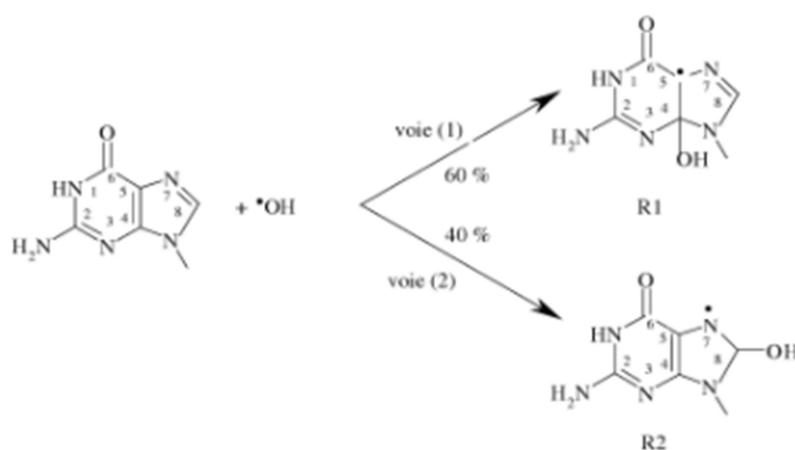


Figure 30. Réaction des radicaux hydroxyles avec la guanine, par addition sur les doubles liaisons
D'après Delattre *et al.*, 2005.



- le radical hydroxyle peut également s'ajouter sur l'acide linoléique, un acide gras polyinsaturé à longue chaîne qui entre dans la composition des phospholipides membranaires. Le radical hydroxyle arrache l'atome d'hydrogène en position bis-allylique, en donnant naissance à un radical centré sur le carbone L[•]. Celui-ci, en raison de la délocalisation de l'électron célibataire, génère deux autres radicaux L[•] centrés sur le carbone. Ces derniers sont susceptibles de réagir très rapidement avec l'oxygène pour former des radicaux peroxydes de type LO₂[•], eux-mêmes à l'origine de phénomènes de peroxydation lipidique (**Figure 31**).

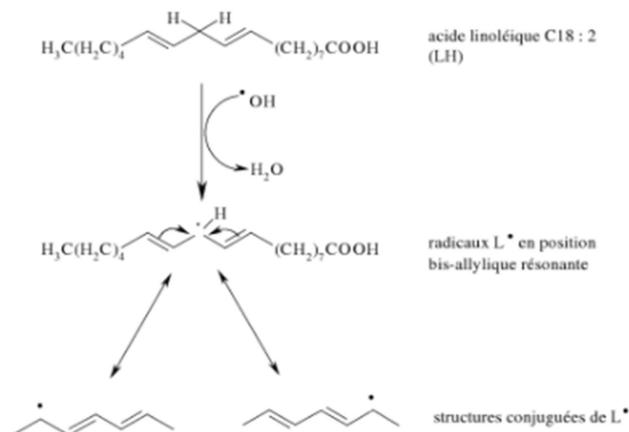


Figure 31. Action des radicaux hydroxyles sur l'acide linoléique, par arrachement d'un atome d'hydrogène

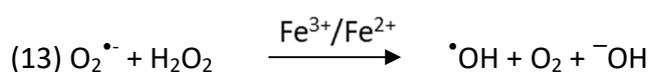
D'après Delattre et al., 2005.

- les acides aminés constitutifs des protéines sont très sensibles à l'attaque des radicaux hydroxyles. Ces derniers peuvent oxyder aussi bien les acides aminés aromatiques qu'aliphatiques. Dans le cas des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane), les radicaux [•]OH réagissent principalement en s'additionnant sur les doubles liaisons des cycles aromatiques, tandis que dans le cas des acides aminés aliphatiques (glycine, alanine, valine, isoleucine et leucine) ils réagissent essentiellement par abstraction d'atome d'hydrogène, en donnant naissance à des fonctions carbonyles (> C = O), en présence d'oxygène. Ces dernières sont généralement accompagnées de fragments peptidiques carbonylés. Dans le cas des enzymes, les radicaux hydroxyles sont susceptibles d'inactiver, ou du moins en partie, le site actif. Celui-ci, généralement enfoui à « l'intérieur » de la protéine, est en effet protégé de l'attaque des radicaux hydroxyles qui ne réagissent directement qu'avec les acides aminés de la « surface » protéique.



1.2. Le radical superoxyde

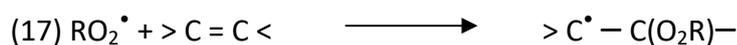
Les radicaux superoxydes $O_2^{\bullet-}$ ont une réactivité assez faible vis-à-vis des substrats bio-organiques. Ils réagissent tout de même avec le cytochrome c, l'ascorbate et les superoxydes dismutases dont $O_2^{\bullet-}$ est le substrat. Les radicaux superoxydes peuvent générer des espèces secondaires qui sont plus dommageables, à partir de la réduction du peroxyde d'hydrogène (**réaction 13**). C'est la réaction de Haber-Weiss qui nécessite la présence de cations métalliques, comme le fer, qui jouent le rôle de catalyseurs. Elle apparaît comme la somme des **réactions 14 et 15** (Bito and Nishigori, 2012; Delattre *et al.*, 2005).



1.3. Le radical peroxyde

Les radicaux peroxydes sont des radicaux secondaires issus de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le carbone R^{\bullet} (**réaction 7**). Ils sont généralement issus de l'action de radicaux hydroxydes sur les substrats biologiques (Nimse and Pal, 2015; Delattre *et al.*, 2005).

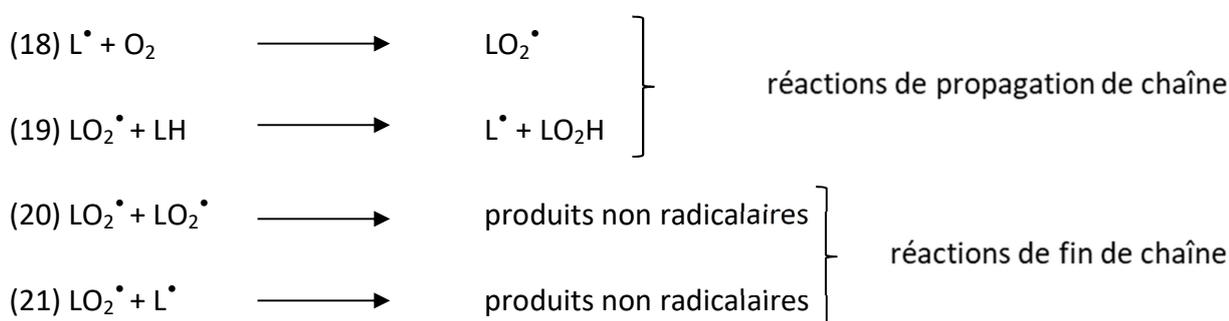
Les radicaux peroxydes sont des oxydants qui peuvent s'additionner sur les doubles liaisons (réaction intramoléculaire) (**réaction 16**), ou intermoléculaire, avec formation d'endoperoxydes radicalaires ROOR (**réaction 17**).



Les radicaux peroxydes peuvent initier des réactions en chaîne pouvant mener à la dégradation des membranes cellulaires sous l'effet de la peroxydation lipidique. Les radicaux L^{\bullet} (centrés sur le carbone) sont formés lors de l'attaque des radicaux hydroxydes sur les acides gras polyinsaturés. En présence de dioxygène, ces radicaux sont transformés en radicaux peroxydes LO_2^{\bullet} (**réaction 18**). Ils peuvent alors arracher un atome d'hydrogène d'une autre molécule d'acide gras proche de la

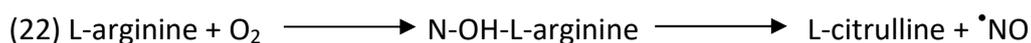


première, comme dans la bicouche lipidique, de telle sorte qu'il y a de nouvelle formation de radicaux L[•] (**réaction 19**). Ce processus amplifie notablement le phénomène de peroxydation initié par les radicaux hydroxyles. Les réactions 18 et 19 peuvent se produire jusqu'à épuisement des acides gras ou de l'oxygène. Les réactions en chaîne sont stoppées lorsque deux radicaux se rencontrent (**réactions biradicalaires 20 et 21**). Outre les hydroperoxydes LO₂H (**réaction 19**), de nombreux autres produits de peroxydation tels que des époxydes, des endoperoxydes, des alcools, des aldéhydes, des cétones peuvent apparaître et modifier considérablement l'intégrité et les fonctions membranaires.

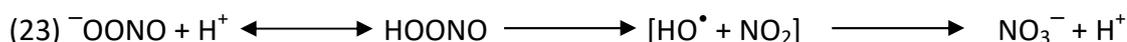


1.4. Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote radicalaire est synthétisé à partir d'un atome d'azote du radical guanidium de la L-arginine et d'une molécule d'oxygène (**réaction 22**) (Kalyanaraman *et al.*, 2012; Delattre *et al.*, 2005).



Ses effets régulateurs s'exercent sur la plupart des grandes fonctions physiologiques de l'organisme telles que le tonus vasculaire et les phénomènes de neurotransmission. Il exerce des effets protecteurs vis-à-vis du stress oxydant en limitant la peroxydation lipidique. Cependant, le [•]NO en forte concentration peut être une cause majeure de souffrance cellulaire. Dans cette situation, le [•]NO interagit avec l'O₂^{•-} pour former le peroxytrinitrate (OONO⁻). Après protonation, le [•]NO est rapidement transformé en nitrate (**réaction 23**).



La formation de peroxytrinitrate conduit à la perte de réactivité du [•]NO mais à l'oxydation de molécules, telles que les acides aminés. L'un des produits les plus stables est la nitrotyrosine.



La présence de $\cdot\text{NO}$ conduit à la S-nitrosylation du glutathion réduit intracellulaire. Ce dernier étant majoritairement converti en glutathion oxydé, la cellule perd une grande partie de sa capacité de défense contre les EROs.

Pour empêcher les effets délétères des EROs et des ERAs, des systèmes moléculaires susceptibles de limiter leurs effets existent. Ce sont des antioxydants endogènes ou exogènes.

2. Les molécules anti-oxydantes

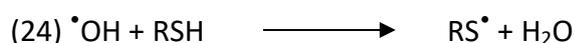
2.1. Les antioxydants non enzymatiques

Des molécules vont réagir avec les radicaux libres oxygénés. Elles apparaissent comme des « capteurs » de radicaux libres, susceptibles de se substituer aux cibles biologiques vis-à-vis de l'attaque radicalaire, afin de protéger ces dernières. Les capteurs de radicaux libres oxygénés sont généralement des espèces réductrices, c'est-à-dire qu'elles vont donner des électrons ou des atomes d'hydrogène. C'est le cas des alcools, des thiols et des phénols (Delattre *et al.*, 2005).

2.1.1. Les thiols

Les thiols (symbolisés ici par RSH) ont des propriétés réductrices intéressantes :

- ils réagissent avec les radicaux hydroxyles (**réaction 24**) ;
- ils ont la capacité de « réparer » les radicaux centrés sur le carbone (**réaction 25**), ils s'opposent à l'oxygène qui réagit très rapidement avec les radicaux centrés sur le carbone pour générer des radicaux centrés sur le soufre ($\text{RS}\cdot$, radicaux thiyles).



Un thiol biologique ubiquitaire dans le milieu intracellulaire, le **glutathion**, peut jouer ces deux rôles et par conséquent, il est l'un des protecteurs endogènes les plus performants (**Figure 32**) (Forman *et al.*, 2010).



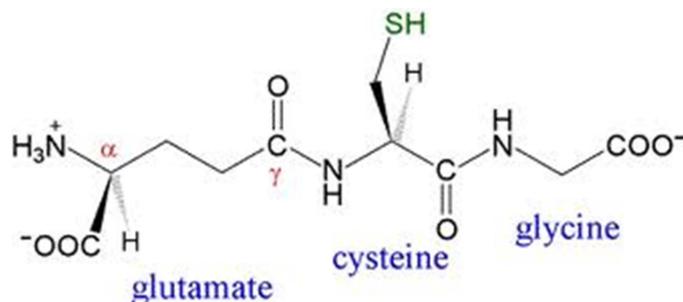


Figure 32. Molécule de glutathion

Les radicaux centrés sur le soufre (RS^\bullet , radicaux thiyles), formés lors des réactions 24 et 25, ne sont pas inactifs et peuvent donner naissance à de nouveaux radicaux libres, centrés sur le carbone comme $RSSR^{\bullet-}$ ou centrés sur l'oxygène comme RSO_2^\bullet et RSO^\bullet (Becker *et al.*, 1994). L'effet protecteur des thiols est donc limité puisqu'il entraîne des effets secondaires *via* diverses formes radicalaires.

L'oxydation des groupements thiols des protéines à la surface cellulaire entraîne une diminution du ratio GSH/GSSG et est une cible biologique pour la mesure de la maturation des cellules dendritiques (Kagatani *et al.*, 2010; Hirota *et al.*, 2010).

2.1.2. Les antioxydants d'origine alimentaire

L'**ascorbate** est la forme déprotonée de l'acide ascorbique, ou vitamine C, à pH physiologique. C'est un antioxydant non enzymatique d'origine alimentaire très performant. Il a la capacité d'être recyclé et cela lui confère la possibilité de jouer le rôle d'antioxydant à plusieurs reprises. Il possède la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes.

L'ascorbate, symbolisé par $AsCH^-$, est oxydé en radicaux ascorbyles Asc^- qui sont très peu réactifs vis-à-vis de l'oxygène et des substrats bio-organiques (**réaction 26**). Le recyclage de l'ascorbate semble être assuré, en partie, par dismutation des radicaux ascorbyles, qui conduit à la formation, outre de l'ascorbate, du déhydroascorbate (forme oxydée à deux électrons).



Il existe d'autres antioxydants alimentaires comme la vitamine E, le tocophérol. L' **α -tocophérol** est connu pour piéger les radicaux peroxydes et alkoxydes en interceptant les réactions de propagation en chaîne des lipides. Le produit d'oxydation du tocophérol est le radical tocophéroxyloxy. Dans les



systèmes cellulaires et lipidiques, quand l'acide ascorbique ou l'ubiquinol sont présents, le radical tocophéroxyl est rapidement réduit et le tocophérol est régénéré (**réactions 27 et 28**) (Bisby and Parker, 1995).



2.1.3. L'acide urique

L'acide urique est le produit issu de la dégradation des nucléosides de purine et de bases libres. Il est formé suite à l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine par la xanthine oxydase. Il s'agit d'un composé organique hétérocyclique qui est majoritairement ionisé dans les conditions physiologiques, sous la forme d'urate (UrH_2^-) (**Figure 33**).

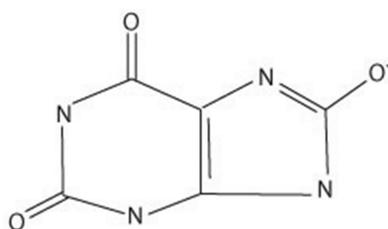
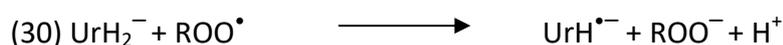
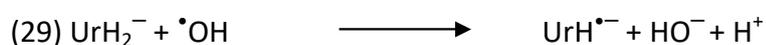
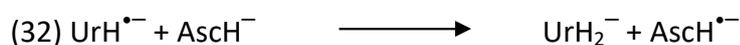


Figure 33. Structure de l'ion urate

L'acide urique est un puissant piègeur de radicaux hydroxyles, peroxydes et nitrites (**réactions 29, 30 et 31**) (Ames et al., 1981; Kellogg and Fridovich, 1977; Sautin and Johnson, 2010) en produisant le radical $\text{UrH}^{\bullet-}$ qui est relativement stable en raison de la délocalisation des électrons dans le noyau purine.



L'ion urate peut être ensuite régénéré suite à la réduction du radical $\text{UrH}^{\bullet-}$ par l'ascorbate AscH^- , ce qui limite ainsi l'action du radical urate avec d'autres cibles (**réaction 32**).



2.2. Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques convertissent des produits d'oxydation potentiellement délétères en peroxyde d'hydrogène puis en eau. Le processus est constitué de plusieurs étapes en présence de co-facteurs comme le cuivre, la manganèse et le fer (Nimse and Pal, 2015).

2.2.1. La superoxyde dismutase

Les superoxydes dismutases ont pour substrat le radical superoxyde et catalysent leur dismutation en peroxyde d'hydrogène (réaction 3). Il existe trois isoformes chez l'homme :

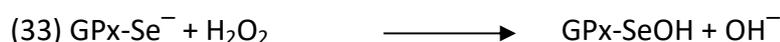
- une isoforme située dans le cytoplasme, nucléaire et membrane mitochondriale, et nucléaire avec des ions Cu^{2+} et Zn^{2+} en tant que co-facteurs associés (Cu/Zn-SOD ou SOD1),
- une isoforme située dans la matrice mitochondriale avec des ions Mn^{3+} en tant que co-facteurs associés (Mn-SOD ou SOD2),
- une isoforme située dans la MEC, à la surface des cellules et dans les fluides extracellulaires (EC-SOD ou SOD3) (Fukai and Ushio-fukai, 2011).

Le peroxyde d'hydrogène produit pourra être pris en charge par des enzymes à activité peroxydase, comme la catalase et la glutathion peroxydase.

2.2.2. Glutathion peroxydase et glutathion réductase

Les glutathion peroxydases comprennent 8 isoformes qui jouent un rôle important dans la détoxification des hydroperoxydes. Le site catalytique des isoformes 1, 2, 3, 4 et 6 contient une sélénocystéine (Sec) alors que le site catalytique de leurs congénères 5, 7 et 8 contient uniquement une cystéine (Brigelius-flohé and Maiorino, 2013).

Les glutathion peroxydases permettent la réduction des peroxydes en eau. Le selenol (-SeH) dans les SecGPxs réagit sous la forme de selenolate avec le peroxyde d'hydrogène pour devenir un acide selenenique (-SeOH) (**réaction 33**). Cet acide retourne sous sa forme réduite -SeH grâce à 2 GSH qui jouent le rôle de substrats réducteurs, ce qui forme du GSSG et de l'eau (**réaction 34 et 35**), la glutathion peroxydase étant nommée GPx).





Le GSSG oxydé va être recyclé dans son état réduit GSH par la glutathion réductase. La glutathion réductase est une oxydoréductase qui contient un domaine auquel le FAD peut se lier et un domaine auquel la forme réduite NADPH peut se lier (Couto *et al.*, 2016). On la trouve dans les régions à haut flux d'électrons, à savoir le cytoplasme, le noyau et les mitochondries. La glutathion réductase joue un rôle important en catalysant les formes oxydées du glutathion en forme réduite en une réaction médiée par le NADPH (Ithayaraja, 2011) (**Figure 34**).

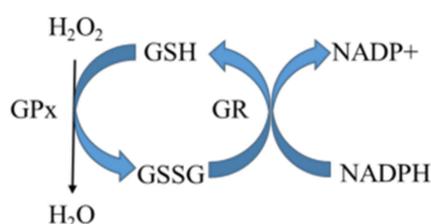


Figure 34. Transformation du peroxyde d'hydrogène en eau via la glutathion peroxydase et recyclage du GSH par la glutathion réductase

GPx : Glutathion peroxydase ; GR : Glutathion réductase

D'après Ithayaraja, 2011

2.2.3. La catalase

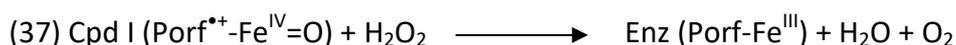
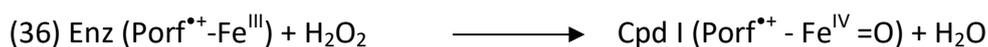
La catalase est une enzyme clé dans le métabolisme du peroxyde d'hydrogène et des ERAs et se situe dans les peroxysomes. Elle contient quatre sous-unités identiques. Chacune de ses sous-unités contient quatre domaines distincts et un groupement hème (Putnam *et al.*, 2000; Nagem *et al.*, 1999). Les quatre domaines contiennent :

- un domaine N-terminal qui contient une histidine distale essentielle pour la réaction de la catalase,
- un domaine contenant huit feuillets β anti-parallèles avec une insertion de six hélices α , ce qui confère un noyau hydrophobe nécessaire pour la structure tridimensionnelle de l'enzyme,
- un domaine de connexion avec une tyrosine résiduelle qui se lie au groupement hème,
- des domaines en hélice α qui sont importants pour la liaison avec le cofacteur NADPH.

La catalase permet la dismutation du peroxyde d'hydrogène (réaction 5). Cette réaction enzymatique se déroule en plusieurs étapes. Le groupement hème de la catalase est d'abord



oxydé par le peroxyde d'hydrogène, ce qui mène à la formation d'un ion intermédiaire ferrique hypervalent, connu sous le nom de composé I (Cpd I) (**réaction 36**). Cpd I est constitué d'une porphyrine qui joue le rôle de co-facteur. Le Cpd I retourne ensuite à son état réduit par une deuxième molécule de peroxyde d'hydrogène pour générer de l'eau et du dioxygène dans une réaction redox impliquant deux électrons (**réaction 37**) (Glorieux and Calderon, 2017).



2.2.4. Les peroxyrédoxines

Les peroxyrédoxines sont une famille ubiquitaire d'enzymes peroxydases qui dépendent de la cystéine, qui ne requièrent pas de cofacteur spécial pour leur activité enzymatique. Elles jouent un rôle prédominant dans la régulation du niveau de peroxydes dans la cellule. Durant leur cycle catalytique, une cystéine peroxydatique thiolate (Cp-S^-) attaque le substrat hydroperoxyde et est oxydée en acide sulfénique (Cp-SOH), puis en une sous unité disulfide avant d'être réduite (par un mélange disulfide et réducteur) pour reformer le thiolate (**Figure 35**) (Perkins *et al.*, 2015).

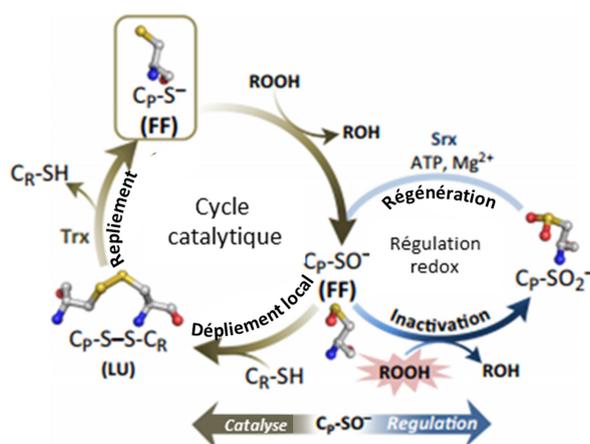


Figure 35. Les sites catalytiques et régulateurs de deux cystéines peroxyrédoxines

En brun se trouve le cycle normal de la peroxyrédoxine avec la structure des résidus de la cystéine peroxydatique (Cp) montré à chaque état redox (le carbone est en gris, l'azote en bleu, l'oxygène en rouge et le soufre en jaune, les hydrogènes ne sont pas représentés)

D'après Perkins *et al.*, 2015

Durant la catalyse, des changements conformationnels sont observés entre une conformation complètement repliée (FF) dans laquelle Cp peut réagir avec les peroxydes et une forme non



repliée (LU) dans laquelle Cp est exposée et peut former un pont disulfure avec une forme « résolvente » comprenant une cystéine présente dans de nombreuses formes de peroxyrédoxines. Dans les formes Cp-S⁻ et Cp-SOH, les conformations FF et LU s'équilibrent rapidement. Mais sous forme disulfure, les peroxyrédoxines se bloquent en conformation LU (**Figure 35**) (Ådén *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2011). La stabilisation de la conformation FF pourrait promouvoir une autre oxydation de Cp par des peroxydes en raison d'une opportunité de réagir avec une deuxième molécule de peroxyde dans le site actif. La forme Cp-SOH de ces peroxyrédoxines est fortement stabilisée en conformation FF ce qui forme une Cys sulfinate (Cys-SO₂⁻), rendant la peroxyrédoxine inactive (**Figure 35**, redox régénération). La protéine sulfiredoxine catalyse la régénération des peroxyrédoxines I, ce qui restaure leur activité (Perkins *et al.*, 2014).

Les peroxyrédoxines sont décrites comme ayant une activité catalytique 1000 fois plus lente que celle de la catalase et des glutathion peroxydases, mais la réduction du disulfure n'est pas limitante. Il existe six sous familles de peroxyrédoxines qui varient selon leur localisation dans la cellule. Les peroxyrédoxines I et II sont localisées dans le cytosol et le noyau, la peroxyrédoxine III est localisée dans la mitochondrie, la peroxyrédoxine IV dans le réticulum endoplasmique, la peroxyrédoxine V est localisée dans les péroxysomes, les mitochondries et le cytosol et la peroxyrédoxine VI est localisée dans le cytosol (Rhee *et al.*, 2012).

2.2.5. La Glutamylcystéine synthétase et la GSH synthase

La glutamylcystéine synthétase est une enzyme limitante qui joue un rôle clé dans la synthèse du GSH. Elle est composée de deux sous-unités, la glutamate-cystéine ligase catalytique et la glutamate-cystéine ligase régulatrice. Ce complexe permet la conjugaison de la cystéine et du glutamate, ce qui génère du γ -glutamylcystéine. La GSH synthase permet l'addition de la glycine ce qui permet la formation du GSH. La GSH exerce un rétrocontrôle négatif sur la glutamylcystéine synthétase (**Figure 36**) (Schulze *et al.*, 2009). Ces enzymes sont retrouvées dans le cytoplasme.



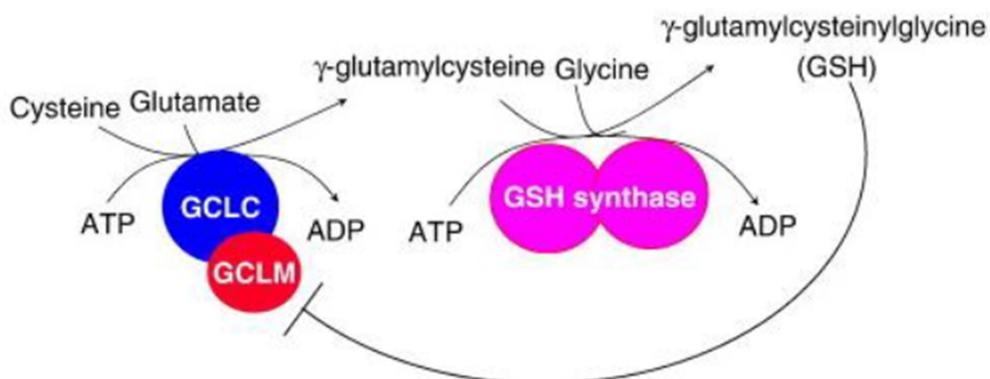


Figure 36. La synthèse du GSH

GCLC : Glutamate-cystéine ligase catalytique ; GCLM : Glutamate-cystéine ligase régulatrice
D'après Schulze *et al.*, 2009.

2.2.6. La NADP(H) : quinone oxydoréductase 1

La NADP(H) : quinone oxydoréductase 1 (NQO1) est une protéine homodimérique dépendante du FAD. Chaque monomère est constitué d'une molécule de FAD. Cette enzyme utilise les cofacteurs NADH ou NADPH en tant que donneurs d'électrons pour catalyser la réduction, obligatoirement à deux électrons, d'un large spectre de quinones (Iyanagi and Yamazaki, 1970). Le cofacteur et le substrat partageant le même site catalytique de l'enzyme. NQO1 est essentiellement localisée dans le cytosol mais a également été détecté en plus faible proportion dans le noyau. Cette enzyme permet la réduction des quinones et des nitroaromatiques. En faisant cela, NQO1 diverte les quinones électrophiles de leur participation à des réactions qui pourraient mener à des déplétions sulfhydryles ou à des réductions à un électron qui pourraient générer des semiquinones. De plus, les produits d'hydroquinones de la réaction avec NQO1 peuvent être métabolisés en conjugués glucuronide et sulfates, ce qui facilite leur élimination (Dinkova-Kostova and Talalay, 2010; Siegel *et al.*, 2012).

2.2.7. La hème oxygénase

La dégradation de l'hème est critique car celui-ci peut être toxique pour les cellules. Lorsque l'hème est complexé avec les protéines comme le cytochrome c ou le cytochrome P450, il est aménagé dans une poche hydrophobe et n'est pas dangereux (Wegiel *et al.*, 2014). Mais les hèmes libres peuvent entraîner des dommages oxydants car le fer se détache rapidement de



l'anneau porphyrine de l'hème. L'hème a été décrit comme induisant une oxydation des lipides dans une étude *in vitro* sur des cellules endothéliales (Balla *et al.*, 1991).

La hème oxygénase (HO) est une enzyme de choc thermique (heat shock protein) qui déclenche la dégradation de l'hème, en le convertissant en biliverdine (Wegiel *et al.*, 2014).

Il existe deux isoformes capables de convertir l'hème en biliverdine : HO-1 qui est induite par le stress oxydant et HO-2 qui est exprimée constitutivement dans de nombreux organes (Ewing and Maines, 1992). Lors de la catalyse, il y a libération de monoxyde de carbone, ce qui est permis grâce à une molécule du cofacteur NADPH. La conversion de la biliverdine en bilirubine nécessite également une molécule de NADPH. Les molécules de NADP⁺ ainsi formées vont pouvoir être utiles aux voies anaboliques telles que la voie des pentoses phosphates. HO-1 est un membre clé du métabolisme cellulaire et son activité peut influencer d'autres voies de signalisation dans lesquelles NADPH est impliqué, comme la synthèse des acides gras ou le métabolisme oxydant du cytochrome P450. Mais la dégradation du monoxyde de carbone, du fer et de la bilirubine influence également plusieurs processus cellulaires (**Figure 37**). (Wegiel *et al.*, 2014)

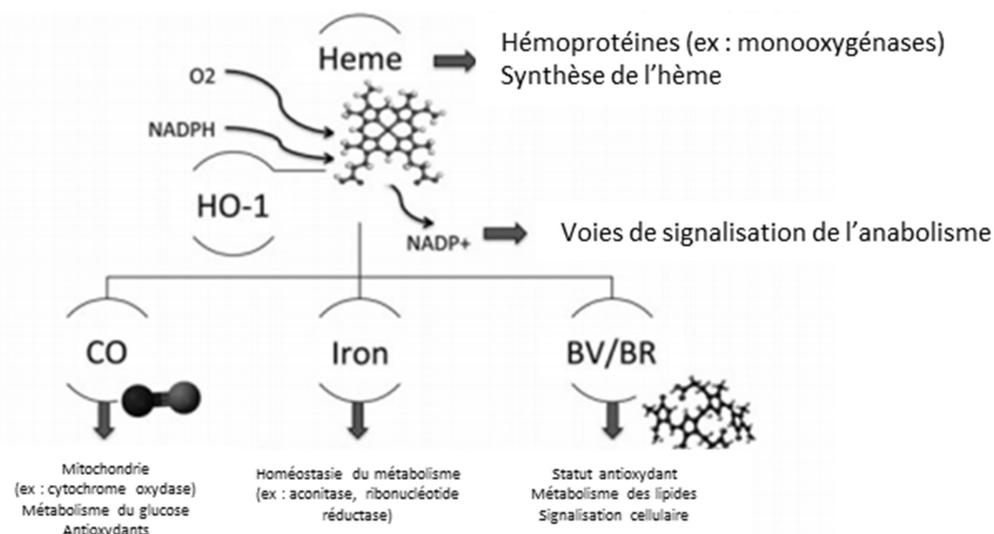


Figure 37. Cross-talk de la dégradation de l'hème et le métabolisme cellulaire

D'après Wegiel *et al.*, 2014



3. Nrf2 et peau

3.1. Peau et espèces réactives

Dans la peau saine, tous les types cellulaires produisent des EROs et des ERAs (Korkina and Pastore, 2009). Les mélanocytes et les KCs produisent du peroxyde d'hydrogène et des radicaux superoxydes par la réaction de la pheomélanine et des UVs (Pelle *et al.*, 2005). Les fibroblastes et les autres cellules produisent de larges quantités d'anions superoxydes en tant que produit dérivé de transfert d'électron dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Bazso-Dombi *et al.*, 2000).

Du fait de son exposition directe aux UVs et aux xénobiotiques, la peau est riche en systèmes antioxydants.

La couche cornée est la couche la plus exposée à l'oxygène moléculaire et aux irradiations UVs. Les lipides extracellulaires qui la composent sont protégés de l'oxydation par des antioxydants liposolubles tels que la vitamine E et l'ubiquinol (coenzyme Q10).

Dans les couches plus inférieures de l'épiderme se trouvent les KCs, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules immunitaires circulantes. Des antioxydants hydrosolubles sont présents dans le cytoplasme des cellules tels que l'acide ascorbique, le glutathion et l'acide urique (Thiele *et al.*, 2006).

Dans la couche basale de l'épiderme et dans le derme, il y a une abondance d'enzymes antioxydantes décrites dans le paragraphe précédent, telles que la catalase, la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et principalement la glutathion peroxydase 3 et les peroxyrédoxines. (Holley *et al.*, 2014). Il a été découvert que le rôle homéostatique de la superoxyde dismutase à travers la réponse des KCs aux Uvs est médié par le epidermal growth factor receptor (Packer and Valacchi, 2002). La superoxyde dismutase 3 est exprimée de façon prédominante dans la MEC, où elle se lie aux protéoglycanes d'héparine sulfate (Holley *et al.*, 2014).

Les fonctions métaboliques des cytochromes des cellules de la peau (KCs, fibroblastes et cellules dendritiques) contribuent à la génération des EROs à travers la réduction de l'oxygène moléculaire en anion radicalaire superoxyde. C'est le cas du CYP2E1, CYP2B1, CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A (West *et al.*, 2008).



Si un déséquilibre survient entre les systèmes oxydants et les capacités anti-oxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire, on parle de stress oxydant. (Barouki, 2006). Dans un premier temps, la cellule ne modifie pas ses propriétés biologiques mais si les EROs et les ERAs continuent à s'accumuler, des gènes codant des enzymes anti-oxydantes ou impliquées dans la réparation de l'ADN sont activés (Roussel *et al.*, 2005). La chaîne respiratoire, les cytochromes P450 et la NADPH oxydase peuvent être réprimés car ils sont susceptibles de libérer des EROs (Barouki and Morel, 2001). La cellule ayant adapté ses fonctions biologiques suite aux modifications de son environnement, on parle de stress. Si le stress est trop important, la cellule peut rentrer en apoptose.

3.2. La voie Nrf2/Keap1

Le facteur de transcription Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) est un indicateur de stress oxydant pour la cellule. Il s'agit d'un membre de la famille cap'n'collar, basic leucine zipper, qui inclue également p45NF-E2, Nrf1, Nrf3, BACH1 et BACH2 (Sykiotis and Bohmann, 2010). Nrf2 forme un dimère avec l'une des petites protéines Maf et se lie à des séquences antioxydantes ou électrophiles localisées dans les régions promotrices de gènes codant pour des protéines de défense cellulaire (**Tableau 6**). Ces séquences sont appelées antioxidant response element (ARE) et plusieurs centaines de gènes comprenant cette séquence promotrice ont été identifiés (Suzuki and Yamamoto, 2015).



Tableau 6. Liste non exhaustive des différentes protéines contrôlées pas Nrf2

| | | |
|--|---|----------------------------------|
| Enzymes qui contrôlent l'équilibre redox intracellulaire | Superoxyde dismutase (SOD 1, 2 et 3) | (Zhu <i>et al.</i> , 2005) |
| | Catalase | (Zhu <i>et al.</i> , 2005) |
| | Glutathion peroxydase (Gpx1, 2, 3 et 4) | (Banning <i>et al.</i> , 2005) |
| | Glutathion réductase | (Zhu <i>et al.</i> , 2005) |
| | Thiorédoxine (Trx) | (Zhang <i>et al.</i> , 2013) |
| | Thiorédoxine réductase (TrxR) | (Hintze <i>et al.</i> , 2003) |
| | Peroxyrédoxine (Prx 1 et 3) | (Chowdhury <i>et al.</i> , 2009) |
| | Glutamate cystéine ligase catalytique (GCLC) | (Yang <i>et al.</i> , 2005) |
| | Sulfirédoxine (Srxn) | (Bae <i>et al.</i> , 2009) |
| Enzymes de détoxification de phase II | Glutathion-S-transférase (GSTs, GSTA, GSTT, GSTP, GSTM et GSTO) | (Zhu <i>et al.</i> , 2005) |
| | UDP-glucoronyl transférase (UGT) | (Kalthoff <i>et al.</i> , 2010) |
| | Epoxyde hydrolase | (Lubet <i>et al.</i> , 2016) |
| | NADP(H) : quinone oxydoréductase 1 (NQO1) | (Zhu <i>et al.</i> , 2005) |
| Enzymes et protéines cytoprotectrices | Hemo oxygénase 1 (HO-1) | (Hintze <i>et al.</i> , 2003) |
| | Ferritine | (Pietsch <i>et al.</i> , 2003) |
| Transporteurs (contrôle de l'efflux des substances intracellulaires et xénobiotiques) | Multidrug resistance associated protein (MRP) | (Ji <i>et al.</i> , 2013) |
| Facteurs de transcription | MafF et MafG | (Toki <i>et al.</i> , 1997) |

Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap 1) est le répresseur cytosolique de Nrf2, il interagit avec l'un de ses domaines correspondant à un signal de sa dégradation, appelé Nrf2-ECH homology domain 2. Keap 1 interagit également avec la protéine Cullin 3 (Cul3) pour former un complexe ubiquitin E3 ligase qui entraîne l'ubiquitination de Nrf2 presque exclusivement (Suzuki and Yamamoto, 2017). Les résidus lysine (K) qui résident entre les deux motifs sont la cible de l'ubiquitination. En condition basale, il est lié à Nrf2 dans le cytoplasme et entraîne son ubiquitination et sa dégradation par la protéasome 26S.



L'homodimère de Keap1 se lie à une molécule de Nrf2 à deux endroits par le biais de motifs DLG (faible affinité) et ETGE (forte affinité). Les deux motifs se lient individuellement à une poche dans le domaine double glycine repeat and C-terminal (DC) de Keap1. Les activateurs de Nrf2 inactivent Keap1 *via* la modification des résidus de cystéine (Cys) et Nrf2 est stabilisé. Les nouvelles molécules de Nrf2 synthétisées transloquent dans le noyau. Nrf2 forme un hétérodimère avec les petites protéines Maf (sMaf) et active ses gènes cibles *via* les séquences ARE (**Figure 38**).

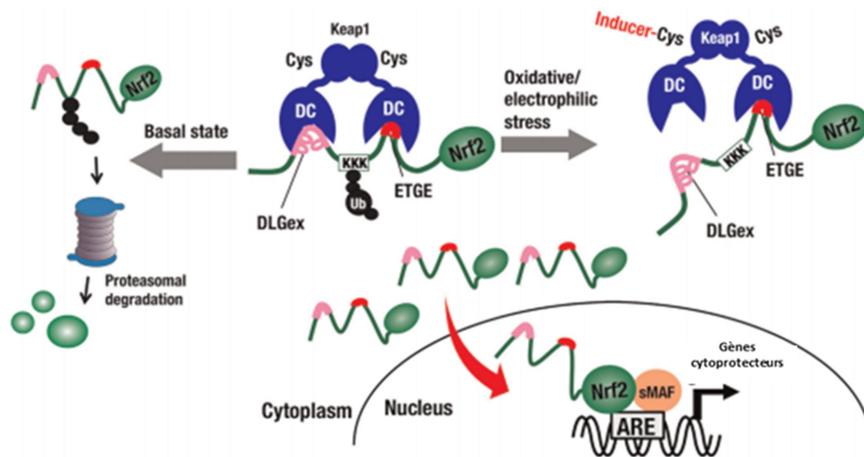


Figure 38. Interaction de Keap1 et Nrf2
D'après Suzuki and Yamamoto, 2017.

Dès le début de l'analyse de la voie de signalisation Nrf2/Keap1, ce système a été lié à un groupe d'inducteurs biologiques et il a été trouvé que la majorité des activateurs de Nrf2 étaient électrophiles et réagissaient avec les thiols nucléophiles, dont les groupes cystéine sulfhydryles. La modification des résidus de cystéine de Keap1 résulte en l'inhibition de son activité ubiquitine E3 ligase.

L'activité de Nrf2 est également contrôlée par phosphorylation. Nrf2 peut être phosphorylé par PERK, une des kinases contrôlant la réponse de stress de surcharge du réticulum, ou UPR (Unfolded Protein Response), ce qui entraîne son détachement de Keap1 (Cullinan and Diehl, 2004). Nrf2 peut également être phosphorylé en plusieurs résidus serine et thréonine par des kinases de la famille des MAP kinases : extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs), la c-jun N-terminal kinases (JNKs) et la p38 kinases (Sun *et al.*, 2009).



En plus de protéger du stress oxydant et des xénobiotiques, Nrf2 est également connu pour atténuer l'inflammation. Nrf2 se lie à une région promotrice proximale de gènes pro inflammatoires de cytokines, incluant l'il-6 et l'il-1 β et inhibe l'expression de leurs gènes. (Suzuki and Yamamoto, 2017).

3.3. Organisation de Nrf2 dans la peau

Nrf2 est exprimé dans tous les types cellulaires de la peau, avec une présence accrue dans les KCs (Schäfer *et al.*, 2012). Un gradient de l'expression de Nrf2 et son activité a été décrite dans des cellules normal human epidermal keratinocytes (NHEK) ayant subi une différenciation par prolongation de leur culture après confluence (Piao *et al.*, 2011). L'expression de NQO-1 est induite à un stade tardif de différenciation des NHEK (7 jours après la confluence des cellules), tandis que Nrf2 a été activé quelques jours avant (au bout de 3 jours). Les cellules des couches supérieures expriment davantage Nrf2 et ses gènes cibles que les cellules basales non différenciées (**Figure 39**). Le gradient de Nrf2 coïncide avec l'apoptose préférentielle des KCs des couches supérieures, en réponse à l'environnement et particulièrement aux irradiations UVs. La présence de Nrf2 est importante pour l'élimination des cellules endommagées ou mutées et la protection des KCs des couches supérieures de l'épiderme est cruciale pour l'intégrité de la peau (Schäfer and Werner, 2015).

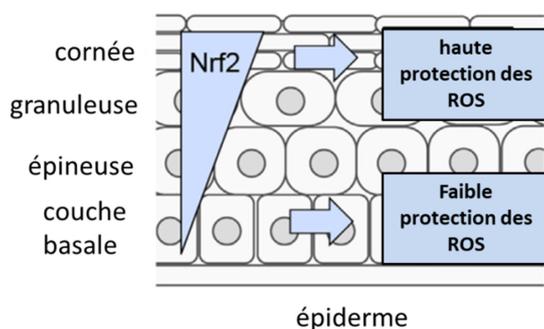


Figure 39. Nrf2 protège les kératinocytes des couches suprabasales des dommages générés par les ROS

L'expression et l'activité de Nrf2 augmente avec la différenciation des KCs.

D'après Schäfer and Werner, 2015.



3.4. Nrf2 et différenciation des kératinocytes

Des marquages en immunohistochimie ont montré que Nrf2 était détecté de façon uniforme dans l'épiderme humain et Keap 1 détecté de façon prédominante dans les couches basales et épineuses de l'épiderme (Natarajan *et al.*, 2010a). Une autre étude réalisée sur des NHEK a montré que la translocation de Nrf2 dans le noyau augmentait graduellement quand les NHEK se différenciaient.

Un modèle de cellules NHEK transduites par un adénovirus recombinant, exprimant Nrf2, a permis de montrer que Nrf2 régule les expressions de la loricrine et les kératines 10, protéines exprimées lors de la différenciation terminale de l'épiderme (Lee *et al.*, 2014). Lee *et al.* ont également montré que Nrf2 se fixerait à une séquence promotrice du gène codant la loricrine en régulant sa transcription. Ces résultats ont permis d'indiquer que Nrf2 est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des KCs en modulant l'expression de l'involucrine.

