



Impact de l'environnement sur la réponse lymphocytaire T reconnaissant les β -lactamines : rôles dans les mécanismes allergiques

Alexia Feray

► To cite this version:

Alexia Feray. Impact de l'environnement sur la réponse lymphocytaire T reconnaissant les β -lactamines : rôles dans les mécanismes allergiques. Toxicologie. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASQ032 . tel-03585716

HAL Id: tel-03585716

<https://theses.hal.science/tel-03585716>

Submitted on 23 Feb 2022

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

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

Impact de l'environnement sur la réponse
lymphocytaire T reconnaissant les β -lactamines :
rôles dans les mécanismes allergiques
*Impact of the environment on β -lactam specific
T-cell responses: consequences for allergy*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat: Toxicologie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Inserm, Inflammation, Microbiome,
Immunosurveillance, 92290, Châtenay-Malabry, France

Référent : Faculté de pharmacie

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 08 octobre 2021, par
Alexia FERAY**

Composition du Jury

Bernard MAILLÈRE

Directeur de Recherche, HDR, Commissariat à l'énergie atomique et aux
énergies alternatives (CEA), Saclay

Président

Françoise PONS

Professeure des Universités, CNRS Université de Strasbourg, Illkirch-
Graffenstaden

Rapporteur
& Examinatrice

Marc VOCANSON

Chargé de Recherche, HDR, INSERM Centre International de Recherche
en Infectiologie (CIRI), Lyon

Rapporteur
& Examineur

Armelle BAEZA

Professeure des Universités, CNRS Université de Paris, Paris

Examinatrice

Friederike JÖNSSON

Directeur de Recherche, HDR, INSERM Institut Pasteur, Paris

Examinatrice

Richard WEAVER

Directeur de Recherche des laboratoires SERVIER, Suresnes

Examineur

Direction de la thèse

Marc PALLARDY

Professeur des Universités, INSERM Université Paris Saclay,
Châtenay-Malabry

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je remercie le **Professeur Pons** et le **Docteur Vocanson** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce projet. Un grand merci également au **Professeur Baeza**, au **Docteur Jönsson** et au **Docteur Weaver** d'avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examinateurs. Je remercie également chaleureusement le **Docteur Maillère** d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

J'adresse également mes tout premiers remerciements à mon directeur de thèse, le **Professeur Marc Pallardy**. Merci pour ta présence, ton soutien et tes précieux conseils tout au long de ces trois années. Ce fut un travail de longue haleine et une expérience inoubliable. Merci également pour toutes ces discussions pleines d'idées et de nouvelles expériences à faire qui ont rendu ce travail si palpitant.

Je remercie également le **LabEx LERMIT** d'avoir financé ce projet de thèse. Merci de m'avoir donné cette opportunité. J'exprime également toute ma gratitude au **Docteur Françoise Bachelier** pour m'avoir accueillie au sein de son unité. Merci pour vos encouragements, votre bienveillance et toute votre aide scientifique.

Je tiens à remercier chaleureusement toute la grande famille UMR 996. Un merci tout spécial au **Professeur Saadia Kerdine-Römer**. Merci Saadia pour ta bonne humeur, ta bienveillance et tes conseils qui ont été un moteur tout au long de l'aventure. Tu as été d'une aide précieuse au cours de ces trois années de thèse mais également pour le « grand après ». Je ne te remercierais jamais assez pour ça. Merci également à toute la team nano : un grand merci au **Docteur Armelle Biola-Vidamment** : merci pour ta patience, tes conseils et ton encadrement tout au long du master 2. Je tiens également à remercier **Natacha Szely**, mon phare dans les passages de tempêtes ! Merci de m'avoir épaulée toutes ces années. Merci d'avoir été présente au labo mais également en dehors des projets professionnels autour d'un bon zombicide avec Jérôme. On se revoit très vite ! Un grand merci également au **Docteur François-Xavier Legrand**, merci de m'avoir initié à la caractérisation des nanos et d'avoir rendu cela presque agréable (et ce n'était pas gagné d'avance !). Je te remercie également d'avoir toujours répondu présent même en dehors du laboratoire. La caractérisation nano a également été plus facile avec le **Docteur Emilie Brun**, merci pour toute ton expérience et ta bonne humeur. Merci également à **Eléonore Guillet** qui reprend le flambeau du projet nano au sein du laboratoire, bon courage à toi pour la suite des aventures !

Heureusement, tout ne tourne pas autour des nanos : je remercie chaleureusement le **Professeur Sylvie Chollet-Martin** pour son immense gentillesse et pour avoir volontiers partagé toute son expérience à chaque demande. Un grand merci à ma maman de l'aventure, **Marie-Hélène Damiens** : la pro du western blot et pas que ! Merci pour toutes nos discussions qui ont rendu tout cela encore plus sympathique (on se revoit très vite, je l'espère). Un grand merci également à mon compère de bavardages **Benoît Noël**. Merci pour ta présence et ta bonne humeur à chaque instant. Les réunions papotage dans le « bureau des techs » vont me manquer. Je remercie également **Isabelle Boristhène** pour tout ce qu'elle m'a apporté au labo au quotidien et pour toutes nos discussions, que ferait-on sans toi ? Un grand merci également à **Muriel Berthaud**, ma deuxième maman de l'aventure qui est revenue juste à temps pour assister à mon départ. Merci pour toutes ces discussions autour de nos vacances (même si nous avons parfois déclenché des catastrophes naturelles à partir au même endroit au même moment). Merci au **Docteur Isabelle Turbica** pour sa gentillesse, ses conseils scientifiques et, bien-sûr, les délicieuses figues de son jardin. Je remercie également le **Docteur Kevin Hardonnière**, le **Docteur Luc de Chaisemartin** et le **Docteur Vanessa Granger** pour toutes ces discussions scientifiques et leurs conseils avisés. Je remercie également **Khadi Kouyate** pour sa bonne humeur communicative. Je remercie également la team stagiaires, doc et post-doc : merci au **Docteur Myriam Nabhan**, au **Docteur Romain Vaillion** et à **Lise Aubry** d'avoir apporté une bonne ambiance au bureau. Un merci tout spécial à notre nouvelle thésarde **Joëlle Dagher**, qui a égayé ces derniers mois de thèse : merci pour toutes les rigolades et on se revoit très vite à Saint-Malo (escale touristique obligée avant le retour au Liban) ! Merci à **Marine Peyneau** et **Sara Salman** de m'avoir accompagnée pendant toute cette aventure. Je vous souhaite pleins de courage et de belles découvertes pour la suite. Un merci tout spécial pour une ancienne Master 2 du labo : **Anna Zerdoug**, que j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés au bureau pour toujours plus de rigolades. Je te souhaite toute la réussite possible pour ta thèse, même si je ne doute pas que tu viendras me raconter tout cela. Je remercie également toute l'équipe de Clamart et tout particulièrement **Professeur Géraldine Schlecht-Louf**, **Nadine Belzic** et **Docteur Viviana Marin-Esteban**. Je tiens également à remercier tous ceux qui étaient là au départ : le **Docteur Rami Bechara**, le **Docteur Doumet Helou** (et son ami la rose, bien sûr), le **Docteur Chloé Raffaëli**, **Kim Pacchiardi**, **Mathilde Zeller** et **Carine Karkh**. Je remercie également le **Docteur Carole Deflers** pour toutes les conversations et les encouragements dans l'escalier.

Que serait un travail de thèse sans les collaborations ? Un immense merci au **Docteur Séverine Domenichini** pour toutes les expériences d'imagerie : merci pour ta bonne humeur et ton efficacité (il en fallait, pipelettes comme nous sommes). Une collaboration qui restera dans mon cœur. Merci également à **Sophie Veil** et **Marie-Laure Aknin** avec qui j'ai pu effectuer un superbe travail à la plateforme cytométrie. Je tiens également à remercier les laboratoires Servier et plus particulièrement le **Docteur Emmanuel Nony**, le **Docteur Grégory Leclerc** et **Jérôme Dupuis** qui nous ont permis de

développer notre projet. Merci à tous pour votre disponibilité, votre soutien et votre rigueur. Je remercie également **Stéphanie Nicolaÿ**, **Guillaume Ruellou** et le **Docteur Danielle Libong**, qui nous ont également grandement aidé pour le projet de spectrométrie de masse. Merci pour la bonne ambiance et votre disponibilité, ce fut un réel plaisir de travailler avec vous tous. Je tiens à remercier chaleureusement la team chimie : **Professeur Delphine Joseph** et **Docteur Nicolas Gigant**. Delphine, merci pour vos idées précieuses et votre présence tout au long du projet. Nicolas, un grand merci à toi pour avoir rendu toutes les manips de chimie plus agréables. Je tiens également à remercier le **Docteur Yann Gallais** pour avoir toujours répondu présent à toutes mes questions et pour sa patience et sa disponibilité légendaires. Je te souhaite tout le meilleur dans ton nouveau (super) boulot. Un grand merci également à la team Miltenyi pour toute leur aide sur les co-cultures : le **Docteur Gabrielle Carvalho** et le **Docteur Shahul Mouhamad**. Merci à tous les deux pour votre bonne humeur communicative. Je remercie également le **Docteur Benoît Maury** pour toutes les lectures de plaques à l'UVSQ.

Je terminerais par remercier ma famille, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci à **mes parents** pour m'avoir toujours poussé à donner le meilleur et m'avoir toujours soutenue dans tout ce que j'ai entrepris. Merci à toute **ma belle-famille** pour m'avoir épaulé et accompagné dans cette aventure. Et enfin, mon plus grand merci revient à ma tendre moitié **Jérémy**. Ton amour et ton soutien ont été et seront toujours ma plus grande force.

SOMMAIRE

Sommaire

REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE	9
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	15
ABREVIATIONS	17
AVANT-PROPOS	23
INTRODUCTION	25
Chapitre 1 : Les mécanismes cellulaires et moléculaires de la réponse immunitaire	27
I. <u>La présentation de l'antigène et les cellules présentatrices de l'antigène</u>	27
1.1 Les différentes cellules présentatrices de l'antigène : le rôle clé des cellules dendritiques	27
1.2 La capture et la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques	30
1.2.1 Les mécanismes de capture de l'antigène	30
1.2.2 Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité	31
1.2.3 L'apprêtement de l'antigène	34
1.2.4 Le mécanisme de la présentation croisée	36
1.3 La maturation des cellules dendritiques : le rôle des signaux de danger	37
1.3.1 Le rôle des signaux de danger	38
1.3.2 Les modifications phénotypiques des cellules dendritiques matures	41
II. <u>L'immunité adaptative médiée par la réponse lymphocytaire</u>	42
2.1 Le répertoire des lymphocytes T naïfs	42
2.2 La synapse immunologique : présentation et activation des lymphocytes T	45
2.3 La polarisation des lymphocytes T	47
III. <u>Le cas particulier des molécules chimiques</u>	48
3.1 La théorie de l'haptène	49
3.2 Les différents types d'haptènes	49
3.2.1 Les haptènes classiques	49
3.2.2 Les pro-haptènes	52

3.2.3 Les pré-haptènes.	53
3.2.4 Les haptènes non classiques.	53
3.3 Les différents mécanismes de reconnaissance des molécules chimiques par les lymphocytes T. ...	54
3.3.1 Le pharmacological-interaction concept.	54
3.3.2 L'altération du répertoire peptidique du soi.	55
3.3.3 L'origine du répertoire T naïf reconnaissant les molécules chimiques.	57

Chapitre 2 : Physiopathologie des hypersensibilités médicamenteuses : cas particulier des β -lactamines 59

I. <u>Définition et classification des hypersensibilités.</u>	59
1.1 Définitions.	59
1.2 La classification des hypersensibilités.	60
1.2.1 Les hypersensibilités non-allergiques.	60
1.2.2 Les hypersensibilités allergiques.	61
Les hypersensibilités dépendantes de la sécrétion des anticorps.	61
Les hypersensibilités indépendantes de la sécrétion des anticorps.	63
Les hypersensibilités de type IV a.	63
Les hypersensibilités de type IV b.	64
Les hypersensibilités de type IV c.	64
Les hypersensibilités de type IV d.	67
II. <u>L'allergie aux β-lactamines.</u>	68
2.1 Mécanisme d'action et structure des β -lactamines.	68
2.1.1 Mécanisme d'action des β -lactamines.	68
2.1.2 Mécanismes de résistance aux β -lactamines.	68
2.1.3 Structure des différentes β -lactamines.	69
2.2 Epidémiologie de l'allergie aux β -lactamines.	70
2.3 Les formes cliniques de l'allergie aux β -lactamines.	71
2.3.1 Les réactions d'hypersensibilités dépendantes des anticorps.	71
2.3.2 L'exanthème maculopapuleux.	71
2.3.3 Les syndromes de Lyell et Stevens-Johnson et la nécrose épidermique toxique.	72
2.3.4 Le syndrome de DRESS.	72
2.3.5 La pustulose exanthémateuse aiguë généralisée.	73
2.3.6 Drug-induced liver injury.	73

Chapitre 3 : Allergie et environnement 77

I. <u>Une augmentation croissante des allergies.</u>	77
II. <u>Influence des facteurs environnementaux.</u>	78
2.1 Les conditions climatiques.	79
2.2 La pollution atmosphérique.	79
2.3 Les infections virales.	80
III. <u>Les signaux de danger immunologiques et l'allergie médicamenteuse.</u>	83

3.1 Les différents types de signaux de danger associés aux molécules chimiques et aux médicaments	
3.2 L'origine des signaux de danger dans l'allergie médicamenteuse	85
IV. <u>Les nanoparticules et le système immunitaire : le cas des nanoparticules de silice amorphe</u>	86
4.1 Définitions, utilisations et réglementations des nanoparticules de silice amorphe	86
4.1.1 Définition des nanoparticules	86
4.1.2 La réglementation des nanoparticules	87
4.1.3 Les modes de production des nanoparticules de silice amorphe	87
4.1.4 Les utilisation des nanoparticules de silice amorphe	88
4.2 Caractéristiques des nanoparticules et impact sur les systèmes biologiques	89
4.3 L'immunotoxicité des nanoparticules de silice amorphe	91
4.3.1 La détection et l'internalisation des nanoparticules de silice amorphe par les cellules du système immunitaire	92
4.3.2 Les effets cytotoxiques des nanoparticules de silice amorphe	93
4.3.3 Le effets immunoadjuvants des nanoparticules de silice amorphe	93
4.3.4 Les effets immunomodulateurs médiés par la corona des nanoparticules	95

PRESENTATION DU TRAVAIL99

I. Etude de l'effet signal de danger des nanoparticules et leur impact sur la réponse des lymphocytes T reconnaissant les β -lactamines	99
II. Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'activation des lymphocytes T CD8+ reconnaissant les β -lactamines : impact de l'environnement cellulaire.	101
III. Application du modèle d'étude aux molécules médicamenteuses en cours de développement.	103

RESULTATS107

I. <u>Etude de l'effet signal de danger des nanoparticules et leur impact sur la réponse des lymphocytes T reconnaissant les β-lactamines (Article n°1 et n°2)</u>	107
1.1 Article n°1 et n°2 : étude de l'effet signal de danger des nanoparticules de silice amorphe.	107
1.2 Résultats complémentaires : étude de l'impact des nanoparticules de silice amorphe sur la réponse lymphocytaire T dirigée contre les β -lactamines	109
1.2.1 Introduction.	109
1.2.2 Matériel et méthodes.	109
Le modèle de co-culture autologue polarisé.	109
Le modèle de co-culture autologue non polarisé.	110
1.2.3 Résultats.	111
Les nanoparticules de silice amorphe augmentent l'activation des LT CD4+ reconnaissant la HSA-BP.	111
Les nanoparticules de silice amorphe favorisent la sécrétion d'IL-5 par les lignées de LT reconnaissant le médicament.	112

II. Article n°3: Intracellular haptentation of benzylpenicillin with human serum albumin in dendritic cells trigger CD8+ T-cell activation (en préparation).	115
III. Application du modèle d'étude aux molécules médicamenteuses en cours de développement.	135
3.1 Introduction.	135
3.1.1 Le score d'immunisation.	135
3.1.2 Le cas de la benzylpénicilline.	137
3.1.3 Le cas du sulfaméthoxazole.	138
3.2 Matériel et méthodes.	139
3.2.1 Cultures primaires de cellules dendritiques humaines.	139
3.2.2 Modèle de co-culture autologue.	139
3.2.3 Mesure de l'activation du répertoire de lymphocytes T CD4+ naïfs par la technique ELISpot.	140
3.3 Résultats.	141
3.3.1 Les voies métaboliques des molécules étudiées.	141
3.3.2 Identification du répertoire de lymphocytes T CD4+ naïfs reconnaissant les molécules A et B.	141
3.3.3 Mécanismes de reconnaissance de la molécule B par les lymphocytes T CD4+ naïfs.	142

DISCUSSION GENERALE147

I. Etude de l'effet signal de danger des nanoparticules et leur impact sur la réponse des lymphocytes T reconnaissant les β -lactamines	147
II. Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'activation des lymphocytes T CD8+ reconnaissant les β -lactamines : impact de l'environnement cellulaire.	153
III. Application du modèle d'étude aux molécules médicamenteuses en cours de développement.	157

CONCLUSION ET PERSPECTIVES163

CONTRIBUTIONS169

BIBLIOGRAPHIE173

Liste des figures

Figure 1. Les populations de cellules dendritiques humaines

Figure 2. Les mécanismes de capture de l'antigène par les cellules dendritiques

Figure 3. Nomenclature génomique et associations des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité dans les allergies médicamenteuses

Figure 4. Présentation de l'antigène par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité

Figure 5. Mécanisme de la présentation croisée dans les cellules dendritiques humaines

Figure 6. Les voies de signalisation des Toll-like receptors

Figure 7. Modifications phénotypiques des cellules dendritiques matures

Figure 8. Structure du récepteur des cellules T

Figure 9. Processus de sélection thymique des lymphocytes T

Figure 10. La synapse immunologique et les signaux de co-stimulation et co-inhibition

Figure 11. Polarisation des lymphocytes T

Figure 12. Mécanismes de reconnaissance des molécules chimiques par les lymphocytes T

Figure 13. Mécanisme des hypersensibilités médicamenteuses dépendantes de la sécrétion des anticorps

Figure 14. Mécanismes des hépatites médicamenteuses immunologiques

Figure 15. Classification des hypersensibilités médicamenteuses selon Gell et Coombs modifiée par Pichler

Figure 16. Structure des différentes β -lactamines

Figure 17. Le mécanisme hépatotoxique de la flucloxacilline

Figure 18. Augmentation de la prévalence de l'asthme à travers le monde

Figure 19. Le modèle de l'immunité hétérologue

Figure 20. L'ATP extracellulaire comme signal de danger détecté par le récepteur

Figure 21. Mode de production des nanoparticules de silice amorphe

Figure 22. Les nanoparticules de silice amorphe augmentent l'activation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs reconnaissant la HSA-BP

Figure 23. Les nanoparticules de silice amorphe orientent la polarisation du répertoire de lymphocytes T CD4⁺ naïfs reconnaissant la HSA-BP vers une réponse pro-allergique

Figure 24. Identification du répertoire de lymphocytes T CD4+ naïfs reconnaissant la molécule B

Figure 25. La reconnaissance du métabolite B par les lymphocytes T CD4+ est dépendante des molécules HLA-DR et de la présence d'albumine humaine

Figure 26. Mécanismes d'hapténisation de la BP et déclenchement des réponses lymphocytaires