3.5. Nrf2, UVs et vieillissement

3.5.1. Nrf2 et UVs

Les radiations UVs sont composées des UVA, des UVB et des UVC, d'après la longueur d'onde des photons. Les UVA ont la longueur d'onde la plus longue (315-400 nm), les UVB ont une longueur d'onde intermédiaire (290-320 nm) et les UVC ont la longueur d'onde la plus courte (100-280 nm). La lumière ambiante est composée principalement des UVA (90-95%) et des UVB (5-10%), la plupart des UVC provenant du soleil sont retenus par la couche d'ozone (Amaro-Ortiz *et al.*, 2015). Les radiations UVs ont un effet mutagène responsable de pathologies de la peau, incluant des érythèmes, un vieillissement prématuré et des cancers. Nrf2 jouant un rôle dans la défense antioxydante, il a été étudié dans la photoprotection. Les UVA et les UVB augmentent tous deux le niveau d'EROs intracellulaires. Plusieurs laboratoires ont étudié l'activation de Nrf2 dans des modèles humains et murins. Ils peuvent être résumés dans le tableau suivant (**Tableau 7**).



Tableau 7. Régulation de Nrf2 par la lumière UV

D'après Schäfer and Werner, 2015.

| Espèce, type cellulaire et traitement | <i>In vitro/in vivo</i> | Dose UVA [J/cm ²] | Dose UVB [mJ/cm ²] | Activation de Nrf2 | Références |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------|------------------------------------|
| KCs | | | | | |
| UVB | | | | | |
| Souris | <i>In vitro</i> | | 0,75 | ↑ | (Kannan and Jaiswal, 2006) |
| | | | 2 | ↓ | Kannan and Jaiswal, 2006 |
| | | | 10-40 | → | (Durchdewald <i>et al.</i> , 2007) |
| | <i>In vivo</i> | | 100-300 | → | (Durchdewald <i>et al.</i> , 2007) |
| Homme | <i>In vitro</i> | | 10 | ↓ | (Kokot <i>et al.</i> , 2009) |
| UVA | | | | | |
| Souris | <i>In vitro</i> | 5-20 | | → | (Durchdewald <i>et al.</i> , 2007) |
| Homme | <i>In vitro</i> | 20 | | → | (Zhao <i>et al.</i> , 2013) |
| | | 22,5 | | ↑ | (Marrot <i>et al.</i> , 2007) |
| | | 40 | | ↗ | (Zhao <i>et al.</i> , 2013) |
| Lumière du soleil | | | | | |
| Homme | <i>In vitro</i> | 16,8 | 480 | ↗ | (Marrot <i>et al.</i> , 2007) |

| | | | | | |
|---------------------|-----------------|----|--------|---|-------------------------------|
| Fibroblastes | | | | | |
| UVB | | | | | |
| Souris | <i>In vitro</i> | | 15-200 | → | (Hirota <i>et al.</i> , 2005) |
| Homme | <i>In vitro</i> | | 0,75 | ↑ | (Kannan and Jaiswal, 2006) |
| | | | 2 | ↓ | (Kannan and Jaiswal, 2006) |
| UVA | | | | | |
| Souris | <i>In vitro</i> | 10 | | ↑ | (Hirota <i>et al.</i> , 2005) |
| Homme | <i>In vitro</i> | 25 | | ↑ | (Zhong <i>et al.</i> , 2010) |
| | | 40 | | ↑ | (Gruber <i>et al.</i> , 2010) |



L'irradiation de KCs humains avec 20 J/cm² d'UVA a montré peu d'effet sur l'expression des gènes médiés par Nrf2, tandis que 40 J/cm² était plus important. Une autre étude a également montré un effet positif des UVA sur l'activité de Nrf2. Des cellules NHEK ont été irradiées avec 22,5 J/cm² d'UVA qui ont induit une transcription des gènes cibles de Nrf2 (*nqo-1* et *gclc*). Une exposition avec la lumière du soleil, un mélange de 16,8 J/cm² d'UVA et de 480 mJ/cm² d'UVB) ont reflété un effet mineur sur l'activation de Nrf2. Ce résultat suggère que les irradiations des UVB ont un effet inhibiteur sur Nrf2. Ceci a été confirmé dans une étude *in vitro* avec des NHEK et des mélanocytes, mais aussi *ex vivo* avec des explants de peau, où une irradiation à une dose physiologique de 10 mJ/cm² d'UVB a réduit l'expression de Nrf2 et de ses gènes cibles (HO-1, GCLC et GST) (Kokot *et al.*, 2009).

Les UVA peuvent atteindre les fibroblastes car leur longueur d'onde est élevée, alors que les UVB sont absorbés par l'épiderme. Dans des fibroblastes humains primaires, l'irradiation avec 40 J/cm² d'UVA a induit la formation de phospholipides oxydés, qui ont permis l'activation de HO-1 (Gruber *et al.*, 2010).

Dans l'épiderme murin, l'apoptose des KCs induite par les UVB est plus importante dans les cellules de la couche basale. Pourtant, les UVs sont plus importants dans les couches supérieures, car les KCs les absorbent fortement (Anderson and Parrish, 1981). Par son rôle cytoprotecteur, Nrf2 est en partie responsable de l'apoptose moins importante dans les couches suprabasales (Schafer *et al.*, 2010). La protection des UVs médiée par Nrf2 se produit de façon paracrine : les KCs différenciés présentent une forte activité de Nrf2, ce qui leur permet de protéger les KCs des couches basales des dégâts que provoquent les UVs (**Figure 40**).



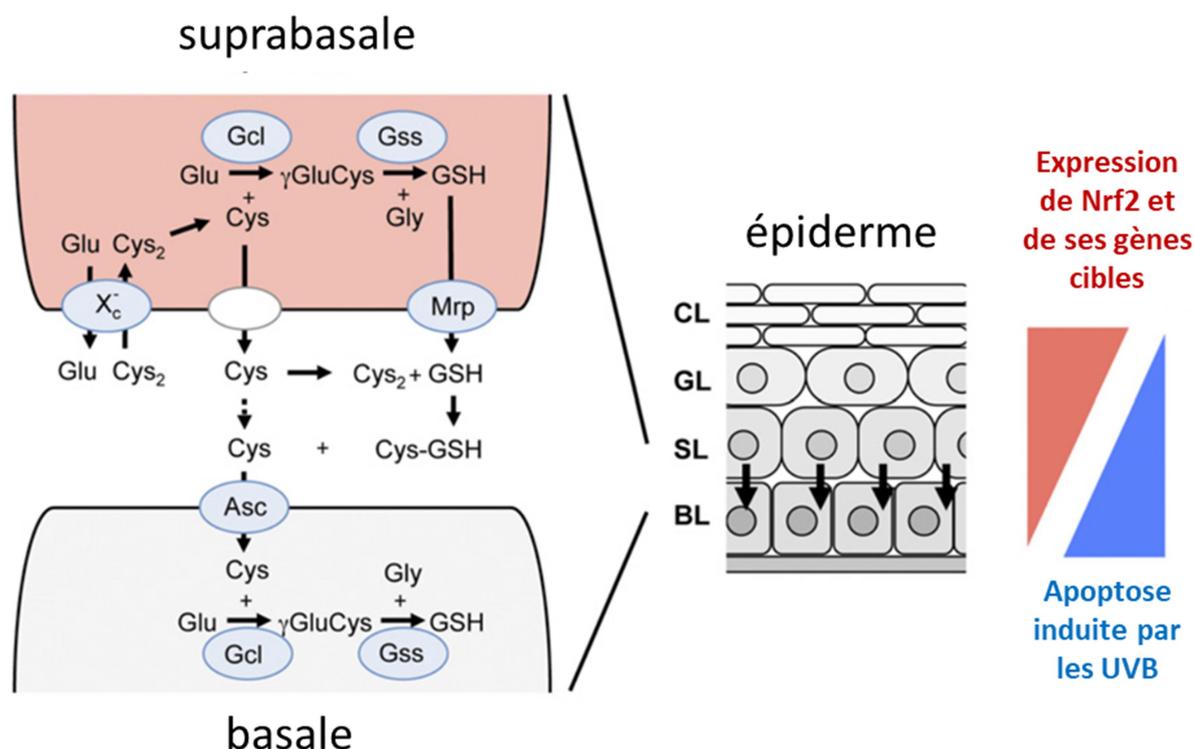


Figure 40. Modèle d'une protection des KCs des UVB médiée par Nrf2

Le schéma du milieu présente un épiderme murin avec la lame basale (BL), la couche épineuse (SL), la couche garnuleuse (GL) et la couche cornée (CL). Une protection paracrine des KCs basaux par les KCs des couches suprabasales est postulée dans l'épiderme, indiquée par des flèches. Le GSH est synthétisé par une réaction à deux étapes catalysée par la glutamate cysteine ligase (Gcl) et la glutathione synthetase (Gss). Le substrat limitant pour cette réaction est la cystéine (Cys). Les KCs des couches supérieures importent la cystéine extracellulaire (Cys₂) par le co-facteur X_c⁻. Cys₂ est ensuite réduit en cys. Le GSH et la cys sont exportés par les KCs des couches supérieures. Le GSH est exporté par des multidrug resistance proteins (Mrps). Le GSH extracellulaire subit une réaction avec échange de thiols avec cys₂ pour former la cys. La cys est importée dans les KCs des couches basales par l'importateur Asc et sert de substrat pour la synthèse de GSH.

D'après Schafer *et al.*, 2010.

Après une forte exposition aux UVB, comme c'est le cas dans les couches superficielles de l'épiderme, le niveau d'EROs et la déplétion du GSH augmentent et la protection paracrine des KCs est réduite. Cette protection réduite entraîne une apoptose des KCs de la couche basale. Grâce à l'apoptose, le risque de transformation maligne des cellules de la couche basale est limité. En revanche, les cellules des couches suprabasales, qui servent de maintien pour l'épiderme, sont préservées (Schäfer *et al.*, 2010).



3.5.2. Nrf2 et photo-vieillessement

Les EROs induits par les UVs entraînent des altérations de l'épiderme et du derme. La voie de signalisation nucleotide excision repair est impliquée dans la réparation des lésions provoquées par les UVs (Ichihashi *et al.*, 2003). La réparation par excision de nucléotides agit sur des lésions qui distordent de façon conséquente la double hélice d'ADN, comme les dimères de pyrimidines générés par les UV. Ce type de réparation est ubiquitaire et son efficacité diminue avec l'âge. Le stress oxydant active la sénescence cellulaire en ciblant cette voie de réparation des dommages cellulaires (Velarde *et al.*, 2012). La sénescence cellulaire est associée à une capacité réduite de division et de prolifération, parfois en conjonction avec un raccourcissement des télomères. Des KCs humains NHEK exposés au peroxyde d'hydrogène ont subi un raccourcissement de ces télomères, associé à une diminution de la prolifération et un élargissement cellulaire (Yokoo *et al.*, 2004).

Le rôle de Nrf2 a été étudié dans le cas du photo-vieillessement sur un modèle de souris déficiente en Nrf2 (Nrf2 ko). Ces souris irradiées aux UVB subissent un photo-vieillessement accéléré : la formation de rides épaisses a été observée (**Figure 41**), ainsi qu'une perte de la flexibilité de la peau et une plus grande épaisseur de l'épiderme (Hirota *et al.*, 2011). Une diminution du taux de GSH cutané a également été mesurée. Il semblerait donc que la voie de Nrf2/Keap1 joue un rôle dans la prévention du photo-vieillessement en maintenant un niveau élevé d'antioxydants, comme le GSH, dans la peau.

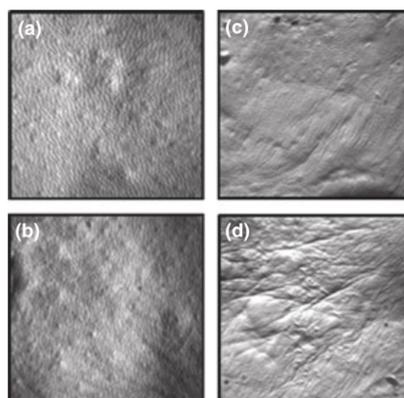


Figure 41. La formation de rides est augmentée chez les souris Nrf2 ko

Le dos préalablement rasé des souris a été exposé 3 fois aux UVB pendant 15 semaines, la dose d'UVb totale était de 6,39 J/cm². (a) souris wild type non irradiée, (b) souris Nrf2 ko non irradiée, (c) souris wild-type irradiée et (d) souris Nrf2 ko irradiée.



D'après Hirota *et al.*, 2011.

3.6. Nrf2 et polymorphisme

Les organes affectés par le polymorphisme de Nrf2 semblent être ceux qui sont en contact avec le stress lié à l'environnement. Il s'agit par exemple de la peau (Guan *et al.*, 2008), de l'intestin (Arisawa *et al.*, 2007, 2008) et des poumons (Calverley and Walker, 2003).

3.6.1. Polymorphisme et cancer

L'expression des protéines dépendantes de Nrf2 est cruciale pour éliminer les substances carcinogènes et maintenir l'homéostasie cellulaire. Nrf2 joue donc un rôle important dans la prévention du cancer (Lau, Nicole F Villeneuve, *et al.*, 2008; Iida *et al.*, 2004). Ainsi, certains laboratoires ont étudié les mutations de Nrf2 présentes sur des cellules cancéreuses. Un séquençage effectué sur plus d'une centaine de lignées cellulaires cancéreuses et de cellules primaires a permis de caractériser ces mutations.

Des mutations somatiques de Nrf2 ont été répertoriées sur l'un ou sur ses deux motifs terminaux, DLG et ETGE, qui permettent sa liaison à Keap1 (**Figure 42**). Une mutation sur le domaine de faible affinité de Nrf2, DLG, est suffisante pour permettre à Nrf2 d'échapper à sa dégradation par le protéasome 26S (Shibata *et al.*, 2008).

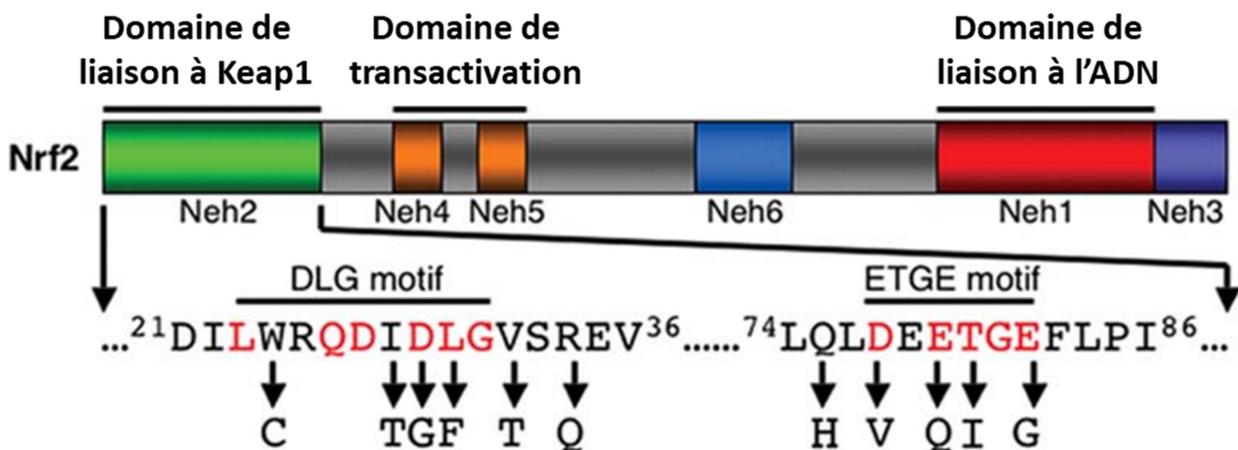


Figure 42. Les mutations de Nrf2 dans les cancers chez l'homme

D'après Shibata *et al.*, 2008.



Dans un cas de carcinome de cellules squameuses, une mutation de l'exon 2 qui inclut les séquences codant les motifs DLG et ETGE a été observée par PCR (Kim *et al.*, 2010). Après analyse de coupes de peau de patients atteints de carcinomes, il a été montré que 30% d'entre eux présentaient un défaut d'expression de GCLC et NQO-1. La prévalence des mutations de Nrf2 provoquant des cancers des cellules squameuses de la peau est estimée à 7% (Gęgotek and Skrzydlewska, 2015).

3.6.2. Polymorphisme et vitiligo

Le vitiligo vulgaris est un trouble de la pigmentation qui résulte de l'incapacité des mélanocytes à produire de la mélanine et/ou l'apoptose de ces cellules. Plusieurs régions du corps perdent progressivement leur pigmentation. Le stress oxydant a été mis en évidence dans cette pathologie, car une accumulation de peroxyde d'hydrogène a été mesurée dans l'épiderme de patients (Schallreuter *et al.*, 1999). C'est la présence de ce peroxyde d'hydrogène qui va entraîner l'apoptose des mélanocytes. Une diminution de la catalase a été observée dans des mélanocytes de patients atteints de vitiligo (Maresca *et al.*, 1997). Le rôle de Nrf2 dans la pathogénèse de cette maladie a été suggéré suite à une étude réalisée sur une population chinoise, qui indiquait que le polymorphisme de la région promotrice de Nrf2 était associé au développement de cette maladie (Guan *et al.*, 2008). Une étude réalisée sur 22 patients a montré que les peaux lésées avaient une expression plus faible de l'ARN messager codant pour Nrf2 par rapport aux peaux de volontaires sains (Amin *et al.*, 2013).

Cependant, des controverses existent concernant l'implication de Nrf2 dans le vitiligo, car une augmentation de l'expression de Nrf2 et ses gènes cibles *nqo1* et *gclc* a été observée sur des peaux lésées (Natarajan *et al.*, 2010b). Cela signifie que la réponse des protéines cytoprotectrices ciblées par Nrf2 est altérée. En cas de stress oxydant, l'activation de Nrf2 est défectueuse, ce qui aboutit à une apoptose des mélanocytes.

Le CinA pourrait avoir un potentiel thérapeutique pour le traitement du vitiligo et d'autres désordres causés par le stress oxydant, en tant qu'activateur de Nrf2 dans la lignée HaCaT (Uchi *et al.*, 2017).



3.7. Etude d'un gain de fonction de Nrf2 sur la peau

L'activation pharmacologique de Nrf2 est une approche prometteuse pour la prévention ou la thérapie de maladies de la peau. Il a été montré que les activateurs de Nrf2 protégeaient l'épiderme des dommages induits par les UVs (Dinkova-Kostova *et al.*, 2006). une accumulation de Nrf2 peut tout de même avoir des effets délétères : les souris déficiente en Keap1 ne sont pas viables à cause d'une hyperkératose de leur œsophage (Wakabayashi *et al.*, 2003).

3.7.1. Corrélation avec l'ichthyose lamellaire

Une activation de Nrf2 peut mener à de sévères anomalies de la peau, qui s'apparentent à celles des patients qui souffrent d'ichthyose (Hohl and Williams, 2011). Une étude sur la souris, dans un modèle présentant un gain de fonction de Nrf2 dans les KCs, a montré que ces anomalies reposent sur 3 critères :

- une achantose de l'épiderme provoquée par 4 à 7 couches basales et épineuses. Ceci est provoqué par une hyperprolifération des KCs, observé par un marquage au BrdU ;
- une hyperkératose massive et un élargissement des glandes sébacées sont observés après un marquage HE ;
- un léger érythème est observé, provoqué par une augmentation modérée des mastocytes et neutrophiles (Schäfer *et al.*, 2012).

Il a été récemment montré que Nrf2 avait une activité pro-inflammatoire et qu'il stimulait la prolifération des cellules épithéliales. L'un des mécanismes d'action sous-jacent pourrait être la cytokine IL-36 γ , qui a été décrite comme étant une nouvelle cible directe de Nrf2 dans les KCs, à la fois dans un modèle murin et dans la lignée cellulaire HaCaT (Kurinna *et al.*, 2016). L'activation de l'expression de l'IL-36 γ pourrait se produire après activation de Nrf2 par un xénobiotique dans l'épiderme (**Figure 43**). L'IL-36 γ stimule la prolifération des KCs de façon autocrine. L'IL-36 γ et l'IL-36 α permettent également aux fibroblastes d'induire l'expression de mitogènes de KCs tels que l'IL-6, ce qui est propice à la prolifération des KCs de façon paracrine.



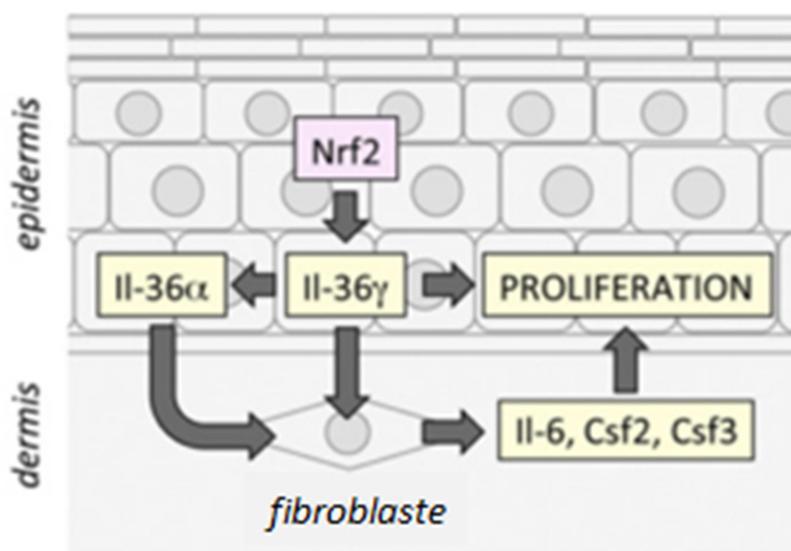


Figure 43. La régulation de l'IL-36 γ et de l'IL-36 α par Nrf2 dans les kératinocytes et leur effet sur la prolifération des kératinocytes

D'après Kurinna *et al.*, 2016.

3.7.2. Impact sur la fonction barrière et la différenciation de l'épiderme

L'hyperkératose est un mécanisme compensatoire d'un déséquilibre de la barrière épidermique, comme observé chez les patients avec de l'ichthyose (Proksch *et al.*, 2008). La mesure de la perte en eau (transepidermal water loss), a été réalisée sur le modèle murin. La peau du dos des souris dont les KCs sur-expriment Nrf2 a montré une perte en eau plus importante. En revanche, les marqueurs de différenciation tels que la loricrine, l'involucrine et la filaggrine ont une expression augmentée mais sont distribués de façon normale chez les souris dont les KCs présentent un gain de fonction de nrf2 (Schäfer *et al.*, 2012).

3.7.3. Nrf2 et keratines

Les souris dont les KCs présentent un gain de fonction de Nrf2 ont une distribution des kératines 10 et 14 similaire à celle des wild type (Schäfer *et al.*, 2012). Les kératines 10 sont caractéristiques des couches suprabasales alors que les kératines 14 sont exprimées dans les cellules non différenciées de la couche basale.

Les kératines 6, 16 et 17 ne sont exprimées que par les KCs des épithéliums hyperprolifératifs et lors de la cicatrisation cutanée (Paladini and Coulombe, 1998). Ces trois kératines ont été décrites



comme étant présentes dans les couches supérieures des épidermes psoriatiques (Leigh *et al.*, 1995). Le psoriasis est une pathologie de la peau, provoquée par une inflammation chronique, caractérisée par une hyperprolifération et une différenciation aberrante des KCs. Une étude sur des épidermes de patients atteints de psoriasis a été réalisée et les résultats d'immunohistochimie ont montré que leurs épidermes exprimaient davantage de Nrf2 que ceux des sujets sains (Yang *et al.*, 2017a). Nrf2 augmente l'expression des kératines 6, 16 et 17 dans les KCs primaires et les cellules de la lignée cellulaire HaCaT, en se liant à leur région promotrice.

3.8. Nrf2 et sensibilisation cutanée

Keap1 contient des résidus de cystéine hautement réactifs, notamment les cystéines 273 et 288 (Wakabayashi *et al.*, 2004). Des modifications covalentes des cystéines réactives de Keap1 par des molécules oxydantes ou électrophiles mène à sa dissociation de Nrf2, ce qui empêche sa dégradation. Nrf2 va s'accumuler dans le noyau et induire la transcription de ses gènes cibles (**Figure 44**). La réactivité d'une molécule sur les cystéines de Keap1 cible l'activation de Nrf2.

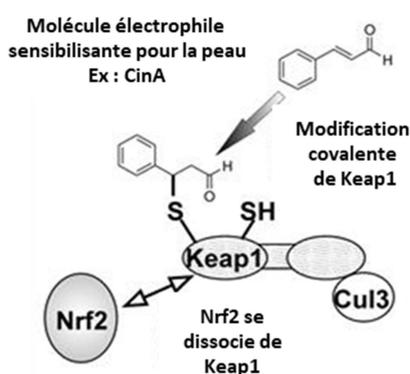


Figure 44. Keap1 est modifié de façon covalente par le cinnamaldehyde
D'après Natsch and Emter, 2008.

Comme évoqué dans le chapitre précédent, les fragrances peuvent posséder des fonctions électrophiles ou oxydantes et de ce fait activer la voie de signalisation Nrf2/Keap1. Des études *in vitro* sur la THP-1, lignée cellulaire utilisée en substitut des DCs, ont montré une activation de Nrf2 en réponse au CinA (Migdal *et al.*, 2013). Une activation de Nrf2 en réponse au CinA a également été décrite dans le modèle de monocyte derived dendritic cells (MoDC) et de bone marrow derived dendritic cells (BMDC) (El Ali *et al.*, 2017). 102 substances chimiques dont le potentiel sensibilisant pour la peau est connu, ont été testées sur la lignée cellulaire AREc32. Cette lignée



est dérivée de la lignée mammaire humaine MCF-7 qui contient un gène codant pour la luciférase dans les régions ARE. 83% des molécules décrites comme étant sensibilisantes ont effectivement induit l'activité de la luciférase, ce qui montre une haute spécificité du test (Natsch and Emter, 2008).

Une étude réalisée au laboratoire sur un modèle de souris déficiente en Nrf2 (Nrf2 ko) a identifié le rôle de Nrf2 dans la régulation de la DAC (El Ali *et al.*, 2013). Les souris Nrf2 ko exhibaient une réponse exacerbée de l'hypersensibilité de contact en réponse aux molécules sensibilisantes telles que le DNCB et le CinA, d'après des résultats du test LLNA et le mouse ear swelling test (MEST). De plus, les DCs dérivées de la moelle osseuse des souris Nrf2 ko ont montré une plus forte apoptose en réponse au DNCB et au CinA. La production d'espèces réactives était également plus élevée chez ces souris (El Ali *et al.*, 2017).



Objectifs





Le linalol et le limonène sont des terpènes insaturés qui sont abondamment présents dans les produits cosmétiques. Au contact de l'air, ils vont s'autoxyder pour former des hydroperoxydes allyliques, qui sont classés comme étant des allergisants forts d'après les résultats du test chez la souris, le LLNA. De par leur grande réactivité chimique, ces molécules peuvent induire un stress oxydant sur les cellules de la peau et activer le facteur de transcription Nrf2. Elles vont également former des adduits avec les protéines de la peau, qui vont être pris en charge par les DCs. Les DCs jouent un rôle primordial dans la génération d'une allergie de contact : elles vont migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques et activer les lymphocytes T. Contrairement à d'autres molécules allergisantes telles que le CinA, le mécanisme d'action des terpènes et des hydroperoxydes allyliques sur les DCs est peu décrit.

Dans ce contexte, mon premier objectif de thèse était d'étudier le mécanisme d'action de ces terpènes et leurs hydroperoxydes allyliques sur la lignée cellulaire THP-1, en tant que substitut aux DCs. Le rôle du facteur de transcription Nrf2 en réponse à ces produits a également été investigué.

Les KCs sont les premières cellules à être en contact avec les molécules allergisantes dans la peau, entraînant l'expression de facteurs chimioattractants qui attirent les DCs jusqu'au site d'exposition. L'un des tests *in vitro* de mesure du potentiel allergisant des molécules chimiques s'effectue sur une lignée de KCs : le KeratinoSens. Cependant, les modèles *in vitro* de culture en monocouche peuvent être critiqués, car des différences dans l'expression protéique et génique ont été observées entre les cellules en culture 2D et 3D. De plus, dans ce test *in vitro*, les molécules allergisantes sont utilisées à des concentrations subtoxiques, c'est-à-dire que la viabilité cellulaire est de 80 % après 24h d'exposition au produit. Or les consommateurs de produits cosmétiques sont exposés à de faibles concentrations de molécules allergisantes, mais plusieurs fois par jour ou par semaine.

Le deuxième objectif de ce travail a été d'étudier l'impact de l'exposition répétée d'une molécule allergisante, à faible concentration, sur la différenciation d'un épiderme en 3D.





Présentation du travail

Partie I





Les allergies et les irritations de la peau sont les problèmes les plus fréquents causés par les ingrédients parfumants. De nombreux terpènes odorants, présents dans les huiles essentielles végétales utilisées pour leur pouvoir parfumant dans les produits cosmétiques, tels que le limonène et le linalol, sont considérés comme des molécules allergisantes faibles pour la peau. Au contact de l'air, ces produits vont s'autoxyder pour former des diols, des époxydes et des hydroperoxydes allyliques. Les hydroperoxydes allyliques sont classés comme étant des sensibilisants forts d'après les résultats du Local Lymph Node Assay, test réalisé chez la souris. Cependant, le mécanisme d'action de leur effet sur le système immunitaire reste incertain.

Les DCs jouant un rôle clé dans la DAC, nous avons étudié leur activation par deux terpènes, le linalol (LINA) et le limonène (LIMO) et leurs hydroperoxydes allyliques respectifs (LINA-OOH, LIMO-OOH). Un mélange de deux isomères de LINA-OOH, avec la fonction hydroperoxyde sur les carbones 6 et 7 (LINA-OOH 6 + 7) et un isomère de LINA-OOH avec la fonction hydroperoxyde sur le carbone 7 (LINA-OOH 7) ont été utilisés. Nous avons utilisé la lignée THP-1, en substitut des DCs, car c'est la lignée actuellement utilisée dans le test *in vitro* validé h-CLAT (OCDE 442E). Les résultats nous indiquent que les hydroperoxydes de limonène et de linalol se comportent différemment.

Les terpènes et hydroperoxydes de linalol et de limonène oxydent les thiols de surface après 30 minutes d'exposition, mais seuls les hydroperoxydes maintiennent cette oxydation jusqu'à deux heures, alors qu'un recyclage plus rapide des thiols est observé après exposition aux terpènes. Le stress oxydant induit par le LINA-OOH est plus fort que celui observé après exposition au LIMO-OOH : la diminution du rapport GSH/GSSG est plus importante et il y a une production d'espèces réactives. Les espèces réactives ne sont mesurées qu'en réponse au LIMO-OOH. Contrairement au LINA, le LIMO induit une diminution du rapport GSH/GSSG.

Le LINA-OOH induit également une accumulation de Nrf2 plus importante en comparaison au LIMO-OOH. Cette accumulation est corrélée avec l'expression de trois des gènes cibles de Nrf2 : *ho-1*, *nqo-1* et *il-8*. Une faible accumulation de Nrf2 et une induction significative du gène cible *il-8* sont observées après exposition au LIMO-OOH. Aucun des terpènes n'a induit Nrf2 de façon significative.



Les protéines des voies de signalisation mitogen-activated protein kinase (MAPK) et nuclear factor-kappa B (NF- κ B), impliquées dans la maturation des DCs, sont phosphorylées en réponse au LINA-OOH mais pas au LINA. Les molécules LIMO et LIMO-OOH ont induit une faible augmentation de pJNK, pERK et pp65. Ils induisent également la phosphorylation de p38 mais avec une cinétique différente.

Enfin, le phénotype des THP-1 a été analysé après 24h d'exposition et les deux hydroperoxydes allyliques induisent une augmentation significative des marqueurs d'activation CD54 et CD86. Les terpènes n'induisent l'augmentation significative que de l'un des deux marqueurs.

En conclusion, nous avons pu mesurer des différences entre les hydroperoxydes de LIMO et de LINA. Ces différences peuvent s'expliquer par le mécanisme suspecté de ces produits avec les protéines de la peau, qui implique des radicaux libres. Les radicaux alkoxy ou peroxy peuvent mener à des cyclisations intramoléculaires, à des fragmentations ou à des abstractions hydrogène. Cela va entraîner la formation de radicaux centrés sur le carbone qui vont interagir avec les protéines de la peau pour former des adduits. Les possibilités de réarrangements radicalaires sont plus limitées dans le cas du LIMO-OOH que dans le cas du LINA-OOH, ce qui explique que le LINA-OOH soit une molécule allergisante plus puissante.

Le LIMO a induit la diminution du rapport GSH/GSSG ainsi que l'activation des MAPKs. Nous avons émis l'hypothèse que le LIMO pouvait agir en tant que pro-haptène et être métabolisé par les THP-1. Le produit de la métabolisation pourrait induire l'activation des MAPKs, mais une autre partie serait détoxiquée par les enzymes de phase II, ce qui explique que le LIMO induit seulement l'expression de CD54.



Résultats

Partie I





Article I

Fragrance allergens linalool and limonene allylic hydroperoxides in skin allergy: mechanisms of action focusing on transcription factor Nrf2

Toxicological Sciences, 29/09/17

Chloé Raffalli, Elodie Clouet, Salen Kuresepi, Marie-Hélène Damiens, Jean-Pierre Lepoittevin, Marc Pallardy, Pierre-Jacques Ferret, Elena Giménez-Arnau and Saadia Kerdine-Römer

La dermatite allergique de contact (DAC) est considérée comme la plus fréquente expression de l'immunotoxicité chez les hommes. De nombreux terpènes odorants utilisés de façon commune dans les compositions parfumées sont considérés comme des allergisants faibles, alors que certains de leurs produits d'autoxydation, les hydroperoxydes allyliques, sont classifiés comme des allergisants forts d'après le local lymph node assay (LLNA). Cependant, leur mécanisme d'action et leur effet sur le système immunitaire reste incertain. Comme les cellules dendritiques (DCs) jouent un rôle clé dans la DAC, nous avons étudié leur activation après exposition au linalol (LINA), au limonène (LIMO) et leurs hydroperoxydes allyliques respectifs (LINA-OOH et LIMO-OOH). La lignée cellulaire THP-1 a été utilisée en tant que substitut des DCs, il s'agit du modèle cellulaire actuellement employé dans le test *in vitro* h-CLAT, validé par l'OCDE. Nos données montrent que les hydroperoxydes allyliques se comportent de façon différente sur la lignée THP-1. Le LINA-OOH et le LIMO-OOH oxydent les thiols de surface après 30 min de stimulation. Cependant, le stress oxydant induit par le LINA-OOH était plus important, avec une diminution plus importante du *ratio* GSH/GSSG et une production plus importante des espèces réactives. De plus, le LINA-OOH induit une accumulation de Nrf2 plus importante en corrélation avec l'expression de *ho-1* et *nqo-1*, 2 gènes cibles de Nrf2. En ce qui concerne les voies de signalisation impliquées dans le mécanisme d'action de ces produits, les protéines des MAPKs et de P65 étaient activées en réponse au LINA-OOH mais pas au LIMO-OOH. CD54 et CD86 sont exprimés après 24h d'exposition aux hydroperoxydes allyliques alors que le LINA et le LIMO n'ont pas modifié le phénotype des THP-1. Ce travail souligne le fait que les hydroperoxydes allyliques formés par autoxydation ne mènent pas à une réactivité chimique égale puisque le LINA-OOH semble être un activateur plus fort que le LIMO-OOH, concernant le stress oxydant et l'activation de la voie de signalisation Nrf2/Keap1.





Fragrance Allergens Linalool and Limonene Allylic Hydroperoxides in Skin Allergy: Mechanisms of Action Focusing on Transcription Factor Nrf2

Chloé Raffalli,^{*} Elodie Clouet,^{*,†} Salen Kuresepi,[‡] Marie-Hélène Damiens,^{*} Jean-Pierre Lepoittevin,[‡] Marc Pallardy,^{*} Pierre-Jacques Ferret,[†] Elena Giménez-Arnau,[‡] and Saadia Kerdine-Römer^{*,1}

^{*}UMR996 - Inflammation, Chemokines and Immunopathology, INSERM, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France; [†]Pierre Fabre Dermo-Cosmétique Research & Development, Toxicology Division, Safety Department, Toulouse, France; and [‡]Laboratory of Dermatochemistry, Institute of Chemistry-CNRS UMR 7177, University of Strasbourg, 67081 Strasbourg, France

¹To whom correspondence should be addressed at UMR996 - Inflammation, Chemokines and Immunopathology, INSERM, Faculté de Pharmacie Paris Sud, Université Paris-Saclay, 5 Rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France. fax : 01 46 83 54 96; E-mail: saadia.kerdine-romer@u-psud.fr.

ABSTRACT

Allergic contact dermatitis is regarded as the most frequent expression of immunotoxicity in humans. Many odorant terpenes commonly used in fragrance compositions are considered as weak skin sensitizers, whereas some of their autoxidation products, allylic hydroperoxides, are classified as strong sensitizers according to the local lymph node assay. However, the mechanism of their effects on the immune system remains unclear. Since dendritic cells play a key role in allergic contact dermatitis, we studied their activation by the frequently used linalool (LINA) and limonene (LIMO), and their respective sensitizing allylic hydroperoxides (LINA-OOH, LIMO-OOH). The THP-1 cell-line was used as a surrogate for dendritic cells, the model currently employed in the validated h-CLAT *in vitro* test. Our data showed that allylic hydroperoxides behave differently. Both LINA-OOH and LIMO-OOH oxidized cell surface thiols 30 min after stimulation. However, the oxidative stress induced by LINA-OOH was stronger, with a higher decreased GSH/GSSG ratio and a stronger reactive species production. Moreover, LINA-OOH induced a stronger Nrf2 accumulation in correlation with *nqo1* and *ho-1* gene expression, 2 Nrf2 target genes. Regarding signaling pathways involved in these effects, P38 mitogen-activated protein kinase and P-ERK were activated in response to LINA-OOH but not with LIMO-OOH. CD54 and CD86 were induced 24-h postexposure. In contrast, LINA and LIMO did not modify THP-1 phenotype. This work underlies that autoxidation forming allylic hydroperoxide (ROOH) does not lead to equal chemical reactivity since LINA-OOH appears to be a stronger activator than LIMO-OOH, in regard to oxidative stress and Nrf2 pathway activation.

Key words: allergic contact dermatitis; terpenes; allylic hydroperoxides; Nrf2; cell surface thiol; sensitizers.

Terpenes are widespread fragrance compounds of natural origin, used in the production of fine perfumes, fragranced cosmetics and household and industrial products. Some of them, such as limonene (LIMO) and linalool (LINA), behave as prehapten as they autoxidize slowly on air exposure. This oxidation leads to the formation of a cocktail of oxidized molecules such

as epoxides, diols and allylic hydroperoxides (Figure 1). Among them, allylic hydroperoxides have been identified as potent sensitizers in predictive animal tests. Allylic hydroperoxides derived from autoxidation of LIMO and LINA were tested with the local lymph node assay (LLNA) and classified as strong sensitizers according to the Scientific Committee on Consumer

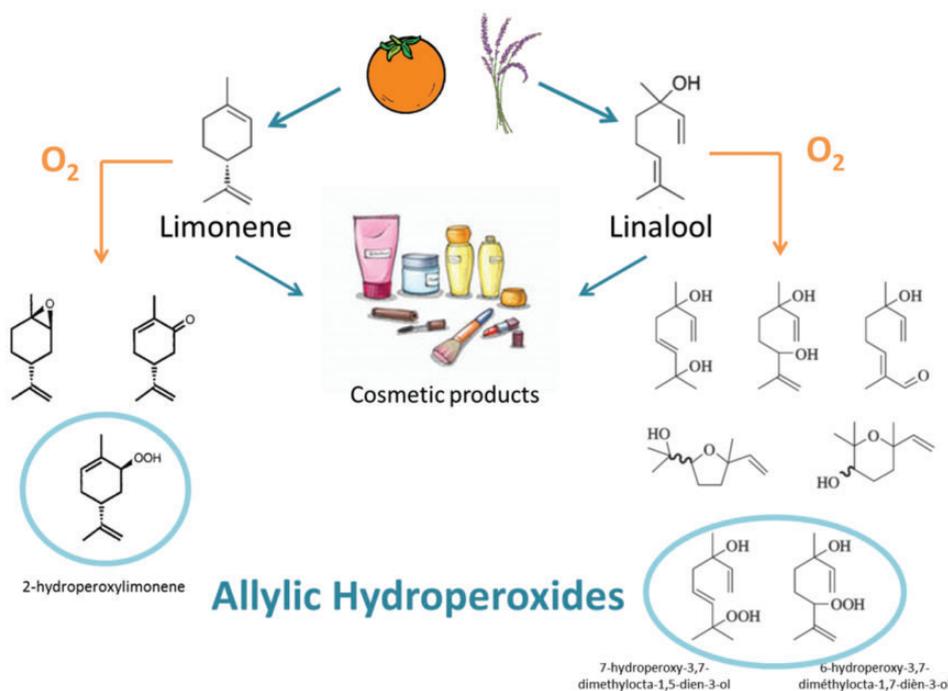


Figure 1. LIMO and LINA autoxidize on air exposure, forming highly allergenic compounds such as allylic hydroperoxides. LIMO and LINA are terpenes extracted from oranges and lavender and are frequently found in cosmetic products. Over time, terpenes slowly autoxidize to induce a cocktail of oxidizing molecules.

Products (2005), due to EC₃ values between 0.2% and 2% (Christensson *et al.*, 2014; Sköld *et al.*, 2004). Hydroperoxides derived from the autoxidation of LIMO and LINA are thus considered as strong sensitizers while the corresponding terpenes are classified as weak sensitizers. Allylic hydroperoxides must react with proteins in the skin to be recognized by the immune system. It has been reported that these compounds form antigens most probably via mechanisms involving radical intermediates, starting with the homolytic cleavage of O-O/O-H bonds of weak dissociation energies (Kao *et al.*, 2014). Recent international multicenter studies showed frequent contact allergic reactions to oxidized LINA and oxidized R-LIMO in tested dermatitis patients. Out of 2900 patients, 5.2% were tested positive to oxidized R-LIMO 3% (containing 0.33% of hydroperoxides) and 6.9% to oxidized LINA 6% (containing 1% of hydroperoxides) (Bråred Christensson *et al.*, 2012, 2013).

Allergic contact dermatitis (ACD) is a major source of occupational skin disease. It results from an adverse reaction of the immune system to low-molecular weight chemicals called haptens and it is a T-cell-mediated delayed-type hypersensitivity reaction (Martin, 2015). Two phases are distinguished in this pathology, the sensitization phase and the elicitation phase. The mechanism behind skin sensitization in ACD is documented by the OECD as an adverse outcome pathway (OECD, 2012). The main key events include the formation of the hapten-protein complex (Gerberick *et al.*, 2004), the activation of cell-signaling pathways such as mitogen-activated protein kinase (MAPK) and oxidative stress signaling pathways (Natsch and Emter, 2016) and phenotypic changes of dendritic cells (DCs) through their expression of cell-surface markers (Nukada *et al.*, 2011).

The main objective of this work was to investigate the activation of DC by terpenes and their autoxidation products. LINA and LIMO terpenes and their respective sensitizing allylic hydroperoxides were studied on the THP-1 cell-line, a human

monocytic leukemia cell-line, as a surrogate of DC. This cell-line is currently used in the h-CLAT *in vitro* test (Nukada *et al.*, 2011). Tested molecules were: one allylic hydroperoxide resulting from the autoxidation of LIMO, 2-hydroperoxylimonene (LIMO-OOH), a mixture of 2 allylic hydroperoxides and one single compound resulting from the autoxidation of LINA, 6 and 7-hydroperoxy-3, 7-dimethylocta-1, 7-dien-3-ol (LINA-OOH 6 + 7) and LINA-OOH 7. Our results showed that both LINA-OOH behave as stronger activators of THP-1 cells than LIMO-OOH, resulting in oxidative stress signaling and MAPK activation. No significant difference between LINA-OOH 7 alone and the LINA-OOH 6 + 7 isomers mixture was found. *In fine*, both terpenes and their hydroperoxides induce a slight maturation of THP-1 cells, with a higher activation in response to hydroperoxides.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Acetonitrile (CH₃CN, CAS number: 75-05-8), Cinnamal (CinA, CAS number: 104-55-2, dithiothreitol (DTT, CAS number: 3483-12-3), D-LIMO (CAS number: 5989-27-5), LINA (CAS number: 78-70-6), and butylhydroperoxide (tBHP, CAS number: 75-91-2) were all purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France).

LIMO-OOH and the mixture of isomers LINA-OOH 6 + 7 (6:4 ratio) were synthesized in the dermatology laboratory (Strasbourg, France) (Kao *et al.*, 2011). As these 2 compounds are difficult to isolate from the mixture, isomer LINA-OOH 7 was kindly provided by Natsch, Givaudan (Duebendorf, Switzerland).