Liste des tableaux

Tableau 1. Calcul du score d'immunisation d'une molécule médicamenteuse

Tableau 2. Calcul du score d'immunisation de la benzylpénicilline

Tableau 3. Calcul du score d'immunisation du sulfaméthoxazole

Tableau 4. Calcul du score d'immunisation de la molécule inconnue

Abréviations

A

ADH Alcool Déshydrogénase

ADR Adverse Drug Reactions

AGEP Pustulose Exanthématique Aiguë Généralisée

AINS Anti-inflammatoires non stéroïdiens

AhR Aryl Hydrocarbon Receptor

Amba1 Ambrosia artemisiifolia 1

ATP Adénosine Triphosphate

B

Bet v 1 Betula verrucosa 1

BL β -lactamines

BMDC Bone Marrow-derived Dendritic Cells

BP Benzylpénicilline

C

cDC Cellules Dendritiques Conventionnelles

CDP Progéniteur commun des cellules dendritiques

CIRC Centre International de Recherche sur le Cancer

CLIP Class II Associated Invariant Chain Peptides

CMH Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA Cellule Présentatrice de l'Antigène

CYP Cytochrome P 450

D

DAMP Damage-Associated Molecular Patterns

DCs Cellules Dendritiques

DEP Diesel Exhaust Particle

DILI Drug-Induced Liver Injury

DNCB Dinitrochlorobenzène

DNP Dinitrophényl

DRESS Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms

E

EAACI European Academy of Allergy and Clinical Immunology

ERO Espèces Réactives de l'oxygène

F

FAS-L FAS Ligand

FITC Fluorescein Isothiocyanate

G

GST Glutathion S-Transférases

H

HLA Human Leukocyte Antigen

HMGB1 High-Mobility Group Box

HSA Albumine Sérique Humaine

HSC Cellules souches hématopoïétiques

HSP Heat Shock Protein

I

IFN- γ Interféron-gamma

IL Interleukine

IRF Interferon Regulatory Factor

ITAM Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

K

KLH Keyhole Limpet Hemocyanin

L

LB Lymphocyte B

LC Cellules de Langerhans

LPS Lipopolysaccharide

LT Lymphocyte T

LTT Lymphocyte Transformation Test

M

MAPK Mitogen-Activated Protein Kinases

MDP Progéniteur de monocytes et de cellules dendritiques

MoDC Monocyte-derived Dendritic Cells

MyD88 Myeloid Differentiation Factor 88

N

NET Neutrophil Extracellular Traps

NF- κ B Nuclear Factor Kappa B

NLRP3 NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

O

OCDE Organisation de coopération et de développement économiques

P

PAF Platelet-Activation Factor

PAMP Pathogen-Associated Molecular Patterns

PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cells

pDC Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes

PD-L Program Death Ligand

Pi-concept Pharmacological Interaction with Immune Receptors

PLP Protéines de Liaisons des Pénicillines

R

RE Réticulum Endoplasmique

REACH Enregistrement, évaluation et autorisation des produits chimiques

ROR- γ t RAR-related Orphan Receptor gamma

S

SSJ Syndrome de Stevens-Johnson

SMX Sulfaméthoxazole

SVF Sérum de Veau Foetale

T

TAP Transporter Associated with Antigen Processing

TCR T-cell Receptor

Th T-helper

TIR Toll IL-1 Receptor

TLR Toll-like Receptor

TNF Tumor Necrosis Factor

Treg Lymphocyte T régulateur

TRIF TIR Domain Containing Adapter Inducing IFN- γ

TSLP Thymic Stromal Lymphopoietin

TEN Nécrose Epidermique Toxique

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

Les β -lactamines sont la classe d'antibiotiques la plus prescrite et représentent l'allergie médicamenteuse la plus fréquente. Ces réactions allergiques sont non prévisibles et peuvent engendrer des formes cliniques sévères pouvant aller jusqu'à engager le pronostic vital du patient. Pour l'ensemble de ces raisons, l'allergie aux β -lactamines est un véritable problème de santé publique et certains mécanismes encore mal compris nécessitent d'être étudiés. L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer l'impact de l'environnement sur le déclenchement des hypersensibilités aux β -lactamines. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à deux aspects de cet environnement : l'exposition environnementale et l'environnement à l'échelle cellulaire.

Notre premier objectif a été de mieux comprendre la nature des signaux de danger impliqués dans le déclenchement de l'allergie aux β -lactamines. Pour cela, nous avons étudié l'impact de l'exposition environnementale aux nanoparticules de silice amorphe, un additif alimentaire largement utilisé, sur les cellules dendritiques et les conséquences fonctionnelles au niveau de la réponse lymphocytaire dirigée contre la benzylpénicilline, utilisée comme un modèle de β -lactamines. Ces travaux originaux ont permis la publication de deux articles dans les journaux *Nanomaterials* (publié, **Article n°1**) et *Toxicological Sciences* (en cours de révision, **Article n°2**).

L'activation des lymphocytes T CD8+, responsables d'hépatites cytolitiques potentiellement fatales, est un mécanisme encore mal compris dans l'allergie aux β -lactamines. Notre second objectif a donc été de mieux comprendre l'impact de l'environnement cellulaire sur les mécanismes d'immunisation des lymphocytes T CD8+ face à la benzylpénicilline. Ces travaux ont abouti à la préparation d'un article (**Article n°3**) qui sera prochainement soumis dans un journal scientifique.

Enfin, notre dernier objectif a été d'utiliser les modèles *in vitro* de ce projet pour développer le calcul d'un score d'immunisation des molécules. Les différents événements clés de l'allergie médicamenteuse identifiés au cours du projet ont permis de calculer un score d'immunisation de molécules connues et inconnues qui fera l'objet d'une publication scientifique.

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Les mécanismes cellulaires et moléculaires de la réponse immunitaire

Le système immunitaire est chargé de répondre aux attaques extérieures qui peuvent être bactériennes, virales ou parasitaires. Pour cela, il fonctionne en deux étapes qui sous-tendent deux immunités distinctes. En premier, l'immunité innée est un système de détection qui répond de façon immédiate et non spécifique via les cellules de l'immunité innée telles que les phagocytes, les polynucléaires et les monocytes. Une fois l'antigène détecté et apprêté par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), l'immunité adaptative se met en place afin de réagir contre l'antigène et conférer une protection durable. Dans ce chapitre, nous détaillerons les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces deux étapes de la réponse immunitaire.

I. La présentation de l'antigène et les cellules présentatrices de l'antigène

La première étape de la réponse immunitaire est la détection et l'apprêtement de l'antigène par les CPA. Dans cette partie, nous aborderons le rôle majeur des cellules dendritiques (DCs) comme CPA et les mécanismes de capture et de présentation de l'antigène.

1.1 Les différentes cellules présentatrices de l'antigène : le rôle clé des cellules dendritiques

Les CPA ont un rôle d'échantillonnage permanent qui leur permet de détecter les antigènes présents dans leur environnement. Il existe différentes CPA professionnelles, caractérisées par la présence de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, notamment les macrophages, les lymphocytes B et les DCs (Weaver et Unanue 1990). Les DCs arrivent au premier rang des CPA professionnelles car elles jouent un rôle majeur dans l'initiation de la réponse immunitaire

(Banchereau *et al.* 2000). Ces cellules ont un double rôle de sentinelle et de chef d'orchestre pour le système immunitaire. Elles servent de messagers entre l'immunité innée et l'immunité adaptative et sont spécialisées dans la capture, l'apprêtement et le transport des antigènes vers les organes lymphoïdes pour les présenter aux lymphocytes T (LT) naïfs (Cella *et al.* 1997, Eisenbarth 2019).

Les DCs sont issues de différenciations successives de cellules souches hématopoïétiques (HSC) en progéniteur de monocyte et de DCs (MDP) puis en progéniteur commun des DCs (CDP) (Figure 1) (Miller *et al.* 2012, Merad *et al.* 2013, Breton 2015, Breton 2017). Les DCs se divisent en quatre sous-populations principales selon leur ontogénie : **les DCs conventionnelles (cDCs), les DCs plasmacytoïdes (pDCs), les DCs dérivées de monocytes (moDCs) et les cellules de langerans (LC)** (Figure 1) (Guilliams *et al.* 2010, Satpathy *et al.* 2012, Eisenbarth 2019, Cabeza-Cabrerizo *et al.* 2021). Ces sous-populations se distinguent par leur phénotype et leurs fonctions.

Les cDCs sont la population la plus répandue de DCs. Elles sont issues de cellules pré-cDCs et sont divisées en deux types de cellules : **les cDC1 et les cDC2** (Breton *et al.* 2017, Eisenbarth 2019, Cabeza-Cabrerizo *et al.* 2021). Leur fonction primaire est la présentation des antigènes et l'activation des LT naïfs. Les cDC1 expriment les molécules XCR1 (XC receptor 1) et BDCA3 et ont été décrites comme ayant une fonction de présentation croisée afin de déclencher l'activation des LT CD8+. Les cDC2 peuvent être identifiées par l'expression des marqueurs CD11b, DCIR2 (DC immunoreceptor 2) et SIRPα (signal regulatory protein-α). Contrairement aux cDC1, ces dernières sont décrites comme les principales cellules activatrices des LT CD4+ naïfs, déclenchant ainsi les réponses lymphocytaires Th (T helper) que nous décrirons dans les parties suivantes. Un dernier niveau de différenciation divise les cDC1 et les cDC2 : les cellules résidentes et les cellules migratoires. Cette propriété se réfère à leur localisation à l'état basal et, de ce fait, à leur façon de détecter les antigènes (Eisenbarth 2019).

Malgré leur précurseur commun, les pDCs diffèrent des cDCs par l'expression de BDCA2 et leur fonctionnalité unique (Breton 2017, Eisenbarth 2019). Ces cellules sont spécialisées dans la production d'interférons de type I mais, contrairement aux cDCs, elles ont une faible capacité de présentation de l'antigène.

La présence de M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) induit la différenciation du MDP en monocytes qui peuvent se différencier en moDCs dans des contextes inflammatoires. Leur fonction est de détecter l'antigène et de migrer des tissus inflammatoires où elles se localisent vers les ganglions lymphatiques afin d'activer les LT naïfs (Vermaelen *et al.* 2001, Merad *et al.* 2013, Eisenbarth 2019, Cabeza-Cabrerizo *et al.* 2021).

Les LC sont des cellules hématopoïétiques qui se différencient à partir d'un précurseur embryonnaire (Ginhoux et Merad 2010). Elles représentent 5% des cellules épidermiques nucléées de l'épiderme humain. Semblables aux DCs, elles expriment de manière constitutive les molécules du CMH de classe II et l'intégrine CD11c. Ces cellules expriment également CD1a, BDCA1 et la lectine de type C Langérine (CD207) (Kaplan 2017, Eisenbarth 2019). Leur rôle est de détecter les antigènes à la surface de la peau puis de les apprêter et de migrer de l'épiderme vers les nœuds lymphatiques pour les présenter aux LT naïfs (Kaplan 2017). Ces cellules ont également des propriétés homéostatiques uniques qui leur permettent de proliférer et de se régénérer continuellement dans l'épiderme à partir de LC quiescentes agissant comme des cellules souches (Collin et Milne 2016).

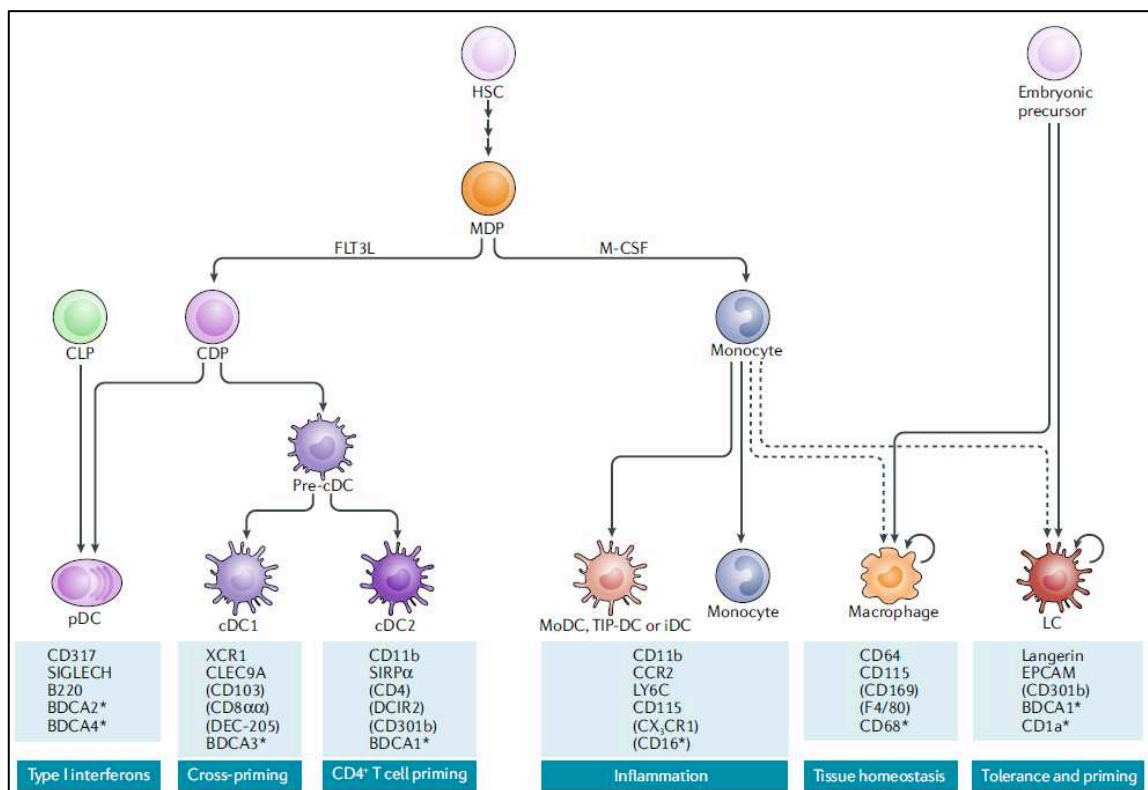


Figure 1. Les populations de cellules dendritiques humaines (adaptée de Eisenbarth 2019)

L'expression des molécules de surface indiquée entre parenthèses varie en fonction des tissus. * : marqueur exprimé uniquement sur les cellules humaines. cDC : cellules dendritiques conventionnelles; CDP : progéniteur commun aux cellules dendritiques; CLP : progéniteur lymphoïde commun; iDC : cellules dendritiques inflammatoires; HSC : cellule souche hématopoïétique; LC : cellules de Langerhans; MDP : progéniteur commun aux monocytes et aux cellules dendritiques; MoDC : cellules dendritiques dérivées de monocytes; pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes; TIP-DC : cellules dendritiques produisant du TNFα et des oxydes nitriques.

1.2 La capture et la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques

Les DCs ont un rôle d'échantillonnage des antigènes de leur environnement. Dans cette partie nous détaillerons la capacité des DCs à capturer ces antigènes, à produire les conjugués CMH-peptide ainsi qu'à migrer des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes secondaires afin d'interagir avec les LT.

1.2.1 Les mécanismes de capture de l'antigène

L'endocytose est un mécanisme cellulaire qui permet l'internalisation de matériel à l'intérieur des cellules. La capture de l'antigène par les DCs est possible selon deux processus majeurs d'endocytose : **l'endocytose à récepteurs** et la **macropinocytose** (Figure 2) (Guermonprez *et al.* 2002, Roche et Furuta 2015). Les antigènes insolubles sont préférablement internalisés via l'endocytose à récepteurs (les récepteurs de la famille des lectines-C, le récepteur au mannose, les récepteurs du fragment Fc des anticorps et le récepteur DC-SIGN (Guermonprez *et al.* 2002) alors que les antigènes solubles ou de petite taille sont ingérés en même temps que du liquide extracellulaire par macropinocytose. En effet, les DCs sont des cellules caractérisées par un haut niveau de macropinocytose basal ce qui leur permet d'ingérer de grandes quantités de liquide et de concentrer les macro-solutés dans des compartiments riches en molécules du CMH de classe II et en protéases afin de débiter l'apprêtement de l'antigène que nous décrirons plus en détails dans les parties suivantes (Sallusto *et al.* 1995, Lim et Gleeson 2011).

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés aux mécanismes d'endocytoses impliqués dans l'internalisation de l'albumine humaine (HSA, human serum albumin). Cette dernière est la protéine hapténisée du bioconjugué médicamenteux formé avec la benzylpénicilline (BP), la HSA-BP, qui a été identifiée comme responsable de l'activation des LT spécifiques chez les patients allergiques à la BP (Yvon *et al.* 1990, Brander *et al.* 1995, Meng *et al.* 2011, Nhim *et al.* 2013, Azoury *et al.* 2018). Chez les DCs, le mécanisme d'internalisation majoritaire de la HSA semble être la macropinocytose car les vésicules formées avaient une taille estimée à 0,5-3 μm et étaient formées après seulement deux minutes d'incubation ce qui est caractéristique des macropinosomes (Sallusto *et al.* 1995, Larsson *et al.* 1995, Larsson *et al.* 1997). Cette macropinocytose

de bioconjugués HSA-médicament a également été démontrée dans différentes études sur plusieurs types cellulaires (cellules HeLa, cellules pancréatiques) (Ichimizu *et al.* 2019, Liu *et al.* 2019).

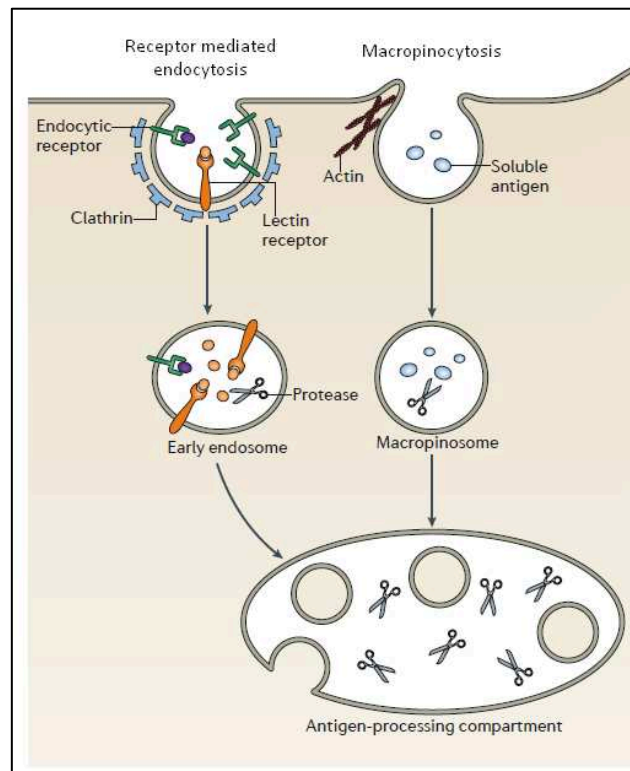


Figure 2. Les mécanismes de capture de l'antigène par les cellules dendritiques (adaptée de Roche et Furuta 2015)

La capture de l'antigène est possible selon deux processus d'endocytose majeurs : l'endocytose à récepteurs et la macropinocytose. Les antigènes insolubles sont préférablement internalisés via l'endocytose à récepteurs (les récepteurs de la famille des lectines-C, le récepteur au mannose, les récepteurs au fragment Fc des anticorps et le récepteur DC-SIGN) alors que les antigènes solubles sont ingérés en même temps que du liquide extracellulaire par macropinocytose.