Culture of THP-1 cell-line. The human monocytic cell-line THP-1 (ATCC-TIB-202; LGC, Molsheim, France) was grown in RPMI 1640 medium with 25 mM HEPES GlutaMAX (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Biowest, AbCys, Courtaboeuf, France), 1% sodium

Table 1. Concentration of Molecules Used For the Experiments

| | Solvent | Concentration Range Tested (mM) | Cytotoxicity > 30% (mM) | Tested Concentrations (mM) |
|----------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| DTT | Medium | Untested | > 1 (Migdal et al., 2013) | 1 |
| CinA | DMSO | Untested | 0.1 (Migdal et al., 2013) | 0.1 |
| tBHP | CH ₃ CN | Untested | 0.5 (Migdal et al., 2013) | 0.5 |
| LINA | CH ₃ CN | 0.25–1.5 | >1.5 | 0.25, 0.5, 1 |
| LINA-OOH 7 | CH ₃ CN | 0.25–1.5 | 1 | 0.25, 0.5, 1 |
| LINA-OOH 6 + 7 | CH ₃ CN | 0.25–1.5 | 1 | 0.25, 0.5, 1 |
| LIMO | CH ₃ CN | 0.5–1.5 | >1.5 | 0.5, 1, 1.5 |
| LIMO-OOH | CH ₃ CN | 0.5–1.5 | >1.5 | 0.5, 1, 1.5 |

THP-1 cells were exposed to different concentrations of chemicals for 24 h. Cell viability was determined and the concentrations inducing 30% of mortality were chosen.

pyruvate (Gibco, Invitrogen), antibiotics [100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Gibco, Invitrogen)] and 0.05 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) at 37 °C in humidified air containing 5% CO₂.

Chemical treatment. THP-1 cells were cultured for at least 12 h at 8×10^5 cells/ml in complete medium without 2-mercaptoethanol. On the next day, the cells were seeded in complete medium at 1×10^6 cells/ml and treated with chemicals. CinA was diluted in DMSO and tBHP, terpenes and allylic hydroperoxides in CH₃CN. Final concentrations of solvent in culture media did not exceed 0.1%.

Measurement of cell viability. For each chemical, several concentrations were first tested on THP-1 cells to assess cell viability after 24 h of treatment using 7-AAD and Annexin V staining according to the manufacturer's protocol (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) (data not shown). Cell viability was measured using the FL-3 wavelength on a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Data acquisition was performed using the CellQuest software (Becton Dickinson). At least 4 independent experiments were performed for each chemical. According to these results, one concentration for each chemical was selected for further experiments. This concentration was the maximal concentration inducing no more than 30% cytotoxicity. For molecules without any cytotoxicity, the highest concentration (1.5 mM) was used (Table 1). Negative and positive controls (DTT, CinA and tBHP) were used at previously determined subtoxic concentrations (Migdal et al., 2013).

Analysis of cell-surface thiols by flow cytometry. The Alexa Fluor 488 C₅ maleimide (AFM) (Fisher Scientific, Illkirch, France) has been used to measure cell-surface thiols (Hirota et al., 2010). Briefly, we seeded THP-1 cells at 1×10^6 cells/ml, then treated them with the compounds for 30 min, 1 and 2 h. THP-1 cells were recovered and washed twice with PBS, then incubated with 100 µl of AFM (10 µM) PBS solution for 30 min at 37 °C. The cells were analyzed by flow cytometry. Relative fluorescence intensity (RFI) was calculated by using the following formula: $\text{RFI (\% of control)} = (\text{mean fluorescence intensity [MFI] of chemical treated cells} / \text{MFI of vehicle control cells}) \times 100$. The results are expressed as RFI-100, meaning that values are negative when thiols are oxidized and are the mean \pm SEM of 4 independent experiments.

Quantification of intracellular reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG). After treatment with chemicals for 1 h, 1×10^6 cells were collected and washed twice with cold PBS. The GSH/GSSG-Glo Assay kit from Promega (Madison, USA) was used and the

ratio of intracellular reduced on oxidized glutathione was measured. Results are expressed as the fold induction over control and are the mean \pm SEM of 4 independent experiments.

Reactive species detection. Intracellular production of reactive species in THP-1 cells following the treatment was determined by measuring DCF (dichlorofluorescein)-derived fluorescence by flow cytometry. THP-1 cells (2×10^6 cells/ml) were pretreated for 30 min with 2 µM DCFH-DA (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) (Sigma-Aldrich) in serum-free RPMI at 37 °C. Cells were washed and resuspended in PBS (1×10^6 cells/ml). Following incubation at 37 °C with chemicals, fluorescence intensity of DCF was then measured in the FL1 channel. A total of 10,000 living cells were analyzed. RFI was calculated by using the following formula: $\text{RFI (\% of control)} = (\text{MFI of chemical-treated cells} / \text{MFI of vehicle control cells}) \times 100$. Results are expressed as the fold induction over control and are the mean \pm SEM of 4 independent experiments. LINA-OOH (7) was not tested for this experiment.

Immunoblotting. Western blot was performed as we previously described (Migdal et al., 2013). Briefly, THP-1 cells were lysed after chemical exposure. Total protein concentration was evaluated using bicinchoninic assay, 30 µg of denatured proteins were loaded on polyacrylamide gels (TGX Stain-Free FastCast; Bio-Rad Laboratories, Hercules, California). Stain-free gels were activated. Proteins were transferred to PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories). Total proteins on membranes were detected using the Stain-free method (Gilda and Gomes, 2013). For the Nrf2/Keap1 analysis pathway, membranes were incubated with antibodies raised against Nrf2 (H-300; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). For the MAPKs and NF-κB analysis pathways, membranes were incubated with antibodies raised against the phosphorylated forms of p65, p38 MAPK, JNK 1/2, or ERK 1/2 (all from Cell Signaling Technology, Ozyme, St-Quentin en Yvelines, France). Immunoreactive bands were detected by chemoluminescence (ECL solution, Amersham Biosciences, Piscataway, USA). Results were expressed as a fold ($\text{Nrf2 protein band intensity of treated cell proteins} / \text{Nrf2 protein band intensity of vehicle treated cell proteins}$) \times ($\text{Loading control of vehicle treated cell proteins} / \text{Loading control of treated cell proteins}$).

Measurement of Nrf2 DNA binding. DNA binding was analyzed using specific ELISA-based TransAM kits from Active Motif as described by Macoch et al. (2015). Colorimetric readout was quantified by spectrophotometry at 450 nm. Each value is the mean \pm SEM of 4 independent experiments.

RNA isolation, reverse transcription, and real time PCR. THP-1 cells (1×10^6 cells/ml, 2 ml/well) were exposed to test compounds for 6 h. This time point was determined in preliminary experiments and was found to be optimal to study expression of Nrf2 target genes (data not shown). We used the Macherey Nagel kit to extract the RNA and followed the manufacturer protocol. Total RNA yield was quantified by spectrophotometry. Reverse transcription and real-time PCR were performed as previously described (Migdal et al., 2013). Expression of *ho-1*, *nqo-1*, and *il-8* was measured by real-time PCR. Results were expressed as fold induction compared with control samples (corresponding vehicle-treated cells) and corrected by the expression of the reference genes β -actin and *gapdh*. Each value is the mean \pm SEM of 4 independent experiments.

Immunofluorescent staining and flow cytometry analysis. After 24 h of incubation with chemicals, THP-1 cells were harvested, washed once in PBS and 3×10^5 cells (per antibody) were incubated in PBS containing 0.05% bovine serum albumin (BSA) for 30 min at 4°C with the monoclonal antibodies PE-conjugated antiCD86 (555658, BD) and allophycocyanin-conjugated antiCD54 (559771, BD). After incubation, cells were washed with PBS + BSA 0.05%. THP-1 cell phenotype modifications were detected using a FACS-Calibur flow cytometer. For each sample, 10,000 cells were acquired and analyzed using the CellQuest software. Results were expressed using RFI calculated with the following formula, where MFI is the mean fluorescence intensity: (MFI of chemical-treated cells labeled with antigen-specific antibody—MFI of chemical-treated isotype control cells)/(MFI of vehicle control cells labeled with antigen-specific antibody—MFI of vehicle isotype control cells). Each value of RFI is the mean \pm SEM of 4 independent experiments.

Statistical analysis. Data are expressed as means \pm SEM. Differences between groups were evaluated with the Mann-Whitney U test (Prism Software; GraphPad, La Jolla, California). $p < .05$ was regarded as significant.

RESULTS

Measurement of Cell-Surface Thiols, Glutathione Depletion and Reactive Species Production After Terpene and Hydroperoxide Exposure

A decrease of cell-surface thiols was described as a trigger of activation of intracellular signal transduction in hapten-treated THP-1 cells (Kagatani et al., 2010). We first measured this after treatment with the terpenes and the allylic hydroperoxides by flow cytometry. We used the Alexa fluor C5 maleimide, a specific impermeable thiol-reactive compound able to covalently bind to membrane surface cysteines. Thiol antioxidant DTT and oxidizing agent tBHP were also tested as negative and positive controls (Supplementary Figure S1A). Our results show that the terpenes and the hydroperoxides significantly induced a decrease of cell-surface thiols after 30 min of treatment. After 1 h of treatment with LINA and LIMO, this decrease was no longer significant, while it remained significant with LINA-OOH and LIMO-OOH. This effect was no longer significant 2 h post exposure (Figure 2A). Since terpene and hydroperoxide treatment decreased cell-surface thiols, GSH depletion was measured. The results showed a significant decrease of GSH/GSSG ratio in response to LINA-OOH (7 and 6 + 7) with a significant difference between LINA and LINA-OOH (Figure 2B). LIMO-OOH induced a slight decrease of the ratio in comparison with LIMO but the

difference was not significant. Both LINA-OOH and LIMO-OOH induced a significant GSH depletion with a stronger effect for LINA-OOH. The depletion induced by the terpenes and/or their hydroperoxides is quite similar to positive controls (CinA or tBHP) (Supplementary Figure S1B).

The measurement of reactive species production showed that LINA-OOH 6 + 7 induced a significant production comparable to levels induced by tBHP, a positive control (Supplementary Figure S1C), whereas LINA, LIMO, and LIMO-OOH did not (Figure 2C).

Nrf2 Is Differently Activated by Terpenes and Hydroperoxides

In response to an oxidative stress to the cells, the Nrf2/Keap1 pathway is activated in order to induce the synthesis of antioxidant enzymes (Dickinson et al., 2004). To investigate the activation of Nrf2 pathway after terpene and hydroperoxide exposure, the accumulation of the Nrf2 protein was measured by western blot. Our results showed that in response to LINA-OOH 7 and 6 + 7, Nrf2 is accumulated. With LIMO and LIMO-OOH, a slight accumulation of Nrf2 was measured (Figure 3A).

In order to activate the transcription of target genes, accumulated Nrf2 needs to translocate to the nucleus and bind to ARE (Antioxidant Response Element) consensus sequence. LINA-OOH induced a significant increase of Nrf2 DNA binding while LINA, LIMO, and LIMO-OOH did not (Figure 3B). The fold induction induced by both LINA-OOH was comparable to tBHP, our positive control (Supplementary Figure S2A). LINA-OOH 7 and 6 + 7 significantly induced the expression of *ho-1*, *nqo1*, and *il-8*, target genes of Nrf2, while LINA did not. LIMO-OOH induced only the expression of *il-8* while LIMO did not (Figs. 3C–E). However, induction of *il-8* is lower with LIMO-OOH stimulation in comparison with LINA-OOH.

MAPKs and NF- κ B Pathway Activation of THP-1 Cells Exposed to Terpenes and Hydroperoxides

MAPK pathways have been described to be involved in the maturation of human DCs (Boislève et al., 2005). Since a link between their activation following oxidation of cell-surface thiols has been shown (Hirota et al., 2010), the activation of MAPK and NF- κ B pathways was measured (Figure 4). LINA-OOH 7 and 6 + 7 induced an activation of all MAPKs and p65 while LINA did not. LIMO and LIMO-OOH induced a slight increase of JNK, ERK, and p65 phosphorylated. Both LIMO and LIMO-OOH induce the phosphorylation of p38 but not with the same kinetic.

Phenotypic Characterization of THP-1 Cells Exposed to Terpenes and Hydroperoxides

The phenotype of THP-1 cells was analyzed after 24 h of treatment with terpenes and hydroperoxides. We measured 2 activation markers: CD86 and CD54. LINA and LINA-OOH 7 and 6 + 7 induced a significant expression of CD86. Concerning CD54, the expression was only significant with LINA-OOH 7 and 6 + 7 but not with LINA. A significant expression of CD86 was observed in response to LIMO-OOH, but not with LIMO. CD54 was significantly induced in response to LIMO and LIMO-OOH (Figure 5). However, the activation of THP-1 by hydroperoxides was lower than the one measured with positive controls (Supplementary Figure S3).

DISCUSSION

According to the European Commission, about 1 to 3% of the general population in Europe is affected by ACD to fragrance

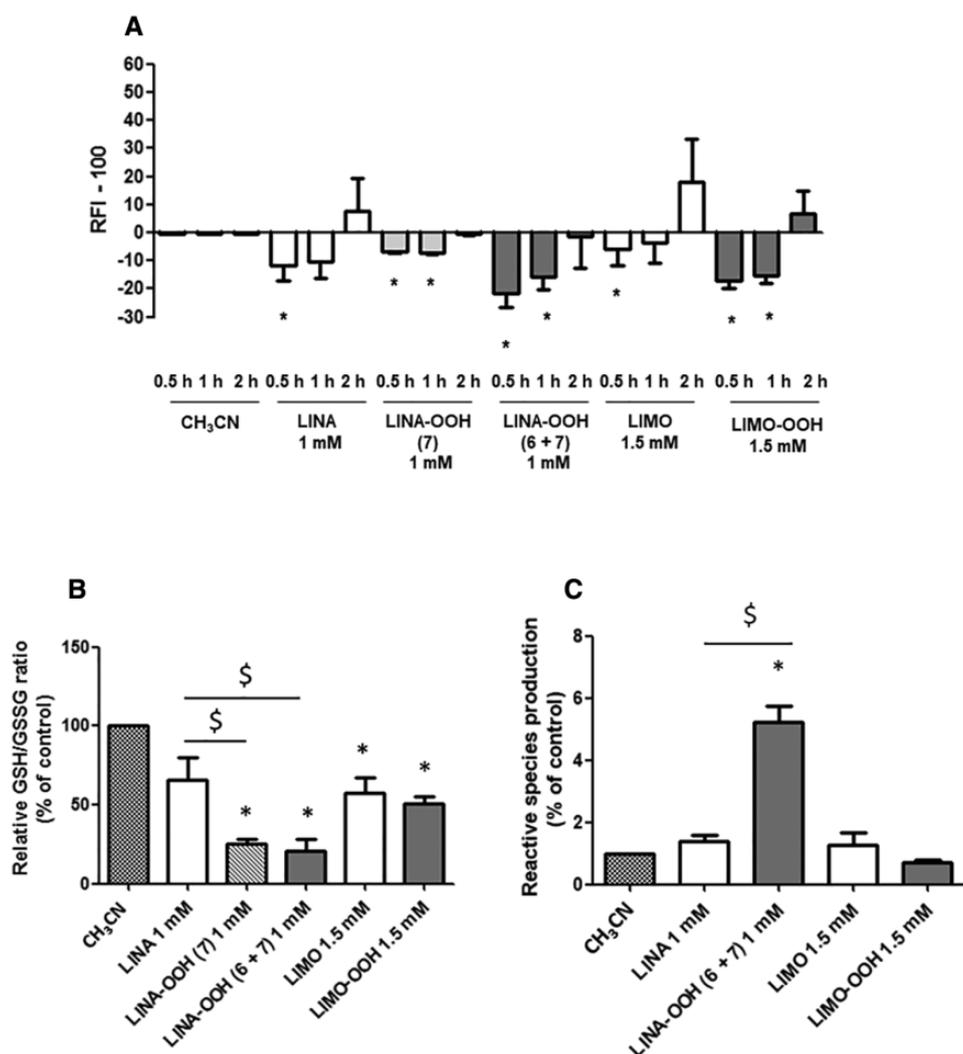


Figure 2. Effect of terpenes and hydroperoxides on cell-surface thiols, intracellular GSH/GSSG ratio and reactive species production. THP-1 cells were exposed to the indicated chemicals at subtoxic concentration. A, Cell-surface thiols, expressed as RFI-100 is the mean \pm SEM of 4 independent experiments. B and C, GSH/GSSG ratio and reactive species production are the expression of the fold increase over control and are the mean \pm SEM of 4 independent experiments. Asterisks indicate a significant ($p < .05$) difference between chemical-treated cells and vehicle-treated cells. Dollars indicate a significant ($p < .05$) difference between both conditions.

sensitizers (Scientific Committee on Consumer Safety, 2011). It is now mandatory to label 26 allergens on the packaging of cosmetic products and LIMO and LINA are part of them (European Commission, 1976). Some of their autoxidation products, such as allylic hydroperoxides, are indeed considered as strong sensitizers (Karlberg et al., 2013). In this study, we hypothesized that terpenes and hydroperoxides induce an oxidative stress leading to DC activation. Therefore, we studied the GSH/GSSG ratio, the Nrf2 and MAPK pathways, in THP-1 cells described as a surrogate of DC.

Kagatani et al. (2010) have reported that cell surface thiols on MoDC and THP-1 cell-line were oxidized following treatment with some haptens. These modifications of surface thiols play a crucial role in the activation of those cells. Once the proteins are oxidized, they need to be recycled to ensure the homeostasis of the cell. GSH acts in conjunction with GSH peroxidases and glutathione S-transferases to detoxify reactive species and to recycle oxidized protein thiols (Requejo et al., 2010). In our work, both terpenes and their derived hydroperoxides led to the oxidation of cell-surface thiols but the effect of the hydroperoxides was stronger than the native molecules.

The oxidation of cell surface thiols by exogenous GSSG can provoke the phosphorylation of p38 MAPK (Filomeni et al., 2003). This kinase was also activated in response to DNCB, a strong sensitizer (Miyazawa et al., 2008). In our hands, LINA-OOH and LIMO-OOH induced the phosphorylation of 3 MAPKs (JNK, ERK, and p38) but only hydroperoxides led to a slight upregulation of both CD54 and CD86. In this study, we did not follow h-CLAT guidelines (OECD 442 D), explaining the low concentrations of terpenes used. Indeed, a lower induction of CD86 and CD54 on the THP-1 cell-surface was observed compared with the literature. No significant differences between exposure with LINA-OOH 7 and 6 + 7 were measured so there is no evidence that the mixture of LINA-OOH was a stronger activator of THP-1 than LINA-OOH 7. The difference of results observed between LIMO-OOH and LINA-OOH could be explained by the suspected mechanisms for their reaction with skin proteins involving radical intermediates. Initially obtained alkoxy RO•/peroxy ROO• radicals can further lead via intramolecular cyclization, fragmentation or hydrogen abstraction to the formation of longer half-life reactive carbon-centred radicals R• through different radical rearrangements. Kao et al. (2011) proved that some of these

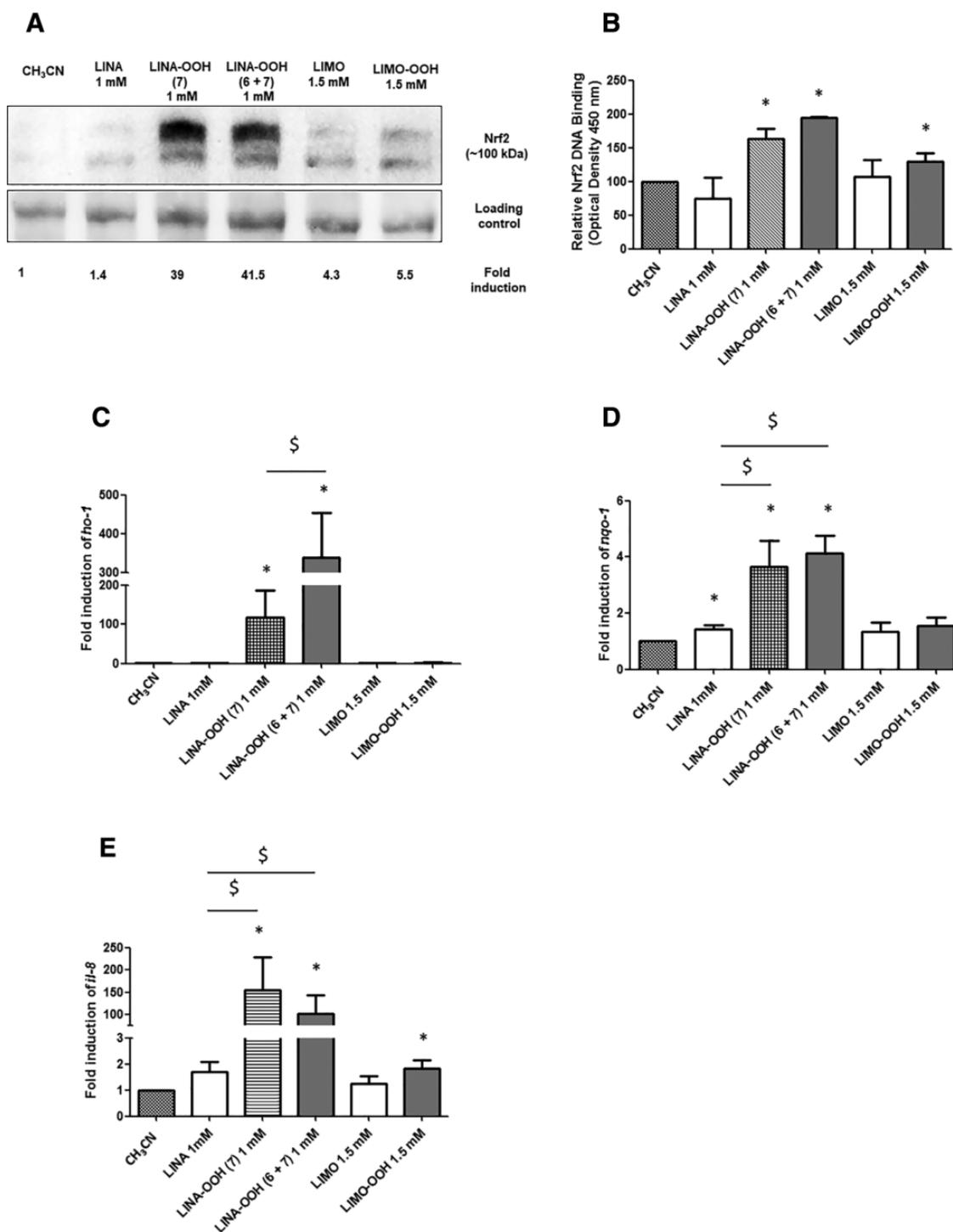


Figure 3. Effect of terpenes and hydroperoxides on Nrf2/Keap1 signaling pathway. THP-1 cells were exposed to the indicated chemicals at subtoxic concentration. A, Western blot was realized as described in “Materials and Methods” Section. B, Relative Nrf2 ARE-sequences binding in THP-1 cells after exposure with terpenes and hydroperoxides are expressed as optical density at 450 nm. Each value is the mean \pm SEM of 4 independent experiments. mRNA expression of Nrf2 target genes in THP-1 cells exposed to the selected chemicals for 6 h. Expression of *ho-1* (C), *nqo-1* (D) and *il-8* (E) was measured by real-time PCR and were expressed as fold induction compared with control samples. Each value is the mean \pm SEM of 4 independent experiments. Asterisks indicate a significant ($p < .05$) difference between chemical treated cells and vehicle treated cells. Dollars indicate a significant ($p < .05$) difference between both conditions.

carbon-centred radicals $R\cdot$ derived from LINA-OOH and LIMO-OOH can react and form adducts with some amino acids such as cysteine, lysine and tryptophan, showing that the possibilities of radical rearrangements were more limited in the case of LIMO-OOH than in the case of LINA-OOH.

Our results allow us to propose that the mechanism of action of both terpenes could be different. LIMO could act as a pro-hapten and be metabolized by THP-1. Once metabolized, the product would activate MAPKs pathways inducing an incomplete maturation of THP-1 cells. Bråred Christensson *et al.*

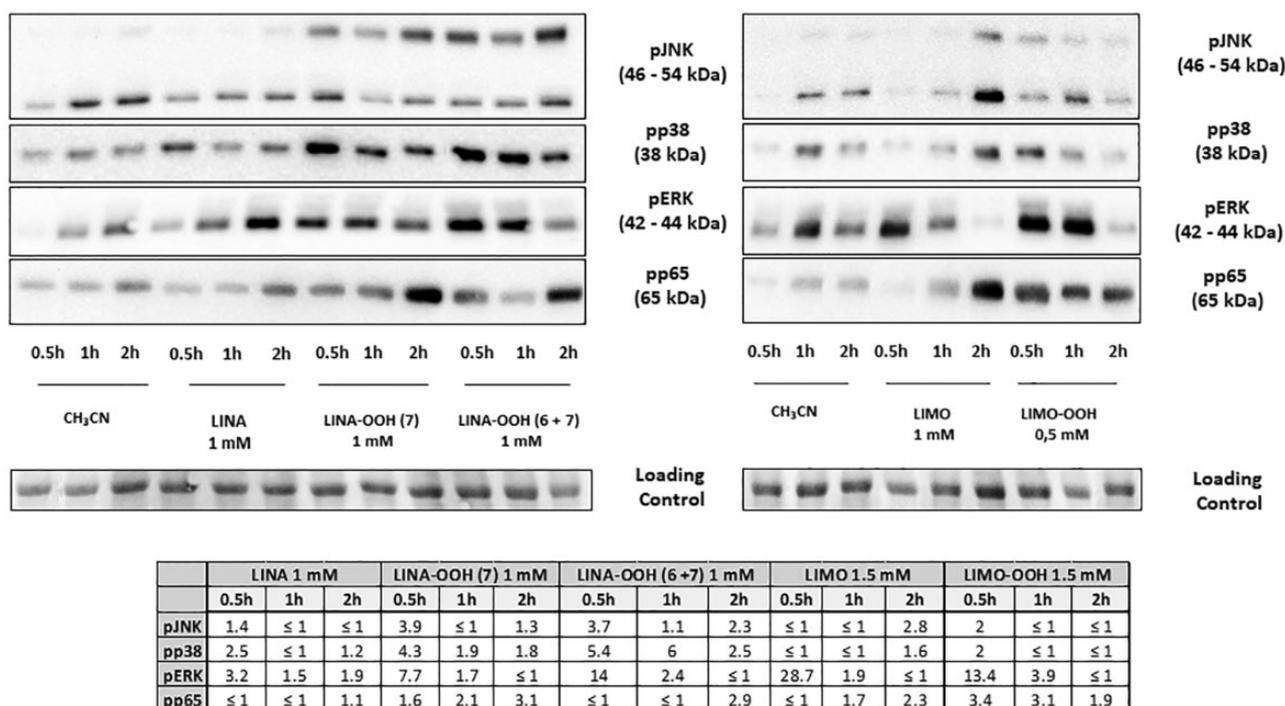


Figure 4. Effect of terpenes and hydroperoxides on the expression of pJNK, pp38 pERK and pp65 protein in THP-1 cells. THP-1 cells were exposed to terpenes and hydroperoxides at subtoxic concentration for 0.5, 1, and 2 h. Representative western blot and semiquantification of MAPKs and p65 proteins expressed as fold induction.

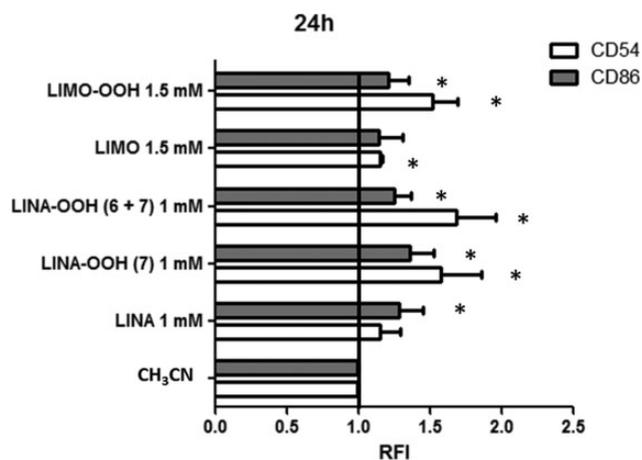


Figure 5. Effect of terpenes and hydroperoxides on CD54 and CD86 expression in THP-1 cells. THP-1 cells were exposed to terpenes and hydroperoxides at subtoxic concentration for 24 h. Each value of RFI is the mean \pm SEM of 4 independent experiments. Asterisks indicate a significant ($p < .05$) difference between chemical-treated cells and vehicle-treated cells.

(2016) mentioned that some terpenes could be activated to become sensitizers through both biotic and abiotic activation (geraniol and α -terpinene for instance). Biotic oxidation can occur in the skin, through enzyme activity such as cytochrome P450 or peroxidases (Moss and Lepoittevin, 2016). Meesters et al. (2007) studied by enzymatic assays the oxidative metabolism of LINA by cytochrome P450. They identified different enzymatic products of allylic hydroxylation and epoxidation such as 8-hydroxylinalool and 6, 7-epoxy-linalool. Epoxides can react as S_N2 electrophiles with skin proteins (Roberts et al., 2017) and might also lead to the activation of intracellular pathways. Since keratinocytes seem to play a role in the metabolic activation of prohaptenes and conjugation of haptens (Hennen et al.,

2011; Hennen and Blömeke, 2016), it would be revealing to test terpenes on a co-culture model using a keratinocyte cell-line (HaCAT) and THP-1 cells. Keratinocytes could then provoke the metabolic activation of terpenes, resulting in a stronger increase of CD54 and CD86 expression on THP-1 cells.

Many interventional studies performed with employees in specific working environments (eg, metal and health care workers, hairdressers) have shown a disturbed skin barrier in occupational ACD (Hachem et al., 2002; Kütting and Drexler, 2003; Williams et al., 2010). In ACD, the first step starts with a disturbance of the skin barrier (Bonnevile et al., 2007; Dickel et al., 2010) and the altered permeability could allow for a better penetration of allergens through the skin.

Furthermore, the dysfunctional skin barrier observed in atopic dermatitis patients may play a role in the increased penetration of chemicals, thus augmenting the risk for sensitization and ACD (Thyssen et al., 2014). This barrier defect also results in increased rates of irritant contact dermatitis, which further compromises the skin barrier and magnifies this issue. People developing allergy to allylic hydroperoxides might have abnormal epidermal barrier that make them more vulnerable.

Since a major mechanism in the cellular defense against oxidative or electrophilic stress is activation of the Nrf2 signaling pathway, we also focused our work on the activation of the Nrf2/Keap1 pathway known to be activated by chemical sensitizers (Ade et al., 2009). Chemical sensitizers have been shown to induce the transcription of Nrf2 target genes *ho-1* and *nqo1* (Migdal et al., 2013). In our study, both allylic hydroperoxides led to the accumulation of Nrf2 with a higher response with LINA-OOH. However, only LINA-OOH induced the Nrf2 pathway activation meaning that terpenes act in a different way for Nrf2 activation. Some research indicates that phosphorylation of Nrf2 on several serine and threonine residues by MAPKs is needed for its activation (Sun et al., 2009). This observation does

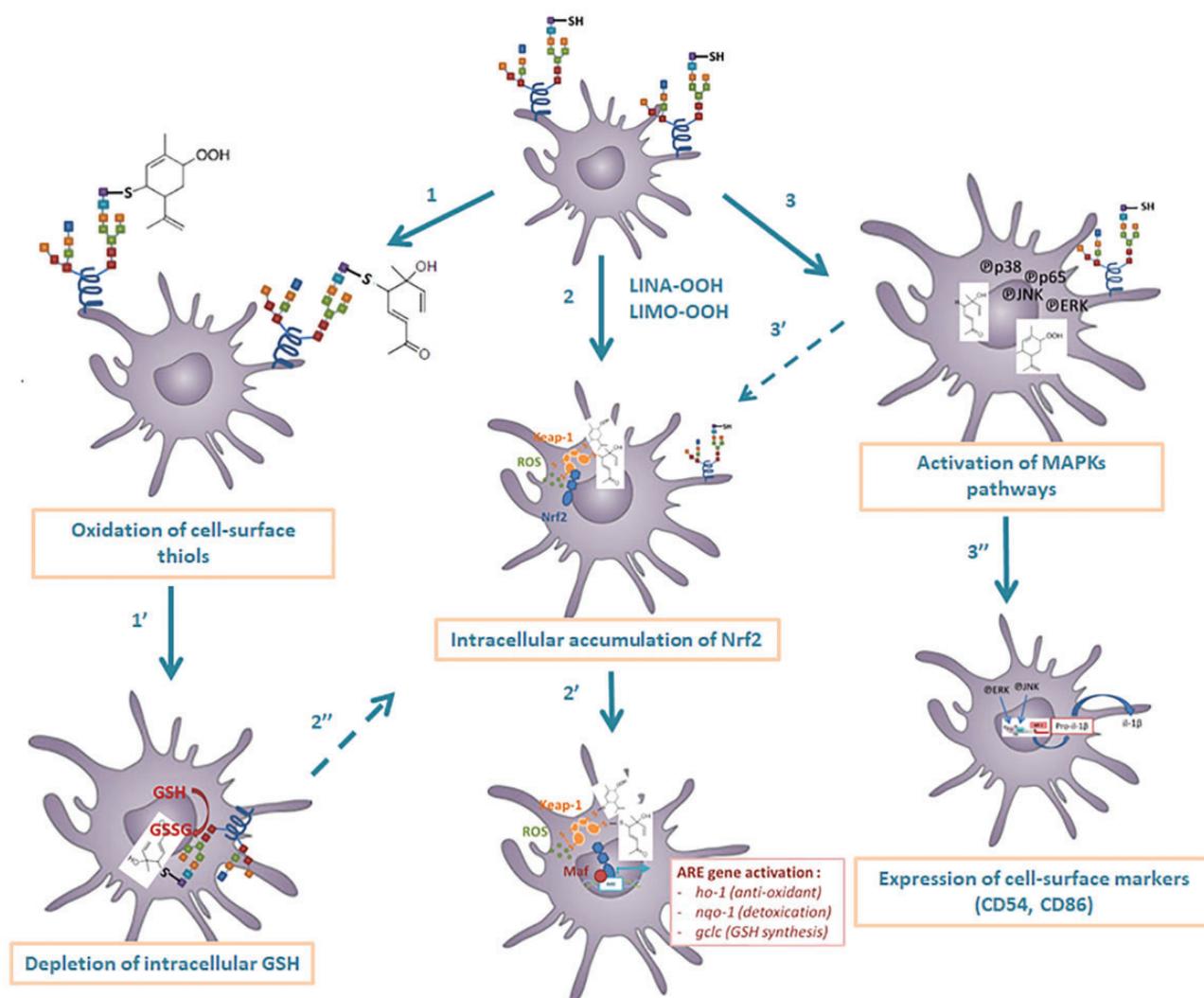


Figure 6. Mechanism of action of terpenes and hydroperoxides on THP-1 cells. The first step is the oxidation of the thiol group of cysteine residues of protein at the membrane of the cell (1) which results in the decrease of intracellular level of GSH (1'). Reactive species production and allylic hydroperoxides lead to the oxidation of cysteine residues of Keap1, Nrf2 is accumulated in the cytoplasm (2) and translocates to the nucleus. Nrf2 induces the transcription of *ho-1*, *nqo1* and *il-8* (2'). Depletion of intracellular glutathione might also contribute to Nrf2 activation (2'). Meanwhile, phosphorylation of MAPKs and NF- κ B pathway proteins (p38, p65, JNK and ERK) occurs (3). It is probable that the activation of these pathways also leads to an accumulation of Nrf2 (3') and the cell may acquire a mature phenotype with the expression of CD86 and CD54 at its surface (3'').

not exclude the fact that activation of MAPKs pathway by the LINA-OOH can be a part of the explanation for the activation of Nrf2. In response to LIMO-OOH, the weak activation of MAPKs could explain the absence of Nrf2 activity even if there was a slight accumulation of Nrf2.

In summary, the main differences of activation observed with these products are the production of reactive species and the activation of the Nrf2 pathway. A mechanism of action can be proposed, describing how the allylic hydroperoxides, at low concentrations used, may lead to the maturation of DCs. LINA-OOH would sufficiently induce MAPKs and reactive species production to lead to an activation of the Nrf2 pathway whereas LIMO-OOH would be unable to sufficiently activate the Nrf2 pathway and the production of reactive species (Figure 6). This study shows that allylic hydroperoxides are not equal in intracellular signaling for inducing an expression of cell-surface markers.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at *Toxicological Sciences* online.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the ANRT (Association nationale de recherche et de technologie). The authors thank Catherine Argillier (Qualiwell) for her support, Andreas Natsch (Givaudan) for providing LINA-OOH 7, the UMS Institut Paris Saclay d'Innovation Thérapeutique (IPSIT), Plateforme Trans-Prot, Université of Paris-Sud, Université Paris-Saclay and Claudine Deloménie for technical assistance. We thank Andrew Pearson for proofreading this article.

REFERENCES

- Ade, N., Leon, F., Pallardy, M., Peiffer, J. L., Kerdine-Romer, S., Tissier, M. H., Bonnet, P. A., Fabre, I., and Ourlin, J. C. (2009). HMOX1 and NQO1 genes are upregulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: Role of the Keap1/Nrf2 pathway. *Toxicol. Sci.* **107**, 451–460.
- 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.
- Bonneville, M., Chavagnac, C., Vocanson, M., Rozieres, A., Benetiere, J., Pernet, I., Denis, A., Nicolas, J.-F., and Hennino, A. (2007). Skin contact irritation conditions the development and severity of allergic contact dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 1430–1435.
- Bråred Christensson, J., Andersen, K. E., Bruze, M., Johansen, J. D., Garcia-Bravo, B., Giménez-Arnau, A., Goh, C. L., Nixon, R., and White, I. R. (2013). An international multicentre study on the allergenic activity of air-oxidized R-limonene. *Contact Dermatitis* **68**, 214–223.
- Bråred Christensson, J., Andersen, K. E., Bruze, M., Johansen, J. D., Garcia-Bravo, B., Gimenez Arnau, A., Goh, C.-L., Nixon, R., and White, I. R. (2012). Air-oxidized linalool—a frequent cause of fragrance contact allergy. *Contact Dermatitis* **67**, 247–259.
- Bråred Christensson, J., Hagvall, L., and Karlberg, A.-T. (2016). Fragrance allergens, overview with a focus on recent developments and understanding of abiotic and biotic activation. *Cosmetics* **3**, 19.
- Christensson, J. B., Hellsén, S., Börje, A., and Karlberg, A.-T. (2014). Limonene hydroperoxide analogues show specific patch test reactions. *Contact Dermatitis* **70**, 291–300.
- Dickel, H., Gambichler, T., Kamphowe, J., Altmeyer, P., and Skrygan, M. (2010). Standardized tape stripping prior to patch testing induces upregulation of Hsp90, Hsp70, IL-33, TNF- α and IL-8/CXCL8 mRNA: New insights into the involvement of 'alarmins'. *Contact Dermatitis* **63**, 215–222.
- Dickinson, D. A., Levenon, A.-L., Moellering, D. R., Arnold, E. K., Zhang, H., Darley-Usmar, V. M., and Forman, H. J. (2004). Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 1152–1159.
- European Commission. (1976). Concil directive of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products (76/768/EEC). *Off. J. Eur. Communities* **1**–163.
- Filomeni, G., Rotilio, G., and Ciriolo, M. R. (2003). Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *FASEB J.* **17**, 64–66.
- Gerberick, G. F., Vassallo, J. D., Bailey, R. E., Chaney, J. G., Morrall, S. W., and Lepoittevin, J. P. (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol. Sci.* **81**, 332–343.
- Gilda, J. E., and Gomes, A. V. (2013). Stain-free total protein staining is a superior loading control to b-actin for western blots. *Anal. Biochem.* **440**, 186–188.
- Hachem, J. P., De Paepe, K., Sterckx, G., Kaufman, L., Rogiers, V., and Roseeuw, D. (2002). Evaluation of biophysical and clinical parameters of skin barrier function among hospital workers. *Contact Dermatitis* **46**, 220–223.
- Hennen, J., Aeby, P., Goebel, C., Schettgen, T., Oberli, A., Kalmes, M., and Blömeke, B. (2011). Cross talk between keratinocytes and dendritic cells: Impact on the prediction of sensitization. *Toxicol. Sci.* **123**, 501–510.
- Hennen, J., and Blömeke, B. (2016). Keratinocytes improve prediction of sensitization potential and potency of chemicals with THP-1 cells 1. *ALTEX* **1**–19.
- Hirota, M., Motoyama, A., Suzuki, M., Yanagi, M., Kitagaki, M., Kouzuki, H., Hagino, S., Itagaki, H., Sasa, H., Kagatani, S., et al. (2010). Changes of cell-surface thiols and intracellular signaling in human monocytic cell line THP-1 treated with diphenylcyclopropenone. *J. Toxicol. Sci.* **35**, 871–880.
- Kagatani, S., Sasaki, Y., Hirota, M., Mizuashi, M., Suzuki, M., Ohtani, T., Itagaki, H., and Aiba, S. (2010). Oxidation of cell surface thiol groups by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 175–183.
- Kao, D., Chaintreau, A., Lepoittevin, J.-P., and Giménez-Arnau, E. (2014). Mechanistic studies on the reactivity of sensitizing allylic hydroperoxides: Investigation of the covalent modification of amino acids by carbon-radical intermediates. *Toxicol. Res. (Camb)* **3**, 278–289.
- Kao, D., Chaintreau, A., Lepoittevin, J., and Gim, E. (2011). Synthesis of allylic hydroperoxides and EPR spin-trapping studies on the formation of radicals in iron systems as potential initiators of the sensitizing pathway. *J. Org. Chem.* **76**, 6188–6200.
- Karlberg, A. T., Börje, A., Duus Johansen, J., Lidén, C., Rastogi, S., Roberts, D., Uter, W., and White, I. R. (2013). Activation of non-sensitizing or low-sensitizing fragrance substances into potent sensitizers - Prehaptens and prohaptens. *Contact Dermatitis* **69**, 323–334.
- Kütting, B., and Drexler, H. (2003). Effectiveness of skin protection creams as a preventive measure in occupational dermatitis: A critical update according to criteria of evidence-based medicine. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **76**, 253–259.
- Macoch, M., Morzadec, C., Génard, R., Pallardy, M., Kerdine-Römer, S., Fardel, O., and Vernhet, L. (2015). Nrf2-dependent repression of interleukin-12 expression in human dendritic cells exposed to inorganic arsenic. *Free Radic. Biol. Med.* **88**, 381–390.
- Martin, S. F. (2015). Immunological mechanisms in allergic contact dermatitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **15**, 124–130.
- Meeesters, R. J. W., Duisken, M., and Hollender, J. (2007). Study on the cytochrome P450-mediated oxidative metabolism of the terpene alcohol linalool: Indication of biological epoxidation. *Xenobiotica* **37**, 604–617.
- Migdal, C., Botton, J., El Ali, Z., Azoury, M. E., Guldemann, J., Giménez-Arnau, E., Lepoittevin, J. P., Kerdine-Römer, S., and Pallardy, M. (2013). Reactivity of chemical sensitizers toward amino acids in Cellulo plays a role in the activation of the Nrf2-ARE pathway in human monocyte dendritic cells and the THP-1 cell line. *Toxicol. Sci.* **133**, 259–274.
- Miyazawa, M., Ito, Y., Kosaka, N., Nukada, Y., Sakaguchi, H., Suzuki, H., and Nishiyama, N. (2008). Role of MAPK signaling pathway in the activation of dendritic type cell line, THP-1, induced by DNCB and NiSO₄. *J. Toxicol. Sci.* **33**, 51–59.
- Moss, E., and Lepoittevin, J. (2016). Rôle du métabolisme épidermique. In *John Libbey Eurotext, Montrouge, France*. (A. Barbaud, J. Waton), 37th ed., pp. 69–84.
- Natsch, A., and Emter, R. (2016). Nrf2 activation as a key event triggered by skin sensitizers: The development of the stable KeratinoSens reporter gene assay. *Altern. Lab. Anim.* **44**, 443–451.
- Nukada, Y., Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Mugita, N., Hirota, M., Miyazawa, M., Ito, Y., Sasa, H., and Nishiyama, N. (2011). Predictive performance for human skin sensitizing potential of the human cell line activation test (h-CLAT). *Contact Dermatitis* **65**, 343–353.

- OECD. (2012) *The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 2: Use of the AOP to Develop Chemical Categories and Integrated Assessment and Testing Approaches*. OECD, Paris, France.
- Requejo, R., Hurd, T. R., Costa, N. J., and Murphy, M. P. (2010). Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage. *febs J.* **277**, 1465–1480.
- Roberts, D. W., Aptula, A., and Api, A. M. (2017). Structure-Potency Relationships for Epoxides in Allergic Contact Dermatitis. *Chem. Res. Toxicol.* **30**, 524–531.
- Scientific Committee on Consumer Products. (2005) Memorandum on the Classification and categorization of skin sensitizers and grading of test reactions, SCCP/0919/05.
- Scientific Committee on Consumer Safety. (2011). Scientific committee on consumer safety on fragrance allergens in cosmetic products. *Eur. Comm.* 0–136.
- Sköld, M., Börje, A., Harambasic, E., and Karlberg, A. T. (2004). Contact allergens formed on air exposure of linalool. Identification and quantification of primary and secondary oxidation products and the effect on skin sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 1697–1705.
- Sun, Z., Huang, Z., Zhang, D. D., and Morty, R. E. (2009). Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLoS One* **4**, e6588.
- Thyssen, J. P., McFadden, J. P., and Kimber, I. (2014). The multiple factors affecting the association between atopic dermatitis and contact sensitization. *Allergy* **69**, 28–36.
- Williams, C., Wilkinson, S. M., McShane, P., Lewis, J., Pennington, D., Pierce, S., and Fernandez, C. (2010). A double-blind, randomized study to assess the effectiveness of different moisturizers in preventing dermatitis induced by hand washing to simulate healthcare use. *Br. J. Dermatol.* **162**, 1088–1092.

Résultats complémentaires

Article I

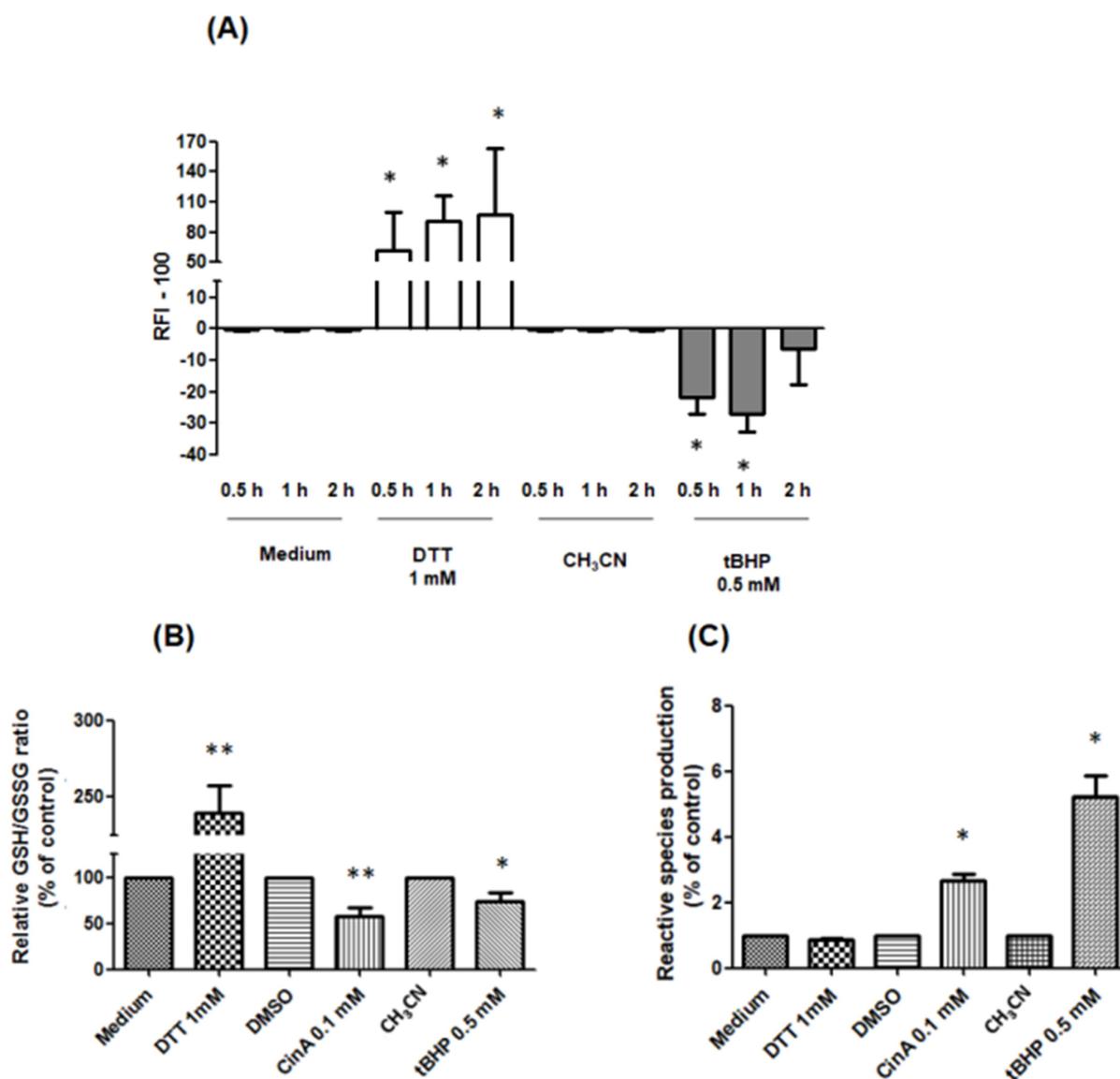


Fig. S1 Effect of positive (CinA, tBHP) and negative (DTT) controls on cell-surface thiols (A), intracellular GSH/GSSG ratio (B) and reactive species production (C). THP-1 cells were exposed to the indicated chemicals at subtoxic concentration as described in Materials and Methods. Each value is the expression of the fold increase over control and is the mean \pm S.E.M of four independent experiments. Asterisks indicate a significant ($p < 0.05$) difference between chemical-treated cells and vehicle-treated cells



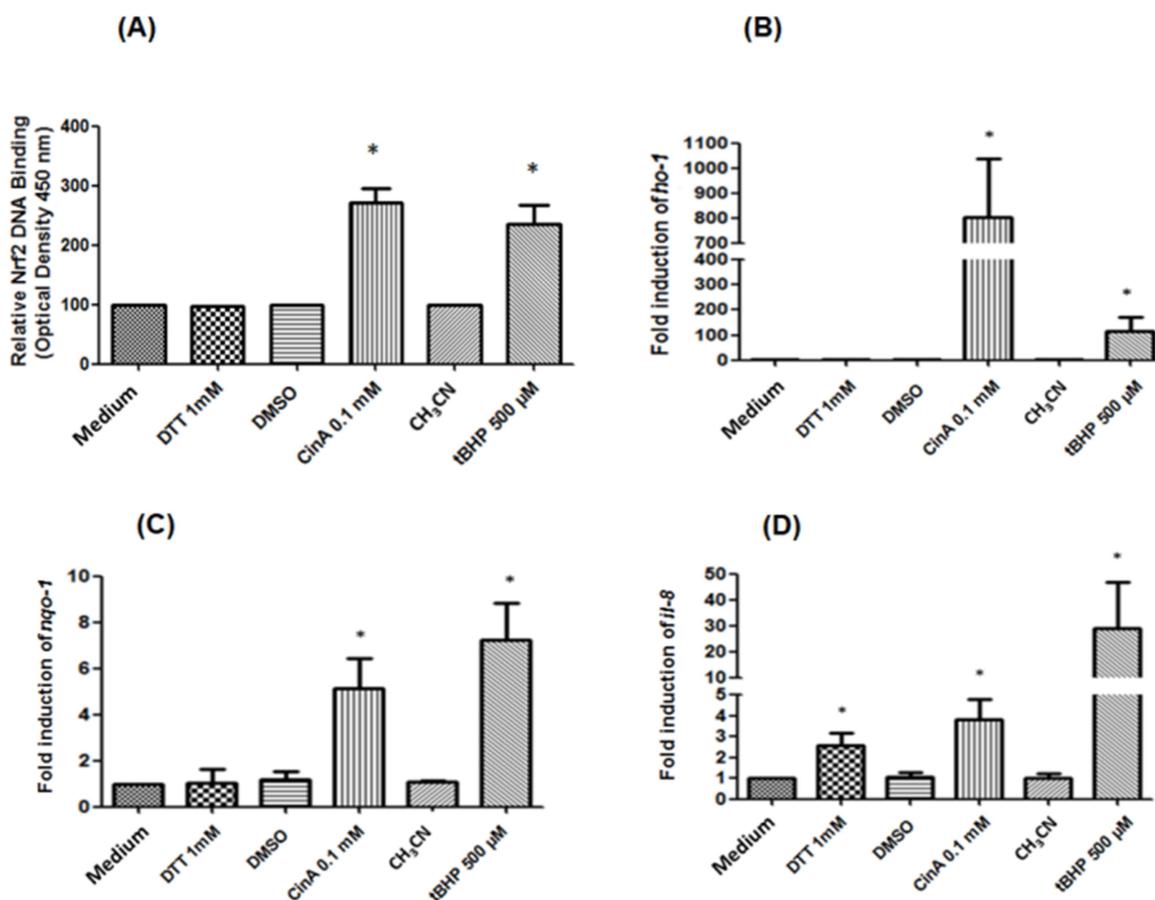


Fig. S2 Effect of positive (CinA, tBHP) and negative (DTT) controls on Nrf2/Keap1 signaling pathway. Relative Nrf2 ARE-sequences binding in THP-1 cells after exposure with chemicals (A). Optical density at 450 nm was measured by spectrophotometry as described in Materials and Methods. mRNA expression of *ho-1* (B), *nqo1* (C) and *il-8* (D) in THP-1 exposed to the selected chemicals for 6 h and analyzed by real-time PCR. Results were expressed as fold induction compared with control samples (corresponding vehicle-treated cells) and corrected by the expression of the reference genes β -actin and *gapdh* as described in Materials and Methods. Each value is the expression of the fold increase over control and is the mean \pm S.E.M of four independent experiments. Asterisks indicate a significant ($p < 0.05$) difference between chemical-treated cells and vehicle-treated cells.



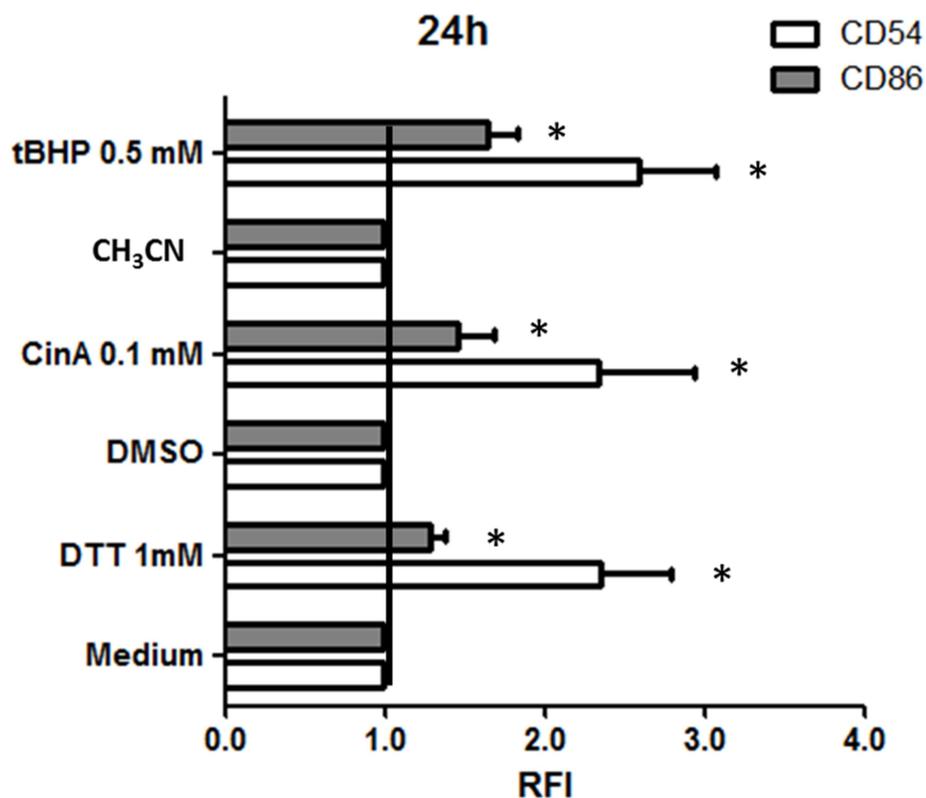


Fig. S3 Effect of positive (CinA, tBHP) and negative (DTT) controls on CD54 and CD86 expression in THP-1 cells. THP-1 cells were exposed to indicated molecules at concentration for 24 hours. Geo Mean was measured by flow cytometer as described in Materials and Methods. Each value of RFI is the mean \pm S.E.M of four independent experiments. Asterisks indicate a significant ($p < 0.05$) difference between chemical-treated cells and vehicle-treated cells.





Autres résultats complémentaires

Partie I

Colophonium, also known as colophony or rosin, is a sticky natural substance derived from pine and spruce trees, both of which are species of the family Pinaceae. It is used industrially in a great variety of common products, such as adhesives, cosmetics, and toiletries. Colophonium allergy is common, and a European study from 2015 showed that 2% of adolescents were already affected (Belloni Fortina *et al.*, 2015; Gether *et al.*, 2017). Colophony is a complex mixture of diterpene resinic acids (85-95%) and their oxidation products (Mutterer *et al.*, 2000), the major constituents being abietic acid (**Figure 45, 1**) and dehydroabietic acid (**2**). Those acids easily autoxidize on exposure to air, forming allergenic oxidation products. The hydroperoxide of abietic acid, 15-hydroperoxyabietic acid (**3**), is identified as the major allergen in colophonium (Christensson *et al.*, 2006). The hydroperoxide of dehydroabietic acid is called hydroperoxydehydroabietic acid (**4**).

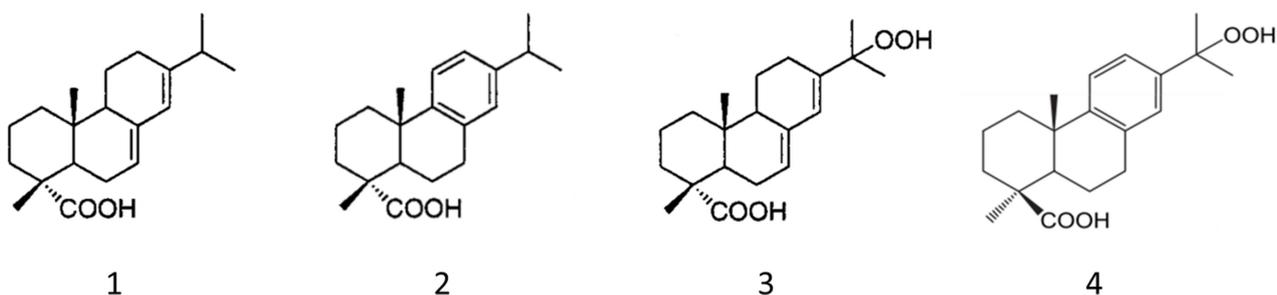


Figure 45. Major constituents of colophony and their allylic hydroperoxides

1: Abietic acid ; 2: dehydroabietic acid ; 3: 15-hydroperoxyabietic acid ; 4: 15-hydroperoxydehydroabietic acid

To better understand the interaction of 15-hydroperoxyabietic acid-like compounds with proteins, the synthesis and allergenic properties of a simplified model (**Figure 46, 5**) of 15-hydroperoxyabietic acid, based on a single cyclohexene ring containing a tertiary allylic hydroperoxide (**6**) has already been reported (Mutterer *et al.*, 2000; Lepoittevin and Karlberg, 1994). Similarly, the synthesis of a simplified model of dehydroabietic acid, called cumene (**7**) and its hydroperoxide (**8**) has been synthesized. Cumene has been shown to exhibit catabolic function (Eaton and Timmis, 1986). Both cumene hydroperoxide **8** and monocyclic model compound cyclohexene hydroperoxide **6** were sensitizers in guinea pigs, and a cross-reactivity was seen



between the 2 compounds (Christensson *et al.*, 2006). As observed with limonene and linalool hydroperoxides, cumene and monocyclic model hydroperoxides might form adducts with protein through radical mechanism. Carbon-centered reactive radicals were observed with chemical-trapping experiments with monocyclic model hydroperoxide (Mutterer *et al.*, 2000). Since a major mechanism in the cellular defense against oxidative stress is activation of the Nrf2 signaling pathway (Ade *et al.*, 2009), the main objective of this work was to investigate the activation of Nrf2 pathway by cumene, cyclohexene and their respective hydroperoxides in THP-1 cell-line at subtoxic concentration for 6h.

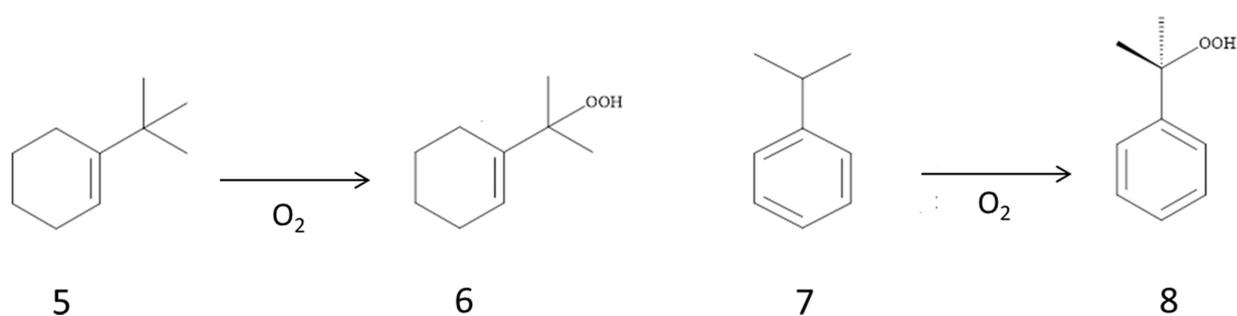


Figure 46. Simplified compounds of colophony constituents and their allylic hydroperoxides

5: 1-tert-butyl-1-cyclohexene (cyclohexene) ; 6: 1-(1-hydroperoxy-1-methylethyl) cyclohexene (cyclohexene hydroperoxide) ; 7: cumene ; 8: cumene hydroperoxide



Results

Cyclohexene and hydroperoxides of cyclohexene and cumene induce an accumulation of intracellular Nrf2

In response to an oxidative stress to the cells, the Nrf2/Keap1 pathway is activated in order to induce the synthesis of antioxidant enzymes (Dickinson *et al.*, 2004). To investigate the activation of Nrf2 pathway after terpene and hydroperoxide exposure, the accumulation of the Nrf2 protein was measured by western blot. Our results showed that Nrf2 is accumulated in response to cumene-OOH, cyclohexene and cyclohexene-OOH, in a similar way of positive control CinA (**Figure 47**). A significant difference was observed between cumene and cumene-OOH, while cyclohexene and its hydroperoxide act the same on Nrf2 accumulation.

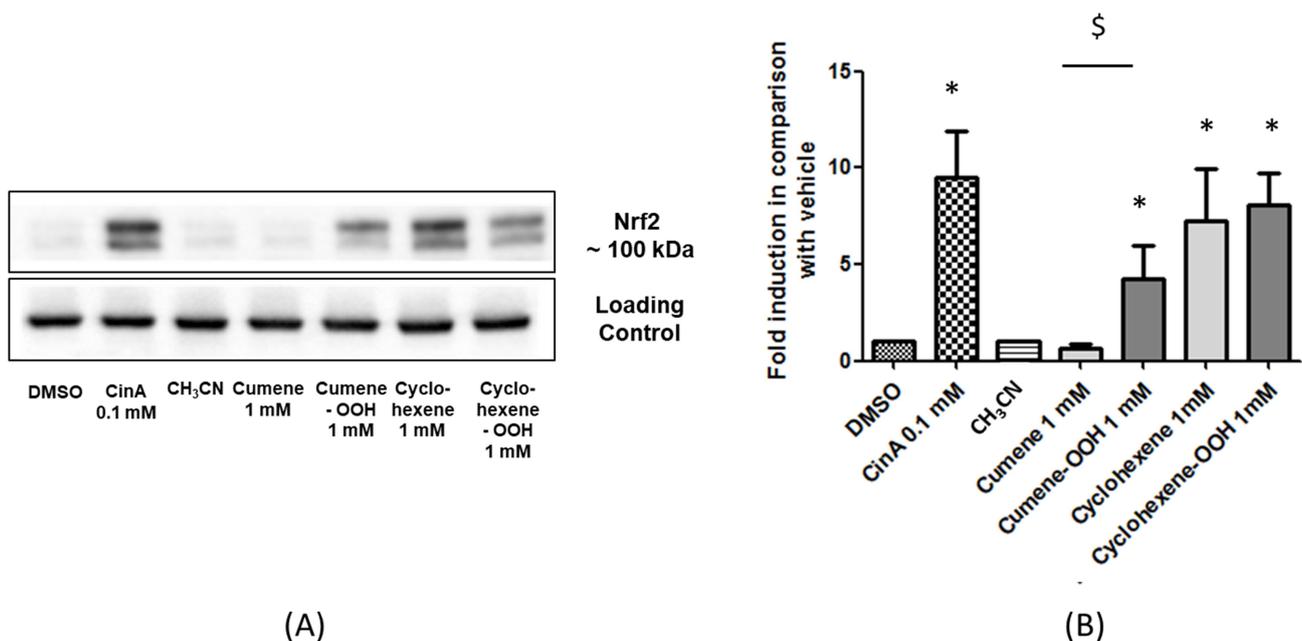


Figure 47. Effect of terpenes and hydroperoxides on Nrf2/Keap1 signaling pathway

THP-1 cells were exposed for 6h to the indicated chemicals at subtoxic concentration. (A) Representative western blot of Nrf2 expression. (B) semi-quantification of Nrf2 protein expressed as fold induction. Positive control CinA was used for this experiment. Each value is the mean \pm SEM of 4 independent experiments. Asterisks indicate a significant ($p < .05$) difference between chemical treated cells and vehicle treated cells. Dollars indicate a significant ($p < .05$) difference between both conditions.



Cyclohexene and hydroperoxides of cyclohexene and cumene induce the transcription of Nrf2 target genes

Cumene-OOH, cyclohexene and cyclohexene-OOH significantly induced the expression of *ho-1*, *nqo1*, and *il-8*, target genes of Nrf2, while cumene did not (**Figure 48**). A significant difference was observed between cumene and cumene-OOH, while cyclohexene and its hydroperoxide act the same on Nrf2 target genes expression. Cumene-OOH induced 3 times more expression of *ho-1* and about 10 times the expression of *il-8*, in a similar manner to positive control CinA.

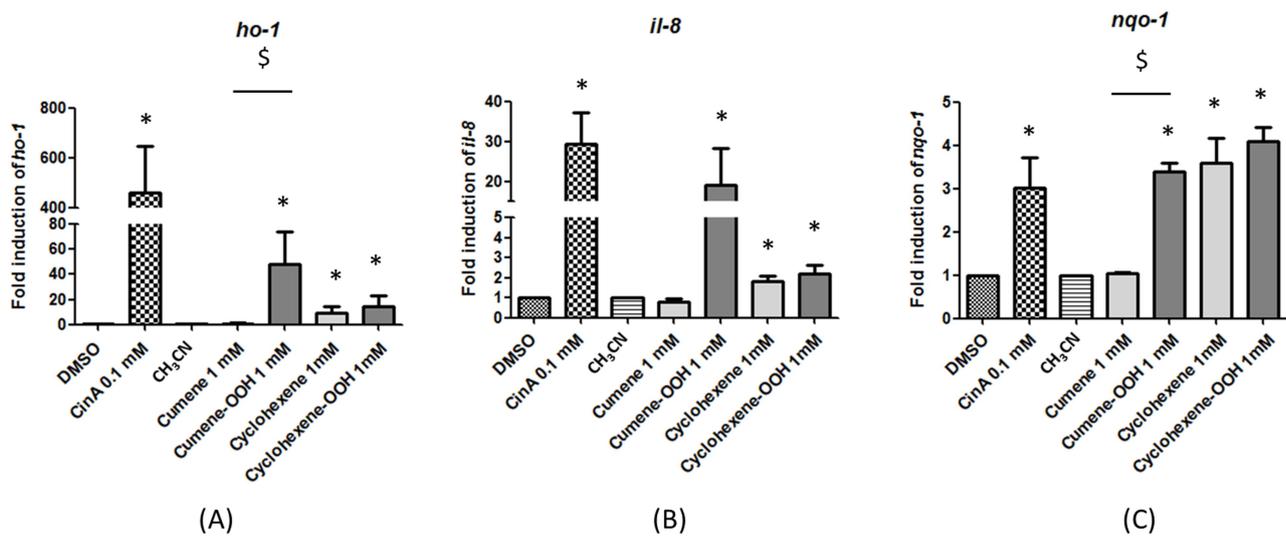


Figure 48. Effect of terpenes and hydroperoxides on Nrf2 target genes

THP-1 cells were exposed for 6h to the indicated chemicals at subtoxic concentration. Expression of *ho-1* (A), *nqo-1* (B) and *il-8* (C) was measured by real-time PCR and were expressed as fold induction compared with control samples. Each value is the mean \pm SEM of 4 independent experiments. Asterisks indicate a significant ($p < .05$) difference between chemical treated cells and vehicle treated cells. Dollars indicate a significant ($p < .05$) difference between both conditions.

Conclusion

Those preliminary results showed that both hydroperoxides induced an activation of Nrf2, as well as the cumene. We could test those compounds on THP-1 24h to measure the expression of CD54 and CD86 in order to see if those chemicals induce any maturation.



Présentation du travail

Partie II





Les KCs jouent un rôle dans la DAC : ce sont les premières cellules qui vont être en contact avec la molécule allergisante dans la peau. Ils contiennent des enzymes, telles que les cytochrome P450, qui possèdent une activité métabolique requise pour la conversion des prohaptènes en haptène immunogène. Cet haptène va ensuite se lier aux protéines pour former le complexe immunogène. Les KCs expriment également des facteurs chimiotactiques après exposition aux molécules allergisantes, incluant des chimiokines (CXCL9, CXCL10, CXCL11) et des molécules d'adhésion (ICAM-1). Ces facteurs attirent les DCs jusqu'au site d'exposition et renforcent la réponse immunitaire.

L'un des tests de sensibilisation *in vitro* validé par l'OCDE (442E) se pratique sur une lignée de KCs (HaCAT) : le KeratinoSens. Dans ce test, les molécules allergisantes sont utilisées à des concentrations subtoxiques, c'est-à-dire que la viabilité cellulaire est de 80 % après 24h d'exposition au produit. Les expositions à des produits cosmétiques se font à de faibles concentrations de molécules allergisantes, mais plusieurs fois par jour ou par semaine.

Nous cherchons à connaître l'impact de l'exposition répétée d'une molécule allergisante sur la différenciation de l'épiderme. Pour ce faire, nous utilisons un modèle 3D *in vitro*, appelé raft, composé de KCs humains spontanément immortalisés (NIKS) déposés sur une matrice de collagène et de fibroblastes humains primaires. Le milieu de culture des rafts est changé tous les deux jours pendant 18 jours. A l'issue des 18 jours, un épiderme différencié et stratifié, constitué de ses 4 couches, est obtenu.

La molécule allergisante que nous avons choisie est le cinnamaldehyde (CinA), une molécule électrophile contenue dans l'huile essentielle de cannelle et abondamment présente dans les produits cosmétiques. Le CinA est classé comme étant une molécule allergisante modérée dans le test du LLNA et fait partie des 26 allergènes qui doivent figurer sur le packaging des produits cosmétiques. Dans le but de mimer les scénari humains, nous avons choisi d'exposer les rafts tous les 2 jours à de faibles concentrations de CinA (0,1 ou 0,25 mM). Les concentrations ont été choisies suite aux résultats d'expériences de cytotoxicité (Annexine V/7AAD) réalisées au préalable sur les NIKS et les fibroblastes. Afin de mimer une exposition aiguë, les rafts ont été exposés à une forte concentration de CinA (2 mM) au jour 16.



Au bout de 18 jours, les rafts sont étudiés par immunohistochimie, western blot et RT-qPCR. Cette étude nous permet de comparer un épiderme exposé plusieurs fois à de faibles concentrations de CinA, à un épiderme non exposé, ou bien exposé à une forte concentration.

Les résultats d'immunohistochimie nous indiquent qu'une exposition répétée de CinA n'induit pas de différence importante concernant l'épaisseur de l'épiderme, l'apoptose et la prolifération cellulaire. En revanche, nous observons une augmentation de l'expression de la filaggrine, témoin de la différenciation cellulaire.

Une augmentation de l'expression de HO-1, enzyme de cytoprotection, est mesurée par immunohistochimie. Les cytokines présentes dans le milieu de culture mesurées tous les deux montrent que l'IL-6, probablement sécrétée par les fibroblastes, est induite avec un pic au jour 14.

Dans le but de caractériser les gènes cibles et les voies de signalisation spécifiques de l'exposition répétée des rafts au CinA, nous avons réalisé un microarray. Cette approche transcriptomique a été effectuée à partir des extraits d'ARN totaux et nous a permis d'obtenir l'expression des gènes correspondant à l'ensemble du génome humain. Une première analyse non supervisée sur l'ensemble de la puce a montré une homogénéité des répliquats. Les gènes exprimés de façon différentielle, avec un fold change supérieur à 1,5, et une variance faible, avec une p value inférieure à 5%, ont été regroupés dans une heat map de 1497 gènes. Cette heat map peut être divisée pour une analyse en clusters. Les fonctions des gènes associés aux clusters ont été analysées. Les gènes activés par le CinA concernent la réponse des cellules épithéliales à un xénobiotique, la différenciation des KCs et l'expression des transporteurs d'ions calciques. Ces résultats concordent avec les observations réalisées en immunohistochimie. Les gènes inhibés par le CinA sont associés à des fonctions d'adhésion à la MEC et à des constituants des jonctions intercellulaires.

En conclusion, nous pouvons affirmer qu'une exposition à de faibles concentrations de CinA impacte la différenciation de l'épiderme, par une augmentation de l'expression de la filaggrine, également témoin d'un renforcement de la fonction barrière. Les cellules sont soumises à un stress oxydant, en exprimant davantage de HO-1 et de NQO-1. Malgré le stress oxydant provoqué par le CinA, le système de défense cellulaire semble assez efficace pour empêcher l'apoptose des



cellules.





Résultats

Partie II





Article II

Activation of keratinocytes in response to repeated-exposure of a cosmetic sensitizer in a 3D skin model

In process

Chloé Raffalli, Agnieszka Jaracz-Ros, Florent Dumont, Françoise Gaudin, Claudine Deloménie, Carmen Gallego, Marc Pallardy, Géraldine Schlecht-Louf, Françoise Bachelerie, Saadia Kerdine-Römer

Les KCs sont les principales cellules qui constituent l'épiderme. Ce sont les premières cellules qui vont rencontrer les substances chimiques dans la peau et elles jouent un rôle dans la DAC. Nous nous sommes demandé quelle serait l'influence d'une molécule chimique sur le processus de différenciation de l'épiderme. Un modèle 3D appelé raft, composé de KCs (les cellules de lignée cellulaire NIKS) mis en culture sur une matrice constituée de collagène et de fibroblastes primaires a été exposé de façon répétée au CinA. Le CinA est une molécule électrophile bien connue, incluse dans la liste des 26 allergènes qui doivent être indiqués sur le packaging des produits cosmétiques. Pendant la différenciation de l'épiderme, les rafts ont été exposés à de faibles concentrations de CinA (0,1 mM et 0,25 mM) un jour sur deux pendant 18 jours. A la fin de la différenciation, l'épiderme a été analysé par immunohistochimie, western blot et RT-qPCR. Un microarray a été réalisé dans le but de découvrir de nouvelles voies de signalisation et de proposer de nouveaux gènes d'intérêt en réponse à l'exposition répétée de CinA. Les résultats montrent que l'exposition répétée à des faibles doses de CinA n'induit pas d'augmentation de l'épaisseur de l'épiderme, ni d'apoptose et de prolifération cellulaire. Cependant, l'expression de la filaggrine, de HO-1 et de NQO-1 est augmentée, ce qui nous permet de suggérer que la barrière cutanée est renforcée et qu'une réponse à un stress oxydant apparaît. Les résultats du microarray ont montré que les gènes activés par le CinA sont en lien avec le développement de l'épiderme, la cornification et le transport des ions calcium. *A contrario*, les gènes les moins exprimés sont ceux qui codent pour des protéines impliquées dans l'adhésion à la membrane basale et les jonctions cellulaires.





Activation of keratinocytes in response to repeated-exposure of a cosmetic sensitizer in a 3D skin model

In process

Chloé Raffalli¹, Agnieszka Jaracz-Ros¹, Florent Dumont², Françoise Gaudin³, Claudine Deloménie², Carmen Gallego¹, Marc Pallardy¹, Géraldine Schlecht-Louf¹, Françoise Bachelier¹, Saadia Kerdine-Römer¹

¹Univ Paris Sud, INSERM UMR-S 996, Université Paris-Saclay, 92290 Châtenay-Malabry, France ;

²IPSIT – Plateforme Trans-Prot – Université Paris-Sud - 5 rue Jean-Baptiste Clément 92296, Châtenay-Malabry, France ;

³IPSIT – Plateforme d’Histologie Expérimentale – 32 rue des Carnets 92140, Clamart, France

Abstract

Keratinocytes (KCs) are the main cells that constitute the epidermis. They are the first cells that encounter the chemicals in the skin, playing a role in Allergic Contact Dermatitis (ACD). We wonder how repeated exposure of a chemical could influence the differentiation process of the epidermis. A 3D raft model composed of KCs (NIKS cell-line) cultured on a matrix of collagen and primary human fibroblasts was repeatedly-exposed to cinnamaldehyde (CinA). CinA is a well-known electrophilic compound, included in the 26 allergens that need to be labelled on the packaging of cosmetic products. During epidermis differentiation, we exposed the rafts with low concentration (0.1 or 0.25 mM) of CinA every other day during 18 days. At the end of the differentiation, epidermis was analyzed by immunohistochemistry, western blot and RT-qPCR. A microarray was performed to highlight new canonical pathways and to propose new genes of interest. Our results show that repeated-exposure of rafts with CinA did not induce an enhance epidermis thickness, neither cellular apoptosis nor proliferation. However, the expression of filaggrin, HO-1 and NQO-1 is increased, letting us suggest that a strengthening of the skin barrier function and an oxidative stress response occurs after CinA exposure. The results of the microarray showed that genes activated by CinA are related to epidermis development, cornification and calcium ion transport. *A contrario*, we measured a lack of activated genes coding for adhesion to basement membrane and cell junctions.





Introduction

One of the principal roles of the skin is to protect against external factors, such as temperature, chemicals and moderate mechanical pressures (Fuchs, 2016). This organ is exposed to a wide variety of chemicals, whether associated with intended use or misuse from high exposure through single or repeated use. Consequently, skin needs to process a wide variety of chemicals to which individuals are exposed as part of everyday lives, such as cosmetic products.

Cosmetic products have been made for thousands of years from a variety of substances derived from plants, animals and mineral sources. Modern technology has added an important number from synthetic and semi-synthetic origin. In practice, cosmetic products have rarely been associated with serious health hazards, which, however, does not mean that cosmetics are safe in use *per se* (Scientific Committee on Consumer Safety, 2011). Particular attention is needed for long-term safety aspects, since cosmetic products may be used extensively over a large part of the human lifespan and sensitive groups of the population may be involved. This is why the evaluation of cosmetic products safety and their ingredients is a concern.

Safety evaluation of cosmetic products and their ingredients is currently facing a major challenge in Europe. Since 2004, EU law bans the sale of any cosmetic product in finished form tested on animals, as well as cosmetics containing ingredients subject to new animal testing since 2013. Therefore, the development of innovative *in vitro* methods that reproduce the physiological functionality of specific human organs has become essential and must continue in order to face the current challenges for risk assessment purposes. Skin *in vitro* models that emulate metabolic mechanisms in skin have been developed and still require refinement.

Immortalized cell-lines such as HaCaT or primary cells such as normal human epidermal keratinocytes (NHEK) have been used in co-culture with other cell types (Hennen and Blömeke, 2016) in an attempt to reproduce some of the biological responses observed in skin *in vivo*. A disadvantage of these cell systems is that they grow as monolayers, which may lead to differences in compound distribution and metabolic competence when compared with intact skin. As a result, to mimic skin in an *in vitro* environment, models have been developed over the past 20 years to reproduce a 3D structure. 3D skin models have been used extensively for skin penetration studies (Lombardi et al., 2008; Rozman et al., 2009) and validated for assessment of skin corrosion and



Article II

skin irritation potential (El Ghalbzouri et al., 2008; Kandarova et al., 2005, 2006; Katoh et al., 2010). Recent studies have also tried to link cell viability and cytokine secretion in these models to the sensitizing potential of chemicals (dos Santos *et al.*, 2011; Gibbs *et al.*, 2013).

We address the concerns about long-term repeated-dose toxicity of cosmetic compounds. Since, consumers of cosmetic products are exposed to low concentrations of cosmetics but several times a day or a week, we address the impact of those compounds on the skin. We focused on the epidermis differentiation, since this process is of major importance for skin barrier integrity (Wikramanayake *et al.*, 2014).

Here we have used an organotypic raft cultures skin model to study the metabolic clearance of cinnamaldehyde (CinA). We chose the CinA since it is a well-known electrophilic compound, extracted from cinnamon and included in the 26 allergens that need to be labelled on the packaging of cosmetic products (Figure 1). A 3D RAFT model composed of KCs (NIKS cells) cultured on a matrix of collagen and primary human fibroblasts was used and exposed to CinA. In contrast to HACAT cells, NIKS cells more closely resembled the differentiation pattern of primary keratinocytes (Allen-Hoffmann *et al.*, 2000). We worked with low (chronic exposure, 0.1 mM & 0.25 mM) or high (acute exposure, 2 mM) concentrations. Results showed that multiple exposures to CinA seem to impact epidermis differentiation by strengthening its barrier function. At low doses of CinA, oxidative stress occurs since HO-1 and NQO-1 expression is measured, but the defense system of the cell is strong enough to avoid apoptosis.



Materials and Methods

Cell-culture

NIKS cells, near-diploid spontaneously immortalized human keratinocytes (Allen-Hoffmann *et al.*, 2000) (kindly provided by Dr Paul F. Lambert), were maintained at subconfluence on mitomycin C-treated 3T3-J2 feeder cells (kindly provided by Dr Paul F. Lambert) in F medium with all supplements as previously described (Lambert *et al.*, 2005). Primary human foreskin fibroblasts (kindly provided by Dr Paul F. Lambert) were cultured in Ham's F12 medium containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin, before use in raft cultures.

Measurement of cell viability

Cinnamal (CinA, CAS number: 104-55-2) and dimethyl sulfoxide (DMSO, CAS number: 67-68-5) were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin- Fallavier, France). Several concentrations were tested on NIKS cells and fibroblasts to assess cell viability after 24h of treatment using 7-AAD and Annexin V staining according to the manufacturer's protocol (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) (data not shown). Cell viability was measured using the FL-3 wavelength on a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Data acquisition was performed using the CellQuest software (Becton Dickinson). According to these results, two concentrations were selected, inducing no more than 30% cytotoxicity: 0.1 and 0.25 mM. For acute exposure, we selected the highest concentration possible that avoids solubility issues.

Organotypic rafts cultures

NIKS cells were grown in raft cultures to induce the three-dimensional architecture of the stratified epithelium, as described previously (Lambert *et al.*, 2005; Meuris *et al.*, 2016). Briefly, 1.5×10^6 NIKS cells were seeded onto a dermal equivalent composed of rat-tail collagen type 1 containing 1×10^6 human foreskin fibroblasts (Figure 2). Raft cultures were lifted onto transwell inserts submerged in deep well plates containing keratinocyte plating medium and cultured for 4 days. The transwell inserts were then raised by placing four cotton pads underneath them, thereby exposing the epithelial cells to the air-liquid interface. Raft cultures were fed by diffusion from below with cornification medium and were allowed to stratify for 14 days, the culture medium was changed every other day. AMD3100 (A5602, Sigma-Aldrich) was added to the



Article II

cornification medium at a concentration of 20 µg/mL from day 4 to the end of the experiment. Rafts were then removed from transwell inserts and either fixed in formalin and embedded in paraffin for histological analyses, or frozen at -80°C for quantitative real-time PCR and western blot analyses.

Chemical treatment

From day 4, during epidermis differentiation, CinA (0.1 or 0.25 mM) was added to the culture medium and renewed every other day. For acute exposure, CinA (2 mM) was added at day 16, in order to stimulate the cells for 2 days.

Western blot

NIKS cells from monolayer cultures or rafts cultures were resuspended in protein lysis buffer (1% Triton X-100, 10mMTris-HCl pH 7.4, supplemented with Protease and Phosphatase Inhibitor Tablets (Pierce). Total protein concentration was evaluated using bicinchoninic assay, 30 mg of denatured proteins were loaded on polyacrylamide gels (TGX Stain-Free FastCast; Bio-Rad Laboratories, Hercules, California). Stain-free gels were activated. Proteins were transferred to PVDF membrane (Bio- Rad Laboratories). Total proteins on membranes were detected using the Stain-free method (Gilda and Gomes, 2013). Primary antibodies were as follows: anti-filaggrin (ab81468, abcam), anti-cytokeratin 5 (ab128190, abcam), anti-cytokeratin 16 (ab76416, abcam), anti-cytokeratin 10 (ab9026, abcam), ho-1 (ab13248, abcam), nqo-1 (ab28947, abcam) and Nrf2 (66504-1-Ig, Proteintech).

Immunohistochemistry

Raft paraffin sections (5-µmthick) were stained with hematoxylin and eosin (HE). Immunohistochemistry was performed on paraffin sections using primary antibodies for cytokeratin 10 (ab9026, abcam), filaggrin (ab218395, abcam), ki67 (ab16667, abcam), cytokeratin 5 (ab17130, abcam), cytokeratin 16 (ab80574, abcam). Bound antibodies were detected using the LSAB +/HRP kit (Dako). For immunofluorescence, staining with the primary antibody for cytokeratin 5, 10 and 16 was followed by staining with a goat anti-mouse Alexa Fluor 596 (Invitrogen). Tissues were counterstained with DAPI. For the TUNEL assay to detect apoptotic cells, we used the In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (11684795910, Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions.



Images analysis

Slides were scanned by the digital slide scanner NanoZoomer 2.0-RS (Hamamatsu) allowing an overall view of the samples. Images were digitally captured from the scanned slides using the NDP.view2 software (Hamamatsu). All quantifications from the histological analyses were performed by counting 10 different fields on the scanned slides.

Extraction and purification of total RNA

The Macherey Nagel kit was used to extract the RNA and the manufacturer protocol was followed. RNA purity and quantity was assessed by UV measurement using a BioMate 3S UV-Visible (Thermo Scientific™) spectrophotometer. RNA integrity evaluated by capillary electrophoresis using RNA 6000 Nano chips and the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) revealed RIN (RNA Integrity Number) values of 7.5 ± 1 , thus lower than RIN threshold usually considered as acceptable.

Gene expression profile analysis

Hybridization of microarrays

A global gene expression analysis was performed from 3 biological replicates of 8-treated or untreated cultures, using 8x60k SurePrint G3 Unrestricted human whole genome oligo microarrays (Agilent Technologies). Target preparation and hybridization were done according to the manufacturer's instructions (Agilent Technologies). Briefly, 200 ng of total RNA from each sample was labeled with Cy3-CTP using the Low Input Quick Amp Labeling Kit, monocolor. Internal standards were derived from the One-color RNA Spike-in Kit. The labeled targets were purified using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen) and their quality and quantity were confirmed by spectrophotometry and by the Bioanalyzer 2100 technology (Agilent Technologies). 600 ng of each labeled cRNA target was incubated on microarray slides at 65°C for 17 hours. After washing, slides were scanned using the Microarray Scanner (G2565CA, Agilent Technologies) at 3- μ m resolution and at high and low photomultiplier voltages to optimize the dynamic range of image quantification. The data were extracted from these images using the Agilent Feature Extraction 10.7.3.1 software.