1.2.2 Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité

Les molécules du CMH ou molécules HLA (human leukocyte antigen) sont un groupe de glycoprotéines membranaires de la famille des immunoglobulines qui ont pour fonction de signaler la présence de structures étrangères aux LT (Altmann et Trowsdale 1989, Bjorkman and Parham 1990, Kelly et Trowsdale 2018). Pour cela, elles se conjuguent aux peptides antigéniques produits à la suite de l'apprêtement cellulaire et les acheminent jusqu'à la membrane des DCs (Trowsdale et Knight 2013). Il existe deux grandes classes de molécules du CMH spécialisées dans la présentation de l'antigène :

les molécules du **CMH de classe I** (CMH I) et les molécules du **CMH de classe II** (CMH II) qui présentent les peptides antigéniques respectivement aux LT CD8+ et LT CD4+ (Figure 4) (Neefjes *et al.* 2011, Kelly et Trowsdale 2018, Heijmans *et al.* 2020).

Les molécules du CMH I sont exprimées sur toutes les cellules nucléées alors que les molécules du CMH II sont exprimées uniquement sur les CPA (Holland *et al.* 2013). Les molécules du CMH I comportent trois chaînes α (α_1 et α_2 extracellulaires et α_3 transmembranaire) qui viennent s'associer de façon non covalente à une chaîne légère invariante : la β_2 microglobuline. Les molécules du CMH II comportent deux molécules α (α_1 extracellulaire et α_2 intracellulaire) et deux molécules β (β_1 extracellulaire et β_2 intracellulaire) (Figure 4) (Bjorkman and Parham 1990). Cette conformation permet aux molécules du CMH II une structure ouverte avec une plus grande poche de présentation des peptides. Ces molécules diffèrent donc également sur la longueur des peptides présentés : les molécules du CMH I peuvent contenir des peptides allant de 8 à 13 acides aminés alors que les peptides contenus par les molécules du CMH II peuvent aller jusqu'à 12 à 20 acides aminés. Concernant les peptides CMH I, ils se lient par deux résidus d'ancrages situés aux extrémités N- et C-terminales des molécules du CMH de classe I (Holland *et al.* 2013). Les peptides CMH II, quant à eux, se lient via quatre points d'ancrage aux extrémités et également au centre des molécules du CMH de classe II. Ces dernières ayant une conformation ouverte, les extrémités des peptides les plus longs sont à l'extérieur de la poche et sont appelés les régions flanquantes (Kelly et Trowsdale 2018, Heijmans *et al.* 2020).

Le système HLA est un ensemble de gènes localisés sur le chromosome 6. La région de classe I exprime uniquement trois gènes : HLA-A, HLA-B et HLA-C (Altmann et Trowsdale 1989). La région de classe II exprime efficacement 6 gènes : HLA-DP (A et B), HLA-DQ (A et B) et HLA-DR (A et B). Pour chaque gène, les locus A et B correspondent respectivement aux chaînes α et β du CMH II (Altmann et Trowsdale 1989). Les 260 gènes codants pour les molécules du CMH sont les plus polymorphes du génome humain ce qui résulte d'une grande diversité de peptides qui peuvent être présentés pour un seul et même individu (Bjorkman and Parham 1990, Trowsdale et Knight 2013, Apanius *et al.* 2017). Un changement unique dans le gène HLA peut modifier le type de peptide présenté et ainsi déclencher la reconnaissance par le T-cell receptor (TCR) des LT (Bharadwaj *et al.* 2012). Le polymorphisme de chaque individu est d'autant plus fort que chaque locus HLA est hétérozygote ce qui multiplie les recombinaisons possibles de ce gène. De ce fait, une nomenclature génomique des molécules HLA a été mise en place pour identifier et classer les différents polymorphismes (Figure 3). Cette nomenclature permet de repérer avec précision le gène codant pour la chaîne α ou β de la molécule HLA ainsi que l'allèle du gène en question (Trowsdale et Knight 2013, Apanius *et al.* 2017).

HLA-DRB1*01:01 Gène codant pour la molécule β ↑ Numérotation de l'allèle ↑		
Médicament	Réactions d'hypersensibilités	Association HLA
Abacavir	Syndrome d'hypersensibilité à l'abacavir	HLA-B*57 :01
Carbamazépine	Syndrome de Lyell et Stevens-Johnson	HLA-B*15 :02 HLA-A*31 :01
Allopurinol	Syndrome de Lyell et Stevens-Johnson	HLA-B*58 :01
Flucloxacilline	Hépatite médicamenteuse	HLA-B*57 :01

Figure 3. Nomenclature génomique et associations des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité dans les allergies médicamenteuses

HLA = Human Leucocyte Antigen

Plusieurs hypothèses ont été soulevées pour expliquer l'immunopathogénèse des allergies médicamenteuses. L'implication des facteurs environnementaux et génétiques est encore mal connue. Concernant le terrain génétique, il a notamment été montré que l'allergie médicamenteuse pouvait être favorisée par la présence d'un allotype HLA spécifique (Schutte *et al.* 2018). L'association la plus étudiée est celle de l'hypersensibilité à l'abacavir (traitement du VIH) avec la molécule **HLA-B*57 :01** dans la population européenne (Hetherington *et al.* 2002, Mallal *et al.* 2008, Chessman *et al.* 2008, Bharadwaj *et al.* 2012, Fan *et al.* 2017) (Figure 3). Concernant la clinique, le syndrome d'hypersensibilité à l'abacavir est un effet indésirable touchant 5% des patients traités et survenant le plus souvent dans la phase initiale du traitement (6 premières semaines) avec un rash cutané, de la fièvre, de la fatigue et des symptômes respiratoires (Bharadwaj *et al.* 2012). Cette réaction peut entraîner un risque vital, particulièrement en cas de retrait tardif du médicament ou encore en cas de réintroduction. Ainsi, le dépistage des molécules **HLA-B*57 :01** est devenu automatique avant l'introduction d'un traitement par l'abacavir et a montré une valeur de prédiction positive de 100% avec une spécificité de 90 à 100%, appuyant un mécanisme allergique majoritairement contrôlé par la présence de cet allèle (Chessman *et al.* 2008).

D'autres associations médicament-HLA ont été démontrées dans la littérature notamment celle de la carbamazépine (traitement de l'épilepsie) avec la molécule **HLA-B*15 :02** dans la population asiatique (Ferrell et McLeod 2008, Chen *et al.* 2011) ou avec la molécule **HLA-A*31 :01** dans la population européenne (McCormack *et al.* 2011) ; celle de l'allopurinol (hypo-uricémiant) avec la molécule **HLA-B*58 :01** dans les populations asiatiques (Kaniwa *et al.* 2008, Kang *et al.* 2011, Jung *et al.* 2011) et également celle de la flucloxacilline (antibiotique de la famille des β -lactamines (BL)) avec la molécule **HLA-B*57 :01** responsable d'hépatites médicamenteuses graves (Daly *et al.* 2009, Bharadwaj *et al.* 2012, Monshi *et al.* 2013, Willemin *et al.* 2013) (Figure 3).

1.2.3 L'apprêtement de l'antigène

L'apprêtement de l'antigène est caractérisé par sa fragmentation en peptides antigéniques de taille variable. Selon l'origine de l'antigène, ce dernier sera préférentiellement orienté vers la **voie exogène** (pour les antigènes extracellulaires) ou vers la **voie endogène** (pour les antigènes intracellulaires) (Figure 4).

Les antigènes extracellulaires sont endocytés par les DCs et subissent l'acidification de l'endosome précoce qui déclenche leur protéolyse par les cathepsines et autres protéases endosomales (Figure 4) (Neefjes *et al.* 2011, Jurewicz et Stern 2018, Heijmans *et al.* 2020). Parallèlement dans le réticulum endoplasmique (RE), les molécules du CMH II sont synthétisées et associées avec le peptide Class II-associated invariant chain peptide (CLIP) qui protège leur poche d'ancrage. La dernière étape est conduite par les molécules HLA-DM et consiste à remplacer la protéine CLIP par un peptide antigénique (Jurewicz et Stern 2018). Le complexe CMH II-peptide formé est ensuite dirigé vers la membrane plasmique pour être présenté aux LT CD4⁺ (Figure 4) (Bjorkman and Parham 1990, Holland *et al.* 2013, Trowsdale et Knight 2013).

Les antigènes intracellulaires sont pris en charge par le protéasome afin d'être fractionnés en peptides (Figure 4). Le protéasome (26S) est un complexe d'une trentaine de protéines qui se regroupent en deux sous-unités : le cœur catalytique (ou sous-unité 20S) et les deux complexes régulateurs (ou sous-unités 19S). Ces sous-unités forment le protéasome 26S qui est responsable de la majorité de la dégradation non-lysosomale des protéines à l'intérieur des cellules (Kotsias *et al.* 2019, Heijmans *et al.* 2020). Lors de conditions pro-inflammatoires exposant les cellules à l'IFN- γ , les sous-unités du protéasome forment l'immunoprotéasome spécialisé dans la génération de peptides antigéniques (Kloetzel et Ossendorp 2004, Kotsias *et al.* 2019). Les peptides antigéniques formés par protéolyse sont ensuite transportés par le complexe de chargement peptidique (PLC, peptide-loading

complex), formé par les protéines transporters associated with antigen processing (TAP), la protéine endoplasmic reticulum resident protein 57 (ERp57) et la calnexine-calréticuline, vers le RE pour être conjugués aux molécules du CMH I (Figure 4). Le complexe CMH I-peptide est ensuite orienté vers l'appareil de golgi pour être externalisé et présenté aux LT CD8+ (Figure 4) (Neefjes *et al.* 2011, Holland *et al.* 2013, Heijmans *et al.* 2020). Les antigènes extracellulaires peuvent également être présentés via les molécules du CMH I pour déclencher une réponse cytotoxique. On appelle ce mécanisme la « présentation croisée » que nous détaillerons dans la partie suivante.

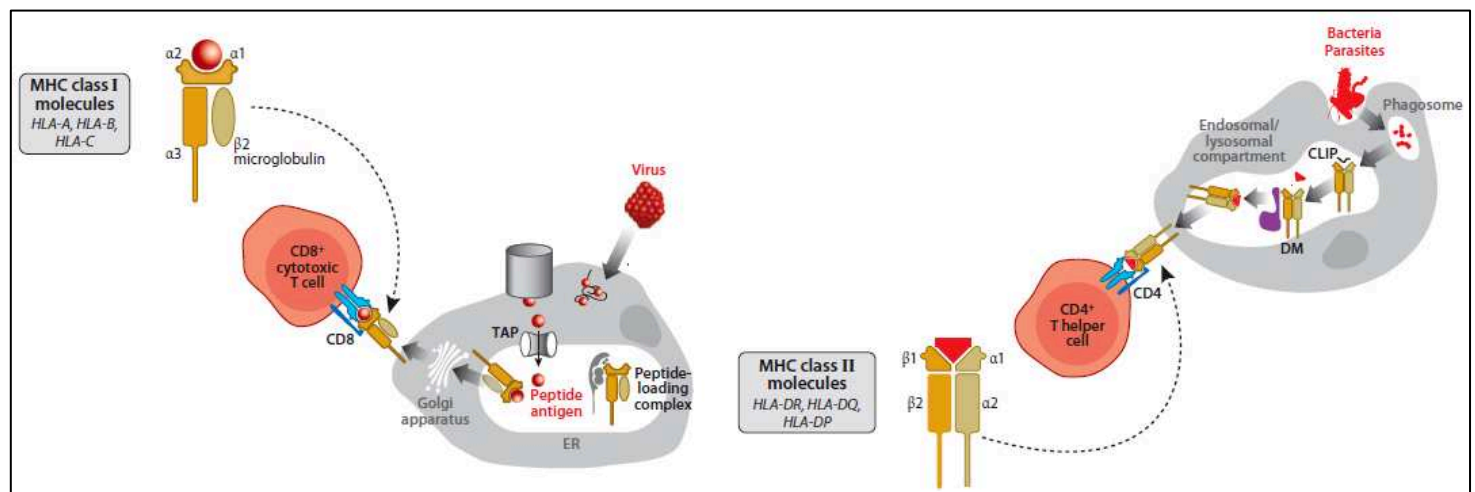


Figure 4. Présentation de l'antigène par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (adaptée de Trowsdale et Knight 2013)

La voie exogène met en jeu un apprêtement par les protéases endosomales suivi par une conjugaison aux molécules du CMH de classe II afin d'être présenté aux LT CD4+. La voie endogène met en jeu un apprêtement de l'antigène par le protéasome suivi par une conjugaison aux molécules du CMH de classe I afin d'être présenté aux LT CD8+. PLC = Peptide-Loading Complex ; CLIP = Class II associated Invariant Chain Peptide; DM = HLA-DM.

1.2.4 Le mécanisme de la présentation croisée

Classiquement, les antigènes extracellulaires sont présentés aux LT CD4+ via les molécules du CMH II (voie exogène) alors que les antigènes intracellulaires sont présentés aux LT CD8+ via les molécules du CMH I (voie endogène). Lorsque les DCs ne sont pas directement infectées par une infection bactérienne/virale, elles sont capables d'orienter les antigènes exogènes provenant des cellules infectées environnantes vers les molécules du CMH I afin d'activer directement une réponse cytotoxique par les LT CD8+ : c'est ce que l'on appelle la **présentation croisée** (Figure 5) (Amigorena et Savina 2010, Joffre *et al.* 2012).

Plusieurs APC ont la capacité de faire de la présentation croisée mais cette dernière est majoritairement conduite par les DCs. En effet, les cDC1 ont la caractéristique de posséder de faibles quantités de protéases endosomales ce qui favorise la formation d'endosomes précoces (Eisenbarth 2019). Ces derniers sont caractérisés par une acidification lente et une faible capacité de dégradation des antigènes extracellulaires ce qui oriente préférentiellement vers une présentation croisée (Joffre *et al.* 2012, Merad *et al.* 2013, Alloati *et al.* 2016).

Il existe deux voies majoritaires permettant de faire de la présentation croisée : **la voie cytosolique** et **la voie vacuolaire** (Figure 5) (Joffre *et al.* 2012). La voie cytosolique est la voie majoritaire où l'antigène est libéré dans le cytosol directement après avoir été endocyté pour être apprêté par le protéasome. Les peptides produits peuvent ensuite reprendre la voie classique en étant acheminés vers le RE et conjugués aux molécules du CMH I. Cette voie est donc sensible aux inhibiteurs du protéasome. Concernant la voie vacuolaire, l'antigène entre dans les DCs par endocytose et son apprêtement se fait par les protéases endosomales. Après cet apprêtement, les peptides sont conjugués aux molécules du CMH I à l'intérieur de l'endosome pour ensuite être acheminés à la membrane des DCs et être présentés aux LT. Cette voie n'est pas sensible aux inhibiteurs du protéasome mais elle est sensible aux molécules alcalinisant le contenu des endosomes telles que la chloroquine.

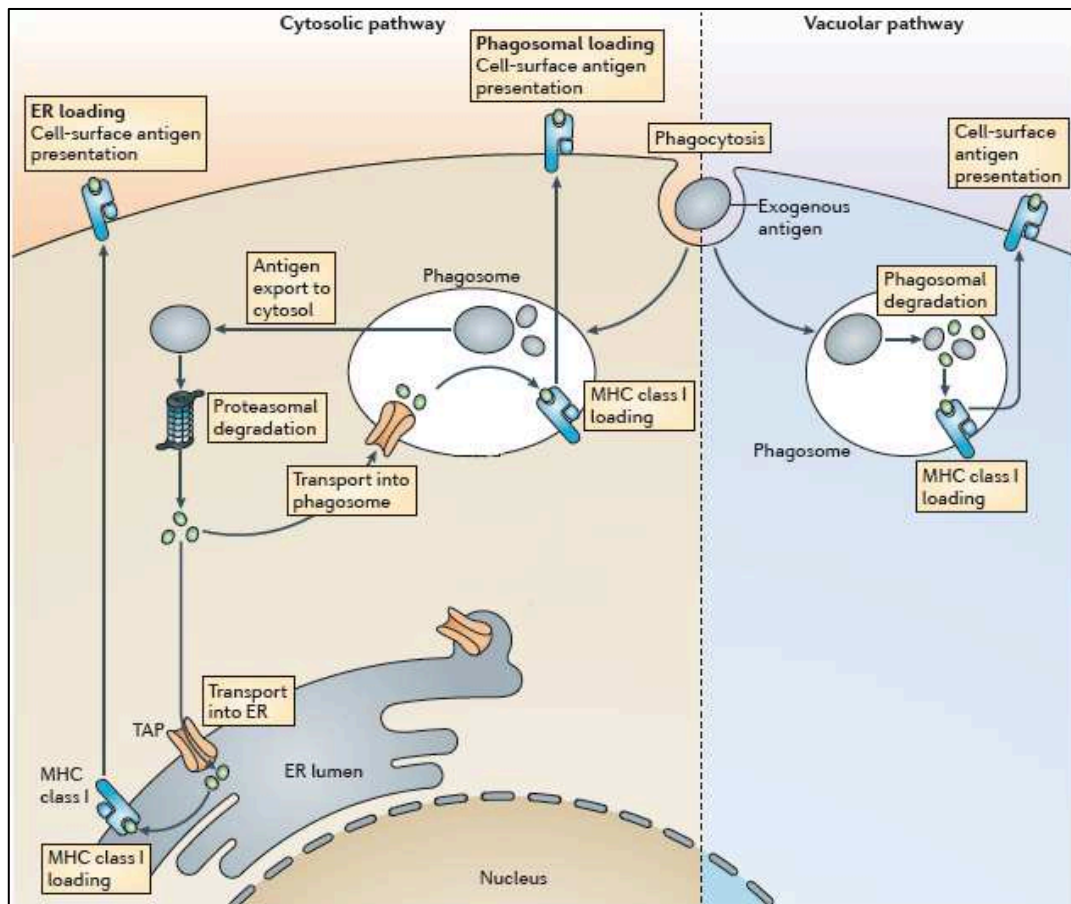


Figure 5. Mécanismes de la présentation croisée dans les cellules dendritiques humaines (adaptée de Joffre *et al.* 2012)

Dans la voie cytosolique, les antigènes exogènes phagocytés sont exportés dans le cytosol où ils sont apprêtés par le protéasome pour être ensuite conjugués aux molécules du CMH de classe I. Dans la voie vacuolaire, les antigènes exogènes sont apprêtés et conjugués aux molécules du CMH de classe I dans le phagosome. CMH I = molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.

1.3 La maturation des cellules dendritiques : le rôle des signaux de danger

Outre la présence d'un antigène, les DCs ont besoin de molécules dites « **signaux de danger** » pour déclencher un processus de maturation permettant la présentation efficace de l'antigène aux LT (Matzinger 1994). Nous allons en détailler les mécanismes dans cette partie.

1.3.1 Le rôle des signaux de danger

L'antigène seul ne permet pas d'induire la maturation des DCs. Cette maturation n'est possible qu'en présence de signaux d'alarme, appelés « signaux de danger » (Matzinger 1994, Gallucci et Matzinger 2001, Matzinger 2002) qui vont alerter les DCs sur le caractère néfaste de l'antigène détecté et la nécessité de l'éliminer. La conséquence majeure de cette alerte est l'acquisition d'un phénotype mature (ou effecteur) des DCs contrairement au phénotype tolérogène qui est adopté en l'absence de signaux de danger (Matzinger 1994, Matzinger 2002). Ainsi, les DCs matures perdent leur capacité d'endocytose de l'antigène au profit de celle de la migration, de l'apprêtement et de la présentation de l'antigène.