Article II

Rawdata and preprocessing

Images and rawdata file were generated using Feature Extraction software from Agilent (version 10.10.1.1). We obtained one rawdata file by sample in .txt format. We used the “green processed signal” value as rawdata. This value corresponds to the rawdata signal for which a multiplicative detrending algorithm was applied to compensate the slight linear variations in intensities. Those intensities can occur if the processing is not homogeneous across the slide [Agilent Feature Extraction Software (v10.5) Reference Guide].

We assure that all QC metrics were validated to save from technical artefact according to Agilent requirements. Rawdata were then quantile normalized and log₂ transform to obtain the normalized matrix data. Rawdata will be accessible on Gene expression Omnibus database (GEO-NCBI).

Statistical analysis

First, to save from biological outliers (or technical bias prior to chip experiment or RNA extraction), we made an unsupervised analysis (taking into account all sample and genes): we applied principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering (Pearson’s dissimilarity and average linkage) on normalized data. This step confirms the data quality and we did not have to remove any sample for the downstream analysis.

To find differentially expressed genes through our three treatments, we applied a one way analysis of variance (ANOVA) for each gene and made pairwise Tukey’s post hoc tests between groups. We also compute fold-change (ie mean ratios) between groups.

Then, we used p-values and fold-changes to select genes of interest. We filtered genes with p-value <0.05 and fold-change >1.5 (or < -1.5) in at least one of our three comparison. We obtained 3 lists of differentially expressed genes (DEGs) with respectively for each comparison 473 genes for CinA 0.1 mM vs DMSO, 798 genes CinA 0.25 mM vs DMSO and 409 genes for CinA 0.25 mM vs CinA 0.1 mM.

We gathered these 3 lists to obtain a final gene expression signature of 1497 unique genes that discriminates our three phenotypes.



Article II

Clustering analysis

With the aim to find pairwise correlated genes that could improve discrimination between groups and downstream analysis (see functional analysis below for more explanation), we decided to find clusters among our 1497 genes signatures using unsupervised classification methods. We used a hierarchical clustering (Pearson's dissimilarity and average linkage) and applied a cutoff at 0.5 in order to cut the dendrogram. We then obtained 12 clusters that could have more relevant physiological traits according to our phenotype.

Pearson's dissimilarity is defined as $1-r/2$ where r is the pearson correlation coefficient.

Functional analysis

In order to find functions or regulators involved in our different phenotypes, we carried out enrichment analysis for all lists of interest through the use of IPA (Ingenuity® Systems, USA www.ingenuity.com) and Pathway Studio (Ariadne Genomics).

We used fisher's exact test to find best enriched pathways and functions. All pvalues were log transformed to sort and display the results. We consider as significant all pathways or functions with pvalues < 0.05 ($-\log_{10}(p) > 2$).

Data accession

All data obtained by microarray analysis will be submitted on GEO NCBI site.



Results

Repeated exposure of CinA did not importantly modify epidermis thickness and apoptosis

In order to evaluate the impact of repeated exposure of CinA during skin differentiation, we treated the rafts with 2 different concentrations of CinA every other day. At the end of the differentiation, we analyzed and measured the epidermis thickness and study the percentage of apoptotic cells. We quantified apoptotic cell numbers in raft sections by TUNEL assay. Results showed a small increase of percentage of apoptotic cells after treatment with CinA 0.25 mM: from 8 % to 18 % (Figure 3A). In comparison, acute exposure of CinA at a high dose (2mM), showed a percentage of apoptotic cells of 36 %. Those results were the mean of 3 rafts. We compared full-thickness skin equivalents treated by CinA and vehicle. A small increase of epidermis thickness was also observed: an increase of 20 % and 35% after 0.1 and 0.25 mM of CinA exposure respectively in comparison with vehicle (Figure 3B). The epidermis thickness of rafts treated with 2 mM of CinA was decreased of 42 %. Repeated exposure of CinA did not modify the skin thickness compared to the vehicle (DMSO 0.1%). However, acute exposure of CinA (2 mM) induced a decrease of epidermis thickness and more apoptosis. Since a small increase of epidermal thickness was observed after CinA exposure, to evaluate the effect of CinA on cell division, rafts paraffin sections were stained with an antibody to Ki67. Ki67 is a marker that is present in cells during essentially all phases (G1-, S-, M- and G2) of the cell cycle, but is absent from resting cells (G(0)), makes it an excellent marker for determining the so-called growth fraction of a given cell population. Immunohistochemical analyses of Ki-67 in raft cultures indicated a slight enhanced of cellular proliferation in the basal compartment of CinA and a higher overall proportion of (Ki-67-positive) cells in cycle (Figure 3C).

CinA alters differentiation of KCs

CinA treated rafts exhibited an increase of expression of keratin filament-associated filaggrin protein in the granular layer, a marker of epidermal differentiation. Filaggrin is a key protein for the epidermal barrier (McGrath and Uitto, 2008; Sandilands *et al.*, 2009). It aggregates keratins and it is cross-linked to cornified envelopes. We observed an enhanced expression of filaggrin immunohistological analysis of rafts treated with CinA 0.1 and 0.25 mM in comparison with vehicle (Figure 4A). These results suggest that the repeated exposure of CinA on rafts lead to an alteration



of differentiation of the suprabasal layers of the epidermis. Results of enhanced proliferation are confirmed with the staining of keratin 10. Keratin 10 is only expressed during cornification of epidermis, meaning its staining would be in the spinous and granular layers. Results of keratin 10 staining showed a thicker basal layer with rafts treated with CinA 0.25 mM in comparison with vehicle and CinA 0.1 mM treatment (Figure 4B). Otherwise, treated rafts exhibited normal expression patterns for keratin 5, a prominent marker of epidermal differentiation in the basal layers (Alam *et al.*, 2011) (Figure 4C). Treated rafts also exhibited normal expression patterns for keratin 16, a functionally important component of a genetic network regulating danger signals and innate immunity (Figure 4D).

CinA repeated exposure induced il-6 secretion

To further validate the effect of CinA on rafts, the culture medium were harvested every other day and assessed for a subset of 6 cytokines (IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-8, MCP-1 and TNF- α), using multi-analytes flow assays. 3 out of 6 proteins were detected in the medium culture: IL-8, MCP-1 and IL-6 (data not shown). Only IL-6 was differentially expressed between CinA-treated and vehicle-treated rafts. Over time, IL-6 secretion tended to increase in comparison with vehicle, with a peak at day 14 and then it decreased (Figure 5). Repeated-exposure of CinA on rafts lead to an inflammatory response.

CinA induced an oxidative stress on rafts

We investigated if the changes in differentiation capability could be attributed to an oxidative stress. In response to an oxidative stress to the cells, the Nrf2/Keap1 pathway is activated in order to induce the synthesis of cytoprotective and detoxification enzymes such as HO-1 and NQO-1 (Migdal *et al.*, 2013). CinA has been reported to induce an antioxidative effect (Hong *et al.*, 2016). Expression of ho-1 was predominantly situated in granular layer of rafts and highly expressed in response to CinA in comparison with vehicle (Figure 6A). Western blot analysis of NQO-1 and NRF2 accumulation showed a higher expression of those proteins in rafts treated with CinA compared to vehicle (Figure 6B and C). Those measurements mean that an oxidative stress is induced by repeated-exposure of CinA in rafts.



Microarray chip analysis showed a segregation between KCs treated with CinA 0.25 mM and the other conditions

As the major goal of our work was to get a better understanding of which molecular pathways might be affected by CinA, we investigated the gene expression profiles of 3 rafts treated with vehicle, 2 rafts treated with CinA 0.1 mM and 3 rafts treated with CinA 0.25 mM. We first did a no-supervised analysis as a quality control of the experiment: 3 CinA 0.25 mM triplicates gathered, meaning that CinA 0.25 mM repeated-exposure induced the same gene expression on rafts. It also meant that the transcriptome was more influent with 0.25 mM CinA than 0.1 mM (Figure 7A).

We did a comparison of gene expression in cells treated with vehicle (DMSO) vs CinA 0.1 mM or CinA 0.25 mM and also CinA 0.1 mM vs CinA 0.25 mM. Only genes with a fold change ≥ 1.5 and a p-value ≤ 0.05 were analyzed. We obtained 3 lists of genes that was gathered in a heat map (Figure 7B).

CinA multi-exposure induced significant expression of 1497 genes that could be divided in 12 clusters

The heat map was divided into 12 clusters in order to make a finer analysis and to find new canonical pathways and genes functions associated with smaller gene lists (Figure 8A). We can see that genes activated in response to CinA 0.25 mM and inhibited in response to the vehicle (cluster 1, 2 and 3) are correlated with epidermis development, response to a toxic substance and calcium ion transport (Figure 8B). Those results are in correlation with the enhanced filaggrin expression.

Expression of genes basement membrane, cell-matrix adhesion, cell junction assembly and extracellular matrix was significantly decreased in all cells that were treated with CinA. It meant epidermis might be less encored to the basement membrane.



Discussion

Most of topically applied products are designed to be used on a regular basis or at least for a few cycles of application before the desired effects are obtained. Whilst repeat product application is considered at the clinical trial stage, repeat dosing studies are not frequently performed during early *in vitro* investigations.

CinA is a major component of the European standard series contact allergen “Fragrance Mix,” which is the most common organic allergen in humans and is second only to nickel in epidemiological studies reporting the frequency of human patch test positives (González-Muñoz *et al.*, 2014). However, the investigation of the mechanisms underlying the effect on the skin induced by chronic (low level) CinA exposure is difficult due to the lack of suitable *in vivo* and *in vitro* models. Consequently, the development of cell culture-based 3D models which strongly resemble the human skin tissue is of high interest. Noteworthy, so-called organotypic cultures or skin equivalents have been shown to reflect the basic elements of normal human skin development (Weinmuellner *et al.*, 2017) and were used successfully over the last years to study the impact of diverse allergenic compounds (Galbiati *et al.*, 2017; Corsini *et al.*, 2016). One problem associated with conventional cell culture models, however, is that primary keratinocytes have a limited proliferative capacity *in vitro* and, thus, are not suited for long-term chemical exposure studies (Arnette *et al.*, 2016). Hence, we here used a spontaneously immortalized, primary-like cell-line (NIKS cells), in order to reproduce organotypic skin cultures, on a matrix of collagen and fibroblasts. In contrast to spontaneously immortalized HaCaT cells, these skin equivalents were characterized by a multi-layered epidermis including a *stratum corneum* (Allen-Hoffmann *et al.*, 2000). In addition, early as well as late differentiation marker patterns were comparable to those of skin equivalents built with primary keratinocytes, suggesting that this model cell-line resembles the behavior of primary cells.

In this study, we demonstrated that repeat low dosing of CinA on a 3D skin model during 18 days did not kill the cells, neither induced an important enhance of the thickness, but definitely impacted the differentiation of the cells with the increase of filaggrin expression. It may demonstrate skin barrier function reinforcement.



Article II

Some studies revealed the role of Nrf2 in skin, with an enhanced expression in KCs cell-type (Schäfer *et al.*, 2012). HO-1 is a cytoprotective enzyme whose gene expression is regulated by Nrf2. We found its overexpression in KC raft cultures treated with CinA in the suprabasal layers. Those results correlate with a study realized on normal human epidermal keratinocytes (NHEKs), saying that NQO-1, another enzyme whose gene expression is regulated by Nrf2, was induced at late stage of differentiation (Piao *et al.*, 2011). It correlates too with a study realized on mice saying that a gradient of Nrf2 occurs from suprabasal to basal layers (Schäfer *et al.*, 2010).

The hypothesis that cells' release of inflammatory cytokines could be maintained or even enhanced after repeated exposures to a model skin sensitizer has been suggested. In our experiments, IL-6 secretion by fibroblasts tended to increase in comparison with vehicle, with a peak at day 14 and then it decreased. It was described that IL-6 promotes human epidermal KCs proliferation and keratin cytoskeleton reorganization in culture (Hernández-Quintero *et al.*, 2006). Recent studies revealed that Nrf2 induced a stimulating effect on epithelial cell proliferation through an IL-36 γ pathway. In particular, IL-36 γ induces the expression of keratinocyte mitogens in fibroblasts, through its secretion of IL-6 (Kurinna *et al.*, 2016).

Our results demonstrate that repeated exposure of CinA fosters a keratinocyte environment to induce the expression of genes coding for proteins with a role in cornification, epidermis development, keratinization and calcium ion transport. These findings in CinA-treated rafts correlate with filaggrin over expression and enhanced KC proliferation. These results are especially relevant because calcium has been described as a regulator of skin differentiation (Bikle *et al.*, 2012).

On the other hand, a decrease of the expression of genes coding for cell-matrix adhesion proteins or cell-junction assembly, might lead to a less anchoring of the cells into the basement membrane. It also correlates with the heterogeneity of the basal cells divisions.

In summary, repeated exposure to CinA seems to impact epidermis differentiation by strengthening its barrier function and enhancing KCs proliferation. At low doses of CinA, oxidative stress occurs since HO-1 expression is observed, but the defense system of the cell is strong enough to avoid apoptosis.



Article II

Some limit of the model can be highlighted. Recent studies demonstrated that the stratum corneum of *in vitro* cultured models differ from native skin in terms of lipid composition and spatial organization. Thus, we did not measure il-18 while it's described in other 3D skin models, containing, primary KCs so maybe NIKS cells do not express il-18 (Galbiati *et al.*, 2017). But the problem with primary KCs is the inter-donor variability that we don't have with cell-line.



References

- Alam, H., Sehgal, L., Kundu, S.T., Dalal, S.N., and Vaidya, M.M. (2011) Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells. *Mol. Biol. Cell*, **22**, 4068–4078.
- Allen-Hoffmann, B.L., Schlosser, S.J., Ivarie, C. a, Sattler, C. a, Meisner, L.F., and O'Connor, S.L. (2000) Normal growth and differentiation in a spontaneously immortalized near-diploid human keratinocyte cell line, NIKS. *J. Invest. Dermatol.*, **114**, 444–455.
- Arnette, C., L, K.J., Hoover, P., S, G., and J, G.K. (2016) In vitro model of the epidermis: Connecting protein function to 3D structure. *Methods Enzymol.*, **569**, 287–308.
- Bikle, D.D., Xie, Z., and Tu, C.-L. (2012) Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.*, **7**, 461–472.
- Corsini, E., Roggen, E., Galbiati, V., and Gibbs, S. (2016) Alternative Approach for Potency Assessment: In Vitro Methods. *Cosmetics*, **3**, 1–9.
- Fuchs, E. (2016) Epithelial Skin Biology: Three Decades of Developmental Biology, a Hundred Questions Answered and a Thousand New Ones to Address. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **116**, 357–374.
- Galbiati, V., Papale, A., Marinovich, M., Gibbs, S., Roggen, E., and Corsini, E. (2017) Development of an in Vitro Method To Estimate the Sensitization Induction Level of Contact Allergens. *Toxicol. Lett.*, **271**, 1–11.
- Gibbs, S., Corsini, E., Spiekstra, S.W., Galbiati, V., Fuchs, H.W., DeGeorge, G., Troese, M., Hayden, P., Deng, W., and Roggen, E. (2013) An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **272**, 529–541.
- Gilda, J.E. and Gomes, A. V. (2013) Stain-free total protein staining is a superior loading control to b-actin for western blots. *Anal. Biochem.*, **440**, 186–188.
- González-Muñoz, P., Conde-Salazar, L., and Vañó-Galván, S. (2014) Allergic Contact Dermatitis Caused by Cosmetic Products. *Actas Dermosifiliogr.*, **105**, 822–832.



Article II

- Hennen, J. and Blömeke, B. (2016) Keratinocytes improve prediction of sensitization potential and potency of chemicals with THP-1 cells 1. *ALTEX*, 1–19.
- Hernández-Quintero, M., Kuri-Harcuch, W., González Robles, A., and Castro-Muñozledo, F. (2006) Interleukin-6 promotes human epidermal keratinocyte proliferation and keratin cytoskeleton reorganization in culture. *Cell Tissue Res.*, **325**, 77–90.
- Hong, S.H., Ismail, I.A., Kang, S.M., Han, D.C., and Kwon, B.M. (2016) Cinnamaldehydes in Cancer Chemotherapy. *Phyther. Res.*, **30**, 754–767.
- Kurinna, S., Muzumdar, S., Köhler, U.A., Kockmann, T., auf dem Keller, U., Schäfer, M., and Werner, S. (2016) Autocrine and Paracrine Regulation of Keratinocyte Proliferation through a Novel Nrf2–IL-36 γ Pathway. *J. Immunol.*, **196**, 4663–4670.
- Lambert, P.F., Ozbun, M.A., Collins, A., Holmgren, S., Lee, D., and Nakahara, T. (2005) Using an immortalized cell line to study the HPV life cycle in organotypic ‘raft’ cultures. *Methods Mol. Med.*, **119**, 141–155.
- McGrath, J.A. and Uitto, J. (2008) The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. *Trends Mol. Med.*, **14**, 20–27.
- Meuris, F., Carthagena, L., Jaracz-Ros, A., Gaudin, F., Cutolo, P., Deback, C., Xue, Y., Thierry, F., Doorbar, J., and Bachelier, F. (2016) The CXCL12/CXCR4 Signaling Pathway: A New Susceptibility Factor in Human Papillomavirus Pathogenesis. *PLoS Pathog.*, **12**, 1–25.
- Migdal, C., Botton, J., El Ali, Z., Azoury, M.E., Guldemann, J., Giménez-Arnau, E., Lepoittevin, J.P., Kerdine-Römer, S., and Pallardy, M. (2013) Reactivity of chemical sensitizers toward amino acids in Cellulo plays a role in the activation of the Nrf2-ARE pathway in human monocyte dendritic cells and the THP-1 cell line. *Toxicol. Sci.*, **133**, 259–274.
- Piao, M.S., Choi, J.Y., Lee, D.H., Yun, S.J., Lee, J.B., and Lee, S.C. (2011) Differentiation-dependent expression of NADP(H):Quinone oxidoreductase-1 via NF-E2 related factor-2 activation in human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.*, **62**, 147–153.
- Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A.D., and McLean, W.H.I. (2009) Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J. Cell Sci.*, **122**, 1285–1294.



Article II

dos Santos, G.G., Spiekstra, S.W., Sampat-Sardjoepersad, S.C., Reinders, J., Scheper, R.J., and Gibbs, S. (2011) A potential in vitro epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency. *Toxicol. Vitr.*, **25**, 347–357.

Schäfer, M., Dutsch, S., Navid, F., Schwarz, A., Johnson, D.A., Johnson, J.A., and Werner, S. (2010) Nrf2 establishes a glutathione-mediated gradient of UVB cytoprotection in the epidermis. *Genes (Basel)*., **24**, 1045–1058.

Schäfer, M., Farwanah, H., Willrodt, A.H., Huebner, A.J., Sandhoff, K., Roop, D., Hohl, D., Bloch, W., and Werner, S. (2012) Nrf2 links epidermal barrier function with antioxidant defense. *EMBO Mol. Med.*, **4**, 364–379.

Scientific Committee on Consumer Safety (2011) Scientific committee on consumer safety on fragrance allergens in cosmetic products. *Eur. Comm.*, 0–136.

Weinmuellner, R., Kryeziu, K., Zbiral, B., Tav, K., Schoenhacker-Alte, B., Groza, D., Wimmer, L., Schosserer, M., Nagelreiter, F., Rösinger, S., *et al.* (2017) Long-term exposure of immortalized keratinocytes to arsenic induces EMT, impairs differentiation in organotypic skin models and mimics aspects of human skin derangements. *Arch. Toxicol.*, 1–14.

Wikramanayake, T.C., Stojadinovic, O., and Tomic-Canic, M. (2014) Epidermal Differentiation in Barrier Maintenance and Wound Healing. *Adv. Wound Care*, **3**, 272–280.



Figure 1:

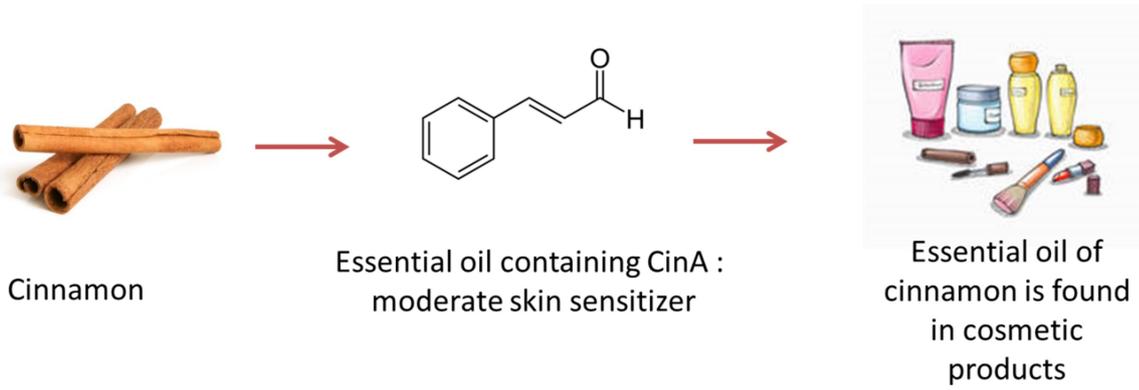


Figure 2:

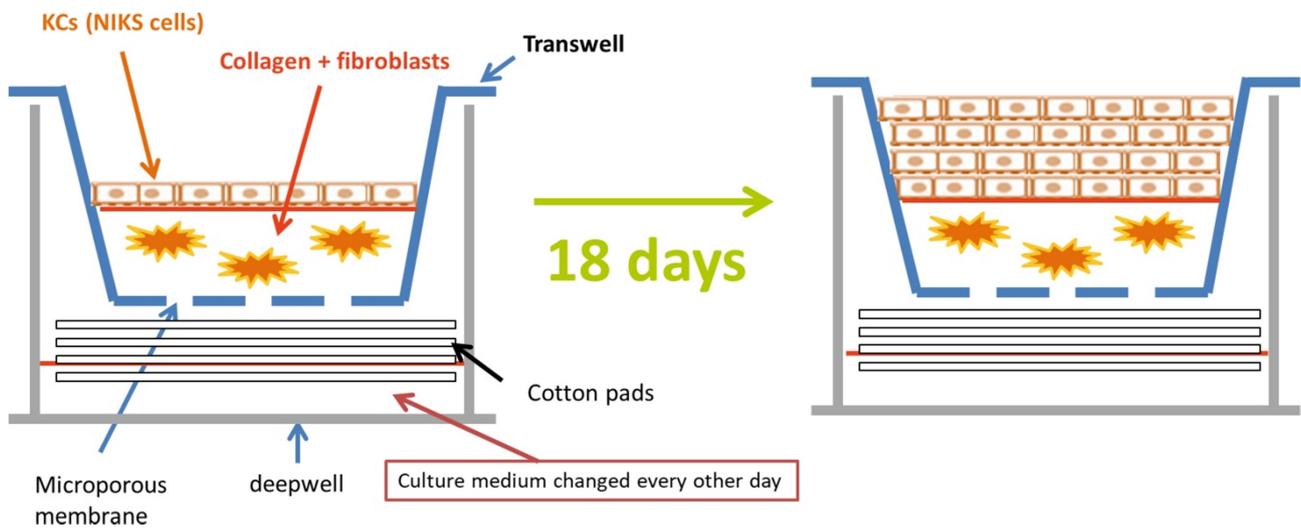
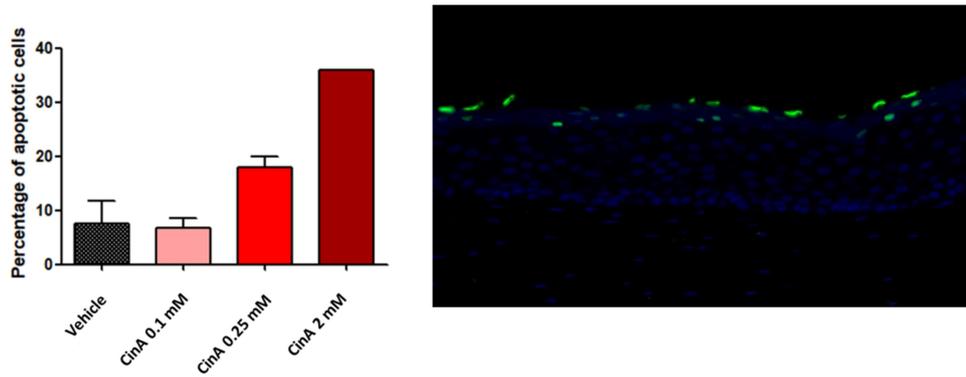
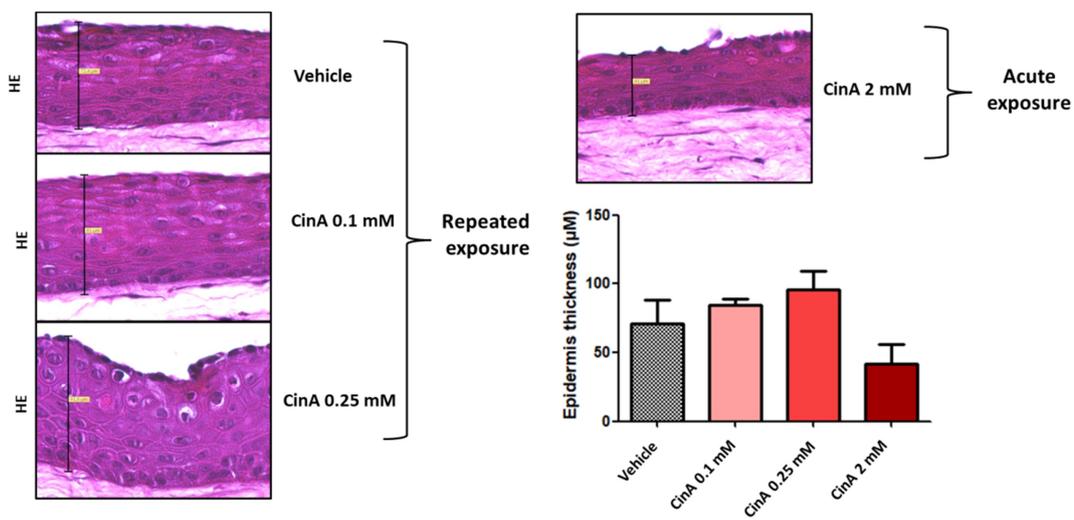


Figure 3:

(A)



(B)



(C)

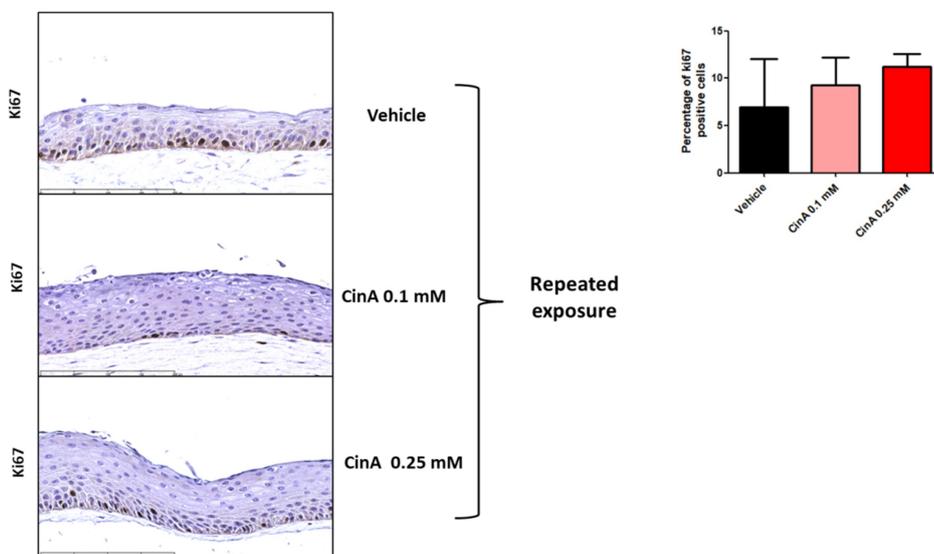


Figure 4:

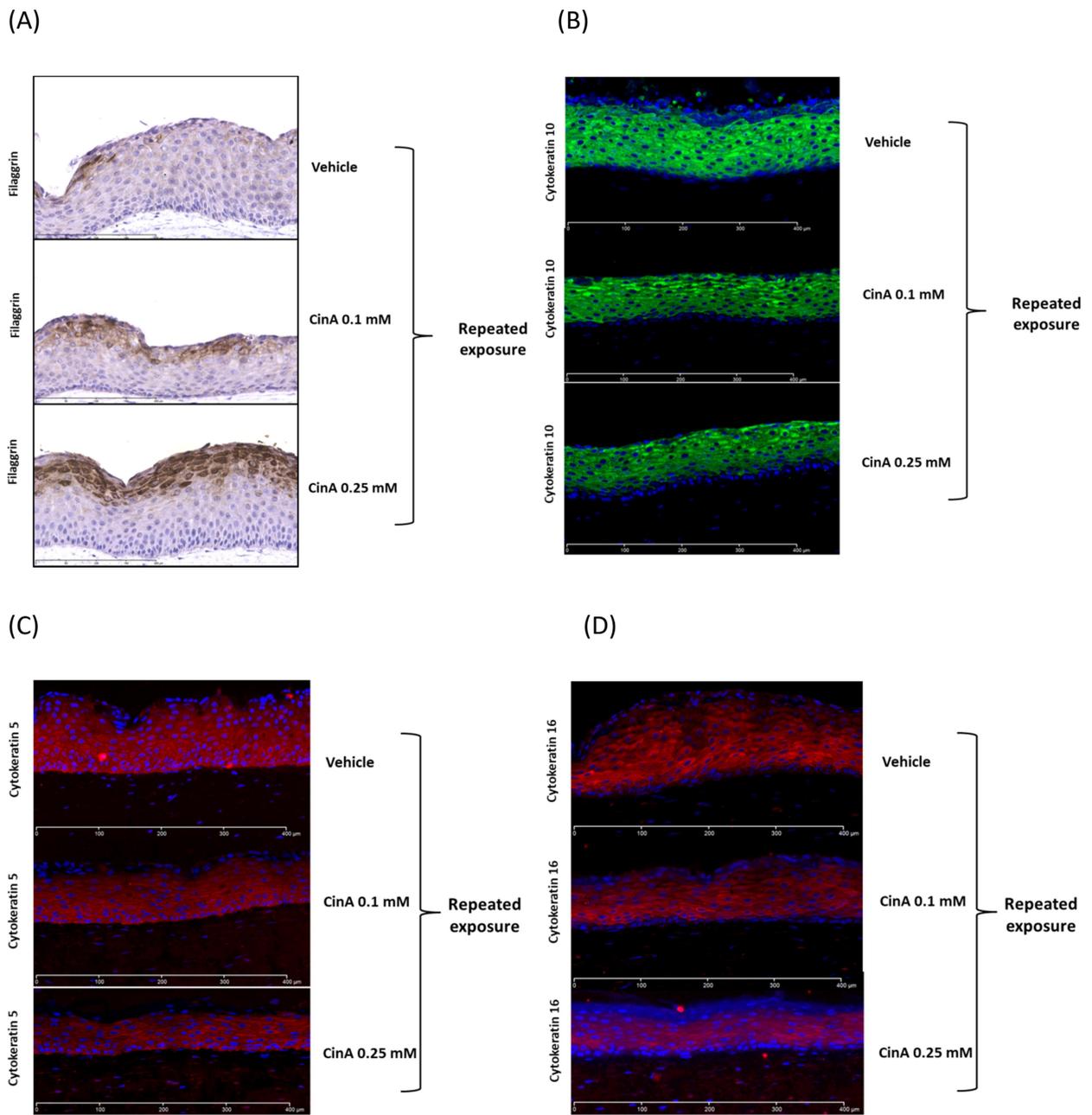


Figure 5:

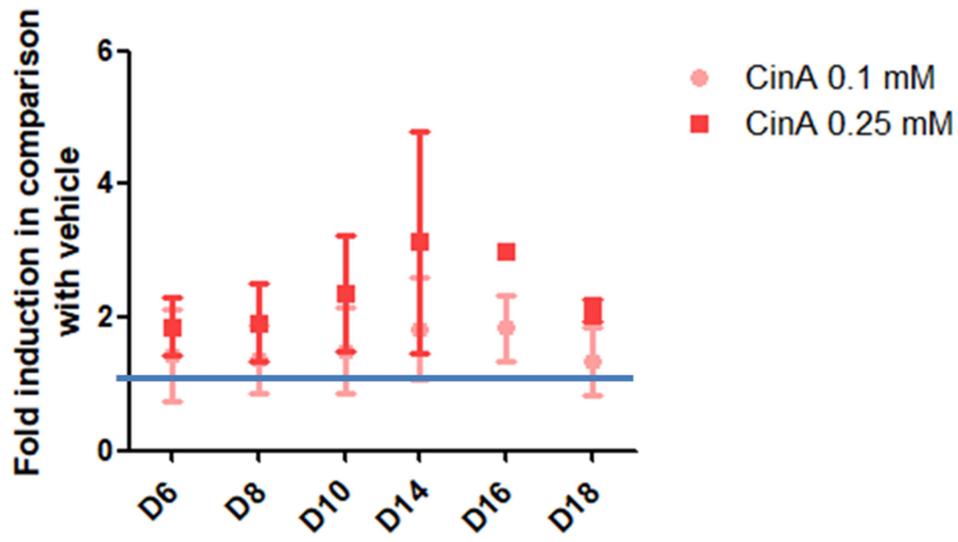
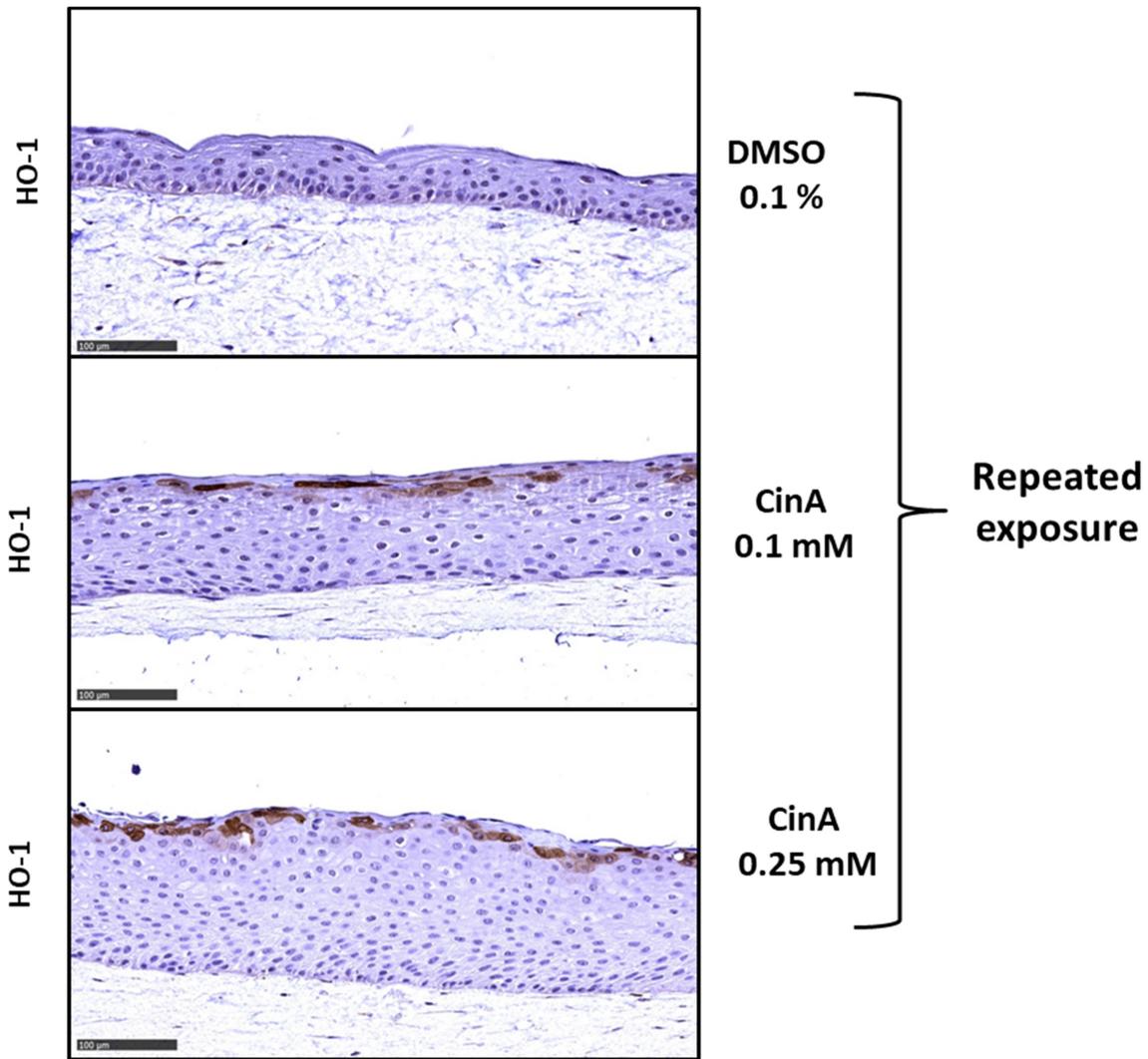
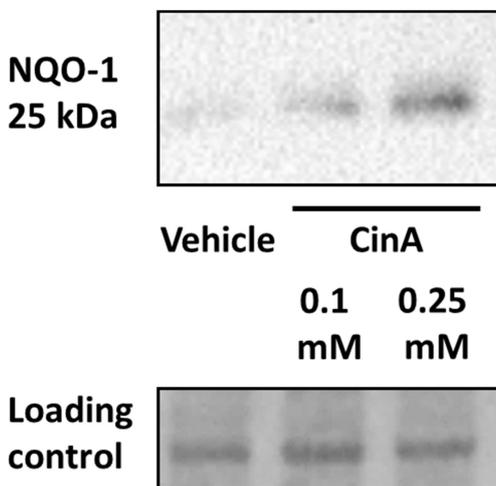


Figure 6:

(A)



(B)



(C)

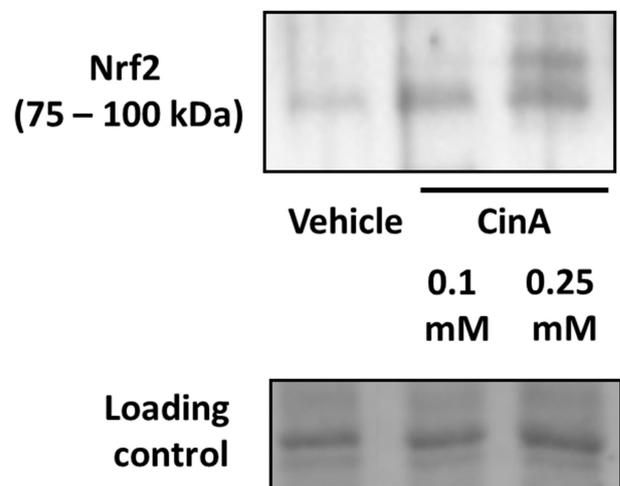


Figure 7:

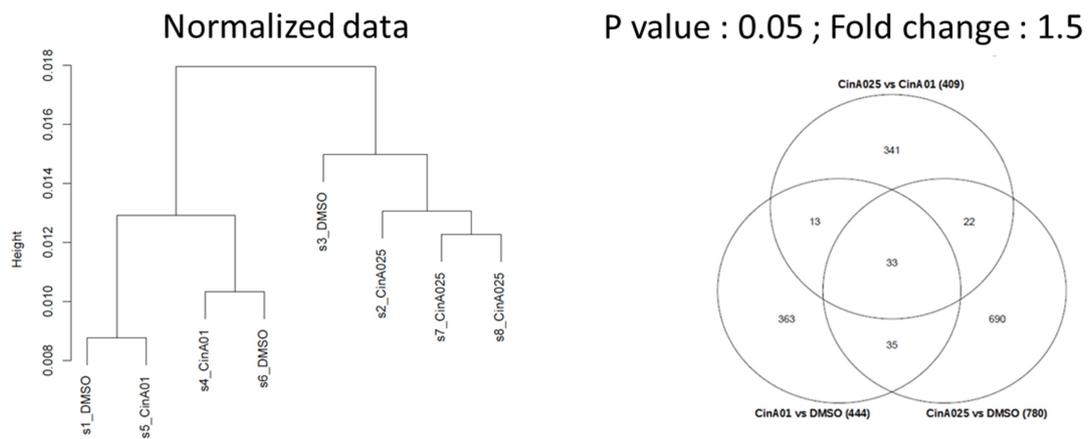
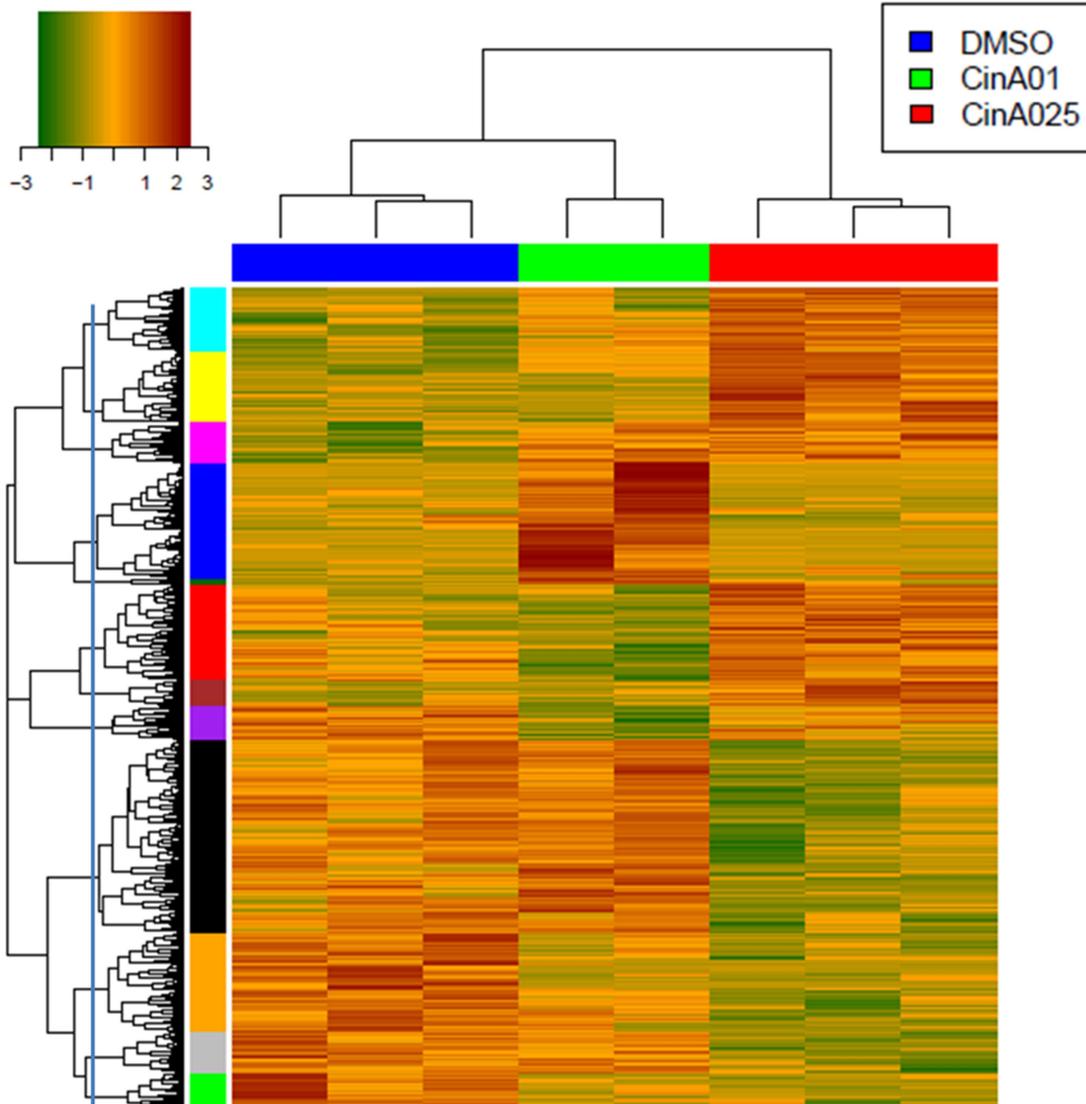


Figure 8:

(A)



(B)

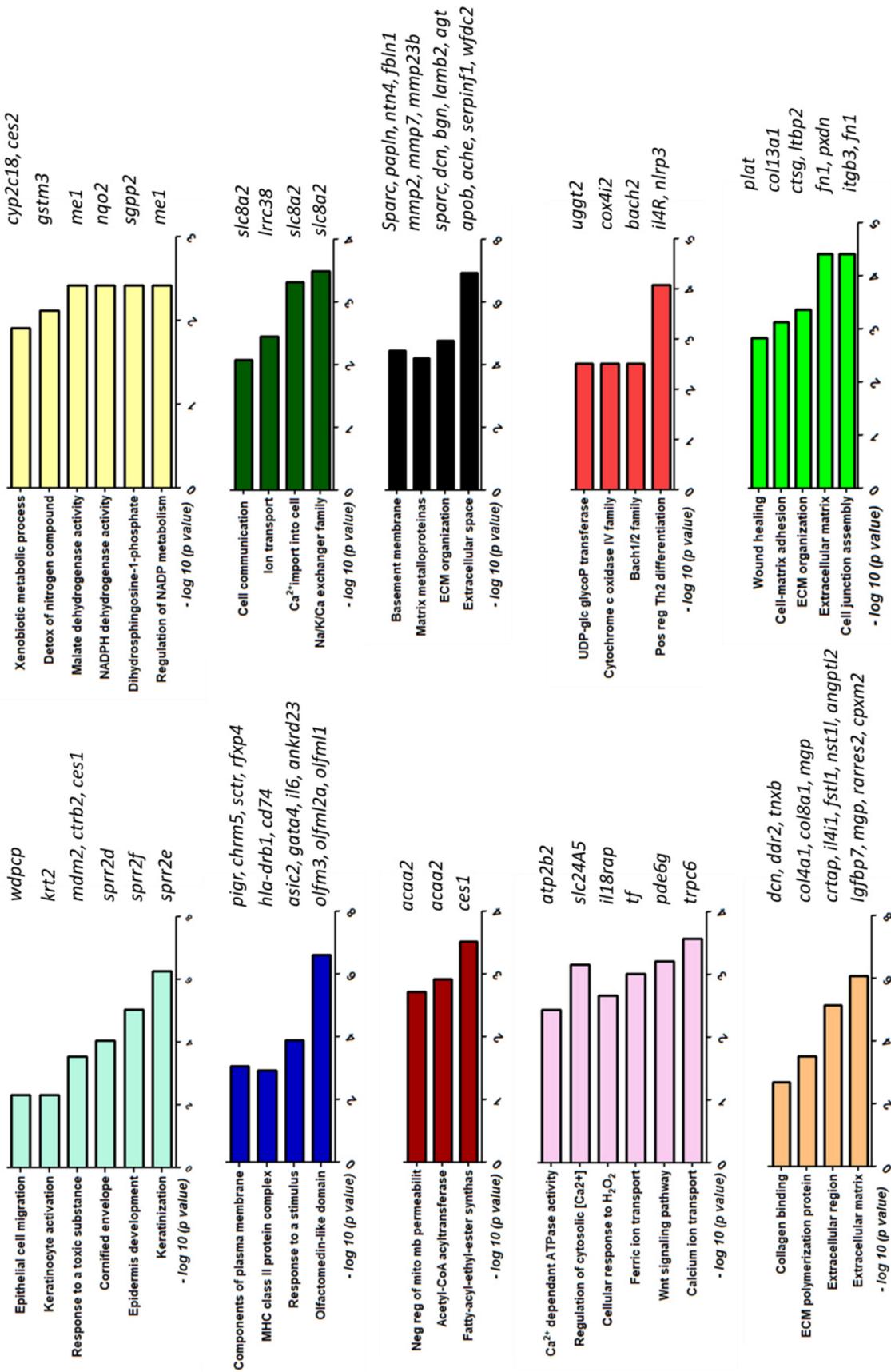


Figure captions:

Figure 1: Essential oil of cinnamon contains CinA, a moderate skin sensitizer. This essential oil is highly found in cosmetic products.