Il existe deux grandes familles de signaux de danger : les signaux de danger exogènes généralement portés par les pathogènes d'où leur nom « **Pathogen associated molecular patterns** » (**PAMPs**) ; ou les signaux de danger endogènes, généralement produits à cause de dommages cellulaires, appelés les « **Damage associated molecular patterns** » (**DAMPs**) (Gallucci et Matzinger 2001, Matzinger 2002, Kaplan *et al.* 2012). Les PAMPs sont des signaux portés par les pathogènes tels que les bactéries, les virus ou les champignons. Ils peuvent être de différente nature : des acides nucléiques, des composants de la paroi fongique (β -glucane et α -mannane), des protéines bactériennes (flagellines) ou des composants de la paroi bactérienne comme le lipopolysaccharide (LPS) (Kaplan *et al.* 2012). Les DAMPs sont des molécules normalement présentes à l'intérieur des cellules qui se retrouvent excrétées dans le compartiment extracellulaire à cause d'un stress ou d'un processus de mort cellulaire. Les premiers signaux de danger endogènes à avoir été caractérisés étaient des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1 β (Gallucci et Matzinger 2001). Les DAMPs regroupent l'acide urique, les acides nucléiques, l'adénosine triphosphate (ATP), les espèces réactives de l'oxygène (ERO), la protéine high mobility group box 1 protein (HMGB1) sécrétée par les cellules nécrotiques, les β -défensines sécrétées par les neutrophiles activés, les protéines de choc thermique (HSP, heat shock proteins) et l'interféron gamma (IFN- γ) (Gallucci et Matzinger 2001, Kaplan *et al.* 2012, Schaefer 2014). Une nouvelle famille de signaux de danger a récemment été introduite : les « **Nanoparticle-associated molecular patterns** » (**NAMPs**) qui seraient les motifs portés par les nanoparticules (Fadeel 2012, Farrera et Fadeel 2015, Pallardy *et al.* 2017, Feray *et al.* 2020). Certaines molécules chimiques sont capables d'agir comme des signaux de danger sur les DCs. Par exemple, il a été montré que le dinitrochlorobenzène (DNCB) et le nickel augmentaient l'expression des molécules d'activation et de co-stimulation ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8 et TNF- α) sur un modèle de DCs humaines (Coutant *et al.* 1999, Manome *et al.* 1999, Tuschl *et al.* 2000, Boislevé *et al.* 2005, Antonios *et al.* 2009).

Ces signaux de danger sont détectés par les DCs via les **Pattern recognition receptors ou PRR**. Il existe différents types de PRR dont les plus connus sont les récepteurs **Toll-like (TLR)**. Il existe 10 TLR numérotés de 1 à 10 chez l'Homme (Schaefer 2014, Satoh et Akira 2016). Les cDCs expriment l'ensemble des TLR alors que les pDCs expriment majoritairement les TLR 7 et 9. L'ensemble des TLR sont situés au niveau de la membrane plasmique à l'exception des TLR 3, 7, 8 et 9 qui sont exprimés au niveau de la membrane endosomale. Les TLR sont classés en fonction du type de signal de danger qu'ils reconnaissent. Les TLR 1, 2, 4 et 6 reconnaissent des lipides et des lipopeptides ; les TLR 3, 7, 8 et 9 reconnaissent les acides nucléiques alors que le TLR 5 reconnaît les protéines et en particulier la flagelline bactérienne (Brennan et Gilmore 2018, Fulde *et al.* 2018). Le TLR4 est notamment connu pour reconnaître le LPS, un composant majeur de la paroi des bactéries à gram négatif (Satoh et Akira 2016, Brennan et Gilmore 2018). Plusieurs études ont également montré que le nickel était un ligand direct du TLR4 induisant une activation des voies d'activation des DCs (MAPK, NF- κ B et JAK-stat) (Boisleve *et al.* 2005, Antonios *et al.* 2009, Schmidt *et al.* 2010, Rachmawati *et al.* 2013, Bechara *et al.* 2017). L'activation d'un TLR, à l'exception du TLR3, déclenche une voie dépendante de l'adaptateur MyD88 (myeloid differentiation factor 88) aboutissant à l'activation des MAPK (mitogen-activated protein kinases) et de la voie du facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor kappa B) (Figure 6) (Kaplan *et al.* 2012). Cette activation déclenche la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β (Yu *et al.* 2010). Le TLR3 passe par l'adaptateur TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β) ce qui déclenche l'activation des facteurs de transcription IRF3 (IFN-regulatory factor 3) et NF- κ B, aboutissant à la sécrétion d'IFN de type I (Figure 6) (Lim et Staudt 2013, Chen *et al.* 2015, De Nardo 2015, Brennan et Gilmore 2018). Ces différentes voies cellulaires permettent l'activation des DCs et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

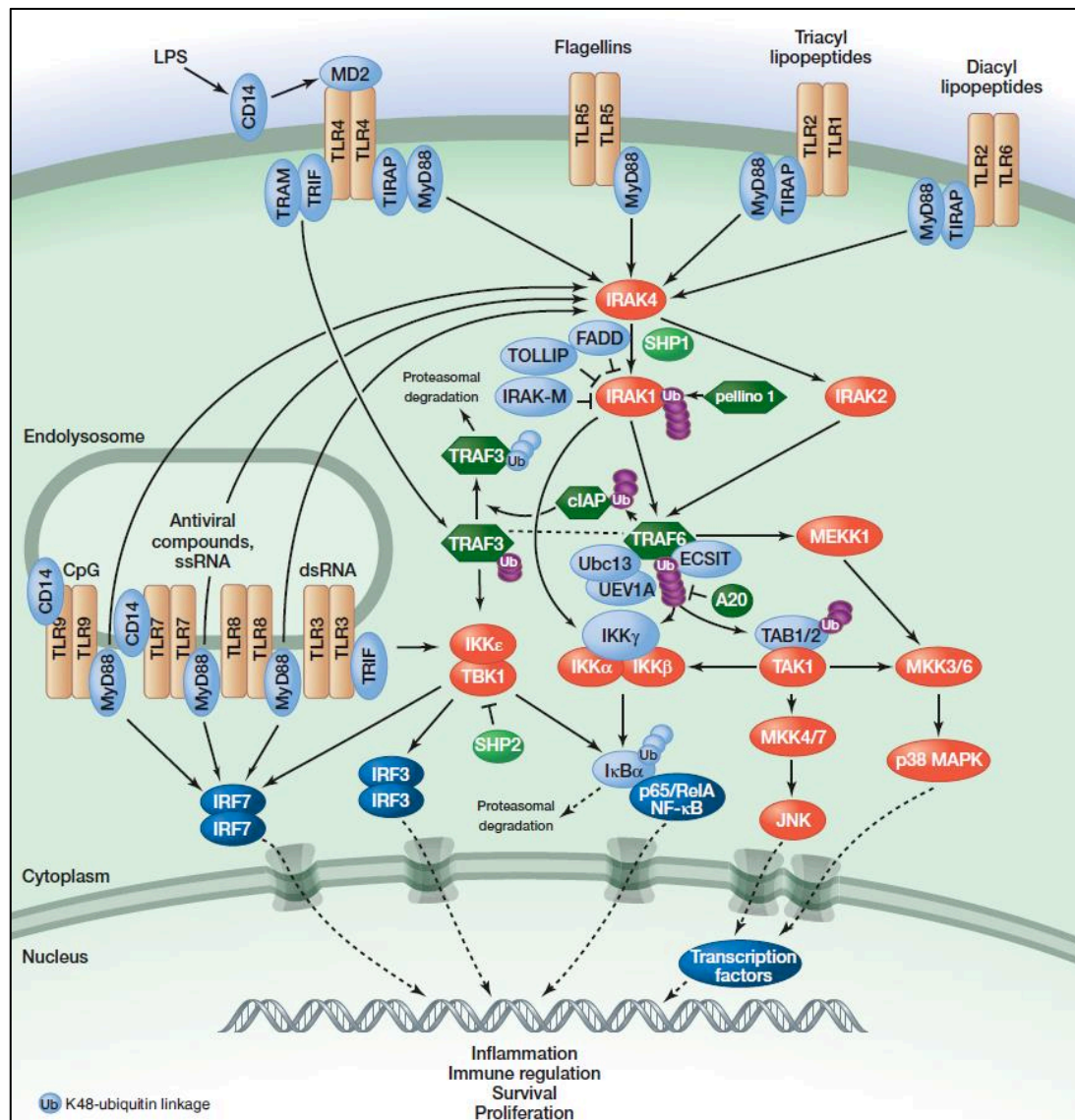


Figure 6. Les voies de signalisation des Toll-like receptors (adaptée de Lim et Staudt 2013)

L'activation d'un TLR déclenche une voie dépendante de l'adaptateur MyD88 aboutissant à l'activation des voies MAPK et NF- κ B aboutissant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Le TLR3 passe par l'adaptateur TRIF qui déclenche l'activation des facteurs de transcription IRF3 et NF- κ B, aboutissant à la sécrétion d'IFN de type I. MyD88 = Myeloid Differentiation factor 88; MAPK = Mitogen-Activated Protein Kinases; NF- κ B = Nuclear Factor kappa B; TRIF = TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β ; IRF3 = IFN-regulatory factor 3.

1.3.2 Les modifications phénotypiques des cellules dendritiques matures

Lorsque les DCs détectent un signal de danger, elles déclenchent un processus de maturation qui leur permet d'apprêter l'antigène en peptides antigéniques qui seront conjugués aux molécules de CMH afin d'être présentés à la surface des cellules (Figure 7) (Bjorkman and Parham 1990, Neefjes *et al.* 2011, Holland *et al.* 2013). Ce processus est une condition *sine qua non* au déclenchement de la réponse lymphocytaire (Bakdash *et al.* 2013).

En passant d'un état immature à un état activé, les DCs perdent leur capacité d'endocytose et d'adhésion au profit de la capacité de migrer et de présenter les peptides antigéniques (Steinman *et al.* 1997). L'expression des molécules du CMH à la surface des DCs est augmentée ainsi que l'expression d'autres molécules telles que les molécules d'adhésion (CD54), les molécules d'activation (CD83) et les molécules de co-stimulation qui permettent de provoquer des éléments de signalisation supplémentaires pour activer les LT (CD40, CD80 et CD86) (Figure 7) (Steinman *et al.* 1997, Ryan *et al.* 2007, Bakdash *et al.* 2013). Ce processus de maturation augmente également l'expression des récepteurs CCR7 et CXCR4 qui permettent la migration des DCs vers les organes lymphoïdes en suivant le gradient de chimiokines produites dans les zones riches en LT : CCL19/CCL21 et CXCL12 (Figure 7) (Förster *et al.* 1999, Kabashima *et al.* 2007, Bakdash *et al.* 2013). Cette maturation déclenche également la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires permettant l'activation et la polarisation des LT que nous détaillerons dans les parties suivantes (Brennan et Gilmore 2018).

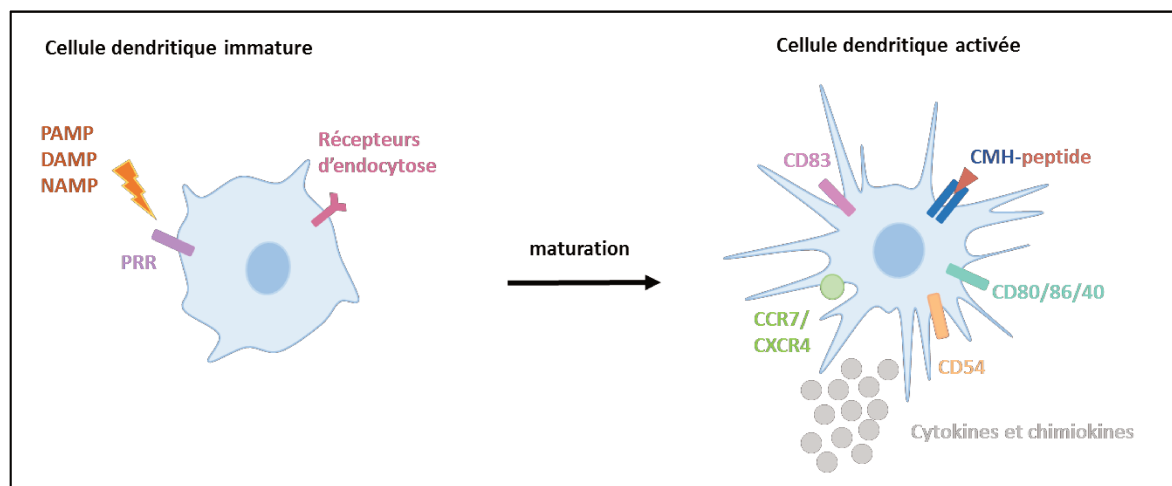


Figure 7. Modifications phénotypiques des cellules dendritiques matures

Les DCs matures perdent leur capacité d'endocytose de l'antigène au profit de celle de la migration, de l'apprêtement et de la présentation de l'antigène. PAMP = Pathogen-Associated Molecular Patterns; DAMP = Damaged-Associated Molecular Patterns; NAMP = Nanoparticle-Associated Molecular Patterns; PRR = Pattern Recognition Receptors; CMH = Complexe Majeur d'Histocompatibilité.

II. L'immunité adaptative médiée par la réponse lymphocytaire

L'ensemble des mécanismes décrits précédemment déclenchent la maturation des DCs qui vont ainsi migrer vers les organes lymphoïdes et activer les LT. Dans cette partie, nous aborderons les mécanismes cellulaires et moléculaires de la réponse lymphocytaire, la seconde étape de la réaction immunitaire.

2.1 Le répertoire des lymphocytes T naïfs

Le répertoire T d'un individu se caractérise par l'ensemble des LT naïfs qu'il possède ainsi que leur spécificité antigénique. Chaque LT est spécifique d'un antigène qu'il reconnaît via le récepteur **TCR**. Le TCR est un hétérodimère composé de deux chaînes polypeptidiques, majoritairement α et β , codées par les gènes V (variable), D (diversité, uniquement pour les chaînes β), J (jonction) et C (constant) (Figure 8) (Nikolich-Zugich *et al.* 2004, Takaba et Takayanagi 2017). La diversité du répertoire T est liée aux recombinaisons aléatoires des différents gènes du TCR. Le génome humain et le réarrangement $\alpha\beta$ génèrent plus de 10^{15} TCR différents (Nikolich-Zugich *et al.* 2004, Zarnitsyna *et al.* 2013, de Greef *et al.* 2021). Cette combinaison unique pour chaque TCR donne lieu à trois domaines hypervariables qui vont permettre une interaction spécifique avec un antigène donné (CDR1, CDR2 et CDR3). Un hétérodimère $\alpha\beta$ TCR s'associe à des paires uniques de molécules de couplage CD3 (CD3 $\gamma\epsilon$, CD3 $\delta\epsilon$ et CD3 $\zeta\zeta$) qui permettent la transduction du signal d'activation. Les molécules CD4 et CD8 sont des corécepteurs qui assistent et stabilisent la reconnaissance TCR/CMH (van der Merwe et Dushek 2011, Malissen et Bongrand 2015).

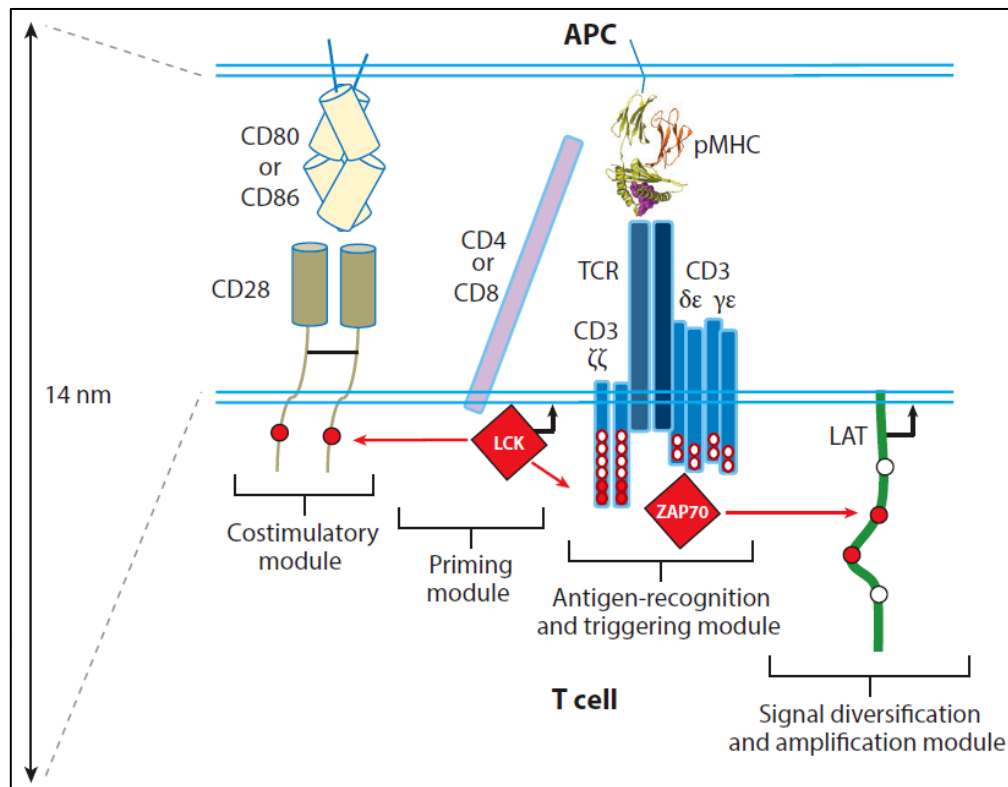


Figure 8. Structure du récepteur des cellules T (adaptée de Malissen et Bongrand 2015)

Un hétérodimère TCR $\alpha\beta$ s'associe à des paires uniques de molécules CD3 (CD3 $\gamma\epsilon$, CD3 $\delta\epsilon$ et CD3 $\zeta\zeta$) contenant des motifs ITAM (représentés par une paire de points). La phosphorylation des motifs ITAM par la protéine tyrosine kinase LCK conduit à l'activation de ZAP-70, qui phosphoryle à son tour l'adaptateur LAT, amplifiant le signal d'activation. La reconnaissance des molécules de co-stimulation CD28 avec les molécules CD80-CD86 à la surface des CPA est amorcée par la LCK ce qui maintient l'engagement du TCR. APC = antigen-presenting cell; CDR = complementarity-determining region; ITAM = immunoreceptor tyrosine-based activation motif; LAT = linker for activation of T cells; TCR = T cell receptor.

Les précurseurs des LT, appelés les thymocytes, se développent dans le thymus où ils subissent un processus de sélection strict par lequel les cellules immatures double positif (CD4+CD8+) sont sélectionnées en fonction de la réactivité de leur TCR face aux peptides du soi présentés par les molécules du CMH des cellules épithéliales thymiques (Sprent et Surh 2011) (Figure 9). Cette sélection thymique aboutit à l'élimination de plus de 90% des thymocytes (Klein *et al.* 2014, Takaya et Takayanagi 2017). En effet, le processus de **sélection négative** permet la suppression des thymocytes ayant une forte affinité pour ces peptides, tandis que la **sélection positive** permet la survie des thymocytes ayant une faible affinité de leur TCR pour les peptides du soi. Les thymocytes sélectionnés sont ensuite différenciés en cellules matures simple positif (CD4+CD8- et CD4-CD8+) avec un

phénotype naïf caractérisé par l'expression des marqueurs CD45RA et CCR7 (Sprent et Surh 2011, Kondo *et al.* 2018). Ces cellules sont maintenues en vie par un cocktail cytokinique riche en IL-7 ainsi qu'avec les signaux de survie induits par l'interaction de leur TCR avec les peptides du soi présentés par les CPA (Figure 9) (Kondo *et al.* 2018). Lors d'une réponse immunitaire, ces LT naïfs réagissent avec les épitopes dont ils sont spécifiques et s'activent pour devenir des cellules effectrices. Après la réaction, ces cellules survivent et forment des cellules T mémoires caractérisées par l'expression du marqueur CD45RO (Woodland et Kohlmeier 2009).

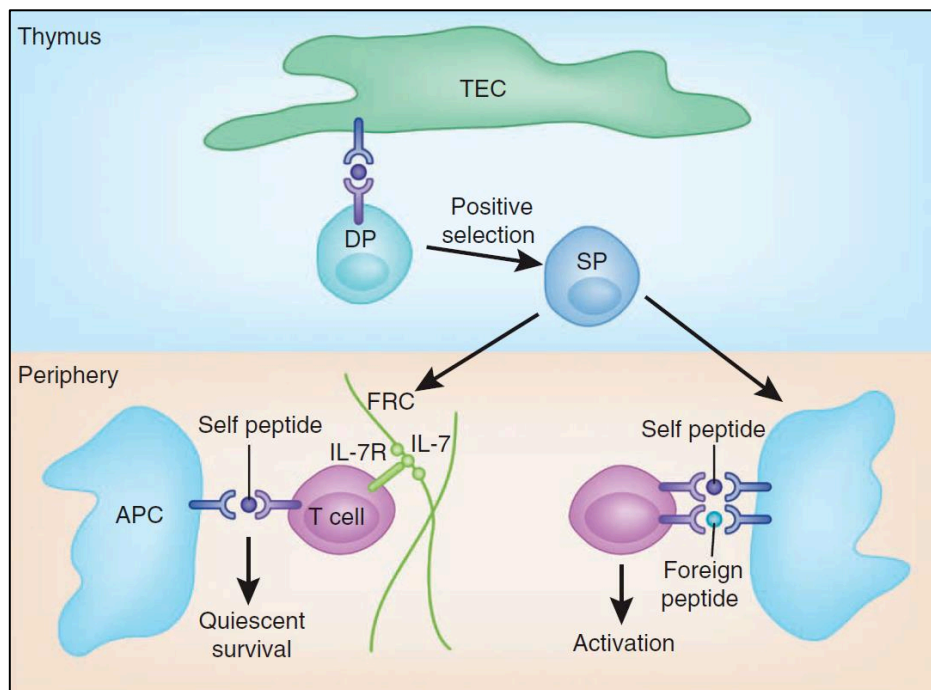


Figure 9. Processus de sélection thymique des lymphocytes T (adaptée de Sprent et Surh 2011)

Les processus de sélection négative et positive permettent la différenciation de cellules matures simples positives dont la survie est maintenue par l'IL-7 et les signaux de survie induits par les interactions de leur TCR avec les peptides du soi présentés par les APC. En périphérie, la présentation d'un peptide étranger aux LT naïfs spécifiques déclenche leur activation et leur différenciation en cellules effectrices. DP = double-positive thymocyte; SP = single positive thymocyte; FRC = fibroblastic reticular cells; TEC = thymic epithelial cells.

2.2 La synapse immunologique : présentation et activation des lymphocytes T

Lorsque les DCs détectent un antigène, et en présence de signaux de danger, elles sont activées et migrent vers les organes lymphoïdes pour activer les LT naïfs via la présentation des peptides antigéniques par les molécules du CMH. L'activation des LT naïfs spécifiques par les DCs nécessite trois signaux (Bakdash *et al.* 2013, Chen et Flies 2013).

Le **premier signal** d'activation passe par la reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR des LT ce qui induit une réorganisation de l'expression des molécules de surface facilitant la synapse entre la DC et le LT (Chen et Flies 2013).

Cette réorganisation permet l'arrivée du **second signal** d'activation, appelé le signal de co-stimulation, qui est médié par les molécules de co-stimulation (*i.e.* CD80 et CD86), particulièrement exprimées sur les DCs matures. Ces molécules se lient avec la molécule CD28 exprimée constitutivement à la surface des LT, favorisant leur activation (Figure 10) (Dustin 2014, Finetti et Baldari 2018, Tittarelli *et al.* 2020). La conséquence de cette liaison est une augmentation de la prolifération et de la survie des LT marquées par une augmentation de la sécrétion d'IL-2 (Boise *et al.* 1995, Bakdash *et al.* 2013). Ce signal de co-stimulation est complété par l'interaction de la molécule CD40 avec son ligand CD40L présent chez les LT. L'interaction CD40/CD40L active la voie NF- κ B induisant ainsi un maintien de l'activation et de la survie des DCs (Caux *et al.* 1994, Bakdash *et al.* 2013). Les molécules Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) sont exprimées sur les LT activés et de façon constitutive sur les LT régulateurs (Olive *et al.* 2011). Ces molécules entrent en compétition avec les molécules CD28 pour la liaison avec les molécules CD80/CD86 et déclenchent un signal inhibiteur (Bakdash *et al.* 2013, Chen et Flies 2013). En effet, la liaison des molécules de co-stimulation CD80/CD86 avec CTLA-4 induit une inhibition de la prolifération des LT et de la sécrétion d'IL-2 (Olive *et al.* 2011, Bakdash *et al.* 2013). Chez les LT conventionnels, ce mécanisme sert de rétro-contrôle négatif pour éviter une activation lymphocytaire excessive. Un autre récepteur lymphocytaire, plus étudié dans le domaine de l'oncologie, peut déclencher une réponse anergique : le récepteur programmed cell death 1 (PD-1). Sa liaison avec son ligand (PD-L1, programmed cell death ligand 1), exprimé par les DCs, induit une inhibition de la prolifération et de la survie des LT (Figure 10) (Bakdash *et al.* 2013).

Le **troisième signal** d'activation est assuré par la sécrétion de cytokines par les DCs telles que l'IL-12, l'IL-23, l'IL-10 et le TNF- α . Ces dernières sont indispensables à la survie et la polarisation des LT que nous détaillerons dans la partie suivante (De Jong *et al.* 2005, Blanco *et al.* 2008).

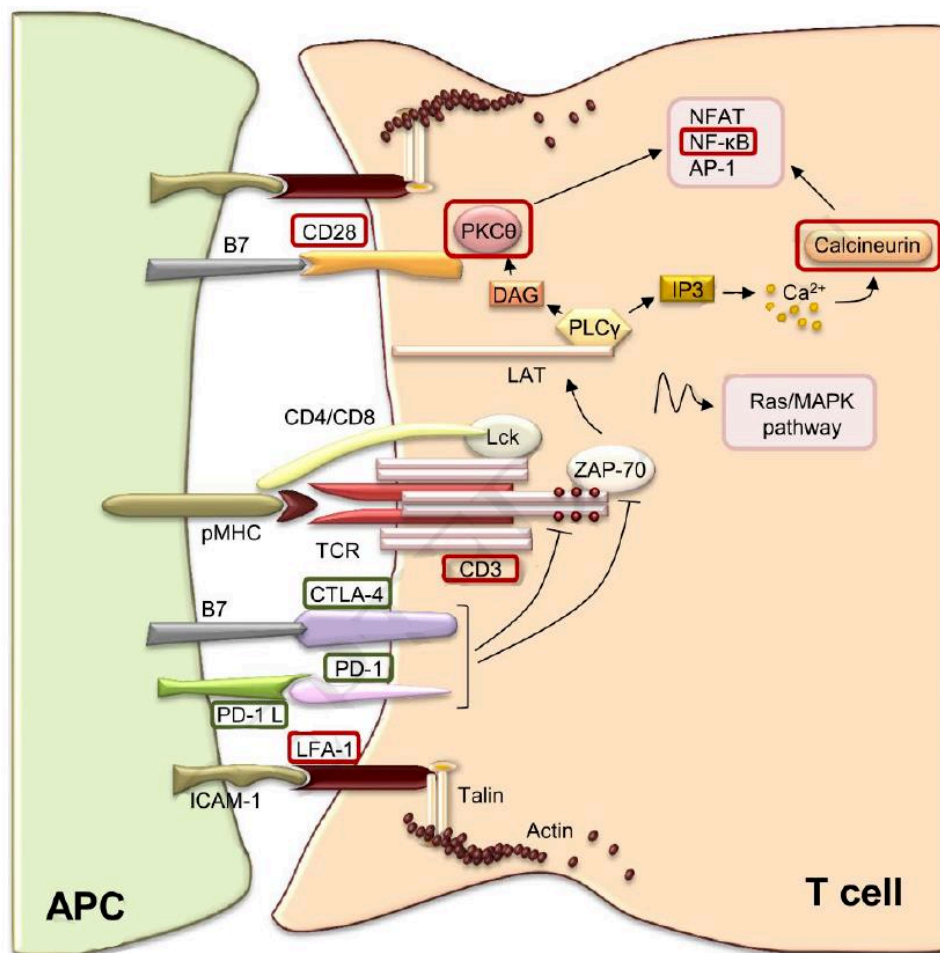


Figure 10. La synapse immunologique et les signaux de co-stimulation et co-inhibition (adaptée de Finetti et Baldari 2018)

L'activation des LT naïfs par les DCs est contrôlée par des signaux de co-stimulation et co-inhibition. Un signal d'activation passe par la reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR des LT. Le second signal d'activation (signal de co-stimulation) est médié par la reconnaissance des molécules de la famille B7 (CD80 et CD86) des CPA avec la molécule CD28 des LT. Au contraire, des signaux inhibiteurs peuvent être déclenchés si les molécules B7 se lient au CTLA-4 ou si le récepteur PD-1 se lie avec son ligand PD-L1 exprimé par les DCs. CTLA-4 = Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen-4; PD-L1 = Programmed cell Death Ligand 1; PD1 = Programmed cell Death 1; LT = Lymphocyte T.

2.3 La polarisation des lymphocytes T

Notre travail de thèse s'intéresse à l'impact de l'environnement cellulaire sur la réponse lymphocytaire T spécifique des BL. Plusieurs études montrent que cet environnement cellulaire (*i.e.* stress, infections), encore appelé épimmunome, influence directement le comportement et la sécrétion de cytokines par les DCs (Swamy *et al.* 2010, Kamekura *et al.* 2016). Le cocktail cytokinique sécrété se fait donc en fonction de la menace détectée et déclenchera la polarisation des LT « helper » vers les réponses **Th1**, **Th2**, **Th17** ou **Th22** (Deenick *et al.* 2011).

En présence d'une infection virale, bactérienne ou fongique, les DCs sécrètent de l'IL-12 qui est détectée par les LT induisant la transcription du facteur de transcription t-Bet et une réponse de type **Th1** (Figure 11) (Blanco *et al.* 2008, Walsh et Mills 2013, Yoshimoto 2018, Zhu 2017). Les LT Th1 sécrètent de l'IFN- γ qui déclenche l'activation des macrophages et l'élimination des pathogènes intracellulaires (De Jong *et al.* 2005, Zhu *et al.* 2010, Walsh et Mills 2013, Yoshimoto 2018).

Un contexte cellulaire riche en IL-4 induit la transcription du facteur de transcription GATA-3 et une réponse de type **Th2** caractérisée par la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 (Figure 11) (Murphy et Stockinger 2010, Zhu *et al.* 2010). Les LT Th2 sont essentiels pour lutter contre les infections par les helminthes et dans le développement des réactions allergiques car ils permettent une activation des basophiles, des éosinophiles et des LB induisant une production d'anticorps spécifiques d'isotype IgE.

La présence de champignons ou de bactéries à gram négatif induit la sécrétion d'IL-23 et d'IL-1 β par les DCs. Ces cytokines sont captées par les LT et induisent la transcription du facteur ROR- γ T conduisant vers une réponse **Th17**. Les LT Th17 sécrètent de l'IL-17 (A et F) et de l'IL-22 qui induisent un chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles et engendrent la destruction des pathogènes extracellulaires et une inflammation (Figure 11) (Zhu *et al.* 2010, Walsh et Mills 2013).

Une inflammation tissulaire peut engendrer la production d'IL-6 et de TNF- α par les LC ou les DCs ce qui induit une orientation vers une réponse **Th22** (Figure 11). Malgré un facteur de transcription commun (ROR- γ T), la réponse Th22 est distincte de la polarisation Th17 car elle est caractérisée par la sécrétion d'IL-22 et de TNF- α en absence d'IL-17A ce qui induit des effets anti-inflammatoires protecteurs responsables de la reconstruction tissulaire et de la cicatrisation cutanée (Deenick *et al.* 2011, Tian *et al.* 2012).

Les LT CD8+ peuvent s'orienter vers deux profils de polarisation cytokinique. Un contexte cellulaire riche en IL-12 orientera la réponse vers un phénotype **Tc1** (Tc pour LT cytotoxique) caractérisé par la sécrétion d'IFN- γ alors qu'un contexte cellulaire riche en IL-4 induira une réponse

Tc2 caractérisée par la sécrétion d'IL-5 et d'IL-13 (Swain 1995, Cerwenka *et al.* 1998, Mittrücker *et al.* 2014).

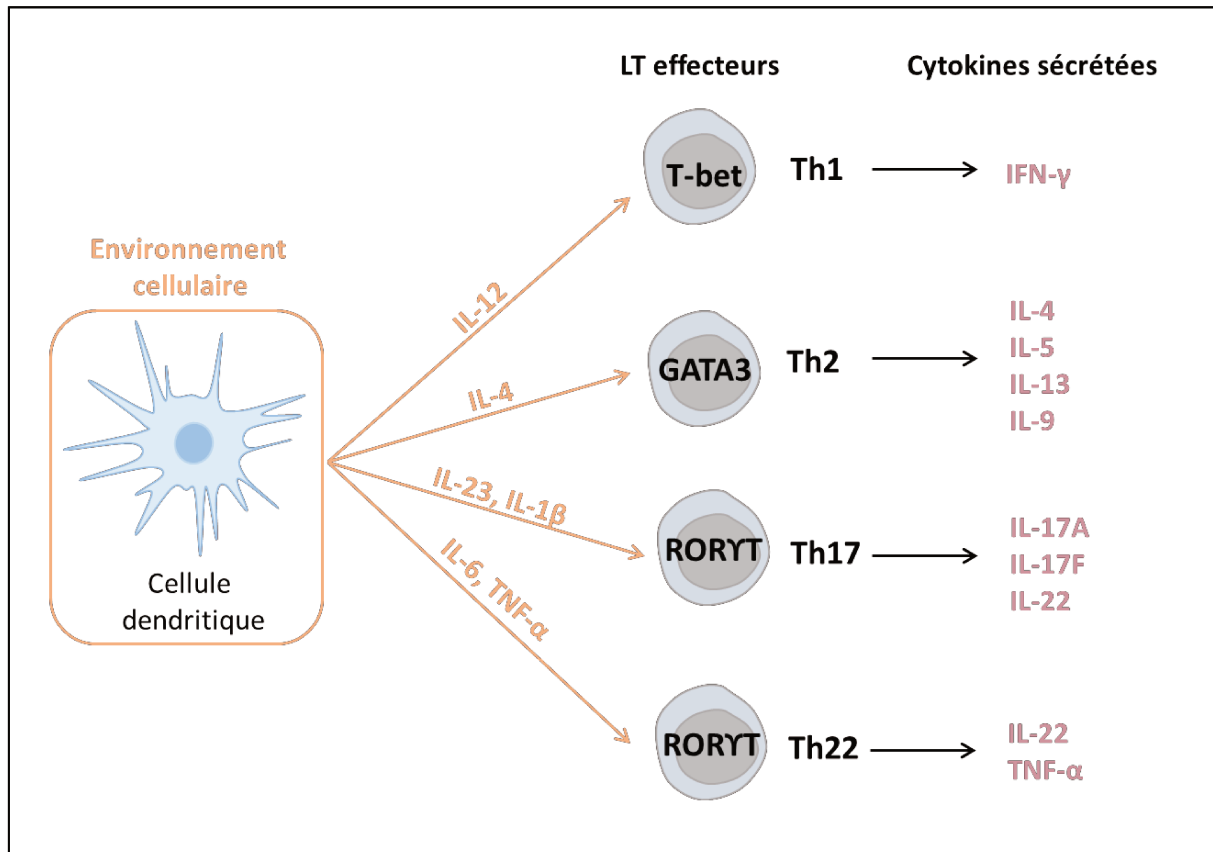


Figure 11. Polarisation des lymphocytes T (adaptée de Deenick et al. 2011)

Le contexte cytokinique influence la polarisation des LT helper vers les réponses Th1 (IL-12), Th2 (IL-4), Th17 (IL-23, IL-1 β) ou Th22 (IL-6, TNF- α). LT = lymphocytes T ; IFN = Interféron ; IL = Interleukine

III. Le cas particulier des molécules chimiques

Certains antigènes de faible poids moléculaire, comme les médicaments ou les molécules chimiques, ne peuvent pas être détectés par les CPA. Par conséquent, ils ne sont pas capables d'induire directement une réponse immunitaire (Pichler *et al.* 2010, Pichler *et al.* 2011). Dans cette partie, nous détaillerons les mécanismes spécifiques des molécules chimiques/médicaments qui peuvent se mettre en place et déclencher une réaction allergique.

3.1 La théorie de l'haptène

Les médicaments ou les molécules chimiques ont un poids moléculaire trop faible (inférieur à 1000 Daltons) qui ne permet pas leur détection par les CPA et empêche, en théorie, toute immunisation en réponse à ces composés (Pichler *et al.* 2011, Pichler et Haussmann 2016). La **théorie de l'haptène** est l'hypothèse la plus classique qui permet d'expliquer le mécanisme par lequel de tels antigènes de faible poids moléculaires, appelés les haptènes, peuvent déclencher une immunisation. Ce mécanisme s'explique par la capacité des haptènes à se conjuguer avec des protéines de plus haut poids moléculaire ce qui leur permet d'être détecté par les CPA et de déclencher une réaction immunitaire (Posadas et Pichler 2007, Pichler 2008). En effet, la formation de ce bioconjugué médicament-protéine crée de nouveaux épitopes pour lesquels aucune tolérance intrinsèque n'existe. Ces nouveaux antigènes déclenchent alors une réponse immunitaire adaptative encore appelée immunisation. La réaction d'hapténisation est favorisée par la haute réactivité des haptènes. Ces électrophiles puissants sont capables de former des liaisons covalentes avec les résidus nucléophiles des protéines, en particulier les lysines, les cystéines et les histidines (Posadas et Pichler 2007, Pichler 2008, Pichler et Haussmann 2016). Le pouvoir allergisant d'une molécule chimique est donc directement corrélée à sa réactivité face aux protéines et à sa capacité de former des bio-conjugués (Martin *et al.* 2010).

3.2 Les différents types d'haptènes

Il existe quatre types d'haptènes qui vont différer par leur capacité plus ou moins directe à se conjuguer aux protéines : les haptènes classiques, les pré-haptènes, les pro-haptènes et les haptènes non classiques.

3.2.1 Les haptènes classiques

Les haptènes classiques sont des molécules réactives qui peuvent se fixer directement aux protéines **sans modification préalable** pour déclencher une réaction immunitaire (Pichler *et al.* 2011). Les BL sont un exemple d'haptène classique car elles présentent une réactivité chimique directe via l'ouverture de leur cycle β -lactame (Ariza *et al.* 2015, Castells *et al.* 2019). Ce dernier subit des attaques nucléophiles, le plus souvent par les résidus lysine des protéines, ce qui induit une réaction d'hapténisation (Jenkins *et al.* 2013, Stone *et al.* 2014, Meng *et al.* 2017). Cette conjugaison protéine-

médicament peut avoir lieu à l'intérieur des cellules (hapténisation intracellulaire) ou à l'extérieur des cellules (hapténisation extracellulaire). Les protéines majoritaires qui s'hapténisent en extracellulaire avec les BL dans la circulation sanguine sont la HSA, les chaînes lourdes d'immunoglobulines et la transferrine (Magi *et al.* 1995, Ariza *et al.* 2012, Ariza *et al.* 2014).