Figure 2: Organotypic culture of skin (rafts): KCs were cultured on a mix of collagen and primary human fibroblasts, as a supporting tissue. Culture medium containing CinA was changed every other day.

Figure 3: Effect of repeated-exposure of CinA on apoptosis, epidermis thickness and proliferation of rafts. (A) Representative image of apoptotic cells in rafts identified by TUNEL assay. Apoptotic cells are stained in green. Quantification of apoptotic cells from the histological analyses. Results are expressed as the percentage of apoptotic cells out of the total number of epithelial cells. (B) Representative raft culture stained with hematoxylin and eosin (HE). Images are representative of three independent experiments. Quantification of epidermis thickness from histological analysis are expressed as μM . Values are mean \pm SEM. (C) Representative raft culture stained with ki67. Images are representative of three independent experiments. Quantification of ki67 positive cells from the histological analyses. Results are expressed as the number of ki67 positive cells out of the total number of epithelial cells.

Figure 4: Effect of repeated-exposure of CinA on epidermis differentiation. Representative raft culture stained with filaggrin (A), cytokeratin 10 (B), cytokeratin 5 (C), cytokeratin 16 (D). Images are representative of three independent experiments.

Figure 5: IL-6 secreted from CinA stimulated rafts. Medium culture was retrieved every other day and a panel of cytokines were dosed with a qualitative Legendplex assay (Biolegend). A qualitative analysis was done with the Legendplex software. The graph represents the mean of IL-6 dosed in two different medium culture of rafts.

Figure 6: Effect of repeated-exposure of CinA on Nrf2/keap1 signaling pathway on rafts. (A) Representative raft culture stained with HO-1. (B) Representative western blot of NQO-1 (C) Representative western blot of Nrf2. Images are representative of three independent experiments.



Article II

Figure 7: (A) Microarray quality control. no-supervised hierarchical clustering on whole transcriptome shows a segregation between CinA 0.25 mM and the other conditions. (B) Selection of differentially expressed genes by ANOVA with the venn diagramm. Each circle represents a comparison between two conditions: CinA 0.1 mM vs DMSO or CinA 0.25 mM vs DMSO or CinA 0.25 mM vs CinA 0.1 mM (1497 unique genes in total). Pvalue < 0.5 and fold change > 1.5.

Figure 8: (A) Heatmap of selected genes (1497) from each comparison. Each selected gene have a p value < 0.05 and a fold change > 1.5. The hierarchical clustering was cut at 0.5 (dissimilarity measure) (blue line) in order to obtain 12 clusters for enrichment analysis. (B) Enrichment analysis results of each cluster from pathway studio database.





Résultats complémentaires

Partie II

Consumers of cosmetic products are exposed to low concentrations of cosmetics but several times a day or a week, we wonder what would be the impact of those compounds on the skin. We decided to address the concerns about long-term repeated-dose toxicity of cosmetic compounds (Van der Veen *et al.*, 2011).

Keratinocytes (KCs) are the main cells that constitute the epidermis. They are the first cells that encounter the chemical hapten in the skin. They contain enzymes with metabolic activity required for the conversion of prohaptens into biologically active haptens, thereby facilitating binding to proteins to form the antigen (Van der Veen *et al.*, 2011). Dendritic cells (DCs) have the ability to acquire and process antigens for presentation to T cells and express high levels of the co-stimulatory molecules that drive T-cell activation (Randolph *et al.*, 2005). Both cell-types play a role in Allergic Contact Dermatitis (ACD).

For the *in vitro* investigation of chemicals' potential for DC activation, the suitability of analyzing CD86 and CD54 upregulation on monocytic THP-1 cells, as a surrogate of DC, has been demonstrated with the h-CLAT *in vitro* test (442E). The impact of keratinocytes on chemicals' capacity for THP-1 activation, and especially their effect on potency prediction, has also been investigated in a co-culture model (Hennen *et al.*, 2011; Hennen and Blömeke, 2016).

In this study, we used a well-described HaCaT/THP-1 coculture setup (Hennen *et al.*, 2011) to study the impact of keratinocytes on the expression of CD86 and CD54 of THP-1 cells after repeated exposure of HaCaT. We chose three chemicals to investigate this question: DNCB, CinA and NiSO₄. DNCB and NiSO₄ are considered as positive controls in h-CLAT test. Only NiSO₄ results will be described here.



Material and Methods

In vitro cell-culture

The human monocytic cell-line THP-1 (ATCC-TIB-202; LGC, Molsheim, France) was grown in RPMI 1640 medium with 25mM HEPES GlutaMAX (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Biowest, AbCys, Courtaboeuf, France), 1% sodium pyruvate (Gibco, Invitrogen), antibiotics [100U/ml penicillin, 100 lg/ml streptomycin (Gibco, Invitrogen)] and 0.05 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) at 37 °C in humidified air containing 5% CO₂. HaCaT cells were cultured in DMEM plus 10% FBS, 2mM L-glutamine, and 1% antibiotics.

Co-culture model

HaCaT cells (2 x 10⁶ cells in 2 mL THP-1 culture medium) were cultivated in six-well plates overnight. Cells were stimulated repeatedly every day from 24 to 72h. THP-1 cells were washed 3 times w/o 2-mercaptoethanol and 1 x 10⁶ in a final volume of 1 mL were added to HaCaT cells and were incubated with or without chemical compounds for 24h. THP-1 cells were then collected, and their expression of cell surface markers was analyzed via flow cytometry. Cytotoxicity was measured by flow cytometry using PI.

Repeated-exposure model – monoculture THP-1 cells

THP-1 cells were cultured for at least 12h at 8 x 10⁵ cells/ml in complete medium without 2-mercaptoethanol. On the next day, the cells were seeded in a 12-wells plate in complete medium at 1 x 10⁶ cells/ml and treated with chemicals. CinA was diluted in DSMO and PBS, DNCB in DMSO and NiSO₄ in complete medium (**Figure 49**). THP-1 cells were then collected, and their expression of cell surface markers was analyzed via flow cytometry. Cytotoxicity was measured by flow cytometry using PI.



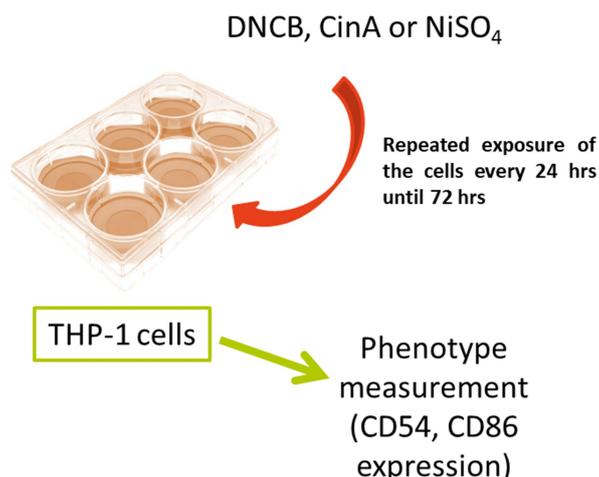


Figure 49. Repeated-exposure model of THP-1 cells

Repeated exposure model – coculture HaCaT/THP-1

HaCaT cells were stimulated every day during 48 or 72h with the indicated chemical. THP-1 cells were cultured for at least 12h at 8×10^5 cells/ml in complete medium without 2-mercaptoethanol. 24h before the end of the experiment, the cells were seeded with HaCaT in complete medium at 1×10^6 cells/ml for 24h (Figure 50). THP-1 cells were then collected, and their expression of cell surface markers was analyzed via flow cytometry. Cytotoxicity was measured by flow cytometry using PI.

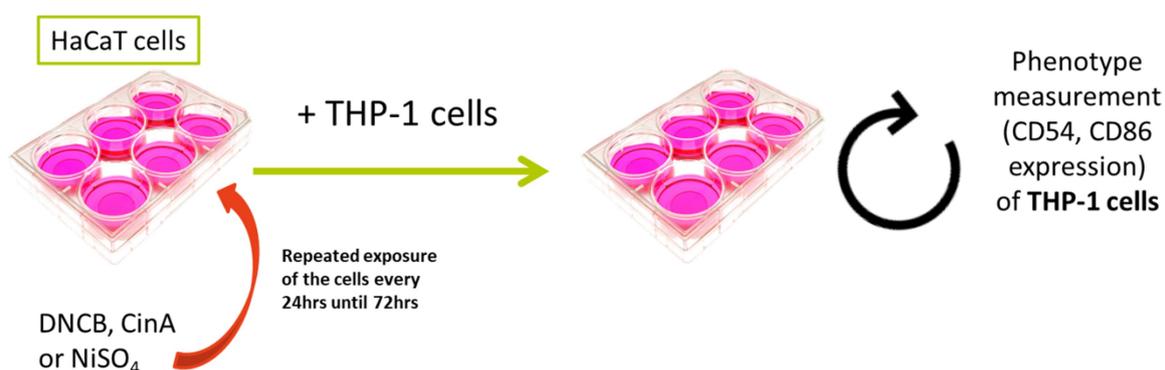


Figure 50. Repeated-exposure model of co-culture HaCaT and THP-1

Repeated exposure model – coculture w or w/o HaCaT supernatant

HaCaT cells were stimulated every day during 48 or 72h with the indicated chemical. THP-1 cells were cultured for at least 12h at 8×10^5 cells/ml in complete medium without 2-mercaptoethanol. 24h before the end of the experiment, the medium of HaCaT culture was removed and used to



suspend the THP-1 cells. Those THP-1 cells were seeded at 1×10^6 cells/ml for 24h. Other THP-1 cells were suspended in fresh new medium at 1×10^6 cells/ml and added to previously stimulated HaCaT for 24h (**Figure 51**). THP-1 cells were then collected, and their expression of cell surface markers was analyzed via flow cytometry. Cytotoxicity was measured by flow cytometry using PI.

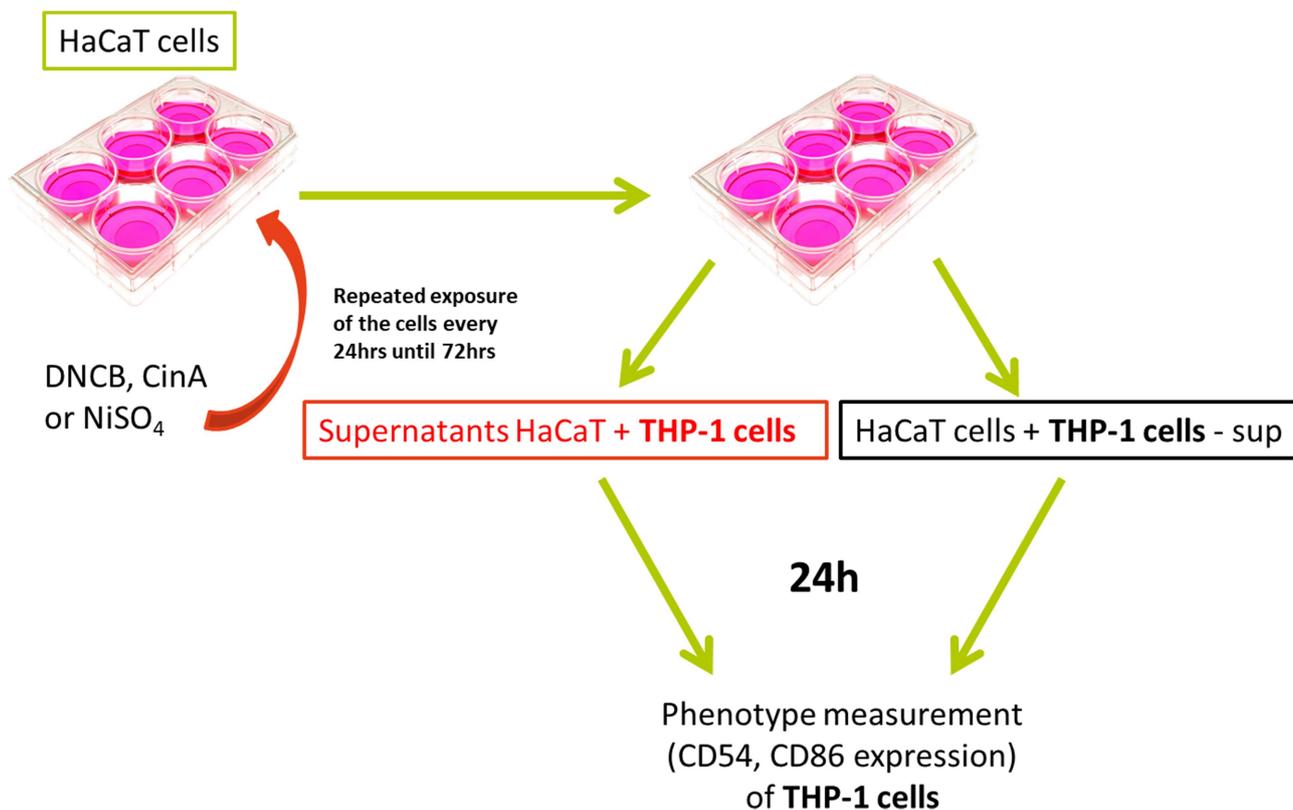


Figure 51. Repeated exposure model – coculture with or without HaCaT supernatant

Chemical treatment and choice of concentrations

Previous work in the lab showed that subtoxic concentration of NiSO₄ on THP-1 cell was 0.5 mM after 24h of treatment (Ade *et al.*, 2009). For repeated exposure, we decided to divide the concentration by the number of exposures. It means, for 48h of exposure, we stimulated HaCaT or THP-1 2 times with NiSO₄ 0.25 mM. For 72h of exposure, we stimulated HaCaT or THP-1 3 times with NiSO₄ 0.17 mM.

Flow cytometry analysis

After 24h of incubation with chemicals, THP-1 cells were harvested, washed once in PBS and 3×10^5 cells (per antibody) were incubated in PBS containing 0.05% bovine serum albumin (BSA) for



30min at 4 °C with the monoclonal antibodies PE-conjugated antiCD86 (555658, BD) and allophycocyanin-conjugated antiCD54 (559771, BD). After incubation, cells were washed with PBS + BSA 0.05%. THP-1 cell phenotype modifications were detected using a FACS-Calibur flow cytometer. For each sample, 10,000 cells were acquired and analyzed using the CellQuest software. Results were expressed using RFI calculated with the following formula, where MFI is the mean fluorescence intensity: $(\text{MFI of chemical-treated cells labeled with antigen-specific antibody} - \text{MFI of chemical-treated isotype control cells}) / (\text{MFI of vehicle control cells labeled with antigen-specific antibody} - \text{MFI of vehicle isotype control cells})$. Each value of RFI is the mean \pm SEM of 4 independent experiments.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Differences between groups were evaluated with the Mann-Whitney U test (Prism Software; GraphPad, La Jolla, California). $p < .05$ was regarded as significant.



Results

NiSO₄ induced an expression of CD54 and CD86 after repeated exposure on THP-1 monoculture model

After 24h of exposure of NiSO₄ 0.5 mM on monoculture of THP-1, NiSO₄ induced a significant expression of both activation markers CD54 and CD86. When cells are exposed twice for 48h, NiSO₄ also induced a significant expression of CD54 and CD86, but twice less than a single exposure with 0.5 mM. After 72h of exposure, 3 times with 0.17 mM of NiSO₄, we measured a significant expression of CD54 and CD86 that tend to increase after 48h and then decrease (**Figure 52**).

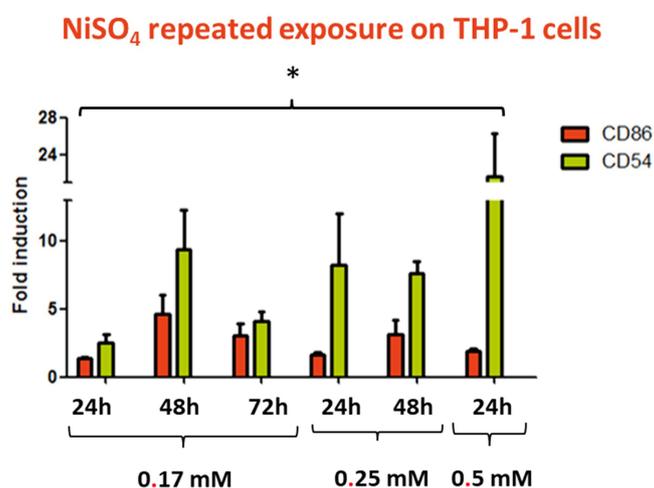


Figure 52. Effect of repeated-exposure of NiSO₄ on THP-1 monoculture model.

Each value is the mean \pm SEM of 4 independent experiments. Asterisks indicate a significant ($p < .05$) difference between chemical treated cells and vehicle treated cells. Dollars indicate a significant ($p < .05$) difference between both conditions.

CD54 and CD86 are less expressed after repeated-exposure of NiSO₄ in co-culture conditions

HaCaT were stimulated for 24, 48 or 72h with 0.5, 0.25 or 0.17 mM of NiSO₄ every 24h. 24h before the end, THP-1 cells were added to the culture medium on top of HaCaT cells. Only the 24h stimulation induced an increase of CD54 and CD86 on THP-1 cells. It looks like THP-1 cells are less activated in co-culture conditions, even if the experience was not sufficiently repeated to conclude (**Figure 53**). Based on the hypothesis that HaCaT could induce an inhibition of THP-1 activation, we



wandered if it was due to a direct contact between the two cell types or to the secretion of cytokines by HaCaT in the culture medium.

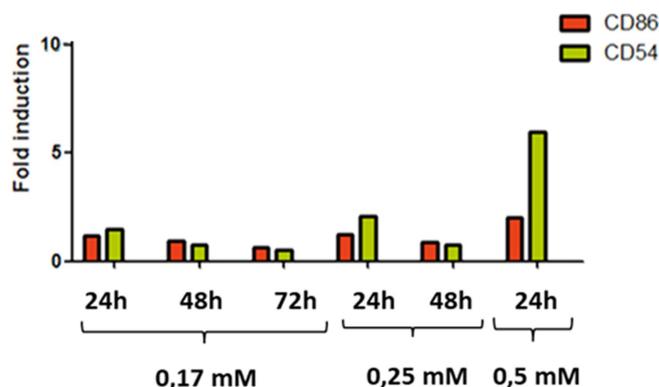


Figure 53. Effect of repeated-exposure of NiSO₄ on THP-1 in co-culture model.
Only one experiment was realized.

CD54 and CD86 on THP-1 are only expressed with HaCaT supernatant

HaCaT were stimulated for 24, 48 or 72h with 0.5, 0.25 or 0.17 mM of NiSO₄ every 24h. 24h before the end, THP-1 cells were suspended in HaCaT medium (**Figure 54A**) or suspended in fresh medium and put on HaCaT cells (**Figure 54B**). Results showed that only THP-1 suspended in HaCaT medium, still containing NiSO₄, induced a significant expression of CD54 and CD86. The expression of CD54 and CD86 was below the one induce in THP-1 monoculture, meaning HaCaT could have an inhibitory effect on THP-1, by secretion of anti-inflammatory cytokines in the culture medium.



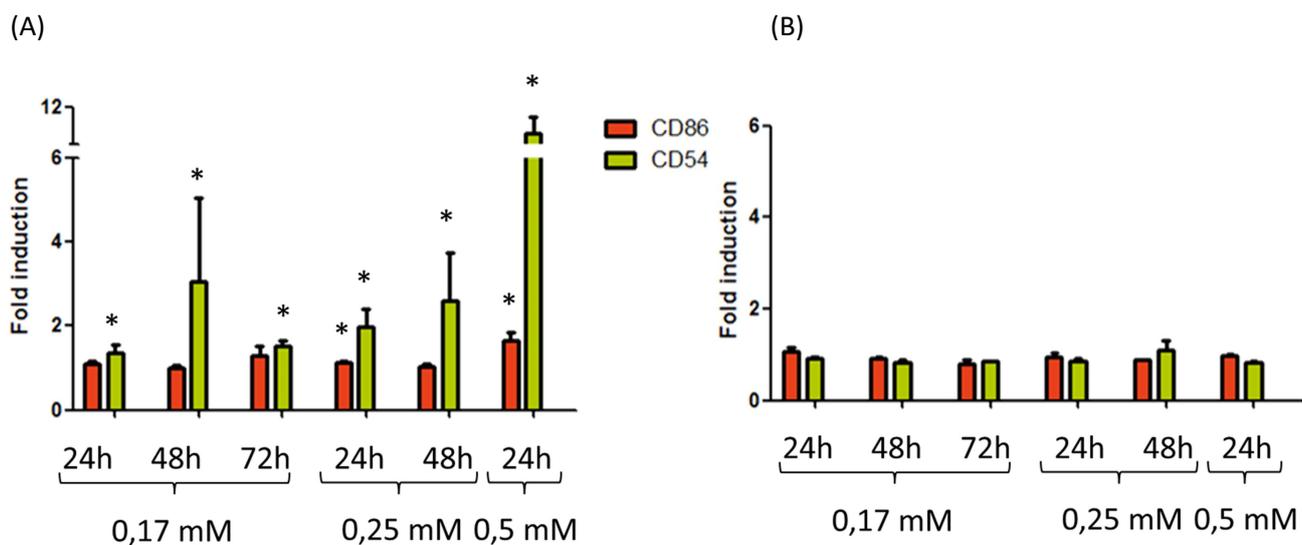


Figure 54. Effect of HaCaT repeated exposure of NiSO₄ on THP-1 suspended in HaCaT supernatant (A) or suspend in fresh medium but put on HaCaT (B).

Each value is the mean ± SEM of 4 independent experiments. Asterisks indicate a significant (p < .05) difference between chemical treated cells and vehicle treated cells. Dollars indicate a significant (p < .05) difference between both conditions.



Conclusion

Those preliminary results of repeated exposure of NiSO₄ showed that THP-1 cells are less activated in co-culture conditions in comparison with mono-culture. Based on the hypothesis that HaCaT could induce an inhibition of THP-1 activation, we wondered if it was due to a direct contact between the two cell types or to the secretion of cytokines by HaCaT in the culture medium. Results showed that only THP-1 suspended in HaCaT medium, still containing NiSO₄, induced a significant expression of CD54 and CD86. The expression of CD54 and CD86 was below the one induce in THP-1 monoculture, meaning HaCaT could have an inhibitory effect on THP-1, by secretion of anti-inflammatory cytokines in the culture medium.



Discussion





La DAC aux fragrances peut se développer suite à un contact avec une quantité suffisante de ces substances, notamment après une utilisation régulière de produits cosmétiques. Chaque réexposition entraîne l'apparition des symptômes sur la zone exposée. La pathologie peut être sévère et avoir une incidence sur la qualité de vie, particulièrement dans le milieu professionnel.

D'après la commission européenne, 1 à 3 % de la population européenne est estimée comme étant allergique aux fragrances et 16 % des patients atteints de DAC y sont immunisés. Ces individus doivent éviter le contact avec les produits contenant ces molécules allergisantes. C'est la raison pour laquelle en 1999, le SSCPNFP a identifié 26 fragrances qui doivent être indiquées aux consommateurs quand elles sont présentes dans les produits cosmétiques.

Le linalol et le limonène ont révélé qu'ils n'étaient pas ou peu allergisants d'après le test du LLNA réalisé sur la souris. Cependant, au contact de l'air, ils s'autoxydent pour former des hydroperoxydes allyliques, considérés comme de fortes molécules allergisantes. Des données cliniques montrent que les formes oxydées de linalol et de limonène sont des allergènes à haut risque d'immunisation pour les consommateurs d'après des résultats de patch test (Bråred Christensson *et al.*, 2013, 2012).

Les propriétés oxydantes des hydroperoxydes allyliques sont l'une des raisons évoquées pour expliquer leur potentiel allergisant. Cette propriété est due aux énergies de dissociation relativement faibles des liaisons O-O et O-H. Des radicaux alcoyles RO^\bullet ou peroxydes ROO^\bullet sont formés, au pouvoir oxydant important.

A la surface cellulaire, le contrôle de l'oxydoréduction est important pour le maintien de l'état basal. Les protéines membranaires contiennent des résidus cystéine, qui leur permettent de former des ponts disulfures jouant un rôle dans leur repliement et leur stabilisation (**Figure 55**). Les ponts disulfures protègent les protéines des oxydants présents dans le milieu extracellulaire (Torres and Gait, 2012). L'oxydation des thiols des protéines de la membrane plasmique a été décrite comme étant reliée à l'activation des voies de signalisation telles que les MAPKs dans les THP-1, mais également à l'expression du CD83 et CD86 dans les MoDCs (Kagatani *et al.*, 2010; Hirota *et al.*, 2010).



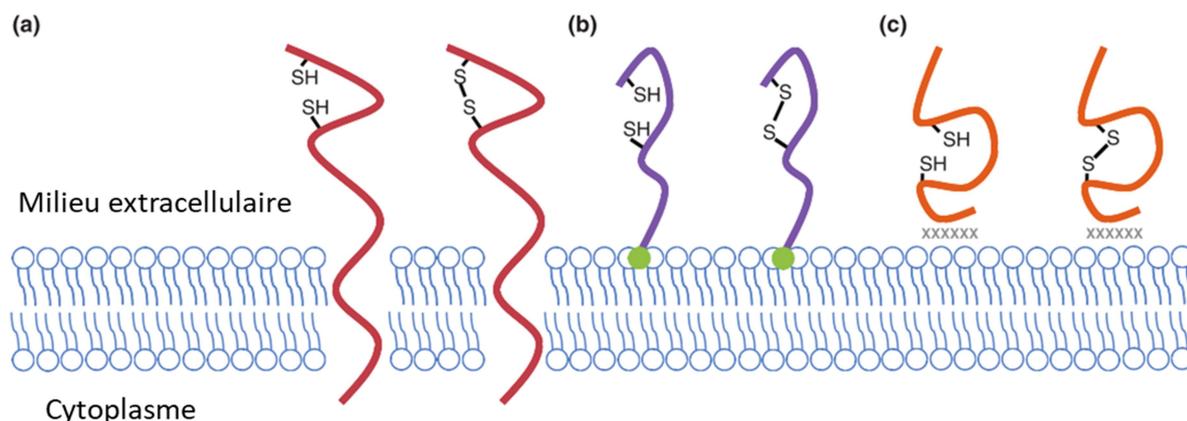


Figure 55. Les protéines membranaires exposent les groupements thiols au milieu extracellulaire. Les protéines peuvent être transmembranaires (a), liées au glycosylphosphatidylinositol (b) ou liées à la membrane de façon non covalente (xxxxx) (c). Les thiols présents sur ces protéines peuvent être sous forme réduite (-SH) ou oxydée (S-S).
D'après Torres and Gait (2012).

L'oxydation des thiols de surface après exposition des cellules THP-1 aux hydroperoxydes allyliques et aux terpènes a été mesurée. Les protéines membranaires sont recyclées au cours du temps car les thiols oxydés ne sont plus mesurés après 1 heure en réponse aux terpènes et 2h aux hydroperoxydes allyliques. Les résultats ont permis de démontrer que les terpènes et hydroperoxydes allyliques étaient internalisés par les cellules THP-1, car plusieurs études ont démontré que l'oxydation des thiols de surface cellulaire permettait d'améliorer le processus d'endocytose des cellules (Sampathkumar *et al.*, 2006; Torres and Gait, 2012; Matthias and Hogg, 2003).

L'oxydation des thiols de surface a été corrélée à une diminution du GSH intracellulaire, témoin d'un stress oxydant pour la cellule (Filomeni *et al.*, 2003). Le GSH réagit avec les espèces réactives de l'oxygène et du carbone, qui peuvent être induites par les hydroperoxydes allyliques internalisés. Nous avons mesuré la présence d'EROs à l'aide de la sonde DCFH-DA. L'utilisation de cette sonde est critiquée car elle est associée à des artefacts dus à une amplification de l'intensité de fluorescence à cause d'un mécanisme redox qui implique un intermédiaire radicalaire : DCF[•]. Elle peut tout de même être utilisée pour mesurer des mécanismes cellulaires impliquant une oxydoréduction (Kalyanaraman *et al.*, 2012). Les résultats de mesure des EROs ont montré que seul l'hydroperoxyde de linalool induit une augmentation significative.



Discussion

Les intermédiaires radicalaires des hydroperoxydes allyliques de linalool et de limonène sont capables d'évoluer vers la formation de radicaux carbonés (Kao *et al.*, 2014). Le GSH a été décrit comme réagissant avec les radicaux centrés sur l'oxygène et sur le carbone (cf réaction 24 et 25, page 79). Dans notre étude, la mesure du rapport intracellulaire GSH/GSSG après exposition aux terpènes et hydroperoxydes allyliques a montré une corrélation avec la mesure de l'oxydation des thiols de surface. Les hydroperoxydes allyliques de limonène et de linalool induisent une diminution significative du GSH, également observée après exposition au limonène. Le limonène en lui-même n'est pas une molécule oxydante, mais pourrait agir en tant que pro-haptène et subir une métabolisation par les cellules de la lignée THP-1. Cette métabolisation peut s'effectuer par des enzymes de phase I, les rendant réactifs. Les peroxydases ont pour principale fonction de réduire l'eau oxygénée en eau mais cette transformation conduit simultanément à l'oxydation d'une autre molécule. Les peroxydases des THP-1 pourraient induire une oxydation du limonène, pour former des hydroperoxydes allyliques qui à leur tour induiraient un stress oxydant pour la cellule. Une oxydation biotique du linalool a été observée dans une étude enzymatique par le cytochrome P450 (Meesters *et al.*, 2007). Plusieurs produits d'oxydation enzymatique ont été identifiés, tels que le 8-hydroxylinalool et le 6 et 7-epoxy-linalool.

Le GSH étant un protecteur cellulaire endogène principal pour la cellule, sa diminution peut être suivie d'une synthèse. La voie Nrf2/keap1 est décrite comme étant une voie de détoxification activée en cas de stress oxydant en réponse à des molécules allergisantes (Ade *et al.*, 2009; Migdal *et al.*, 2013). La glutamylcystéine synthétase va synthétiser du γ -glutamylcystéine qui va se transformer en GSH par la catalyse de la GSH synthase. La sous-unité catalytique de la glutamylcystéine synthétase, la glutamate-cystéine ligase catalytique, a été décrite comme étant activée par Nrf2 (Yang *et al.*, 2005). De plus, Nrf2 active l'expression de gènes codant pour des enzymes cytoprotectrices et de détoxification de phase II, telles que *ho-1* et *nqo-1* en condition de stress oxydant. Dans notre étude, les deux hydroperoxydes allyliques ont induit une accumulation de Nrf2 tandis que seul l'hydroperoxyde de linalool a induit la transcription de trois de ses gènes cibles : *il-8*, *nqo-1* et *ho-1*.

Les résultats avec d'autres terpènes tels que le cyclohexène, le cumène et leurs hydroperoxydes allyliques respectifs sont assez similaires : la voie Nrf2 est activée en réponse au cyclohexène et à



son hydroperoxyde allylique. Les gènes cibles de Nrf2 : *ho-1*, *il-8* et *nqo-1* ont également été induits. L'hypothèse d'une métabolisation par les cellules THP-1 peut être évoquée, car le cyclohexène pourrait se comporter comme un pro-haptène. Une fois métabolisé, il participerait à la formation d'EROs et à l'activation de la voie Nrf2.

Lors de l'activation des cellules par les molécules allergisantes, il a été montré qu'il existait une corrélation entre Nrf2 et la maturation des cellules de la lignée THP-1 (Migdal *et al.*, 2013). Dans notre étude, l'activation des cellules THP-1 a été mesurée par l'expression du CD54 et du CD86. Les hydroperoxydes ont induit l'expression des deux marqueurs, mais de façon moindre par rapport aux contrôles positifs CinA et tertio-butyl hydroperoxyde (t-BHP). Pourtant, les résultats du test validé h-CLAT (442E) classent le limonène et le linalol comme étant des molécules allergisantes, mais avec des concentrations bien plus élevées que celles que nous avons utilisées (5,5 mM pour le limonène et 2 mM pour le linalol) (Urbisch *et al.*, 2015). Nous avons choisi des concentrations induisant 80 % de viabilité après 24h d'exposition. D'après la ligne directrice du test h-CLAT, les molécules sont considérées comme allergisantes si elles induisent une RFI du CD86 \geq à 150 % et/ou du CD54 \geq à 200 %. La viabilité cellulaire induite par les molécules testées doit être supérieure à 50%. Nous avons fait le choix d'utiliser la concentration induisant autant de viabilité que nos contrôles positifs après 24h de stimulation.

En conclusion, les mécanismes d'activation des cellules de la lignée THP-1 en réponse aux hydroperoxydes allyliques de linalol et de limonène sont différents. En induisant des EROs et en diminuant davantage le rapport GSH/GSSG, l'hydroperoxyde de linalol entraîne une activation de Nrf2. Cette différence peut s'expliquer par le nombre de radicaux centrés sur le carbone que vont former les hydroperoxydes de linalol et de limonène sur la peau. En effet, une technique de piégeage radicalaire couplée à la résonance paramagnétique électronique (RPE) décrite par Kao *et al.* (2014) a montré que les hydroperoxydes vont former des espèces réactives par des mécanismes différents (**Figure 56**). Ces mécanismes peuvent être l'abstraction de l'hydrogène, la β -scission ou la cyclisation intramoléculaire. Les espèces réactives vont interagir avec les protéines de l'épiderme ou du derme pour former des complexes immunogènes. Dans le cas de l'hydroperoxyde de limonène, les possibilités de réarrangements radicalaires sont plus limitées, ce qui explique pourquoi il induit moins de stress oxydant que l'hydroperoxyde de linalol.



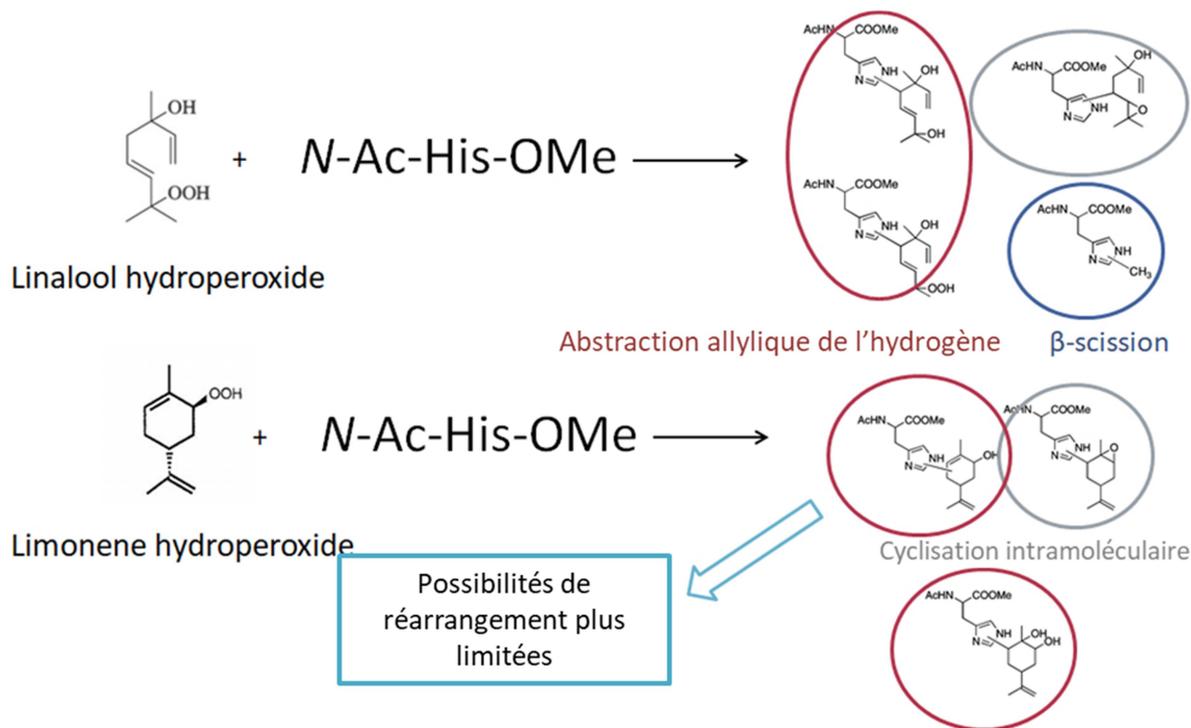


Figure 56. Les différents produits de réaction des hydroperoxydes allyliques et d'un dérivé de l'histidine (N-acéthylhistidineméthyl).

D'après Kao *et al.*, 2010.

Les résultats *in vitro* que nous avons obtenus sont assez éloignés des résultats *in vivo*, tels que ceux du LLNA, qui ont montré que les hydroperoxydes allyliques de limonène et de linalol étaient des allergisants puissants, avec des valeurs d'EC₃ de 0,83 et 1,6 respectivement (Basketter *et al.*, 2000; Urbisch *et al.*, 2015). Les études de patch test sur des volontaires ont également permis de classer ces produits comme des allergisants potentiels (Christensson *et al.*, 2014; Bråred Christensson *et al.*, 2012). Ces différences soulignent les limites des études *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines.

Néanmoins, les résultats des patchs tests indiquent que 16 % des patients atteints de DAC sont allergiques aux fragrances. Plusieurs études ont été réalisées sur des employés travaillant dans un lieu où ils sont particulièrement exposés à des produits chimiques, comme les coiffeurs. Les résultats ont montré que leur barrière cutanée était altérée (Williams *et al.*, 2010), ce qui pourrait mener à une pénétration accrue des allergènes dans la peau. Une altération de la barrière cutanée pourrait rendre les personnes exposées à des fragrances plus vulnérables à leur effet.



Discussion

Les utilisateurs des produits cosmétiques contenant des fragrances sont exposés à de faibles concentrations de molécules allergisantes, mais plusieurs fois par jour ou par semaine. L'exposition répétée d'une molécule n'est pas sans effet. C'est pourquoi, la deuxième partie de notre étude a adressé cette problématique.

Les KCs sont les premières cellules à rencontrer les haptènes dans la peau. Ils sont également des acteurs du métabolisme, car ils contiennent des enzymes permettant la conversion des pro-haptènes en haptènes actifs biologiquement. Ils vont également exprimer des facteurs chimiotactiques après exposition à une molécule allergisante (Albanesi, 2010).

Le modèle de co-culture HaCaT/THP-1 a été bien décrit pour étudier le potentiel allergisant de molécules chimiques (Hennen and Blömeke, 2016; Hennen *et al.*, 2011). Nous avons adapté ce modèle de co-culture en exposant de façon répétée les cellules de la lignée HaCaT avec une molécule allergisante, auxquelles des THP-1 ont été ajoutées pendant 24h. L'activation des THP-1 a été mesurée par cytométrie avec les marqueurs CD54 et CD86 en condition de mono ou de co-culture. Nous avons réalisé ces expériences avec le 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB), le CinA et le sulfate de nickel (NiSO_4). Nous avons choisi de tester le DNBCB et le NiSO_4 car ce sont deux molécules considérées comme des contrôles positifs dans le test h-CLAT.

Les résultats préliminaires de cette co-culture sur le NiSO_4 ont permis de montrer que les HaCaT semblaient avoir un effet inhibiteur sur les THP-1 et que ceci pouvait être dû à la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires dans le milieu de culture. Quant au DNBCB et au CinA, les résultats obtenus sont hétérogènes et n'ont pas permis de conclure pour ces 2 produits.

Ce modèle de co-culture a montré une certaine variabilité des résultats. L'inconvénient de ce type de modèle est la prolifération en monocouches des cellules, ce qui entraîne des différences lorsqu'il est comparé à la peau. En culture 2D, les cellules prolifèrent en monocouche et de façon plus rapide. Les cellules sont également exposées de façon homogène aux molécules chimiques distribuées dans le milieu de culture, ce qui n'est pas le cas dans la peau (Spriggs *et al.*, 2016; Edmondson *et al.*, 2014). C'est la raison pour laquelle des modèles 3D ont vu le jour ces 20 dernières années.



Discussion

Dans un contexte d'exposition répétée à de faibles doses de molécules allergisantes, afin de mimer une exposition quasi quotidienne d'un produit cosmétique, nous avons adressé un modèle 3D. Des cultures organotypiques de peau appelées rafts, ont été exposées toutes les 48h pendant 18 jours à de faibles concentrations de CinA (0,1 et 0,25 mM). Au bout de 18 jours d'exposition, un épiderme stratifié caractérisé par plusieurs couches cellulaires différenciées est formé.

Des fibroblastes humains primaires ont été répartis dans une matrice de collagène afin de servir de support aux KCs. Les KCs sont des cellules de la lignée cellulaire spontanément immortalisée, les NIKS, dont le schéma de différenciation s'apparente à celui des KCs primaires (Allen-Hoffmann *et al.*, 2000). Les NIKS ont été choisies car les KCs primaires ont une capacité de prolifération limitée *in vitro*, ce qui rend leur exposition sur le long terme difficile (Weinmuellner *et al.*, 2017). De plus, l'utilisation d'une lignée cellulaire permet de s'affranchir de la variabilité inter donneur et d'obtenir une meilleure reproductibilité des expériences.