La HSA, au centre de notre étude, est un polypeptide d'environ 66 kDa synthétisé dans le foie. C'est la protéine plasmatique la plus abondante avec une concentration d'environ 40 g par litre de sang (Fasano *et al.* 2005, Ariza *et al.* 2012). Plusieurs études ont ainsi démontré la présence de bioconjugués HSA-BL dans le sang de patients allergiques (Yvon *et al.* 1988, Yvon *et al.* 1989, Yvon *et al.* 1990, Brander *et al.* 1995, Meng *et al.* 2011). Cette hapténisation a été démontrée avec de nombreuses BL dont la BP (Meng *et al.* 2011, Nhim *et al.* 2013, Scornet *et al.* 2016, Azoury *et al.* 2019, Bechara *et al.* 2019), la flucloxacilline (Jenkins *et al.* 2009), l'amoxicilline (Ariza *et al.* 2012), l'ampicilline (Magi *et al.* 1995), la piperacilline (Whitaker *et al.* 2011, Jenkins *et al.* 2013) et l'aztréonam (Jenkins *et al.* 2013). Les liaisons covalentes étaient créées par la formation d'une liaison amide entre un résidu lysine de la HSA et le groupement carboxylique du noyau β -lactame. Plusieurs travaux ont permis d'identifier les sites de liaison de la BP sur la HSA : les lysines 190, 195, 199, 432, 541 et 545 (Yvon *et al.* 1988, Yvon *et al.* 1989, Yvon *et al.* 1990, Scornet *et al.* 2016, Azoury *et al.* 2018). Plusieurs études ont montré que ces sites de fixation variaient en fonction des molécules médicamenteuses. Par exemple, les sites de liaisons préférentiels pour la piperacilline étaient les lysines 190, 195, 432 et 541 (Whitaker *et al.* 2011) alors que pour l'amoxicilline, seules les lysines 190, 199 et 541 étaient conjuguées avec la molécule médicamenteuse (Ariza *et al.* 2012). Concernant la flucloxacilline, les lysines hapténisées étaient les lysines 190 et 212 (Jenkins *et al.* 2009, Taylor *et al.* 2016). Concernant la BP, au centre de notre étude et considérée comme un modèle de référence, les travaux de notre équipe ont permis de mettre en avant la reconnaissance de peptides candidats dérivant du bioconjugué HSA-BP (identifiés par une approche *in silico*) par les LT CD4⁺ naïfs de donneurs sains (Nhim *et al.* 2013, Azoury *et al.* 2018). Ces peptides (PT-BP, KV-BP, et FS-BP) contenaient une molécule de BP hapténisée sur les lysines 159, 525 et 212 (Scornet *et al.* 2016). Plusieurs lignées de LT spécifiques de ces peptides-BP reconnaissaient également le bioconjugué HSA-BP et inversement, appuyant ainsi la théorie de l'haptène. Deux de ces peptides immunodominants (Lys 159 et 525) étaient également reconnus par des PBMC de patients allergiques, confirmant leur rôle dans l'immunisation et la réaction allergique des patients (Azoury *et al.* 2018).

La HSA est la protéine la plus abondante du sérum humain et, par conséquent, est considérée comme la principale cible pour l'hapténisation des BL. Cependant, d'autres protéines sériques représentent de bons candidats pour la réaction de conjugaison. Plusieurs études ont montré que les BL étaient capables de s'hapténiser avec la transferrine, les chaînes légères et les chaînes lourdes d'immunoglobuline et l'haptoglobine (Magi *et al.* 1995, Ariza *et al.* 2014, Martin-Serrano *et al.* 2020).

L'étude d'Ariza *et al.* a également démontré qu'à des concentrations plasmatiques équivalentes entre la HSA et la transferrine, la conjugaison de l'amoxicilline avec la transferrine serait dix fois plus élevée que celle avec la HSA (Ariza *et al.* 2012). Dans ces expériences, de nombreuses protéines abondantes du sérum n'avaient pas formé de bioconjugué avec les BL démontrant ainsi un mécanisme d'hapténisation sélectif et indépendant de l'abondance protéique.

Selon la théorie de l'haptène, les molécules médicamenteuses peuvent se conjuguer aux protéines intracellulaires et extracellulaires. L'hapténisation avec des protéines intracellulaires est beaucoup moins étudiée dans la littérature. L'étude d'Ariza *et al.* était l'une des premières à identifier une hapténisation de l'amoxicilline avec des protéines intracellulaires (le propionyl coenzyme A et la pyruvate carboxylase) dans les macrophages RAW264.7 (Ariza *et al.* 2014). Par la suite, l'étude de Sánchez-Gómez *et al.*, conduite avec l'amoxicilline dans la lignée de LB RPMI 8866, a permis de confirmer le processus d'hapténisation intracellulaire avec l'identification de nouvelles cibles : le facteur d'élongation 2 (Elongation Factor 2, EF-2), la protéine de choc thermique 70 (Heat Shock Protein 70, HSP-70) et l' α -enolase (Sánchez-Gómez *et al.* 2017). Plus récemment, le travail de Waddington *et al.* a permis d'identifier une hapténisation de la flucloxacilline avec différentes protéines intracellulaires dont les protéines 14-3-3 et le facteur d'élongation 1 α dans les cellules C1R-B*57 :01 (Waddington *et al.* 2020). Les peptides générés étaient spécifiquement présentés par les molécules HLA-B*57 :01. Bechara *et al.* ont également démontré un processus d'hapténisation intracellulaire de la BP impliqué dans l'activation de LT CD8+ naïfs spécifiques chez des donneurs sains (Bechara *et al.* 2019). Ces travaux ont permis de montrer que le bioconjugué HSA-BP formé en extracellulaire, responsable de l'activation des LT CD4+ naïfs, n'était pas reconnu par les LT CD8+ naïfs des donneurs. L'utilisation de la molécule libre de BP a permis de mettre en évidence une activation des LT CD8+ naïfs spécifiques de façon dépendante de la concentration du médicament. Cette activation était dépendante des molécules du CMH de classe I et de l'apprêtement du protéasome, confirmant l'emprunt de la voie endogène chez les DCs (Bechara *et al.* 2019). Les résultats précédents ont eu un impact particulièrement important dans ce domaine de recherche car ce sont les premiers à avoir démontré que le processus d'hapténisation extracellulaire ne permettait pas l'activation de l'ensemble des LT naïfs. Dans certains cas, notamment pour l'activation de LT CD8+ cytotoxiques, qui sont en cause dans de nombreuses réactions allergiques, un processus d'hapténisation alternatif (à l'intérieur des cellules) est nécessaire. Ce projet de doctorat s'inscrit à la suite de cette étude et vise à identifier les protéines hapténisées avec la BP libre à l'intérieur des DCs, permettant ainsi l'orientation vers la voie endogène et l'activation des LT CD8+ naïfs.

3.2.2 Les pro-haptènes

Les pro-haptènes ont besoin d'une **réaction enzymatique** pour devenir des métabolites réactifs (Kaplan *et al.* 2012, Esser et Martin 2017, Nepal *et al.* 2019). Ces réactions sont conduites par des enzymes de métabolisation situées au niveau des barrières physiologiques cutanées, intestinales ou pulmonaires. Le plus souvent, la métabolisation est conduite par des enzymes de phase I, essentiellement l'alcool ou l'aldéhyde déshydrogénase et les cytochromes P450 (CYP450) (Kaplan *et al.* 2012).

Dans le cadre de l'allergie médicamenteuse, le foie est le principal lieu de bio-activation pour les médicaments administrés par voie orale, ce qui favorise la synthèse de métabolites réactifs. Le sulfaméthoxazole (SMX) est un exemple typique de pro-haptène. Ce composé nécessite d'être métabolisé en sulfaméthoxazole-hydroxylamine (SMX-NHOH) via le cytochrome CYP2C9 ou la myéloperoxydase. Ce métabolite subit ensuite une oxydation spontanée pour donner le nitroso-sulfaméthoxazole (SMX-NO), un haptène réactif vis-à-vis des protéines environnantes (Naisbitt *et al.* 1999, Naisbitt *et al.* 2002, Manchanda *et al.* 2002, Callan *et al.* 2009, Ogees *et al.* 2015).

Malgré le manque d'informations à ce sujet, plusieurs autres médicaments semblent se comporter comme des pro-haptènes. C'est le cas de la carbamazépine, un anti-convulsivant très prescrit responsable de réactions allergiques graves telles que des hépatites médicamenteuses et des syndromes de Stevens-Johnson (SSJ). Ces réactions sont fortement associées avec les allèles **HLA-B*15 :02** dans la population asiatique (Ferrell et McLeod 2008, Chen *et al.* 2011) ou **HLA-A*31 :01** dans la population européenne (McCormack *et al.* 2011). Concernant le mécanisme, la carbamazépine est d'abord métabolisée (majoritairement par les CYP3A4, CYP2C19, CYP3A5, CYP3A7, CYP1A2 et la myéloperoxydase) pour donner plus de 30 métabolites différents qui sont responsables de son hapténisation avec les protéines (Pearce *et al.* 2005, Pearce *et al.* 2008). Entre autres, les formes hydroxy-carbamazépine, les formes carbamazépine-époxyde et la carbamazépine iminoquinone ont montré leur capacité à se conjuguer aux protéines afin d'induire une réaction allergique (Lu et Uetrecht 2008, Kang *et al.* 2008, Higuchi *et al.* 2012, Faulkner *et al.* 2014).

La névirapine est également un pro-haptène puisque les cycles aromatiques de cette molécule sont métabolisés en époxydes/arènes oxydes réactifs responsables de la conjugaison avec les résidus cystéine et histidine de protéines circulantes telles que la HSA et/ou l'hémoglobine (Caixas *et al.* 2012, Meng *et al.* 2013, Faulkner *et al.* 2014, Yip *et al.* 2017). En effet, le métabolite 12-hydroxy-névirapine, produit par la double action des CYP3A4/2B6 semble être responsable du rash cutané induit par la névirapine chez l'Homme (Sharma *et al.* 2013a, Sharma *et al.* 2013b, Yip *et al.* 2017).

3.2.3 Les pré-haptènes

Les pré-haptènes ont besoin d'une **transformation chimique (non enzymatique)** pour devenir des haptènes réactifs et se conjuguer aux protéines (Lepoittevin 2006). Le plus souvent, il s'agit d'une oxydation par l'oxygène atmosphérique ou d'une photo-activation par les ultra-violets (Esser et Martin 2017). La plupart des pré-haptènes sont des molécules chimiques non médicamenteuses. C'est le cas du d-limonène, un terpène non sensibilisant qui nécessite une oxydation par l'air pour devenir un hydroperoxyde allergisant (Divkovic *et al.* 2005, Karlberg *et al.* 2008). Egalement, la p-phénylènediamine, utilisée dans les colorations capillaires, subit une auto-oxydation au niveau de la peau qui va donner des quinonediimines électrophiles particulièrement réactives (Pot *et al.* 2013). Ces dernières subissent des réactions d'oxydo-conjugaison avant de donner une base de Brandowski (dérivé comportant trois molécules de p-phénylènediamine) qui elle est capable de se conjuguer aux protéines pour induire une réaction allergique (Jenkinson *et al.* 2010, Faulkner *et al.* 2014).

3.2.4 Les haptènes non classiques

Les haptènes non classiques sont le plus souvent des métaux et se caractérisent par le fait que, contrairement aux haptènes classiques, leur hapténisation n'aboutit pas à des liaisons covalentes avec les protéines (Thierse *et al.* 2005, Bechara *et al.* 2021). Ces métaux, tels que le nickel, le cobalt ou encore le chrome forment des complexes géométriques avec des **liaisons de coordination**. Par définition, cela implique que leurs liaisons aux protéines sont réversibles et se recombinent de manière fréquente (Thierse *et al.* 2005). Cette diversité de liaisons explique la difficulté à caractériser les épitopes mis en cause dans les allergies aux métaux.

Le nickel est la cause la plus fréquente d'allergie de contact dans le monde. Ce dernier ne devient sensibilisant que lorsqu'il est transformé en ions Ni^{2+} par la corrosion de l'air ce qui le rend réactif et lui permet de former des complexes de coordination avec les protéines (Artik *et al.* 1999, Franken *et al.* 2015). Parmi ces protéines, la HSA est un candidat idéal car c'est l'une des protéines les plus abondantes de la peau. Il a ainsi été démontré que la présence du complexe HSA-nickel dans les co-cultures *in vitro* déclenchait une réponse lymphocytaire spécifique du nickel pouvant être responsable des réactions allergiques observées chez les patients (Martin *et al.* 2006). Le nickel est également capable de se lier avec d'autres protéines présentant des sites de conjugaison riches en histidine telles que certaines protéines chaperones (e.g. la HSP70) (Jin *et al.* 2003, Heiss *et al.* 2005), des protéines du cytosquelette (la tubuline et l'actine) (Dalledonne *et al.* 1999, Heiss *et al.* 2005) et la protéine Erp44 (endoplasmic reticulum resident protein 44) (Martin *et al.* 2006).

3.3 Les différents mécanismes de reconnaissance des molécules chimiques par les lymphocytes T

Classiquement, l'immunisation contre les molécules chimique se fait en suivant l'hypothèse de l'haptène : le conjugué haptène-protéine est apprêté par les DCs puis présentés aux LT via les molécules du CMH ce qui déclenche une réponse lymphocytaire. Dans certains cas, les molécules chimiques sont assez réactives pour venir se lier directement et de manière non covalente aux molécules du CMH et/ou aux TCR permettant une reconnaissance par les LT sans passer par une étape d'hapténisation. Cette liaison peut se faire à l'intérieur (**pharmacological-interaction concept**) ou à l'extérieur (**altération du répertoire peptidique du soi**) de la poche d'ancrage des molécules du CMH où sont présentés les peptides. Dans cette partie, nous détaillerons ces principaux mécanismes de liaison directe par lesquels les molécules chimiques peuvent être reconnues et induire une réponse lymphocytaire.

3.3.1 Le pharmacological-interaction concept

Le pharmacological-interaction concept (p-i concept) est le mécanisme par lequel une molécule chimique de faible poids moléculaire peut interagir de façon directe et non covalente avec les molécules du CMH (p-i HLA) et /ou les TCR (p-i TCR) (Figure 12) (Schnyder *et al.* 1997, Pichler 2008, Pichler *et al.* 2011, Pichler et Hausmann 2016).

Ce mécanisme a été démontré dans plusieurs études relatant une activation immédiate des lignées de LT spécifiques issues de patients de façon indépendante de l'apprêtement antigénique effectué par les CPA (Schnyder *et al.* 1997, Zanni *et al.* 1998a, Zanni *et al.* 1998b, Schnyder *et al.* 2000, Keller *et al.* 2010). En effet, dans ces études, l'inhibition de l'apprêtement des CPA induite par l'exposition au glutaraldéhyde ne diminuait pas l'activation des lignées de LT reconnaissant le médicament, contrairement aux mécanismes dépendants de l'hapténisation. De plus, cette activation quasiment immédiate n'était pas compatible avec le mécanisme d'apprêtement cellulaire qui nécessite au moins soixante minutes (Pichler 2008).

Les molécules qui ont été identifiées utilisant le p-i concept sont le sulfaméthoxazole (Schnyder *et al.* 1997, Zanni *et al.* 1998b, Schnyder *et al.* 2000), la phénytoïne (Mauri-Hellweg *et al.* 1995), la carbamazépine (Mauri-Hellweg *et al.* 1995), la lidocaïne (Zanni *et al.* 1998a, Zanni *et al.* 1998b) et la ceftriaxone (Zanni *et al.* 1998b). Ces molécules utilisent majoritairement le p-i TCR sauf pour l'allopurinol qui utilise le p-i HLA. Certaines molécules sont capables de se lier à la fois aux molécules

du CMH (p-i HLA) et aux TCR (p-i TCR). C'est le cas de la carbamazépine qui a des interactions préférentielles avec les molécules HLA-B*15 :02 et les TCR V β -11-ISGSY+ des individus, de façon indépendante de l'apprêtement antigénique (Ko *et al.* 2011, Wei *et al.* 2012).

Le métabolisme du médicament peut également jouer un rôle dans le p-i concept. C'est notamment le cas pour l'allopurinol, un traitement hypo-uricémiant très utilisé, responsables de réactions allergiques sévères avec des SSJ, des nécroses épidermiques toxiques (TEN) et des syndromes de DRESS (Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms) (Yun *et al.* 2013, Yun *et al.* 2014, Stamp *et al.* 2015, Stamp et Chapman 2020). Le mécanisme de la réaction allergique de cette molécule est lié à sa métabolisation hépatique qui génère un métabolite réactif : l'oxypurinol. Plusieurs études ont montré que les patients allergiques étaient sensibilisés à l'oxypurinol de façon dépendante de la dose du médicament. Dans ces études, la prédominance des lignées de LT spécifiques de l'oxypurinol chez les patients allergiques pouvait s'expliquer par la conversion rapide de l'allopurinol en oxypurinol *in vivo* (Yun *et al.* 2013). L'étude de Yun *et al.* a permis de comprendre le mécanisme plus en détail en démontrant que l'allopurinol comme l'oxypurinol étaient capables de déclencher une activation directe et immédiate des LT spécifiques avec un mécanisme de p-i concept (Yun *et al.* 2014). Certaines études ont également démontré une prédisposition génétique liée au fait que l'oxypurinol était capable de se lier (p-i HLA) plus facilement avec les molécules HLA-B*58 :01, favorisant ainsi le déclenchement des réactions allergiques (Stamp *et al.* 2015, Stamp et Chapman 2020). En effet, dans ces méta-analyses les patients HLA-B*58 :01 positifs traités par l'allopurinol avaient 80 à 97 fois plus de risque de déclencher une réaction allergique (Somkruea *et al.* 2011). Il est néanmoins important de noter que le p-i concept n'était pas exclusif de cet allèle puisqu'il a également été démontré chez des donneurs HLA-B*58 :01 négatifs (Yun *et al.* 2014).

3.3.2 L'altération du répertoire peptidique du soi

L'altération du répertoire peptidique du soi est un autre mécanisme alternatif conduisant à l'activation des LT face aux molécules chimiques. Ce mécanisme a été évoqué suite à la caractérisation de l'hypersensibilité à l'abacavir et postule qu'une molécule médicamenteuse peut modifier le recrutement des peptides dans la poche des molécules du CMH, permettant à un répertoire inapproprié de peptides du soi d'être présent dans cette poche et de déclencher une réponse lymphocytaire allogénique.

En effet, plusieurs études montrent que l'abacavir est capable de modifier spécifiquement la forme et la chimie des poches de fixation des molécules HLA-B*57 :01 aboutissant à la modification du

répertoire de peptides endogènes présentés (Illing *et al.* 2012, Ostrov *et al.* 2012, Norcross *et al.* 2012). La liaison non covalente de l'abacavir dans la poche F du sillon de présentation des molécules HLA-B*57 :01 favorise la présentation de peptides contenant des résidus aliphatiques de petite taille (valine, alanine ou isoleucine) au lieu de résidus hydrophobes comme le tryptophane ou la phénylalanine qui sont habituellement présentés par ces molécules (Illing *et al.* 2012, Ostrov *et al.* 2012, Norcross *et al.* 2012). Dans ces études, 20 à 45% des peptides élués à partir des CPA HLAB*57 :01+ traitées par l'abacavir étaient différents de ceux élués des CPA HLAB*57 :01+ non traitées. De cette façon, l'abacavir guide la détection de nouveaux peptides endogènes par les LT naïfs en induisant une altération du « soi immunologique ».