Ce modèle en 3D nous permet d'étudier l'impact d'une fragrance sur un épiderme en cours de prolifération et de différenciation. Les rafts ont été exposés de façon basale et non apicale, c'est-à-dire que le CinA se trouvait dans le milieu de culture sous l'insert.

Une exposition répétée de ces rafts à du CinA, à faible dose pendant 18 jours, n'a pas eu d'incidence sur la viabilité cellulaire. Nous avons mesuré une faible augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques, présentes au niveau de la couche basale. Cette faible augmentation est accompagnée d'une légère augmentation de l'épaisseur de l'épiderme et de la prolifération cellulaire.

Au cours de la cornification de l'épiderme, les filaments intermédiaires de kératines vont s'agrèger, grâce à l'intervention de la filaggrine. Cette protéine est le témoin de la différenciation cellulaire qui joue un rôle important dans l'intégrité de la barrière cutanée (Levin *et al.*, 2013; Sandilands *et al.*, 2009). Une nette augmentation de son expression a été mesurée en réponse à de faibles concentrations de CinA, dans les couches supérieures de l'épiderme. Une exposition basale du CinA a conduit à une expression de la filaggrine par les KCs. Les KCs vont donc chercher à renforcer leur fonction barrière suite à l'exposition à un stress chimique, afin de conserver l'intégrité de l'épiderme.



Discussion

La voie de signalisation Nrf2/Keap 1 a été investiguée, car une présence accrue de Nrf2 dans les KCs a été décrite (Schäfer *et al.*, 2012). L'expression de HO-1 a été mesurée par immunohistochimie dans les couches supérieures de l'épiderme de nos rafts. Ceci est corrélé avec les observations faites sur les cellules NHEK ayant subi une différenciation suite à une prolifération prolongée (Piao *et al.*, 2011). L'expression de Nrf2 est plus forte dans les cellules les plus différenciées. Cette observation corrèle également avec des travaux construits sur un modèle murin qui indiquent que le gradient de Nrf2 est plus élevé dans les couches suprabasales, afin de protéger les cellules du stress chimique et des UVs (Schäfer *et al.*, 2012). HO-1 étant localisé au niveau des couches supérieures de l'épiderme, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il est exprimé par les KCs dans le but de maintenir l'intégrité cellulaire. Schäfer *et al.* (2010) ont évoqué une protection paracrine des cellules des couches suprabasales qui expriment davantage Nrf2, vers les cellules de la couche basale en réponse aux UVs. Les cellules des couches supérieures importent la cystéine intracellulaire, substrat limitant pour la synthèse de GSH, vers les cellules des couches inférieures pour qu'elles puissent procéder à la synthèse de GSH (cf Figure 40). Nous pouvons imaginer que le même processus survient lors d'une exposition à des produits chimiques tels que le CinA.

Nous avons mesuré la sécrétion de l'IL-6 au cours du temps par les fibroblastes en réponse au CinA. L'IL-6 sécrétée par les fibroblastes a été décrite comme jouant un rôle dans la prolifération des KCs et la réorganisation de leur cytosquelette (Hernández-Quintero *et al.*, 2006). Il a été récemment montré que Nrf2 a une activité pro-inflammatoire et qu'il stimule la prolifération des cellules épithéliales. L'un des mécanismes d'action sous-jacents pourrait être la cytokine IL-36 γ , qui a été décrite comme étant une nouvelle cible directe de Nrf2 dans les kératinocytes, à la fois dans un modèle murin et dans la lignée cellulaire HaCaT (Kurinna *et al.*, 2016). L'activation de Nrf2 dans l'épiderme par une molécule oxydante peut induire l'expression de l'IL-36 γ . L'IL-36 γ stimule la prolifération des KCs de façon autocrine. Les KCs sécrètent de l'IL-36 γ et de l'IL-36 α qui vont activer les fibroblastes. Suite à cette activation, les fibroblastes vont sécréter de l'IL-6, ce qui est propice à la prolifération des KCs de façon paracrine (cf Figure 43, page 99).

Dans le but de trouver de nouvelles cibles et de nouvelles voies de signalisation qui pourraient être activées en réponse au CinA dans ce modèle d'exposition répétée. Un microarray a été réalisé



Discussion

sur les échantillons d'ARN totaux récupérés au terme des 18 jours de l'expérience. Les résultats ont montré qu'une exposition répétée au CinA induit l'expression de gènes codant pour des protéines dont les fonctions sont impliquées dans la cornification, dans le développement de l'épiderme, la kératinisation et le transport des ions calcium. Le calcium a été décrit comme étant un régulateur de la différenciation des KCs (Bikle *et al.*, 2012). Ces résultats corréleront avec l'expression accrue de la filaggrine dans les épidermes traités au CinA et avec le maintien de l'intégrité de la barrière cutanée.

Par ailleurs, les gènes moins exprimés en comparaison au contrôle, sont ceux qui codent pour des protéines dont les fonctions sont associées à l'adhésion à la matrice ou à l'assemblage des jonctions cellulaires. Ces résultats pourraient également corréler avec notre hypothèse qui serait que l'expression de Nrf2 est plus faible dans les couches basales de l'épiderme. Les couches basales seraient donc plus vulnérables au stress oxydant provoqué par le CinA.

Ceci corrélerait également avec les résultats de l'exposition aiguë de CinA à 2 mM, 48 heures avant la fin de l'expérience. L'excès de CinA a entraîné une forte diminution de l'épaisseur de l'épiderme, sans doute à cause d'un stress oxydant trop important. Il y a eu une rupture de l'équilibre redox de la cellule et la réponse de Nrf2 étant insuffisante, les cellules sont entrées en apoptose. L'intégrité membranaire en a été immédiatement affectée, au point que seules les cellules de la couche basale étaient encore observables au marquage hématoxyline/éosine par immunohistochimie.

Ce modèle semble fournir des réponses à la question de l'exposition répétée de l'épiderme à une molécule électrophile. Néanmoins, certaines limites des modèles 3D ont été décrites : des études récentes ont montré que la couche cornée des modèles de culture *in vitro* différait de celle des cellules de peau natives en termes de composition lipidique et d'organisation spatiale. Il a été montré que les lipides de la couche des équivalents de peau humaine issus de KCs primaires avaient un empaquetage différent des explants de peau. L'empaquetage était à prédominance hexagonale alors que celui de la peau humaine est orthorhombique (Thakoersing *et al.*, 2012).

Le développement de méthodes *in vitro* sur des épidermes reconstruits issus de kératinocytes primaires permettent de déterminer le potentiel allergisant des allergènes de contact (Galbiati *et*



Discussion

al., 2017). Cette méthode est basée sur la mesure de l'IL-18 sécrétée par les KCs dans le milieu de culture. Il a été montré que le CinA induisait la sécrétion d'IL-18 dans ce modèle (Gibbs *et al.*, 2013), or nous n'avons pas mesuré d'IL-18 dans notre milieu de culture, ce qui témoigne certainement d'une limite de la lignée cellulaire NIKS.



Conclusion et perspectives





Conclusion et perspectives

Notre travail a permis de montrer que l'activation des cellules de la lignée THP-1 en réponse aux hydroperoxydes allyliques de linalol et de limonène s'effectue par un mécanisme différent. L'hydroperoxyde de linalol induit suffisamment d'EROs pour induire une activation de Nrf2, ce qui n'est pas le cas de l'hydroperoxyde de limonène.

Les deux terpènes linalol et limonène se comportent également de façon différente vis-à-vis des cellules de la lignée THP-1. L'exposition des cellules au limonène entraîne une diminution du rapport GSH/GSSH ainsi qu'une activation des voies de signalisation des MAPKs et NF- κ B. L'hypothèse que ce produit puisse être un pro-haptène a été suggérée. Il pourrait subir une transformation enzymatique par les cellules THP-1, pour devenir un haptène au pouvoir oxydant. Une partie des produits de cette métabolisation seront sans doute transformés par des enzymes de phase II afin d'être éliminés, ce qui explique que le limonène n'induit pas de maturation des cellules de la lignée THP-1.

Le cyclohexène pourrait également être un pro-haptène, car il active Nrf2 au même titre que son hydroperoxyde allylique. L'expression des marqueurs d'activation des cellules de la lignée THP-1 devrait également être mesurée en réponse à ces produits. Cette mesure nous permettrait de savoir si la métabolisation du cyclohexène par les enzymes de phase I serait suffisante pour induire une maturation cellulaire.

Les KCs sont décrits comme jouant un rôle dans l'activation métabolique des pro-haptènes (Hennen *et al.*, 2011). Une co-culture des cellules des lignées HaCaT et THP-1 pourrait permettre de répondre à l'hypothèse du caractère pro-haptène du limonène et du cyclohexène. En entraînant la transformation enzymatique de ces produits, les KCs participeraient à l'activation des THP-1 avec une expression des marqueurs CD54 et CD86 plus élevée.

Afin d'identifier les produits d'oxydation du limonène par les enzymes des HaCaT, telles que les enzymes du cytochrome P450, nous proposons d'effectuer une étude *in chemico* comme celle décrite par Meesters *et al.*, 2007, qui consisterait à mettre en contact le limonène avec des enzymes de phase I et des co-facteurs, ce qui permettrait d'analyser les produits d'oxydation.

Par ailleurs, la seconde partie de cette thèse concerne le développement d'un modèle *in vitro* dans le but d'étudier l'impact d'une exposition répétée d'une molécule allergisante sur la peau et du



Conclusion et perspectives

mécanisme d'action de différenciation de l'épiderme en réponse à ce produit.

HO-1 est une protéine régulée par Nrf2 qui est bien exprimée dans l'ensemble des rafts en réponse au CinA. Pour adresser le rôle de Nrf2 lors de la différenciation de l'épiderme, nous proposons d'invalider Nrf2 par transfection des KCs avec un vecteur lentiviral. Cela nous permettra de savoir si Nrf2 est nécessaire à cette différenciation et contribue à la défense du CinA ou d'autres molécules oxydantes.

L'exposition répétée de ces rafts par le CinA n'affecte ni la viabilité cellulaire ni l'épaisseur de l'épiderme mais agit sur la filaggrine qui semble renforcer la fonction barrière. Cependant, une répartition asymétrique des cellules de la couche basale post traitement par le CinA laisse suggérer une altération de la division cellulaire. Nous proposons d'étudier les fuseaux mitotiques des cellules basales par immunohistochimie, ce qui nous permettrait de visualiser les centrosomes.

Les changements phénotypiques observés sur les rafts témoignent d'un effet du CinA. Ceux-ci étant exposés de façon systémique, nous proposons de mesurer la perméation du CinA à travers la matrice de collagène à l'aide de cellules de Franz.

Les kératines K5, K10 et K16 ont montré des profils d'expression similaires sur les rafts exposés de façon répétée au CinA. L'expression de HO-1 et NQO-1, deux enzymes régulés par Nrf2, ayant été mesurée dans les rafts en réponse au CinA permet de suggérer l'activation de Nrf2. Une étude récente portée sur des épidermes de patients atteints de psoriasis et sur des cellules de la lignée HaCaT a révélé que Nrf2 favorisait l'expression des kératines K6, K16 et K17 (Yang *et al.*, 2017b). Nous proposons donc de mesurer l'expression des kératines 6 et 17 dans nos rafts.

Une protection paracrine de Nrf2 dans l'épiderme en réponse à un stress oxydant a été décrite (Schäfer *et al.*, 2010). L'expression de HO-1 ayant été observée dans les couches supérieures de l'épiderme, soit dans les cellules les plus différenciées, nous souhaiterions mesurer l'activation de Nrf2 dans les KCs à différents stades de différenciation, à l'aide d'un gradient de calcium.



Bibliographie





A

- Abbas, A.K., Murphy, K.M., and Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, **383**, 787–793.
- Ade, N., Leon, F., Pallardy, M., Peiffer, J.L., Kerdine-Romer, S., Tissier, M.H., Bonnet, P.A., Fabre, I., and Ourlin, J.C. (2009) HMOX1 and NQO1 genes are upregulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: Role of the Keap1/Nrf2 pathway. *Toxicol. Sci.*, **107**, 451–460.
- Ådén, J., Wallgren, M., Storm, P., Weise, C.F., Christiansen, A., Schröder, W.P., Funk, C., and Wolf-Watz, M. (2011) Extraordinary μ s-ms backbone dynamics in *Arabidopsis thaliana* peroxiredoxin Q. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, **1814**, 1880–1890.
- Alam, H., Sehgal, L., Kundu, S.T., Dalal, S.N., and Vaidya, M.M. (2011) Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells. *Mol. Biol. Cell*, **22**, 4068–4078.
- Albanesi, C. (2010) Keratinocytes in allergic skin diseases. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **10**, 452–456.
- El Ali, Z., Deloménie, C., Botton, J., Pallardy, M., and Kerdine-Römer, S. (2017) Dendritic cells' death induced by contact sensitizers is controlled by Nrf2 and depends on glutathione levels. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **322**, 41–50.
- El Ali, Z., Gerbeix, C., Hemon, P., Esser, P.R., Martin, S.F., Pallardy, M., and Kerdine-Römer, S. (2013) Allergic skin inflammation induced by chemical sensitizers is controlled by the transcription factor Nrf2. *Toxicol. Sci.*, **134**, 39–48.
- Allen-Hoffmann, B.L., Schlosser, S.J., Ivarie, C. a, Sattler, C. a, Meisner, L.F., and O'Connor, S.L. (2000) Normal growth and differentiation in a spontaneously immortalized near-diploid human keratinocyte cell line, NIKS. *J. Invest. Dermatol.*, **114**, 444–455.
- Amaro-Ortiz, A., Yan, B., and D'Ozario, J.A. (2015) Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation. *Molecules*, **19**, 6202–6219.
- Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E., and Hochstein, P. (1981) Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 6858–6862.
- Amin, I.M., Abuzeid, O.M., and Rashed, L.A. (2013) Tissue level of nuclear factor-erythroid2-related factor2 and melanocyte-stimulating hormone in vitiligo patients. *J. Egypt. Women's Dermatologic Soc.*, **10**, 89–93.
- Amin, K. (2012) The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir. Med.*, **106**, 9–14.
- Anderson, R.R. and Parrish, J.A. (1981) The Optics of Human Skin. *J. Invest. Dermatol.*, **77**, 13–19.
- Aptula, A.O., Roberts, D.W., and Pease, C.K. (2007) Haptens, prohaptens and prehaptens, or electrophiles and proelectrophiles. *Contact Dermatitis*, **56**, 54–56.
- Arisawa, T., Tahara, T., Shibata, T., Nagasaka, M., Nakamura, M., Kamiya, Y., Fujita, H., Yoshioka, D., Arima, Y., Okubo, M., *et al.* (2007) Association between promoter



Bibliographie

- polymorphisms of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 gene and peptic ulcer diseases. *Int. J. Mol. Med.*, **20**, 849–853.
- Arisawa, T., Tahara, T., Shibata, T., Nagasaka, M., Nakamura, M., Kamiya, Y., Fujita, H., Yoshioka, D., Okubo, M., Sakata, M., *et al.* (2008) Nrf2 gene promoter polymorphism is associated with ulcerative colitis in a Japanese population. *Hepatology*, **55**, 394–397.
- Arnette, C., L, K.J., Hoover, P., S, G., and J, G.K. (2016) In vitro model of the epidermis: Connecting protein function to 3D structure. *Methods Enzymol.*, **569**, 287–308.
- Bae, S.H., Woo, H.A., Sung, S.H., Lee, H.E., Lee, S.K., Kil, I.S., and Rhee, S.G. (2009) Induction of Sulfiredoxin via an Nrf2-Dependent Pathway and Hyperoxidation of Peroxiredoxin III in the Lungs of Mice Exposed to Hyperoxia. *Antioxid. Redox Signal.*, **11**, 937–948.
- Baker, B.M. and Chen, C.S. (2012) Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J. Cell Sci.*, **125**, 3015–3024.
- Balla, G., Vercellotti, G.M., Muller-Eberhard, U., Eaton, J., and Jacob, H.S. (1991) Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab. Invest.*, **64**, 648–655.
- Bangert, C., Brunner, P.M., and Stingl, G. (2011) Immune functions of the skin. *Clin. Dermatol.*, **29**, 360–376.
- Banning, A., Deubel, S., Kluth, D., Zhou, Z., and Brigelius-Flohe, R. (2005) The GI-GPx Gene Is a Target for Nrf2. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 4914–4923.
- Barbero, A.M. and Frasc, H.F. (2016) Effect of Frozen Human Epidermis Storage Duration and Cryoprotectant on Barrier Function Using Two Model Compounds. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **29**, 31–40.
- Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., and Wolf, R. (2012) Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin. Dermatol.*, **30**, 257–262.
- Barouki, R. (2006) Stress oxydant et vieillissement. *Médecine Sci.*, **22**, 266–272.
- Barouki, R. and Morel, Y. (2001) Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: Mechanisms and biological implications. *Biochem. Pharmacol.*, **61**, 511–516.
- Basketter, D.A., Blaike, L., Dearman, R.J., Kimber, I., Ryan, C., Gerberick, G., Harvey, P., Evans, P., White, I., and Rycroft, R. (2000) Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis*, **42**, 344–348.
- Basketter, D., Dooms-Goossens, A., Karlberg, A. -T, and Lepoittevin, J. -P (1995) The chemistry of contact allergy: why is a molecule allergenic? *Contact Dermatitis*, **32**, 65–73.
- Bazso-Dombi, E., K, O., Jeney, F., Nagy, K., and Zs-Nagy, I. (2000) On the useful role of OH & other free radicals in differentiation of cultured human fibroblasts. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **31**, 233–242.
- Becker, D., Summerfield, S., Gillich, S., and Sevilla, M.D. (1994) Influence of oxygen on the repair of direct radiation damage to DNA by thiols in model systems. *Int. J. Radiat. Biol.*, **65**, 537–548.



Bibliographie

- Belloni Fortina, A., Cooper, S.M., Spiewak, R., Fontana, E., Schnuch, A., and Uter, W. (2015) Patch test results in children and adolescents across Europe. Analysis of the ESSCA Network 2002-2010. *Pediatr. Allergy Immunol.*, **26**, 446–455.
- Benezra, C., Sigman, C.C., Perry, L.R., Tucker Helmes, C., and Maibach, H.I. (1985) A Systematic Search for Structure-Activity Relationships of Skin Contact Sensitizers: Methodology. *J. Invest. Dermatol.*, **85**, 351–356.
- Bikle, D.D., Xie, Z., and Tu, C.-L. (2012) Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.*, **7**, 461–472.
- Bisby, R.H. and Parker, A.W. (1995) Reaction of ascorbate with the alpha-tocopheroxyl radical in micellar and bilayer membrane systems. *Arch. Biochem. Biophys.*, **317**, 170–178.
- Bito, T. and Nishigori, C. (2012) Impact of reactive oxygen species on keratinocyte signaling pathways. *J. Dermatol. Sci.*, **68**, 3–8.
- Blanpain, C. and Fuchs, E. (2006) Epidermal stem cells of the skin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **22**, 339–373.
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Wagers, A., Loubeau, M., Isola, L.M., Lubrano, L., Najfeld, V., Phelps, R.G., Grosskreutz, C., Scigliano, E., *et al.* (2006) Identification of a radio-resistant and cycling dermal dendritic cell population in mice and men. *J. Exp. Med.*, **203**, 2627–2638.
- Boniface, K., Guignouard, E., Pedretti, N., Garcia, M., Delwail, A., Bernard, F.-X., Nau, F., Guillet, G., Dagregorio, G., Yssel, H., *et al.* (2007) A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clin. Exp. Immunol.*, **150**, 407–415.
- Bonneville, M., Chavagnac, C., Vocanson, M., Rozieres, A., Benetiere, J., Pernet, I., Denis, A., Nicolas, J.-F., and Hennino, A. (2007) Skin contact irritation conditions the development and severity of allergic contact dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 1430–1435.
- Bos, J.D. (1997) Skin immune system (SIS) : cutaneous immunology and clinical immunodermatology CRC Press.
- Bos, J.D. and Kapsenberg, M.L. (1993) The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol. Today*, **14**, 75–83.
- Bos, J.D. and Meinardi, M.M.H.M. (2000) The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.*, **9**, 165–169.
- Bouwstra, J., Pilgrim, K., and Ponc, M. (2006) Structure of the skin barrier. In, Elias, P. and Feingold, K. (eds), *Skin barrier.*, pp. 65–95.
- Braendstrup, P. and Johansen, J.D. (2008) Hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde (Lyréal®) is still a frequent allergen. *Contact Dermatitis*, **59**, 187–188.
- Bråred Christensson, J., Andersen, K.E., Bruze, M., Johansen, J.D., Garcia-Bravo, B., Giménez-Arnau, A., Goh, C.L., Nixon, R., and White, I.R. (2013) An international multicentre study on the allergenic activity of air-oxidized R-limonene. *Contact Dermatitis*, **68**, 214–223.
- Bråred Christensson, J., Andersen, K.E., Bruze, M., Johansen, J.D., Garcia-Bravo, B., Gimenez Arnau, A., Goh, C.-L., Nixon, R., and White, I.R. (2012) Air-oxidized linalool-a frequent cause of fragrance contact allergy. *Contact Dermatitis*, **67**, 247–259.



Bibliographie

- Bråred Christensson, J., Karlberg, A.T., Andersen, K.E., Bruze, M., Johansen, J.D., Garcia-Bravo, B., Giménez Arnau, A., Goh, C.L., Nixon, R., and White, I.R. (2016) Oxidized limonene and oxidized linalool - Concomitant contact allergy to common fragrance terpenes. *Contact Dermatitis*, **74**, 273–280.
- Brigelius-flohé, R. and Maiorino, M. (2013) Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 3289–3303.
- Brohem, C.A., Da Silva Cardeal, L.B., Tiago, M., Soengas, M.S., De Moraes Barros, S.B., and Maria-Engler, S.S. (2011) Artificial skin in perspective: Concepts and applications. *Pigment Cell Melanoma Res.*, **24**, 35–50.
- Calverley, P.M.A. and Walker, P. (2003) Chronic obstructive pulmonary disease.
- Candi, E., Schmidt, R., and Melino, G. (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 328–240.
- Cao, Z., Tavender, T.J., Roszak, A.W., Cogdell, R.J., and Bulleid, N.J. (2011) Crystal structure of reduced and of oxidized peroxiredoxin IV enzyme reveals a stable oxidized decamer and a non-disulfide-bonded intermediate in the catalytic cycle. *J. Biol. Chem.*, **286**, 42257–42266.
- Cau, L., Pendaries, V., Lhuillier, E., Thompson, P.R., Serre, G., Takahara, H., Méchin, M., and Simon, M. (2017) Lowering relative humidity level increases epidermal protein deimination and drives human filaggrin breakdown. *J. Dermatol. Sci.*, **86**, 106–113.
- Cavani, A., De Pità, O., and Girolomoni, G. (2007) New aspects of the molecular basis of contact allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **7**, 404–408.
- Cheung, C., Smith, C.K., Hoog, J.O., and Hotchkiss, S. a (1999) Expression and localization of human alcohol and aldehyde dehydrogenase enzymes in skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **261**, 100–107.
- Chowdhury, I., Mo, Y., Gao, L., Kazi, A., Fisher, A.B., and Feinstein, S.I. (2009) Oxidant stress stimulates expression of the human peroxiredoxin 6 gene by a transcriptional mechanism involving an antioxidant response element. *Free Radic. Biol. Med.*, **46**, 146–153.
- Christensson, J.B., Hellsén, S., Börje, A., and Karlberg, A.-T. (2014) Limonene hydroperoxide analogues show specific patch test reactions. *Contact Dermatitis*, **70**, 291–300.
- Christensson, J.B., Matura, M., Bäcktorp, C., Börje, A., Nilsson, J.L.G., and Karlberg, A.T. (2006) Hydroperoxides form specific antigens in contact allergy. *Contact Dermatitis*, **55**, 230–237.
- Clark, R. a, Chong, B., Mirchandani, N., Brinster, N.K., Yamanaka, K.-I., Dowgiert, R.K., and Kupper, T.S. (2006) The vast majority of CLA⁺ T cells are resident in normal skin. *J. Immunol.*, **176**, 4431–4439.
- Clouet, E., Kerdine-Römer, S., and Ferret, P.-J. (2017) Comparison and validation of an in vitro skin sensitization strategy using a data set of 33 chemical references. *Toxicol. Vitro.*, **45**, 374–385.
- Collin, M. and Milne, P. (2016) Langerhans cell origin and regulation. *Curr. Opin. Hematol.*, **23**, 28–35.
- Coombs, R.R.A. and Gell, P.G.G. (1975) Classification of allergic reaction for clinical



Bibliographie

- hypersensitivity, disease. In, *Clinical Aspects of Immunology*. London, pp. 761–81.
- Corsini, E., Papale, A., Galbiati, V., and Roggen, E. (2014) Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients: In Vitro Opportunities for the Identification of Contact Allergens. *Cosmetics*, **1**, 61–74.
- Corsini, E., Roggen, E., Galbiati, V., and Gibbs, S. (2016) Alternative Approach for Potency Assessment: In Vitro Methods. *Cosmetics*, **3**, 1–9.
- Cottrez, F., Boitel, E., Ourlin, J.C., Peiffer, J.L., Fabre, I., Henaoui, I.S., Mari, B., Vallauri, A., Paquet, A., Barbry, P., *et al.* (2016) SENS-IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: Reproducibility and predictivity results from an inter-laboratory study. *Toxicol. Vitro.*, **32**, 248–260.
- Coughtrie, M.W., Sharp, S., Maxwell, K., and Innes, N.P. (1998) Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. *Chem. Biol. Interact.*, **109**, 3–27.
- Couto, N., Wood, J., and Barber, J. (2016) The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic. Biol. Med.*, **95**, 27–42.
- Cullinan, S.B. and Diehl, J.A. (2004) PERK-dependent Activation of Nrf2 Contributes to Redox Homeostasis and Cell Survival following Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Biol. Chem.*, **279**, 20108–20117.
- Cumberbatch, M., Dearman, R.J., and Kimber, I. (1997) Interleukin 1 beta and the stimulation of Langerhans cell migration: comparisons with tumour necrosis factor alpha. *Arch. Dermatol. Res.*, **289**, 277–284.
- Delattre, J., Beaudeau, J.-L., and Bonnefont-Rousselot, D. (2005) Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques TEC & DOC. Lavoisier.
- Denda, M. (2006) New methodology to improve epidermal barrier homeostasis. In, Loden, M. and Maibach, H. (eds), *Dry skin and moisturizers.*, pp. 155–167.
- Dickinson, D.A., Levonen, A.-L., Moellering, D.R., and Arnold, E.K. (2004) Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. *Free Radic. Biol. Med.*, **37**, 1152–1159.
- Dinkova-Kostova, A.T., Jenkins, S.N., Fahey, J.W., Ye, L., Wehage, S.L., Liby, K.T., Stephenson, K.K., Wade, K.L., and Talalay, P. (2006) Protection against UV-light-induced skin carcinogenesis in SKH-1 high-risk mice by sulforaphane-containing broccoli sprout extracts. *Cancer Lett.*, **240**, 243–252.
- Dinkova-Kostova, A.T. and Talalay, P. (2010) NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch. Biochem. Biophys.*, **501**, 116–123.
- Donaldson, J.G., Porat-shliom, N., and Cohen, L.A. (2010) Clathrin-Independent Endocytosis: A unique Platform for Cell Signaling and PM Remodeling. *Cell Signal.*, **21**, 1–6.
- Dubertret, L., Coulomb, B., Saiag, P., and Touraine, R. (1987) Les peaux artificielles vivantes.
- Durchdewald, M., Beyer, T.A., Johnson, D.A., Johnson, J.A., Werner, S., and auf dem Keller, U.



Bibliographie

- (2007) Electrophilic Chemicals but not UV Irradiation or Reactive Oxygen Species Activate Nrf2 in Keratinocytes In Vitro and In Vivo. *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 646–653.
- Dyring-Andersen, B., Skov, L., Løvendorf, M.B., Bzorek, M., Søndergaard, K., Lauritsen, J.-P.H., Dabelsteen, S., Geisler, C., and Menné Bonefeld, C. (2013) CD4(+) T cells producing interleukin (IL)-17, IL-22 and interferon- γ are major effector T cells in nickel allergy. *Contact Dermatitis*, **68**, 339–347.
- Eaton, R. and Timmis, K. (1986) Characterization of a plasmid-specified pathway for catabolism of isopropylbenzene in *Pseudomonas putida* RE204. *J. Bacteriol.*, **168**, 123–131.
- Edmondson, R., Broglie, J.J., Adcock, A.F., and Yang, L. (2014) Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev. Technol.*, **12**, 207–218.
- Eguino, P., Lasa, O., and Gardeazábal, J. (2006) Sensitization to Lyral. *Actas Dermosifiliogr*, **96**, 374–378.
- Ehrmann, R.L. and Gey, G.O. (1956) The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen. *J. Natl. Cancer Inst.*, **16**, 1375–1403.
- Enslein, K., Gombar, V.K., Blake, B.W., Maibach, H.I., Hostynek, J.J., Sigman, C.C., and Bagheri, D. (1997) A quantitative structure-toxicity relationships model for the dermal sensitization guinea pig maximization assay. *Food Chem. Toxicol.*, **35**, 1091–1098.
- European Commission (1976) Concil directive of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products (76/768/EEC). *Off. J. Eur. Communities*, 1–163.
- European Commission (2013) EURL ECVAM Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for Skin Sensitisation Testing.
- European Commission (2015) EURL ECVAM Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitisation Testing.
- European Commission (2014) Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing. 1–40.
- Ewing, J.F. and Maines, M.D. (1992) In situ hybridization and immunohistochemical localization of heme oxygenase-2 mRNA and protein in normal rat brain: Differential distribution of isozyeme 1 and 2. *Mol. Cell. Neurosci.*, **3**, 559–570.
- Feghali, C.A. and Wright, T.M. (1997) Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Biosci.*, **2**, 12–26.
- Fernandez-Flores, A. (2015) Regional Variations in the Histology of the Skin. *Am. J. Dermatopathol.*, **37**, 737–754.
- Filomeni, G., Rotilio, G., and Ciriolo, M.R. (2003) Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *FASEB J.*, **17**, 64–66.
- Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006) A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science (80-)*, **311**, 83–88.



Bibliographie

- Forman, H.J., Zhang, H., and Rinna, A. (2010) Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.*, **30**, 1–12.
- Förster, R., Braun, A., and Worbs, T. (2012) Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics. *Trends Immunol.*, **33**, 271–280.
- Fuchs, E. (2016) Epithelial Skin Biology: Three Decades of Developmental Biology, a Hundred Questions Answered and a Thousand New Ones to Address. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **116**, 357–374.
- Fujita, H. (2013) The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *J. Dermatol. Sci.*, **72**, 3–8.
- Fukai, T. and Ushio-fukai, M. (2011) Superoxide Dismutases : Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid. Redox Signal.*, **15**, 1583–1606.
- van Furth, R., Nibbering, P.H., van Dissel, J.T., and Diesselhoff-den Dulk, M.M. (1985) The characterization, origin, and kinetics of skin macrophages during inflammation. *J. Invest. Dermatol.*, **85**, 398–402.
- Galbiati, V., Papale, A., Marinovich, M., Gibbs, S., Roggen, E., and Corsini, E. (2017) Development of an in Vitro Method To Estimate the Sensitization Induction Level of Contact Allergens. *Toxicol. Lett.*, **271**, 1–11.
- Gately, M.K., Renzetti, L.M., Magram, J., Stern, a S., Adorini, L., Gubler, U., and Presky, D.H. (1998) The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, **16**, 495–521.
- Gautheron, D.C. (1984) Mitochondrial oxidative phosphorylation and respiratory chain: review. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **7**, 57–61.
- Gęgotek, A. and Skrzydlewska, E. (2015) The role of transcription factor Nrf2 in skin cells metabolism. *Arch. Dermatol. Res.*, **307**, 385–396.
- Gerberick, G.F., Troutman, J.A., Foertsch, L.M., Vassallo, J.D., Quijano, M., Dobson, R.L.M., Goebel, C., and Lepoittevin, J.-P. (2009) Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system. *Toxicol. Sci.*, **112**, 164–174.
- Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Bailey, R.E., Chaney, J.G., Morrall, S.W., and Lepoittevin, J.P. (2004) Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol. Sci.*, **81**, 332–343.
- Gether, L., Gyldenløve, M., and Thyssen, J.P. (2017) Christmas tree dermatitis caused by colophonium allergy. *Contact Dermatitis*, **77**, 406–429.
- Gibbs, S., Corsini, E., Spiekstra, S.W., Galbiati, V., Fuchs, H.W., DeGeorge, G., Troese, M., Hayden, P., Deng, W., and Roggen, E. (2013) An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **272**, 529–541.
- Gilda, J.E. and Gomes, A. V. (2013) Stain-free total protein staining is a superior loading control to b-actin for western blots. *Anal. Biochem.*, **440**, 186–188.
- Giralt, M., Cervello, I., Nogues, M.R., Puerto, a M., Ortin, F., Argany, N., and Mallol, J. (1996) Glutathione, glutathione S-transferase and reactive oxygen species of human scalp sebaceous



Bibliographie

- glands in male pattern baldness. *J. Invest. Dermatol.*, **107**, 154–158.
- Glorieux, C. and Calderon, P.B. (2017) Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol. Chem.*, **398**, 1095–1108.
- Gómez, J., González, A., Martínez-A, C., and Rebollo, A. (1998) IL-2-induced cellular events. *Crit. Rev. Immunol.*, **18**, 185–220.
- González-Muñoz, P., Conde-Salazar, L., and Vañó-Galván, S. (2014) Allergic Contact Dermatitis Caused by Cosmetic Products. *Actas Dermosifiliogr.*, **105**, 822–832.
- Gordon, S. and others (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 23–35.
- Groves, E., Dart, A.E., Covarelli, V., and Caron, E. (2008) Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 1957–1976.
- Gruber, F., Mayer, H., Lengauer, B., Mlitz, V., Sanders, J.M., Kadl, A., Bilban, M., de Martin, R., Wagner, O., Kensler, T.W., *et al.* (2010) NF-E2-related factor 2 regulates the stress response to UVA-1-oxidized phospholipids in skin cells. *Faseb J.*, **24**, 39–48.
- Guan, C.-P., Zhou, M.-N., Xu, A.-E., Kang, K.-F., Liu, J.-F., Wei, X.-D., Li, Y.-W., Zhao, D.-K., and Hong, W.-S. (2008) The susceptibility to vitiligo is associated with NF-E2-related factor2 (*Nrf2*) gene polymorphisms: a study on Chinese Han population. *Exp. Dermatol.*, **17**, 1059–1062.
- Guengerich, F.P., Liebler, D.C., and Reed, D.L. (1985) Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolites. *Crit. Rev. Toxicol.*, **14**, 259–307.
- Gurski, L.A., Petrelli, N.J., Jia, X., and Farach-Carson, M.C. (2010) 3D Matrices for Anti-Cancer Drug Testing and Development. *Oncol. Issues*, **25**, 20–25.
- Heil, M. and Land, W.G. (2014) Danger signals - damaged-self recognition across the tree of life. *Front. Plant Sci.*, **5**, 578.
- Hennen, J., Aeby, P., Goebel, C., Schettgen, T., Oberli, A., Kalmes, M., and Blömeke, B. (2011) Cross talk between keratinocytes and dendritic cells: impact on the prediction of sensitization. *Toxicol. Sci.*, **123**, 501–510.
- Hennen, J. and Blömeke, B. (2016) Keratinocytes improve prediction of sensitization potential and potency of chemicals with THP-1 cells 1. *ALTEX*, 1–19.
- Hernández-Quintero, M., Kuri-Harcuch, W., González Robles, A., and Castro-Muñozledo, F. (2006) Interleukin-6 promotes human epidermal keratinocyte proliferation and keratin cytoskeleton reorganization in culture. *Cell Tissue Res.*, **325**, 77–90.
- Hintze, K.J., Wald, K.A., Zeng, H., Jeffery, E.H., and Finley, J.W. (2003) Thioredoxin reductase in human hepatoma cells is transcriptionally regulated by sulforaphane and other electrophiles via an antioxidant response element. *J. Nutr.*, **133**, 2721–2727.
- Hirota, A., Kawachi, Y., Itoh, K., Nakamura, Y., Xu, X., Banno, T., Takahashi, T., Yamamoto, M., and Otsuka, F. (2005) Ultraviolet A Irradiation Induces NF-E2-Related Factor 2 Activation in Dermal Fibroblasts: Protective Role in UVA-Induced Apoptosis. *J. Invest. Dermatol.*, **124**, 825–832.



Bibliographie

- Hirota, A., Kawachi, Y., Yamamoto, M., Koga, T., Hamada, K., and Otsuka, F. (2011) Acceleration of UVB-induced photoageing in nrf2 gene-deficient mice. *Exp. Dermatol.*, **20**, 664–668.
- Hirota, M., Motoyama, A., Suzuki, M., Yanagi, M., Kitagaki, M., Kouzuki, H., Hagino, S., Itagaki, H., Sasa, H., Kagatani, S., *et al.* (2010) Changes of cell-surface thiols and intracellular signaling in human monocytic cell line THP-1 treated with diphenylcyclopropenone. *J. Toxicol. Sci.*, **35**, 871–880.
- Hitomi, K. (2005) Transglutaminases in skin epidermis. *Eur. J. dermatology*, **15**, 313–319.
- Hohl, D. and Williams, M. (2011) Mendelian disorders of cornification (MEDOC): The ichthyoses. In, Irvin, A. *et al.* (eds), *Harper's Textbook of Pediatric Dermatology*. Oxford, pp. 121–170.
- Holbrook, K.A., Smith, L.T., Kaplan, E.D., Minami, S.A., Hebert, G.P., and Underwood, R.A. (1993) Expression of morphogens during human follicle development in vivo and a model for studying follicle morphogenesis in vitro. *J. Invest. Dermatol.*, **101**, 39–49.
- Hollenberg, P.F. (1992) Mechanisms of cytochrome P450 and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism. *FEBS J.*, **6**, 686–694.
- Holley, A.K., Xu, Y., Noel, T., Bakthavatchalu, V., Batinic-Haberle, I., and St. Clair, D.K. (2014) Manganese superoxide dismutase-mediated inside-out signaling in HaCaT human keratinocytes and SKH-1 mouse skin. *Antioxidants Redox Signal.*, **20**, 2347–2360.
- Hong, S.H., Ismail, I.A., Kang, S.M., Han, D.C., and Kwon, B.M. (2016) Cinnamaldehydes in Cancer Chemotherapy. *Phyther. Res.*, **30**, 754–767.
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K., and Horikawa, T. (2003) UV-induced skin damage. *Toxicology*, **189**, 21–39.
- Iida, K., Itoh, K., Kumagai, Y., Oyasu, R., Hattori, K., Kawai, K., Shimazui, T., Akaza, H., and Yamamoto, M. (2004) Nrf2 Is Essential for the Chemopreventive Efficacy of Oltipraz against Urinary Bladder Carcinogenesis. *Cancer Res.*, **64**, 6424–6431.
- Ithayaraja, C.M. (2011) Mini-review: Metabolic functions and molecular structure of glutathione reductase. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **9**, 104–115.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006) The Orphan Nuclear Receptor ROR γ Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell*, **126**, 1121–1133.
- Iyanagi, T. and Yamazaki, I. (1970) One-electron-transfer reactions in biochemical systems V. Difference in the mechanism of quinone reduction by the NADH dehydrogenase and the NAD(P)H dehydrogenase (DT-diaphorase). *Biochim. Biophys. Acta - Bioelectron.*, **216**, 282–294.
- Janeway, C. a (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *J. Immunol.*, **54**, 1–13.
- Ji, L., Li, H., Gao, P., Shang, G., Zhang, D.D., Zhang, N., and Jiang, T. (2013) Nrf2 Pathway Regulates Multidrug-Resistance-Associated Protein 1 in Small Cell Lung Cancer. *PLoS One*, **8**, 1–12.



Bibliographie

- Jiang, A., Bloom, O., Ono, S., Cui, W., Unternaehrer, J., Jiang, S., Whitney, J.A., Connolly, J., Banchereau, J., and Mellman, I. (2007) Disruption of E-Cadherin-Mediated Adhesion Induces a Functionally Distinct Pathway of Dendritic Cell Maturation. *Immunity*, **27**, 610–624.
- Johansen, J.D. (2003) Fragrance contact allergy: a clinical review. *Am. J. Clin. Dermatol.*, **4**, 789–798.
- Kagatani, S., Sasaki, Y., Hirota, M., Mizuashi, M., Suzuki, M., Ohtani, T., Itagaki, H., and Aiba, S. (2010) Oxidation of cell surface thiol groups by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.*, **130**, 175–183.
- Kalthoff, S., Ehmer, U., Freiberg, N., Manns, M.P., and Strassburg, C.P. (2010) Interaction between Oxidative Stress Sensor Nrf2 and Xenobiotic-activated Aryl Hydrocarbon Receptor in the Regulation of the Human Phase II Detoxifying UDP-glucuronosyltransferase 1A10. *J. Biol. Chem.*, **285**, 5993–6002.
- Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K.J.A., Dennery, P.A., Forman, H.J., Grisham, M.B., Mann, G.E., Moore, K., Roberts II, L.J., and Ischiropoulos, H. (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.*, **52**, 1–6.
- Kanitakis, J. (2002) Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. dermatology*, **12**, 390–399.
- Kannan, S. and Jaiswal, A.K. (2006) Low and High Dose UVB Regulation of Transcription Factor NF-E2-Related Factor 2. *Cancer Res.*, **66**, 8421–8429.
- Kao, D. (2010) Allergie de contact aux fragrances, réactivité radicalaire d'hydroperoxydes allyliques dérivés de terpènes vis-à-vis d'acides aminés en présence de fer.
- Kao, D., Chaintreau, A., Lepoittevin, J.-P., and Giménez-Arnau, E. (2014) Mechanistic studies on the reactivity of sensitizing allylic hydroperoxides: investigation of the covalent modification of amino acids by carbon-radical intermediates. *Toxicol. Res. (Camb)*, **3**, 278–289.
- 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.
- Kapsenberg, M.L. (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 984–993.
- Karlberg, A.T., Börje, A., Duus Johansen, J., Lidén, C., Rastogi, S., Roberts, D., Uter, W., and White, I.R. (2013) Activation of non-sensitizing or low-sensitizing fragrance substances into potent sensitizers - Prehaptens and prohaptens. *Contact Dermatitis*, **69**, 323–334.
- Kawakubo, Y., Merk, H.F., Masaoudi, T.A., Sieben, S., and Blömeke, B. (2000) N-Acetylation of paraphenylenediamine in human skin and keratinocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 150–5.
- Kellogg, E.W. and Fridovich, I. (1977) Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, **252**, 6721–6728.
- Kendall, R.T. and Feghali-Bostwick, C.A. (2014) Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators. *Front. Pharmacol.*, **5**, 1–13.
- Kerr, M.C. and Teasdale, R.D. (2009) Defining macropinocytosis. *Traffic*, **10**, 364–371.