L'hypothèse est donc que certaines molécules médicamenteuses sont capables se lier aux molécules du CMH et en modifier le type de peptides recrutés (Figure 12). Dans le cas de l'altération du répertoire peptidique du soi, la liaison du médicament a lieu à l'extérieur de la poche de présentation des molécules CMH, ce qui différencie ce processus du p-i concept où le médicament vient se lier à l'intérieur des poches de présentation des molécules du CMH et/ou en contact avec le TCR (Figure 12) (Ostrov *et al.* 2012).

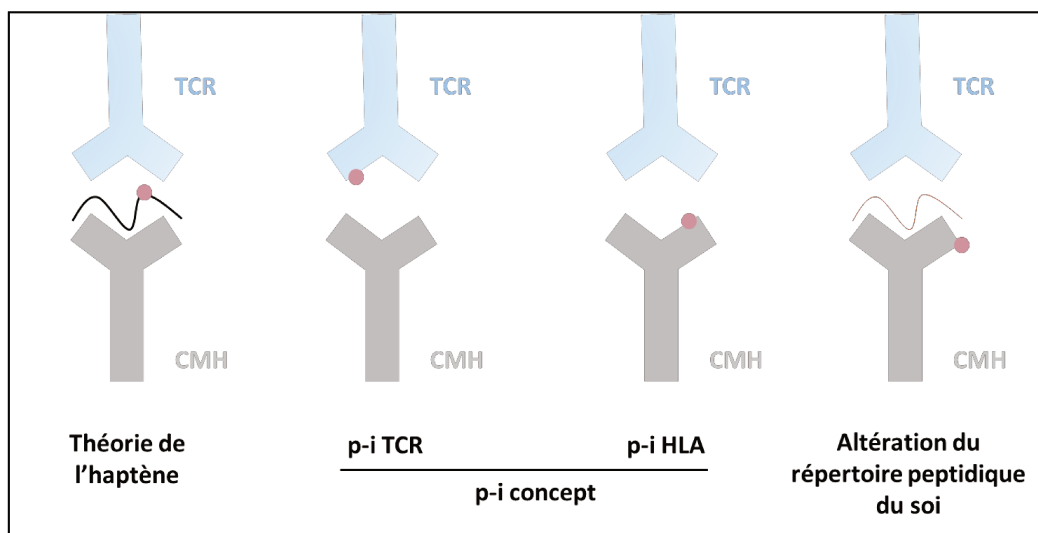


Figure 12. Mécanismes de reconnaissance des molécules chimiques par les lymphocytes T
(adaptée de Yun *et al.* 2016)

P-i = Pharmacological interaction concept ; TCR = T-Cell Receptor ; CMH = Complexe Majeur d'Histocompatibilité

3.3.3 L'origine du répertoire T naïf reconnaissant les molécules chimiques

Les mécanismes par lesquels les LT naïfs reconnaissent les molécules médicamenteuses sont encore mal compris. Ces composés étant de nature artificielle, la question actuelle est de savoir si la sélection de LT naïfs spécifiques est un phénomène commun, s'il est limité aux patients allergiques ou s'il n'existe pas (Bechara *et al.* 2021). Il existe 10^{20} à 10^{61} recombinaisons du répertoire TCR possible qui se répartissent aléatoirement via des processus de sélection stricts au sein des 10^{12} LT qui constituent chaque individu (Arstila *et al.* 1999, Zarnitsyna *et al.* 2013, de Greef *et al.* 2020). Au vue d'une telle diversité, il est statistiquement probable que certaines recombinaisons donnent un TCR accidentellement réactif vis-à-vis de certains complexes peptide-médicament.

Une autre hypothèse qui a été formulée est que l'hapténisation du médicament sur la protéine d'intérêt pourrait orienter vers un apprêtement différent au sein des DCs. Les peptides générés seraient ainsi des peptides « rares » dont les LT spécifiques n'auraient pas pu être éliminés lors de la sélection thymique. Ces LT réagiraient ainsi contre ces peptides « rares » hapténisés avec le médicament ce qui déclencherait une réponse immunitaire (Bechara *et al.* 2021). Cette hypothèse a notamment été démontrée avec les LT CD8+ spécifiques du trinitrophényle dans un modèle murin. Les molécules du CMH I concernées présentaient habituellement des peptides de 8 acides aminés avec une tyrosine ou une phénylalanine en position 5 et des acides aminés aliphatiques hydrophobes en position 8. Dans ce modèle, l'administration de tels peptides n'induisait aucune réaction lymphocytaire. Néanmoins, l'ajout de trinitrophényle en position 4 de la séquence peptidique conduisait à l'activation des LT CD8+, prouvant ainsi l'impact de la molécule médicamenteuse sur un peptide habituellement non immunogène (Martin *et al.* 1992). Le cas de l'abacavir peut également illustrer cette hypothèse puisqu'il qui modifie l'apprêtement des protéines du soi à l'intérieur des DCs et crée de nouveaux déterminants antigéniques rares qui seront davantage reconnus par les LT naïfs spécifiques qui n'ont pas pu être éliminés dans le thymus.

La réactivité chimique de l'haptène est responsable du nombre de protéines qui peuvent se conjuguer au médicament. Une réactivité chimique élevée augmente le nombre d'épitopes produits et, par conséquent, augmente le nombre de LT naïfs recrutés qui portent chacun un TCR différent (Esser *et al.* 2014). Il a ainsi été montré que les sensibilisants de contact forts induisaient une activation lymphocytaire polyclonale (Martin *et al.* 2003). De façon similaire, les BL sont capables de se lier aux lysines de différentes protéines (que nous avons détaillé précédemment) ce qui génère de nombreux peptides différents pouvant chacun être reconnu par les LT naïfs. De plus, la liaison d'une BL à une lysine peut générer plus d'un peptide immunogène ce qui multiplie et augmente davantage le répertoire de LT naïfs impliqué dans la reconnaissance et l'immunisation aux BL (Meng *et al.* 2018).

Dans le cas des BL, plusieurs études ont montré qu'un tel répertoire de LT naïfs spécifiques du médicament est également présent chez les donneurs sains non allergiques (Nhim *et al.* 2013, Azoury *et al.* 2018). Ces derniers résultats suggèrent donc que la majorité de la population possède le matériel immunologique nécessaire et que la seule présence du répertoire spécifique du médicament ne suffit pas pour aboutir à une réaction allergique. Certains co-facteurs que nous aborderons dans le Chapitre 3 (*i.e.* environnementaux, génétiques, pathologiques) pourraient faire basculer un terrain tolérogène vers un terrain allergique.

Chapitre 2 : Physiopathologie des hypersensibilités médicamenteuses : cas particulier des β -lactamines

I. Définition et classification des hypersensibilités

1.1 Définitions

Les allergies médicamenteuses ou hypersensibilités font parties des effets indésirables des médicaments qui sont définis par l'OMS (Rapport de l'OMS n°498, 1972) comme « une réponse nocive et non voulue se produisant aux posologies normalement utilisées chez l'Homme pour la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement d'une pathologie ». Ainsi, ces effets indésirables se distinguent des symptômes liés au surdosage accidentel ou délibéré.

Les effets indésirables des médicaments, également appelés Adverse Drug Reaction (ADR), sont divisés en différentes classes selon que leur apparition soit prévisible (**type A**) ou non (**type B**) (Aronson et Ferner 2003, Edwards et Aronson 2000). Les ADR de type A représentent 85% des ADR et sont dépendantes du mécanisme pharmacologique du médicament. Un exemple d'ADR de type A sont les somnolences entraînées par certains antihistaminiques (Farnam *et al.* 2012, Pichler et Hausmann 2016). Les allergies médicamenteuses font partie des ADR de type B qui regroupent les réactions imprévisibles dites idiosyncratiques (Pichler 2003, Demoly *et al.* 2007). Ces réactions représentent un problème de santé publique majeur car elles sont totalement indépendantes de la pharmacologie du médicament. De ce fait, elles sont rarement détectées au cours des phases non cliniques et cliniques et peuvent engendrer des arrêts tardifs du développement du médicament, des retraits d'autorisation de mise sur le marché et des surcoûts liés à la prise en charge des patients affectés. Ces ADR de type B dépendent à la fois du terrain génétique du patient mais aussi des facteurs environnementaux que nous détaillerons dans le chapitre suivant.

1.2 La classification des hypersensibilités

Les hypersensibilités peuvent être divisées en deux classes : les hypersensibilités non allergiques et allergiques (Demoly et al. 2007, Farnam et al. 2012, Pichler et Hausmann 2016).

1.2.1 Les hypersensibilités non-allergiques

Les hypersensibilités non-allergiques impliquent une activation directe de récepteurs ou d'enzymes situées dans les cellules du système immunitaire inné (*e.g.* basophiles, mastocytes, monocytes, éosinophiles) de façon indépendante des acteurs du système immunitaire adaptatif (*i.e.* IgE, IgG ou LT spécifiques du médicament) (Farnam *et al.* 2012, Pichler et Hausmann 2016). L'apparition des symptômes se fait dans la majorité des cas dès le premier contact avec la molécule médicamenteuse.

Ces réactions sont assez fréquentes et ont notamment été décrites avec les fluoroquinolones (Subramanian *et al.* 2016), les agents neuromusculaires bloquants (Spoerl *et al.* 2017), les chimiothérapies (*e.g.* taxanes, L-asparaginase) (Farnam *et al.* 2012), la vancomycine (Hoelen *et al.* 2007), les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (Ponvert et Scheinmann 2007) et les produits de contraste iodés (Hamamura-Yasuno *et al.* 2020).

Les mécanismes d'action de ces hypersensibilités non-allergiques sont divers et varient en fonction des molécules médicamenteuses étudiées. L'un des mécanismes décrits, notamment avec les fluoroquinolones et les agents neuromusculaires bloquants, est la liaison directe de ces molécules au récepteur MRGPRX2 (MAS-related G protein-coupled receptor X2) à la surface des mastocytes ce qui déclenche leur dégranulation (Subramanian *et al.* 2016, Spoerl *et al.* 2017). Cette dégranulation libère des médiateurs tels que la tryptase et l'histamine qui sont responsables des réactions anaphylactoïdes observées (Varricchi *et al.* 2019). Il a également été décrit, notamment avec les produits de contraste iodés, des mécanismes non-allergiques induits par une activation directe du système du complément (Szebeni 2004). Cette activation aboutit à la libération d'anaphylatoxines (C3a et C5a) qui, après la liaison à leurs récepteurs respectifs (C3aR et C5aR) à la surface des mastocytes et des basophiles, déclenchent également leur dégranulation. Un autre mécanisme alternatif a également été observé avec les AINS. Ces médicaments agissent par inhibition des cyclooxygénases et de la synthèse de prostaglandines ce qui entraîne la synthèse de leucotriènes responsables d'angio-oedèmes et de bronchoconstriction non-allergiques (Kowalski *et al.* 2013, Pichler et Hausmann 2016).

1.2.2 Les hypersensibilités allergiques

Les hypersensibilités allergiques sont dépendantes de mécanismes immunologiques spécifiques du médicament médiés par les IgE, les IgG ou les LT (Farnam *et al.* 2012) (Figure 15). Ces mécanismes ont été classés selon la classification de Gell et Coombs qui a été modifiée par Pichler en 2010 (Pichler *et al.* 2010, Dispenza 2019). Les hypersensibilités dépendantes de la sécrétion d'anticorps sont les hypersensibilités de **type I, II et III** alors que les hypersensibilités indépendantes de la sécrétion d'anticorps sont les hypersensibilités de **type IV**.

Les hypersensibilités dépendantes de la sécrétion des anticorps

Le mécanisme des hypersensibilités de **type I** se déroule en deux phases. La première phase est une phase de sensibilisation, où la molécule médicamenteuse est détectée et présentée par les CPA aux LT CD4+ auxiliaires. Ces derniers permettent l'activation des LB et la production d'anticorps spécifiques (IgE) qui se lient aux mastocytes et aux basophiles (Figure 15) (Kaplan *et al.* 2012, Stone *et al.* 2014). La deuxième phase est une réaction d'éllicitation : l'antigène vient effectuer un pontage entre deux immunoglobulines spécifiques à la surface des mastocytes/basophiles ce qui provoque leur dégranulation (Mertes et Laxenaire 2004, Greenberger et Ditto 2012, Spoerl *et al.* 2017). Les granules libérés contiennent des médiateurs tels que l'histamine, la tryptase, la prostaglandine D2 et la bradykinine qui induisent une vasodilatation ainsi qu'une augmentation de la perméabilité capillaire ce qui va conduire à des œdèmes (Figure 13) (Serafin et Austen 1987). Les granules contiennent également des leucotriènes (C4, D4 et E4) dont l'action spasmogène conduit à une bronchoconstriction, une augmentation de la production de mucus et un angio-œdème (Serafin et Austen 1987). Certaines études conduites avec les agents neuromusculaires bloquants ont également démontré que ces signes cliniques pouvaient être déclenchés par le pontage d'IgG à la surface des monocytes, des macrophages ou des neutrophiles induisant la sécrétion spécifique du platelet-activated factor (PAF) et la présence de Neutrophil Extracellular Trap (NET) (Jönsson *et al.* 2019).

Les signes cliniques observés lors de ces réactions dépendantes de la sécrétion des anticorps (IgE et IgG) sont divers allant de l'urticaire jusqu'à la manifestation clinique la plus grave : le choc anaphylactique (Brown *et al.* 2004, Zambonino *et al.* 2013, Azevedo *et al.* 2018). Pour en faciliter le diagnostic, ces symptômes ont été classés par grade selon leur gravité (Brown *et al.* 2004) :

- **Grade 1 - léger** : apparition de troubles cutanés et sub-cutanés (érythèmes et urticaires généralisés) éventuellement accompagnés de rhinites, d'œdèmes péri-orbitéaires et d'angio-

œdèmes. C'est le grade le plus souvent retrouvé lors des réactions d'anaphylaxie aux BL (Zambonino *et al.* 2013, Azevedo *et al.* 2018).

- **Grade 2 – modéré** : les troubles cutanés observés dans le grade 1 sont suivi d'une atteinte multi-viscérale au niveau respiratoire (dyspnée, stridor et respiration sifflante), cardiovasculaire (vertiges, diaphorèse et sensations d'angine de poitrine) et/ou intestinal (vomissements et douleurs abdominales).
- **Grade 3 – Sévère** : les symptômes décrits précédemment sont suivis d'une atteinte neurologique marquée par des signes de confusion et/ou une perte de conscience. Il y a ensuite une apparition d'hypotension et de cyanose pouvant aller jusqu'au collapsus et le décès du patient.

Ces réactions allergiques sont les plus dangereuses et peuvent engager le pronostic vital du patient (Demoly et Romano 2005). Elles doivent être traitées rapidement avec de l'adrénaline, des antihistaminiques ou des corticostéroïdes selon la gravité des symptômes observés (Azevedo *et al.* 2018).

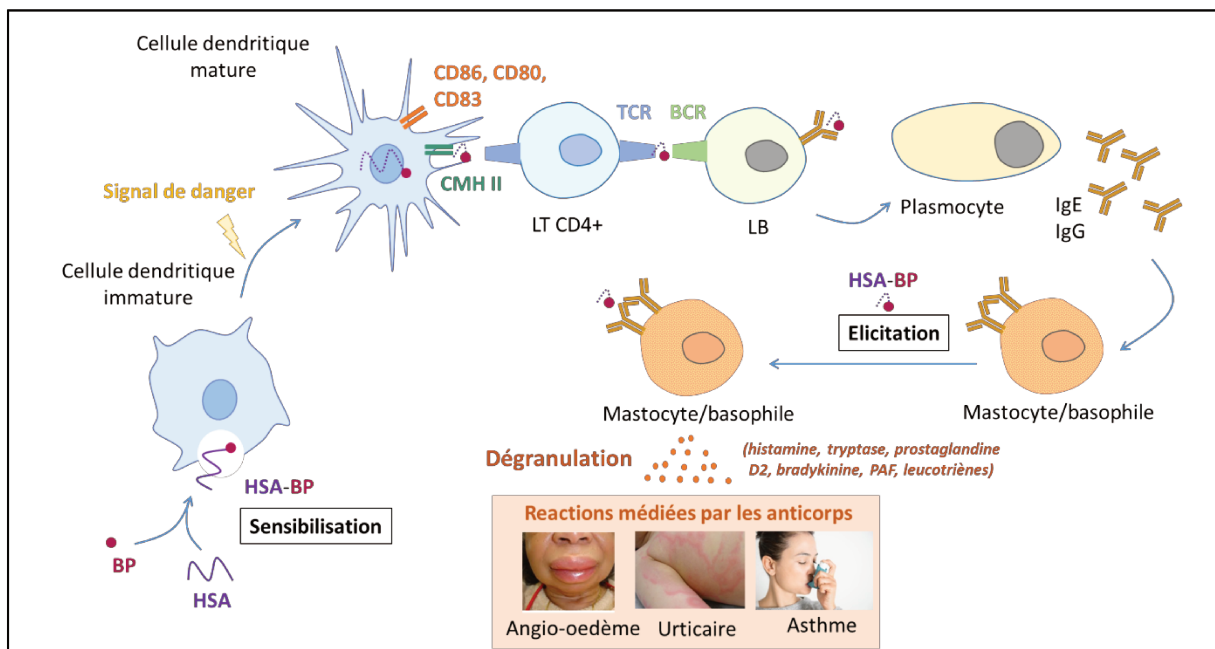


Figure 13. Mécanisme des hypersensibilités médicamenteuses dépendantes de la sécrétion des anticorps

La phase de sensibilisation consiste à la détection du médicament par les DCs et l'activation des LT puis des LB qui vont sécréter des anticorps spécifiques (IgE et IgG) responsables de la dégranulation des mastocytes et basophiles lors de la phase d'élicitation. Les médiateurs présents dans les granules déclenchent une bronchoconstriction et des angio-œdèmes. HSA = human serum albumin, BP = benzylpénicilline, LT = lymphocytes T, LB = lymphocytes B, TCR = T cell receptor, BCR = B cell receptor.

Les hypersensibilités de **type II** sont dites cytotoxiques ou cytolytiques. Lors de ces réactions, l'antigène est exprimé à la surface de certaines cellules (e.g. les globules rouges) et est reconnu par des anticorps (IgG) circulants. La reconnaissance de l'antigène par les anticorps déclenche une activation du système du complément aboutissant à la lyse cellulaire. Les maladies relevant de ce mécanisme sont essentiellement des anémies hémolytiques (pénicilline, céphalosporine) et des thrombocytopénies (sulfaméthoxazole, quinine) (Pichler *et al.* 2010, Dispenza 2019).

Les hypersensibilités de **type III** sont induites par la formation de complexe IgG ou IgM-médicament circulants qui s'accumulent dans le système circulatoire et déclenchent l'activation du système du complément (Eggleton 2005). Cette activation induit le recrutement de polynucléaires induisant des liaisons tissulaires de type vascularites (rituximab, infliximab).