Bibliographie

- Kim, J. Bin (2005) Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin. Cancer Biol.*, **15**, 365–377.
- Kim, Y.R., Oh, J.E., Kim, M.S., Kang, M.R., Park, S.W., Han, J.Y., Eom, H.S., Yoo, N.J., and Lee, S.H. (2010) The role of nuclear organization in cancer. *J. Pathol.*, **220**, 446–451.
- Kimber, I., Dearman, R.J., Basketter, D.A., Ryan, C.A., and Gerberick, G.F. (2002) The local lymph node assay: past, present and future. *Contact Dermatitis*, **47**, 315–328.
- Kleinewietfeld, M., Puentes, F., Borsellino, G., Battistini, L., Ro, O., and Falk, K. (2005) CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25⁺ CD4⁺ T-cell subset. *Blood*, **105**, 2877–2886.
- Kokot, A., Metze, D., Mouchet, N., Galibert, M.-D., Schiller, M., Luger, T.A., and Böhm, M. (2009) α -Melanocyte-Stimulating Hormone Counteracts the Suppressive Effect of UVB on Nrf2 and Nrf-Dependent Gene Expression in Human Skin. *Endocrinology*, **150**, 3197–3206.
- Korkina, L. and Pastore, S. (2009) The role of redox regulation in the normal physiology and inflammatory diseases of skin. *Front. Biosci.*, **1**, 123–141.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.*, **27**, 485–517.
- Kosten, I.J., Spiekstra, S.W., de Gruijl, T.D., and Gibbs, S. (2015) MUTZ-3 derived Langerhans cells in human skin equivalents show differential migration and phenotypic plasticity after allergen or irritant exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **287**, 35–42.
- Kosten, I.J., Spiekstra, S.W., De Gruijl, T.D., and Gibbs, S. (2016) MUTZ-3 langerhans cell maturation and CXCL12 independent migration in reconstructed human gingiva. *ALTEX*, **33**, 423–434.
- Krautheim, A., Uter, W., Frosch, P., Schnuch, A., and Geier, J. (2010) Patch testing with fragrance mix II: Results of the IVDK 2005-2008. *Contact Dermatitis*, **63**, 262–269.
- Krueger, S.K. and Williams, D.E. (2005) Mammalian flavin-containing monooxygenases: Structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacol. Ther.*, **106**, 357–387.
- Kruh, G.D., Zeng, H., Rea, P.A., Liu, G., Chen, Z.S., Lee, K., and Belinsky, M.G. (2001) MRP subfamily transporters and resistance to anticancer agents. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**, 493–501.
- Küchler, S., Strüver, K., and Friess, W. (2013) Reconstructed skin models as emerging tools for drug absorption studies. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **9**, 1255–1263.
- Kumari, S., Mg, S., and Mayor, S. (2010) Endocytosis unplugged : multiple ways to enter the cell. *Cell Res.*, 256–275.
- Kurinna, S., Muzumdar, S., Köhler, U.A., Kockmann, T., auf dem Keller, U., Schäfer, M., and Werner, S. (2016) Autocrine and Paracrine Regulation of Keratinocyte Proliferation through a Novel Nrf2–IL-36 γ Pathway. *J. Immunol.*, **196**, 4663–4670.
- Lambert, P.F., Ozbun, M.A., Collins, A., Holmgren, S., Lee, D., and Nakahara, T. (2005) Using an immortalized cell line to study the HPV life cycle in organotypic ‘raft’ cultures. *Methods Mol.*



Bibliographie

Med., **119**, 141–155.

Lampe, M.A., Burlingame, A.L., Whitney, J., Williams, M.L., Brown, B.E., Roitman, E., and Elias, P.M. (1983) Human stratum corneum lipids : characterization and regional variations. *J. Lipid Res.*, **24**, 120–130.

Landmann, L. (1988) The epidermal permeability barrier. *Anat. Embryol. (Berl.)*, **178**, 1–13.

Langerhans, P. (1868) Über die nerven der menschlichen haut. *Arch. Pathol. Anat.*, **44**, 325–337.

Lau, A., Villeneuve, N.F., Sun, Z., Wong, P.K., and Zhang, D.D. (2008) Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol. Res.*, **58**, 262–270.

Lau, A., Villeneuve, N.F., Sun, Z., Wong, P.K., and Zhang, D.D. (2008) Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol. Res.*, **58**, 262–70.

Lebre, M.C., van der Aar, A.M.G., van Baarsen, L., van Capel, T.M.M., Schuitemaker, J.H.N., Kapsenberg, M.L., and de Jong, E.C. (2007) Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 331–341.

Lee, S.H., Elias, P.M., Proksch, E., Menon, G.K., Mao-Quiang, M., and Feingold, K.R. (1992) Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. *J. Clin. Invest.*, **89**, 530–538.

Lee, Y., Shin, J.M., Jang, S., Choi, D.K., Seo, M.S., Kim, H.R., Sohn, K.C., Im, M., Seo, Y.J., Lee, J.H., *et al.* (2014) Role of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) in epidermal differentiation. *Arch. Dermatol. Res.*, **306**, 677–682.

Leigh, I.M., Navsaria, H., Purkis, P.E., McKay, I.A., Bowden, P.E., and Riddle, P.N. (1995) Keratins (K16 and K17) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis in vivo and in vitro. *Br. J. Dermatol.*, **133**, 501–511.

Lepoittevin, J.P. (2011) Les bases chimiques de l'allergie de contact. *Rev. Fr. Allergol.*, **51**, 208–211.

Lepoittevin, J.P. (2006) Metabolism versus chemical transformation or pro- versus prehapten? *Contact Dermatitis*, **54**, 73–74.

Lepoittevin, J.P. and Cribier, B. (1998) Physiopathology of contact eczema. *Ann. Dermatol. Venereol.*, **125**, 775–82.

Lepoittevin, J.P. and Karlberg, A.T. (1994) Interactions of allergenic hydroperoxides with proteins: a radical mechanism? *Chem. Res. Toxicol.*, **7**, 130–133.

Levin, J., Friedlander, S.F., and Del Rosso, J.Q. (2013) Atopic dermatitis and the stratum corneum - Part 1: The role of filaggrin in the stratum corneum barrier and atopic skin. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.*, **6**, 16–22.

Levine, W.G. (1991) Metabolism of AZO Dyes: Implication for Detoxication and Activation. *Drug Metab. Rev.*, **23**, 253–309.

Lü, J.-M., Lin, P.H., Yao, Q., and Chen, C. (2010) Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J. Cell. Mol. Med.*, **14**, 840–860.

Lubet, R.A., Townsend, R., Clapper, M.L., Juliana, M.M., Steele, V.E., McCormick, D.L., and



Bibliographie

- Grubbs, C.J. (2016) 5MeCDDO Blocks Metabolic Activation but not Progression of Breast, Intestine, and Tongue Cancers. Is Antioxidant Response Element a Prevention Target? *Cancer Prev. Res.*, **9**, 616–623.
- Maresca, V., Roccella, M., Roccella, F., Camera, E., Del Porto, G., Passi, S., Grammatico, P., and Picardo, M. (1997) Increased sensitivity to peroxidative agents as a possible pathogenic factor of melanocyte damage in vitiligo. *J. Invest. Dermatol.*, **109**, 310–313.
- Marrakchi, S. and Maibach, H.I. (2007) Biophysical parameters of skin: map of human face, regional, and age related differences. *Contact Dermatitis*, **57**, 28–34.
- Marrot, L., Jones, C., Perez, P., and Meunier, J.-R. (2007) The significance of Nrf2 pathway in (photo)-oxidative stress response in melanocytes and keratinocytes of the human epidermis. *Pigment Cell Melanoma Res.*, **21**, 79–88.
- Martin, R.J., Denyer, S.P., and Hadgraft, J. (1987) Skin metabolism of topically applied compounds. *Int. J. Pharm.*, **39**, 23–32.
- Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009) The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.*, **27**, 229–265.
- Martins, L.E.A.M. and Reis, V.M.S. Dos (2011) Immunopathology of allergic contact dermatitis. *An. Bras. Dermatol.*, **86**, 419–433.
- Masterson, A.J., Sombroek, C.C., de Gruijl, T.D., Graus, Y.M.F., van der Vliet, H.J.J., Lougheed, S.M., van den Eertwegh, A.J.M., Pinedo, H.M., and Scheper, R.J. (2002) MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+precursors. *Blood*, **100**, 701–703.
- Matthias, L.J. and Hogg, P.J. (2003) Redox control on the cell surface: implications for HIV-1 entry. *Antioxid. Redox Signal.*, **5**, 133–138.
- Mazzoleni, G., Di Lorenzo, D., and Steimberg, N. (2009) Modelling tissues in 3D: The next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr.*, **4**, 13–22.
- McGrath, J.A. and Uitto, J. (2008) The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. *Trends Mol. Med.*, **14**, 20–27.
- McLafferty, E., Hendry, C., and Alistair, F. (2012) The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nurs. Stand.*, **27**, 35–42.
- Meesters, R.J.W., Duisken, M., and Hollender, J. (2007) Study on the cytochrome P450-mediated oxidative metabolism of the terpene alcohol linalool: indication of biological epoxidation. *Xenobiotica*, **37**, 604–617.
- Mélissopoulos, A. and Levacher, C. (2012) La peau Structure et physiologie.
- Menon, G.K., Grayson, S., and Elias, P.M. (1985) Ionic Calcium Reservoirs in Mammalian Epidermis: Ultrastructural Localization by Ion-Capture Cytochemistry. *J. Invest. Dermatol.*, **84**, 508–512.
- Merad, M., Ginhoux, F., and Collin, M. (2008) Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 935–947.



Bibliographie

- Metcalf, D.D., Pawankar, R., Ackerman, S.J., Akin, C., Clayton, F., Falcone, F.H., Gleich, G.J., Irani, A.M., Johansson, M.W., Klion, A.D., *et al.* (2016) Biomarkers of the involvement of mast cells, basophils and eosinophils in asthma and allergic diseases. *World Allergy Organ. J.*, **9**, 1–15.
- Meuris, F., Carthagena, L., Jaracz-Ros, A., Gaudin, F., Cutolo, P., Deback, C., Xue, Y., Thierry, F., Doorbar, J., and Bachelier, F. (2016) The CXCL12/CXCR4 Signaling Pathway: A New Susceptibility Factor in Human Papillomavirus Pathogenesis. *PLoS Pathog.*, **12**, 1–25.
- Mienaltowski, M.J. and Birk, D.E. (2014) Structure, Physiology, and Biochemistry of Collagens. In, *Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases*. Springer, Dordrecht, pp. 5–29.
- Migdal, C., Botton, J., El Ali, Z., Azoury, M.E., Guldemann, J., Giménez-Arnau, E., Lepoittevin, J.P., Kerdine-Römer, S., and Pallardy, M. (2013) Reactivity of chemical sensitizers toward amino acids in Cellulo plays a role in the activation of the Nrf2-ARE pathway in human monocyte dendritic cells and the THP-1 cell line. *Toxicol. Sci.*, **133**, 259–274.
- Migdal, C. and Serres, M. (2011) Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Medecine/Sciences*, **27**, 405–412.
- Milpied-Homsy, B., Collet, E., and Vigan, M. (2009) Allergic dermatitis. *Ann. Dermatol. Venereol.*, **136**, 8–9.
- Moll, I. (2003) Human skin organ culture. *Methods Mol. Med.*, **78**, 305–10.
- Moll, R., Divo, M., and Langbein, L. (2008) The human keratins: Biology and pathology. *Histochem. Cell Biol.*, **129**, 705–733.
- Mortz, C.G. and Andersen, K.E. (2010) Fragrance mix i patch test reactions in 5006 consecutive dermatitis patients tested simultaneously with TRUE Test® and Trolab® test material. *Contact Dermatitis*, **63**, 248–253.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, **136**, 2348–2357.
- Moss, E., Debeuckelaere, C., Berl, V., Elbayed, K., Moussallieh, F.M., Namer, I.J., and Lepoittevin, J.P. (2016) In situ metabolism of cinnamyl alcohol in reconstructed human epidermis: new insights into the activation of this fragrance skin sensitizer. *Chem. Res. Toxicol.*, **29**, 1172–1178.
- Moss, E. and Lepoittevin, J. (2016) Rôle du métabolisme épidermique. *Progrès en Dermato-Allergologie*, 69–84.
- Mosser, D.M. and Edwards, J.P. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 958–969.
- Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., *et al.* (2014) Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*, **41**, 14–20.
- Mutterer, V., Gimenez Arnau, E., Karlberg, A.T., and Lepoittevin, J.P. (2000) Synthesis and allergenic potential of a 15-hydroperoxyabiatic acid-like model: Trapping of radical intermediates. *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 1028–1036.



Bibliographie

- Nagem, R.A., Martins, E.A., Gonçalves, V.M., Aparício, R., and Polikarpov, I. (1999) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of human catalase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **55**, 1614–1615.
- Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.-Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O’Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., *et al.* (2007) Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat. Immunol.*, **8**, 1217–1226.
- Natarajan, V.T., Singh, A., Kumar, A.A., Sharma, P., Kar, H.K., Marrot, L., Meunier, J.R., Natarajan, K., Rani, R., and Gokhale, R.S. (2010a) Transcriptional upregulation of Nrf2-dependent phase II detoxification genes in the involved epidermis of vitiligo vulgaris. *J. Invest. Dermatol.*, **130**, 2781–2789.
- Natarajan, V.T., Singh, A., Kumar, A.A., Sharma, P., Kar, H.K., Marrot, L., Meunier, J.R., Natarajan, K., Rani, R., and Gokhale, R.S. (2010b) Transcriptional upregulation of Nrf2-dependent phase II detoxification genes in the involved epidermis of vitiligo vulgaris. *J. Invest. Dermatol.*, **130**, 2781–2789.
- Natsch, A. and Emter, R. (2016) Nrf2 activation as a key event triggered by skin sensitizers: the development of the stable KeratinoSens reporter gene assay. *ATLA*, **44**, 443–451.
- Natsch, A. and Emter, R. (2008) Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: Application to the in vitro testing of the sensitization potential of chemicals. *Toxicol. Sci.*, **102**, 110–119.
- Nedoszytko, B., Sokołowska-Wojdyło, M., Ruckemann-Dziurdzińska, K., Roszkiewicz, J., and Nowicki, R.J. (2014) Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: Atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. *Postep. Dermatologii i Alergol.*, **31**, 84–91.
- Nemes, Z. and Steinert, P.M. (1999) Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp. Mol. Med.*, **31**, 5–19.
- Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z., and Nickoloff, B.J. (2009) Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, **9**, 679–691.
- Nestle, F.O., Zheng, X.G., Thompson, C.B., Turka, L.A., and Nickoloff, B.J. (1993) Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J. Immunol.*, **151**, 6535–6545.
- Nielsen, J.B., Plasencia, I., Sørensen, J.A., and Bagatolli, L.A. (2011) Storage conditions of skin affect tissue structure and subsequent in vitro percutaneous penetration. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **24**, 93–102.
- Niessen, C.M. (2007) Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function. *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 2525–2532.
- Nimse, S.B. and Pal, D. (2015) Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.*, **5**, 27986–28006.
- Nomura, T., Kabashima, K., and Miyachi, Y. (2014) The panoply of $\alpha\beta$ T cells in the skin. *J. Dermatol. Sci.*, **76**, 3–9.



Bibliographie

- Nukada, Y., Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Mugita, N., Hirota, M., Miyazawa, M., Ito, Y., Sasa, H., and Nishiyama, N. (2011) Predictive performance for human skin sensitizing potential of the human cell line activation test (h-CLAT). *Contact Dermatitis*, **65**, 343–353.
- OECD (2012) The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 2: Use of the AOP to Develop Chemical Categories and Integrated Assessment and Testing Approaches, Paris, France.
- OpenStax (2016) Anatomy & Physiology OpenStax CNX (ed).
- Ouvrage collectif (2005) Comprendre la peau.
- Ouwehand, K., Santegoets, S.J.A.M., Bruynzeel, D.P., Scheper, R.J., de Gruijl, T.D., and Gibbs, S. (2008) CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis. *Eur. J. Immunol.*, **38**, 3050–3059.
- Packer, L. and Valacchi, G. (2002) Antioxidants and the Response of Skin to Oxidative Stress: Vitamin E as a Key Indicator. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **15**, 282–290.
- Paladini, R.D. and Coulombe, P.A. (1998) Directed expression of keratin 16 to the progenitor basal cells of transgenic mouse skin delays skin maturation. *J. Cell Biol.*, **142**, 1035–1051.
- Park, B.K., Pirmohamed, M., and Kitteringham, N.R. (1995) The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacol. Ther.*, **68**, 385–424.
- Pelle, E., Mammone, T., Maes, D., and Frenkel, K. (2005) Keratinocytes act as a source of reactive oxygen species by transferring hydrogen peroxide to melanocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **124**, 793–797.
- Perkins, A., Nelson, K.J., Parsonage, D., Poole, L.B., and Karplus, P.A. (2015) Peroxiredoxins: Guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem. Sci.*, **40**, 435–445.
- Perkins, A., Poole, L.B., and Karplus, P.A. (2014) Tuning of peroxiredoxin catalysis for various physiological roles. *Biochemistry*, **53**, 7693–7705.
- Piao, M.S., Choi, J.Y., Lee, D.H., Yun, S.J., Lee, J.B., and Lee, S.C. (2011) Differentiation-dependent expression of NADP(H):Quinone oxidoreductase-1 via NF-E2 related factor-2 activation in human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.*, **62**, 147–153.
- Picchianti-Diamanti, A., Rosado, M.M., Scarsella, M., Laganà, B., and D'Amelio, R. (2014) P-glycoprotein and drug resistance in systemic autoimmune diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 4965–4976.
- Pickard, C., Smith, A.M., Cooper, H., Strickland, I., Jackson, J., Healy, E., and Friedmann, P.S. (2007) Investigation of Mechanisms Underlying the T-Cell Response to the Hapten 2,4-Dinitrochlorobenzene. *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 630–637.
- Pietsch, E.C., Chan, J.Y., Torti, F.M., and Torti, S. V. (2003) Nrf2 Mediates the Induction of Ferritin H in Response to Xenobiotics and Cancer Chemopreventive Dithiolethiones. *J. Biol. Chem.*, **278**, 2361–2369.
- Price, K.J., Tsykin, A., Giles, K.M., Sladic, R.T., Epis, M.R., Ganss, R., Goodall, G.J., and Leedman, P.J. (2012) Matrigel Basement Membrane Matrix influences expression of



Bibliographie

- microRNAs in cancer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **427**, 343–348.
- Proksch, E., Brandner, J.M., and Jensen, J.-M. (2008) The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.*, **17**, 1063–1072.
- Proksch, E. and Jensen, J. (2008) Skin as an organ of protection. In, Wolff, K. *et al.* (eds), *Fitzpatrick's dermatology in general medicine.*, pp. 383–395.
- Prost-Squarcioni, C. (2006) Histology of skin and hair follicle. *Med. Sci. MS*, **22**, 131–137.
- Prusakiewicz, J.J., Ackermann, C., and Voorman, R. (2006) Comparison of skin esterase activities from different species. *Pharm. Res.*, **23**, 1517–1524.
- Putnam, C.D., Arvai, A.S., Bourne, Y., and Tainer, J.A. (2000) Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism 1 Edited by R. Huber. *J. Mol. Biol.*, **296**, 295–309.
- Python, F., Goebel, C., and Aeby, P. (2007) Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **220**, 113–124.
- Randolph, G.J., Angeli, V., and Swartz, M.A. (2005) Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat. Immunol.*, **5**, 617–628.
- Ratzinger, G., Stoitzner, P., Ebner, S., Lutz, M.B., Layton, G.T., Rainer, C., Senior, R.M., Shipley, J.M., Fritsch, P., Schuler, G., *et al.* (2002) Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *J. Immunol.*, **168**, 4361–4371.
- Reijnders, C.M.A., van Lier, A., Roffel, S., Kramer, D., Scheper, R.J., and Gibbs, S. (2015) Development of a Full-Thickness Human Skin Equivalent In Vitro Model Derived from TERT-Immortalized Keratinocytes and Fibroblasts. *Tissue Eng. Part A*, **21**, 2448–2459.
- Rhee, S.G., Woo, H.A., Kil, I.S., and Bae, S.H. (2012) Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *J. Biol. Chem.*, **287**, 4403–4410.
- Rheinwald, J.G. and Green, H. (1975) Serial Cultivation of Strains of Human Epidermal Keratinocytes: the Formation of Keratinizing Colonies from Single Cells. *Cell*, **6**, 331–344.
- Richmond, J.M. and Harris, J.E. (2014) Immunology and skin in health and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **4**, 1–20.
- Ridings, J.E., Barratt, M.D., Cary, R., Earnshaw, C.G., Eggington, C.E., Ellis, M.K., Judson, P.N., Langowski, J.J., Marchant, C.A., Payne, M.P., *et al.* (1996) Computer prediction of possible toxic action from chemical structure: an update on the DEREK system. *Toxicology*, **106**, 267–279.
- Roberts, D.W., Fragnals, R., Lepoittevin, J.P., and Benezra, C. (1991) Refinement of the relative alkylolation index (RAI) model for skin sensitization and application to mouse and guinea-pig test data for alkyl alkanesulphonates. *Arch. Dermatol. Res.*, **283**, 387–394.
- Roche, P.A. and Furuta, K. (2015) The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.*, **15**, 203–216.
- Roop, D. (1995) Defects in the barrier. *Science (80-.)*, **267**, 474–475.



Bibliographie

- Rosdy, M. and Clauss, L.C. (1990) Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.*, **95**, 409–414.
- Rougier, A., Lotte, C., and Maibach, H.I. (1987) In vivo percutaneous penetration of some organic compounds related to anatomic site in humans: predictive assessment by the stripping method. *J. Pharm. Sci.*, **76**, 451–454.
- Roussel, A., Nève, J., and Hininger, I. (2005) Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. In, Delattre, J. and Bonnefont-Rousselot, D. (eds), *Antioxydants et nutrition*. Paris, pp. 261–280.
- Russell, W.M.S. and Burch, R.L. (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique* Methuen. London, UK.
- Rustemeyer, T., van Hoogstraten, I.M.W., von Blomberg, B.M.E., and Scheper, R.J. (2006) Mechanisms in Allergic Contact Dermatitis. In, *Contact Dermatitis*, pp. 11–43.
- Saint-mezard, P., Rosieres, A., Berard, F., Dubois, B., Kaiserlian, D., and Nicolas, J. (2004) Allergic contact dermatitis. *Eur. J. dermatology*, **14**, 284–295.
- Sampathkumar, S.-G., Jones, M.B., and Yarema, K.J. (2006) Metabolic expression of thiol-derivatized sialic acids on the cell surface and their quantitative estimation by flow cytometry. *Nat. Protoc.*, **1**, 1840–1851.
- Sandby-Møller, J., Poulsen, T., and Wulf, H.C. (2003) Epidermal Thickness at Different Body Sites: Relationship to Age, Gender, Pigmentation, Blood Content, Skin Type and Smoking Habits. *Acta Derm. Venereol.*, **83**, 410–413.
- Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A.D., and McLean, W.H.I. (2009) Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J. Cell Sci.*, **122**, 1285–1294.
- Santegoets, S.J.A.M., Masterson, A.J., van der Sluis, P.C., Loughheed, S.M., Fluitsma, D.M., van den Eertwegh, A.J.M., Pinedo, H.M., Scheper, R.J., and de Gruijl, T.D. (2006) A CD34+ human cell line model of myeloid dendritic cell differentiation: evidence for a CD14+CD11b+ Langerhans cell precursor. *J. Leukoc. Biol.*, **80**, 1337–1344.
- dos Santos, G.G., Spiekstra, S.W., Sampat-Sardjoepersad, S.C., Reinders, J., Scheper, R.J., and Gibbs, S. (2011) A potential in vitro epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency. *Toxicol. Vitro.*, **25**, 347–357.
- Sautin, Y.Y. and Johnson, R.J. (2010) Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **27**, 608–619.
- Schafer, M., Dutsch, S., Auf Dem Keller, U., and Werner, S. (2010) Nrf2: A central regulator of UV protection in the epidermis. *Cell Cycle*, **9**, 2917–2918.
- Schäfer, M., Dutsch, S., Navid, F., Schwarz, A., Johnson, D.A., Johnson, J.A., and Werner, S. (2010) Nrf2 establishes a glutathione-mediated gradient of UVB cytoprotection in the epidermis. *Genes (Basel)*, **24**, 1045–1058.
- Schäfer, M., Farwanah, H., Willrodt, A.H., Huebner, A.J., Sandhoff, K., Roop, D., Hohl, D., Bloch, W., and Werner, S. (2012) Nrf2 links epidermal barrier function with antioxidant defense. *EMBO Mol. Med.*, **4**, 364–379.



Bibliographie

- Schäfer, M. and Werner, S. (2015) Nrf2 - A regulator of keratinocyte redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 243–252.
- Schallreuter, K.U., Moore, J., Wood, J.M., Beazley, W.D., Gaze, D.C., Tobin, D.J., Marshall, H.S., Panske, A., Panzig, E., and Hibberts, N.A. (1999) In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase. *J. Invest. Dermatol.*, **4**, 91–96.
- Schnuch, A., Geier, J., and Uter, W. (2012) Is hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde sensitization declining in central Europe? *Contact Dermatitis*, **67**, 47–49.
- Schnuch, A., Uter, W., Geier, J., and Gefeller, O. (2002) Epidemiology of contact allergy: an estimation of morbidity employing the clinical epidemiology and drug-utilization research (CE-DUR) approach. *Contact Dermatitis*, **47**, 32–39.
- Schulze, H., Kolter, T., and Sandhoff, K. (2009) Principles of lysosomal membrane degradation: Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, **1793**, 674–683.
- Schweizer, J., Bowden, P.E., Coulombe, P.A., Langbein, L., Lane, E.B., Magin, T.M., Maltais, L., Omary, M.B., Parry, D.A.D., Rogers, M.A., *et al.* (2006) New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J. Cell Biol.*, **174**, 169–174.
- Scientific Committee on Consumer Safety (2011) Scientific committee on consumer safety on fragrance allergens in cosmetic products. *Eur. Comm.*, 0–136.
- Scotton, C. and Chambers, R. (2007) Molecular Targets in Pulmonary Fibrosis: The Myofibroblast in Focus. *Chest*, **132**, 1311–1321.
- Seneschal, J., Clark, R.A., Gehad, A., Baecher-Allan, C., and Kupper, T. (2009) Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells. *Immunity*, **27**, 339–351.
- Shevach, E.M., DiPaolo, R. a, Andersson, J., Zhao, D.-M., Stephens, G.L., and Thornton, A.M. (2006) The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol. Rev.*, **212**, 60–73.
- Shibata, T., Ohta, T., Tong, K.I., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., Asamura, H., Yamamoto, M., and Hirohashi, S. (2008) Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 13568–13573.
- Siegel, D., Yan, C., and Ross, D. (2012) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochem. Pharmacol.*, **83**, 1033–1040.
- Simpson, C.L., Patel, D.M., and Green, K.J. (2011) Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 565–580.
- Smith, C.K., Moore, C.A., Elahi, E.N., Smart, A.T.S., and Hotchkiss, S.A.M. (2000) Human Skin Absorption and Metabolism of the Contact Allergens, Cinnamic Aldehyde, and Cinnamic Alcohol. *Toxicol Appl Pharmacol*, **168**, 189–199.
- Souwer, Y., Szegedi, K., Kapsenberg, M.L., and de Jong, E.C. (2010) IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. *Curr. Opin. Immunol.*, **22**, 821–826.



Bibliographie

- Spriggs, S., Sheffield, D., Olayanju, A., Kitteringham, N.R., Naisbitt, D.J., and Aleksic, M. (2016) Effect of repeated daily dosing with 2,4-dinitrochlorobenzene on glutathione biosynthesis and Nrf2 activation in Reconstructed Human Epidermis. *Toxicol. Sci.*, **154**, 5–15.
- Stone, K.D., Prussin, C., and Metcalfe, D.D. (2010) IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **125**, 73–80.
- Streilein, J.W. (1983) Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *J. Invest. Dermatol.*, **80**, 12–16.
- Streilein, J.W. and Grammer, S. (1989) In vitro evidence that Langerhans cells can adopt two functionally distinct forms capable of antigen presentation to T lymphocytes. *J. Immunol.*, **143**, 3925–3933.
- Sun, T., Jackson, S., Haycock, J.W., and MacNeil, S. (2006) Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. *J. Biotechnol.*, **122**, 372–381.
- Sun, Z., Huang, Z., and Zhang, D.D. (2009) Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLoS One*, **4**, 1–9.
- Suter, M.M., Schulze, K., Bergman, W., Welle, M., Roosje, P., and Müller, E.J. (2009) The keratinocyte in epidermal renewal and defence. *Vet. Dermatol.*, **20**, 515–532.
- Suzuki, T. and Yamamoto, M. (2015) Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 93–100.
- Suzuki, T. and Yamamoto, M. (2017) Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1–Nrf2 system during cellular stress. *J. Biol. Chem.*, **292**, 16817–16824.
- Sykoti, G.P. and Bohmann, D. (2010) Stress-Activated Cap'n'collar Transcription Factors in Aging and Human Disease. *Sci. Signal.*, **3**, 1–22.
- Tammi, R. and Maibach, H. (1987) Skin Organ Culture : Why ? *Int. J. Dermatol.*, **26**, 150–161.
- Tang, A., Amagai, M., Granger, L.G., Stanley, J.R., and Udey, M.C. (1993) Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature*, **361**, 82–85.
- Thakoersing, V.S., Danso, M.O., Mulder, A., Gooris, G., Ghalbzouri, A. El, and Bouwstra, J.A. (2012) Nature versus nurture: does human skin maintain its stratum corneum lipid properties in vitro? *Exp. Dermatol.*, **21**, 865–870.
- Thiele, J., Barland, C., and Ghadially, R. (2006) Permeability and antioxidant barriers in aged skin. *Skin aging*. Gilchrist, B. and Krutmann, J. (eds) Springer Berlin, Germany.
- Tibbitt, M.W. and Anseth, K.S. (2010) Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for 3D Cell Culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **103**, 655–663.
- Tinois, E., Tiollier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M., and Thivolet, J. (1991) In vitro and post-transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. *Exp. Cell Res.*, **193**, 310–309.
- Toki, T., Itoh, J., Kitazawa, J., Arai, K., Hatakeyama, K., Akasaka, J., Igarashi, K., Nomura, N.,



Bibliographie

- Yokoyama, M., Yamamoto, M., *et al.* (1997) Human small Maf proteins form heterodimers with CNC family transcription factors and recognize the NF-E2 motif. *Oncogene*, **14**, 1901–1910.
- Torres, A.G. and Gait, M.J. (2012) Exploiting cell surface thiols to enhance cellular uptake. *Trends in Biotechnol.*, **30**, 185–190.
- Tukey, R.H. and Strassburg, C.P. (2000) Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **40**, 581–616.
- Uchi, H., Yasumatsu, M., Morino-Koga, S., Mitoma, C., and Furue, M. (2017) Inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling and induction of NRF2-mediated antioxidant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.*, **85**, 36–43.
- Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., *et al.* (2015) Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **71**, 337–351.
- Uter, W., Amario-Hita, J.C., Balato, A., Ballmer-Weber, B., Bauer, A., Belloni Fortina, A., Bircher, A., Chowdhury, M.M.U., Cooper, S.M., Czarnecka-Operacz, M., *et al.* (2017) European Surveillance System on Contact Allergies (ESSCA): results with the European baseline series, 2013/14. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.*, **31**, 1516–1525.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., *et al.* (2000) Langerin, a Novel C-Type Lectin Specific to Langerhans Cells, Is an Endocytic Receptor that Induces the Formation of Birbeck Granules. *Immunity*, **12**, 71–81.
- Van der Veen, J.W., Vandebriel, R.J., van Loveren, H., and Ezendam, J. (2011) Keratinocytes, Innate Immunity and Allergic Contact Dermatitis - Opportunities for the Development of In Vitro Assays to Predict the Sensitizing Potential of Chemicals. In, *Contact dermatitis.*, pp. 39–58.
- Velarde, M.C., Flynn, J.M., Day, N.U., Melov, S., and Campisi, J. (2012) Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging (Albany. NY)*, **4**, 3–12.
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kang, M.-I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W., and Talalay, P. (2004) Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**, 2040–2045.
- Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D.R., *et al.* (2003) Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat. Genet.*, **35**, 238–245.
- Watt, F.M. (2002) Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J.*, **21**, 3919–3926.
- Webb, A., Li, A., and Kaur, P. (2004) Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation*, **72**, 387–395.
- Wegiel, B., Nemeth, Z., Correa-Costa, M., Bulmer, A.C., and Otterbein, L.E. (2014) Heme Oxygenase-1: A Metabolic Nike. *Antioxid. Redox Signal.*, **20**, 1709–1722.



Bibliographie

- Weinmuellner, R., Kryeziu, K., Zbiral, B., Tav, K., Schoenhacker-Alte, B., Groza, D., Wimmer, L., Schosserer, M., Nagelreiter, F., Rösinger, S., *et al.* (2017) Long-term exposure of immortalized keratinocytes to arsenic induces EMT, impairs differentiation in organotypic skin models and mimics aspects of human skin derangements. *Arch. Toxicol.*, 1–14.
- West, E.R., Xu, M., Woodruff, T.K., and Shea, L.D. (2008) Cytochromes P450 and Skin Cancer: Role of Local Endocrine Pathways. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **28**, 4439–4448.
- De Wever, B., Kurdykowski, S., and Descargues, P. (2015) Human Skin Models for Research Applications in Pharmacology and Toxicology: Introducing NativeSkin®, the ‘Missing Link’ Bridging Cell Culture and/or Reconstructed Skin Models and Human Clinical Testing. *Appl. Vitro Toxicol.*, **1**, 26–32.
- Weyler, W., Hsu, Y.P., and Breakefield, X.O. (1990) Biochemistry and genetics of monoamine oxidase. *Pharmacol. Ther.*, **47**, 391–417.
- Wikramanayake, T.C., Stojadinovic, O., and Tomic-Canic, M. (2014) Epidermal Differentiation in Barrier Maintenance and Wound Healing. *Adv. Wound Care*, **3**, 272–280.
- Wilhelm, K.P. and Maibach, H.I. (1990) Factors predisposing to cutaneous irritation. *Dermatol. Clin.*, **8**, 17–22.
- Williams, C., Wilkinson, S.M., McShane, P., Lewis, J., Pennington, D., Pierce, S., and Fernandez, C. (2010) A double-blind, randomized study to assess the effectiveness of different moisturizers in preventing dermatitis induced by hand washing to simulate healthcare use. *Br. J. Dermatol.*, **162**, 1088–1092.
- Wolff, K. (1967) The fine structure of the Langerhans cell granule. *J. Cell Biol.*, **35**, 468–473.
- Yang, H., Magilnick, N., Lee, C., Kalmaz, D., Ou, X., Chan, J.Y., and Lu, S.C. (2005) Nrf1 and Nrf2 regulate rat glutamate-cysteine ligase catalytic subunit transcription indirectly via NF-kappaB and AP-1. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 5933–5946.
- Yang, L., Fan, X., Cui, T., Dang, E., and Wang, G. (2017a) Nrf2 Promotes Keratinocyte Proliferation in Psoriasis through Up-Regulation of Keratin 6, Keratin 16, and Keratin 17 Elsevier Inc.
- Yang, L., Fan, X., Cui, T., Dang, E., and Wang, G. (2017b) Nrf2 Promotes Keratinocyte Proliferation in Psoriasis through Up-Regulation of Keratin 6, Keratin 16, and Keratin 17. *J. Invest. Dermatol.*, **137**, 2168–2176.
- Yazar, K., Johnsson, S., Lind, M.-L., Boman, A., and Lidén, C. (2011) Preservatives and fragrances in selected consumer-available cosmetics and detergents. *Contact Dermatitis*, **64**, 265–272.
- Yip, D. and Cho, C.H. (2013) A multicellular 3D heterospheroid model of liver tumor and stromal cells in collagen gel for anti-cancer drug testing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **433**, 327–332.
- Yokoo, S., Furumoto, K., Hiyama, E., and Miwa, N. (2004) Slow-down of age-dependent telomere shortening is executed in human skin keratinocytes by hormesis-like-effects of trace hydrogen peroxide or by anti-oxidative effects of pro-vitamin C in common concurrently with reduction of intracellular oxidative stress. *J. Cell. Biochem.*, **93**, 588–597.
- Yousef, H. and Sharma, S. (2017) Anatomy, Skin (Integument), Epidermis.



Bibliographie

- Yuan, X.H. and Jin, Z.H. (2017) Paracrine regulation of melanogenesis. *Br. J. Dermatol.*
- Zaba, L.C., Krueger, J.G., and Lowes, M.A. (2009) Resident and ‘inflammatory’ dendritic cells in human skin. *J. Invest. Dermatol.*, **129**, 302–308.
- Zaragoza-Ninet, V., Blasco Encinas, R., Vilata-Corell, J.J., Pérez-Ferriols, A., Sierra-Talamantes, C., Esteve-Martínez, A., and de la Cuadra-Oyanguren, J. (2016) Allergic Contact Dermatitis Due to Cosmetics: A Clinical and Epidemiological Study in a Tertiary Hospital. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Ed.)*, **107**, 329–336.
- Zhang, M., An, C., Gao, Y., Leak, R.K., Chen, J., and Zhang, F. (2013) Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Prog. Neurobiol.*, **100**, 30–47.
- Zhao, Y., Zhang, C.-F., Rossiter, H., Eckhart, L., König, U., Karner, S., Mildner, M., Bochkov, V.N., Tschachler, E., and Gruber, F. (2013) Autophagy Is Induced by UVA and Promotes Removal of Oxidized Phospholipids and Protein Aggregates in Epidermal Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **133**, 1629–1637.
- Zhong, J.L., Edwards, G.P., Raval, C., Li, H., and Tyrrell, R.M. (2010) The role of Nrf2 in ultraviolet A mediated heme oxygenase 1 induction in human skin fibroblasts. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **9**, 18–24.
- Zhu, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Zweier, J.L., and Li, Y. (2005) Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: Protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett.*, **579**, 3029–3036.



Communications scientifiques





Communications orales

Oxidation of cell-surface thiols and intracellular signaling in THP-1 treated with air oxidized terpenes: role of Nrf2 - **Raffalli C**, Kuresepi S, Lepoittevin JP, Pallardy M, Gimenez-Arnau E, Kerdine-Römer S - 26th ERGECD meeting (European research group on experimental contact dermatitis), Milano, Italy (Novembre 2015)

Skin allergy caused by air-oxidized terpenes: mechanism of action and role of transcription factor Nrf2 - **Raffalli C**, Clouet E, Kuresepi S, Damiens M-H, Lepoittevin JP, Pallardy M, Gimenez-Arnau E, Kerdine-Römer S - 8th ITCASS meeting (Immunotoxicology and chemical allergy specialty session), Châtenay-Malabry, France (Novembre 2016)

Skin allergy caused by air-oxidized terpenes: mechanism of action and role of transcription factor Nrf2 - **Raffalli C**, Clouet E, Kuresepi S, Damiens M-H, Lepoittevin JP, Pallardy M, Gimenez-Arnau E, Kerdine-Römer S - LERMIT meeting (Laboratoire d'excellence en recherche sur le médicament et l'innovation thérapeutique), Kremlin-Bicêtre, France (Decembre 2016)

Development of a new *in vitro* model of repeated exposure for measuring sensitizing potential of molecules - **Raffalli C**, Jaracz-Ros A, Gallego C, Bachellerie F, Schlecht-Louf G, Kerdine-Römer S - 27th ERGECD meeting, Zurich, Switzerland (Mai 2017)

Development of a new *in vitro* model of repeated exposure for measuring sensitizing potential of molecules - **Raffalli C**, Jaracz-Ros A, Gallego C, Bachellerie F, Schlecht-Louf G, Kerdine-Römer S - Journée de l'école doctorale, Châtenay-Malabry, France (Juin 2017) **Best short oral communication**

Activation des kératinocytes humains par une molécule allergisante : quels nouveaux gènes impliqués ? - **Raffalli C**, Jaracz-Ros A, Gallego C, Bachellerie F, Schlecht-Louf G, Kerdine-Römer S, Dumont F, Deloménie C - Lundi de l'IPSIT, Châtenay-Malabry, France (Octobre 2017)

Activation of keratinocytes in response to repeated-exposure of fragrances in a 3D skin model - **Raffalli C**, Jaracz-Ros A, Gallego C, Bachellerie F, Schlecht-Louf G, Kerdine-Römer S, Dumont F, Deloménie C - Skin Challenges and ageing, Porto, Portugal (February 2018)



Posters

Oxidation of cell-surface thiols and intracellular signaling in THP-1 treated with air oxidized terpenes: role of Nrf2 - **Raffalli C**, Kuresepi S, Lepoittevin JP, Pallardy M, Gimenez-Arnau E, Kerdine-Römer S – Journée de la Recherche de l'UFR de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France (Novembre 2015)

Oxidation of cell-surface thiols and intracellular signaling in THP-1 treated with air oxidized terpenes: role of Nrf2 - **Raffalli C**, Kuresepi S, Lepoittevin JP, Pallardy M, Gimenez-Arnau E, Kerdine-Römer S – Young Researchers in Life Science (YRLS) Conference, Paris, France (Mai 2016)

Skin allergy caused by air-oxidized terpenes: mechanism of action and role of transcription factor Nrf2 - **Raffalli C**, Clouet E, Kuresepi S, Damiens M-H, Lepoittevin JP, Pallardy M, Gimenez-Arnau E, Kerdine-Römer S – 52nd European congress of the European societies of toxicology EUROTOX, Seville, Spain (Septembre 2016)

Skin allergy caused by air-oxidized terpenes: mechanism of action and role of transcription factor Nrf2 - **Raffalli C**, Clouet E, Kuresepi S, Damiens M-H, Lepoittevin JP, Pallardy M, Gimenez-Arnau E, Kerdine-Römer S – 19th international congress on in vitro toxicology ESTIV, Juan-les-Pins, France (Octobre 2016) **Travel grant winner**

Skin allergy caused by air-oxidized terpenes: mechanism of action and role of transcription factor Nrf2 - **Raffalli C**, Clouet E, Kuresepi S, Damiens M-H, Lepoittevin JP, Pallardy M, Gimenez-Arnau E, Kerdine-Römer S – Young Researchers in Life Science (YRLS) Conference, Paris, France (Mai 2017)

Activation of keratinocytes in response to multi-exposure of a cosmetic sensitizer in a reconstructed epidermis: a new model to study - **Raffalli C**, Jaracz-Ros A, Gallego C, Bachelerie F, Schlecht-Louf G, Kerdine-Römer S, Congrès annuel de la société française de toxicologie, Paris, France (Novembre 2017)



Titre : Les allergies cutanées aux fragrances : mécanisme d'action et rôle du facteur de transcription Nrf2. Du modèle 2D au modèle 3D

Mots clés : allergie cutanée, fragrances, Nrf2, in vitro, kératinocytes, cellules dendritiques

Résumé : La dermatite allergique de contact (DAC) est une réaction inflammatoire aiguë, médiée par les cellules dendritiques (DCs) survenant suite à l'exposition répétée de la peau avec une molécule allergisante. La prévalence estimée des cas de DAC aux substances parfumantes est de 1,7 % à 4,1% dans la population générale. Les molécules allergisantes sont des molécules appelées haptènes, qui vont se conjuguer avec des protéines de l'épiderme ou du derme. C'est le cas du cinnamaldéhyde (CinA), une molécule retrouvée dans la cannelle. Le linalol et le limonène sont des terpènes présents dans la lavande et l'orange, qui vont s'autoxyder au contact de l'air pour former des allergènes puissants, tels que les hydroperoxydes allyliques. Le premier objectif de cette thèse a été d'étudier le mécanisme d'action de ces terpènes et leurs hydroperoxydes allyliques respectifs sur la

lignée cellulaire THP-1, qui sert de substitut aux cellules dendritiques. Le rôle du facteur de transcription Nrf2, majeur dans la lutte contre le stress oxydant, a également été investigué.

Les consommateurs de produits cosmétiques sont exposés à de faibles concentrations de molécules allergisantes, mais plusieurs fois par jour ou par semaine. Nous avons souhaité étudier l'exposition répétée à de faibles doses d'haptène sur la peau.

Les kératinocytes jouent également un rôle dans la DAC : ce sont les premières cellules qui vont rencontrer la molécule allergisante dans la peau. La deuxième partie de ce travail a été d'étudier l'impact d'une exposition répétée de CinA à de faible concentration sur ces KCs et plus particulièrement sur la différenciation de l'épiderme, en utilisant un modèle organotypique de peau en 3D.

Title : Cutaneous allergy to fragrances : mechanism of action and role of transcription factor Nrf2. From 2D to 3D models

Keywords : cutaneous allergy, fragrances, Nrf2, in vitro, keratinocytes, dendritic cells

Abstract : Allergic contact dermatitis (ACD) represents a severe health problem. It is a dendritic cells (DCs) mediated skin disease caused by repeated exposure to an allergenic compound. ACD cases of fragrances in general population is estimated from 1.7 % to 4.1%. Contact sensitizers are compounds termed haptens and they will form a conjugate with epidermis and dermis proteins. Example is cinnamaldehyde (CinA), a molecule found in cinnamon. Linalool and limonene are terpenes found in lavender and oranges. In contact with the air, they will autoxidize to form highly allergenic compounds: allylic hydroperoxides. The first aim of this thesis was to study the mechanism of action of those terpenes and their respective allylic hydroperoxides on THP-1 cell-line, described as a surrogate of DCs.

The transcription factor Nrf2 is playing a major role in oxidative stress and was also investigated.

Consumers of cosmetic products are exposed to low quantities of allergenic compounds, but several times a day or a week. We wanted to study repeated exposure of low concentration of haptens on the skin.

KCs also play a key role in ACD: they are the first cells that will encounter the allergenic compound in the skin. The second aim of this thesis was to study the impact of repeated exposure of low concentrations of CinA on those KCs and more particularly on the epidermis differentiation, using a 3D organotypic culture of skin.