Les hypersensibilités indépendantes de la sécrétion des anticorps

Dans ce travail de thèse nous nous intéresserons particulièrement aux réactions indépendantes de la sécrétion des anticorps qui sont regroupées sous le terme d'hypersensibilités de type IV. Ces réactions sont médiées par les LT et sont divisées en quatre sous-types selon la nature des LT impliqués : les LT CD4⁺ Th1 (**type IV a**), les LT CD4⁺ Th2 (**type IV b**), les LT CD8⁺ (**type IV c**) ou une réponse mixte CD4⁺ et CD8⁺ (**type IV d**) (Pichler *et al.* 2010, Dispenza 2019).

Les hypersensibilités de type IV a

Dans les hypersensibilités de type IV a, la réponse est médiée par les LT CD4⁺ de type Th1 qui, activés par la molécule médicamenteuse, vont sécréter de l'IFN- γ pour recruter les macrophages afin de déclencher une réponse pro-inflammatoire (Figure 15) (Pichler *et al.* 2003, Pichler *et al.* 2010). Les LT Th1 sont également connus pour favoriser l'activation des LT CD8⁺ dans certaines réactions comme **l'allergie de contact** ou **dermatite allergique** (Pichler *et al.* 2003, Pichler *et al.* 2010). La dermatite allergique s'établit en deux phases : la phase de sensibilisation est la phase où l'antigène est détecté par les DCs et les LC qui migrent vers les ganglions lymphatiques et activent les LT naïfs (Watanabe *et al.* 2002, Vocanson *et al.* 2005). Ces LT sensibilisés vont ensuite migrer et se loger dans le derme jusqu'au second contact (ou phase d'élicitation) où ils sont directement activés et déclenchent la sécrétion de cytokines et de médiateurs pro-inflammatoires (e.g. IFN- γ , TNF- α , granzyme B, perforine) responsables des effets toxiques sur les kératinocytes (Watanabe *et al.* 2002, Peng et Novak 2015). Les signes cliniques apparaissent 1 à 3 jours après le second contact avec l'antigène et se manifestent par

un prurit intense, de l'érythème et des desquamations cutanées (Burkemper 2015). La sécheresse cutanée induit l'apparition de crevasses et de fissures majoritairement au niveau des mains et du visage. Ces lésions peuvent s'étendre au-delà de la zone de contact avec l'antigène (Streit et Braathen 2001).

Les hypersensibilités de type IV b

Les hypersensibilités de type IV b sont médiées par des LT CD4+ de type Th2 qui sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 en grande quantité provoquant ainsi la maturation des LB et l'activation des mastocytes et des polynucléaires éosinophiles (Figure 15) (Pichler *et al.* 2003, Pichler *et al.* 2010). La forme clinique la plus classique est le syndrome **drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS)** qui se manifeste environ 7 à 14 jours après la prise du traitement (second contact) sous la forme d'éruptions érythémateuses maculaires ou papuleuses qui commencent souvent sur le tronc et s'étendent ensuite de façon symétrique jusqu'aux extrémités (Yawalkar 2005, Roujeau 2005). Ces symptômes sont ensuite accompagnés d'atteintes plus sévères telles qu'une fièvre élevée, des œdèmes du visage, une érythrodermie et un prurit sévère (Bocquet *et al.* 1996, Pinto Gouveia *et al.* 2016). Les signes cliniques du DRESS sont sévères avec des adénopathies diffuses et des atteintes viscérales, par conséquent, l'évolution n'est pas toujours favorable avec une mortalité d'environ 10% (Roujeau 2005).

Les hypersensibilités de type IV c

Les hypersensibilités de type IV c sont médiées par les LT CD8+ cytotoxiques qui s'immunisent et réagissent contre le médicament en deux étapes. Lors du premier contact, le médicament (ou métabolite réactif) se conjugue aux protéines environnantes pour former des bioconjugués médicament-protéines. Ces bioconjugués sont apprêtés et présentés par les DCs aux LT CD8+ qui s'immunisent contre le médicament. Lors du second contact, les cellules qui expriment les conjugués protéines-médicament à leur surface (telles que les kératinocytes ou les hépatocytes) sont détectées par ces LT CD8+ qui déclenchent leur mort cellulaire (Figure 15). En effet, l'activation du TCR par le complexe CMH I-peptide déclenche la libération de granules cytotoxiques contenant de la perforine, de la granulysine et des granzymes (Voskoboinik *et al.* 2015). La perforine et la granulysine sont des protéines capables de former des pores nanométriques dans les membranes plasmiques cellulaires. La formation de pores par la perforine et la granulysine permet l'entrée des granzymes (majoritairement

A et B chez l'Homme) qui activent les caspases et déclenchent l'apoptose cellulaire (Voskoboinik *et al.* 2015). Un autre mécanisme cytotoxique utilisé par les LT CD8+ est lié à la surexpression du récepteur Fas par les kératinocytes activés (Viard *et al.* 1998, Murata *et al.* 2008). La liaison de ce récepteur Fas avec les molécules Fas-ligand (FasL) exprimées par les LT CD8+ conduit au recrutement de Fas associating protein with death domain (FADD) dont le domaine de mort permet l'activation des caspases 8 et 3 déclenchant une apoptose cellulaire responsable des dommages tissulaires (Nagata 1997). Ainsi, les principaux signes cliniques qui en découlent sont liés à la lyse cellulaire engendrée sur les kératinocytes [dans le **SSJ** et la **TEN**] ou sur les hépatocytes [dans les **hépatites médicamenteuse immunologique (drug induced liver injury, DILI)**].

Concernant les **SSJ/TEN**, le décollement et la nécrose cutanée surviennent en moyenne 7 à 21 jours après la prise du médicament (second contact). Ces deux toxidermies bulleuses sont les formes les plus sévères des réactions cutanées et se distinguent par l'étendue des décollements cutanés qui peuvent comprendre entre 10% (SSJ) et plus de 30% (TEN) de la surface corporelle totale. Un élément diagnostique pour la TEN est le signe de Nikolsky positif caractérisé par un décollement de la peau sous forme d'ampoule après une forte pression avec les doigts sur de la peau visuellement saine (Roujeau 2005). Les signes associés sont une forte fièvre, des atteintes des muqueuses, une hépatite (dans 10% des cas) et des signes intestinaux et pulmonaires (dont les épithéliums se décollent de façon similaire à la peau) (Roujeau 2005). L'origine médicamenteuse est identifiée dans plus de 70% des cas de SSJ/TEN (Roujeau 2005). L'évolution est souvent défavorable puisque le décès du patient a lieu dans 10% (SSJ) à 50% (TEN) des cas et les séquelles (cutanées et oculaires) ont été constatées chez 50 à 90% des patients (Roujeau 2005).

Concernant le mécanisme des **DILI immunologiques** : lors de son passage dans le foie, le médicament (ou son métabolite) peut agir comme un haptène et se conjuguer avec des protéines environnantes telles que la HSA ou les CYP450 responsables de sa métabolisation (Robin *et al.* 1997, Pacitto *et al.* 2007, Kim et Naisbitt 2016, Waddington *et al.* 2020). La formation du conjugué médicament-protéine est détecté comme un néo-antigène qui est apprêté et présenté par les DCs aux LT CD8+ qui s'immunisent contre le médicament (Holt et Ju 2006). Lors d'un deuxième contact avec le médicament, les hépatocytes qui expriment les peptides-médicaments à leur surface (via les molécules du CMH I) sont dégradés par les LT CD8+ activés ce qui déclenche une lyse hépatocellulaire conduisant aux DILI. Ces réactions peuvent également être potentialisées par la réactivité intrinsèque de la molécule (ou de son métabolite) déclenchant la production de signaux de danger (*e.g.* ERO, nécrose cellulaire, cytokines pro-inflammatoires) et l'activation des DCs hépatiques (Figure 14) (Uetrecht 1999, Kaplowitz 2004, Weaver *et al.* 2020). Les anomalies hépatiques observées dans les DILI peuvent être de deux types : les hépatites cytolytiques ou les hépatites cholestatiques (Yuan et

Kaplowitz 2013). Les hépatites cytolytiques sont dues à la nécrose hépatocellulaire qui déclenche une fatigue intense et une augmentation des transaminases. Dans le cas des hépatites cholestatiques (caractéristiques des DILI à la flucloxacilline), les lésions sont induites au niveau des cholangiocytes (ou le pôle biliaire des hépatocytes) ce qui induit la diminution voire l'arrêt du flux biliaire et, par conséquent, la cholestase. Le tableau clinique se traduit par une augmentation de la bilirubine conjuguée accompagnée par un ictère et un prurit (Pateron *et al.* 2009).

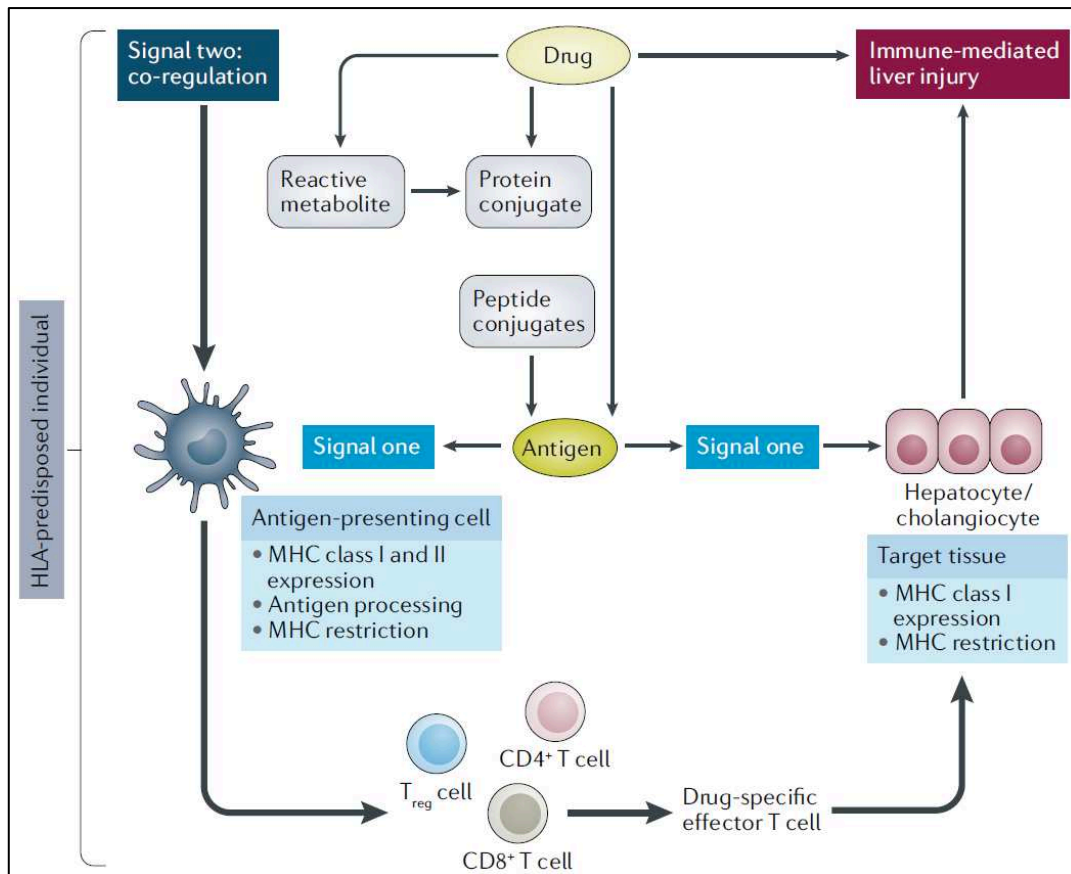


Figure 14. Mécanismes des hépatites médicamenteuses immunologiques (extraite de Weaver *et al.* 2020)

Le mécanisme des hépatites médicamenteuses immunologiques est lié à la réactivité du médicament (ou de son métabolite) qui est capable de s'hapténiser au niveau du foie pour former un néo-antigène qui sera présenté aux LT CD8+ par les DCs engendrant la mort cellulaire des hépatocytes.

Les hypersensibilités de type IV d

Les hypersensibilités de type IV d sont médiées par les LT CD4+ et CD8+ qui, activés par la molécule médicamenteuse, sécrèteraient de l'IL-8 et du GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) en grande quantité induisant le recrutement de polynucléaires neutrophiles dont l'infiltration crée les éruptions caractéristiques de la **pustulose exanthémateuse aiguë généralisée (PEAG)** (Figure 15) (Britschgi *et al.* 2001, Schmid *et al.* 2002, Pichler 2003, Roujeau 2005). La clinique est caractérisée par un érythème œdémateux qui débute brutalement moins de 2 jours après l'administration du médicament (second contact). Ces éruptions cutanées s'accompagnent de fièvre élevée, d'œdèmes de la face et des mains et d'ampoules localisées majoritairement sur le tronc (Roujeau 2005, Bommarito *et al.* 2013). L'élément diagnostique de la PEAG est l'hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles à l'origine des pustules dans la partie superficielle de l'épiderme (Mysore et Ghuloom 2003, Roujeau 2005). Le seul traitement curatif est l'arrêt de la molécule en cause. Après une desquamation cutanée, la résolution est favorable et se fait en moins de quinze jours (Beylot *et al.* 1996).

Classification Type	Immunologic Mechanisms	Clinical Examples
I	Mast cell-mediated reactions IgE-dependent (anaphylactic)	Anaphylaxis, angioedema, urticaria, asthma, allergic rhinitis
	IgE-independent (nonimmunologic or anaphylactoid)	Reactions to iodinated contrast reagents and some biologics
IIa	Antibody-mediated cytotoxic reactions (IgG/IgM antibodies); complement often involved	Immune cytopenias
IIb	Antibody-mediated cell-stimulating reactions	Graves disease, chronic idiopathic (spontaneous) urticaria
III	Immune complex-mediated complement activation	Serum sickness, drug-induced lupus, vasculitis
IVa	Th1 cell-mediated macrophage activation	Type 1 diabetes, contact dermatitis (with type IVc), tuberculin test reactions
IVb	Th2 cell-mediated eosinophilic inflammation	Maculopapular exanthems, DRESS syndrome, persistent asthma, allergic rhinitis
IVc	Cytotoxic T cell-mediated reactions	SJS and/or TEN, bullous exanthems
IVd	T cell-mediated neutrophilic inflammation	AGEP, Behçet's disease

IgE = Immunoglobulin E; Th = T-helper cell; DRESS = Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms; SJS = Stevens-Johnson syndrome; TEN = toxic epidermal necrolysis; AGEP = acute generalized exanthematous pustulosis.

Figure 15. Classification des hypersensibilités médicamenteuses (adaptée de Dispenza 2019)

Les hypersensibilités de type I sont des réactions médiées par les récepteurs aux IgE qui, après pontage par l'antigène, déclenchent la dégranulation des mastocytes et des basophiles. Les réactions de type II sont médiées par les IgG et provoquent la cytolyse des cellules exprimant l'antigène en raison de l'activation du complément. Les réactions de type III sont médiées par les complexes immuns IgG-médicament circulants qui déclenchent le recrutement des neutrophiles et une inflammation vasculaire locale. Les réactions de type IV sont médiées par les LT Th1 (IVa), Th2 (IVb), les LT CD8+ (IVc) ou mixte (IVd).

II. L'allergie aux β -lactamines

Les BL sont la classe d'antibiotiques la plus prescrite. En Europe et aux Etats-Unis, elles représentent plus de 60% des prescriptions d'antibiotiques (Bush et Bradford 2016). Ce sont également les médicaments les plus fréquemment mis en cause dans les hypersensibilités médicamenteuses. En effet, elles représentent 75% des allergies qui surviennent à l'hôpital et 8% de la population américaine a un historique d'allergie à la pénicilline (Gomes et Demoly 2005, Macy 2014).

2.1 Mécanisme d'action et structure des β -lactamines

2.1.1 Mécanisme d'action des β -lactamines

La paroi bactérienne est un composant bactérien vital qui permet aux bactéries (gram négatif et positif) de garder leur structure rigide et de résister à la pression osmotique. Les protéines de liaison à la pénicilline (PLP) sont des transpeptidases impliquées dans la synthèse du peptidoglycane, l'un des composants majeurs de la paroi bactérienne (Sauvage *et al.* 2008). En 1965, Tipper et Strominger ont démontré pour la première fois une similarité structurelle entre la BP et le substrat naturel des PLP. Grâce à cette similarité, les BL peuvent se fixer sur les PLP par ouverture du cycle β -lactame et **inhiber la synthèse du peptidoglycane** aboutissant à une paroi bactérienne non fonctionnelle et la mort cellulaire (Tipper et Strominger 1965, Bush et Bradford 2016).

2.1.2 Mécanismes de résistance aux β -lactamines

Certaines souches bactériennes sont capables de développer des mécanismes de résistance qui diminuent leur sensibilité aux antibiotiques. Il existe trois mécanismes principaux de résistance aux BL : l'hydrolyse du cycle β -lactame, la modification de la cible (les PLP) et la modification de la perméabilité membranaire à l'antibiotique (Poole 2004, Drawz et Bonomo 2010). Le principal mécanisme de résistance est l'inactivation de l'antibiotique par hydrolyse de la liaison amide du noyau β -lactame, empêchant ainsi le maintien de la fonction antibactérienne (Drawz et Bonomo 2010). Cette action est conduite par une famille d'enzymes appelées les β -lactamases. Grâce à leur structure semblable aux PLP, elles se lient de façon covalente aux BL et les inactivent (Neu 1986, Bush et Bradford 2016).

Pour lutter contre les β -lactamases, l'industrie pharmaceutique a développé un inhibiteur de β -lactamases, l'**acide clavulanique**, qui est dépourvu d'activité antibactérienne mais possède un cycle β -lactame qui joue le rôle d'inhibiteur suicide. Cet inhibiteur a une bonne activité inhibitrice sur les β -lactamases en particulier sur les pénicillinases produite par le *Staphylococcus aureus* (Neu 1986).

2.1.3 Structure des différentes β -lactamines

Les BL sont classées selon leur structure chimique : **les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames**. Tous ces antibiotiques ont une structure commune qui leur confère leur activité antimicrobienne : le noyau β -lactame, une fonction amide incluse dans un cycle carbone tétragonal (Bush et Bradford 2016). La différence vient de la nature du cycle associé au noyau β -lactame, à l'exception des monobactames où le noyau est isolé. Les pénicillines ont un cycle thiazolidine, les céphalosporines ont un cycle dihydrothiazine et les carbapénèmes ont un cycle thiazolidine avec un carbone à la place du soufre (Figure 16) (Bryskier 2006). Leurs structures diffèrent également par les chaînes latérales qui permettent de distinguer les molécules à l'intérieur d'une même classe. Les pénicillines, au centre de notre étude, sont divisées en plusieurs groupes selon leurs chaînes latérales : la pénicilline G ou BP, la pénicilline V ou phénoxyméthylpénicilline, les pénicillines A ou les aminopénicillines, les pénicillines M ou isoxazolyl-pénicilline, les uréido-pénicillines, les carboxypénicillines et les amidino-pénicillines.

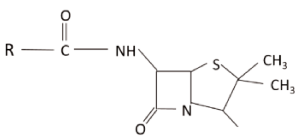
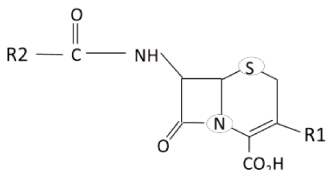
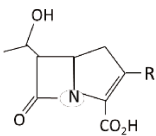
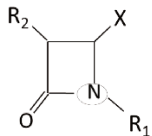
Pénicillines	Céphalosporines
	
Carbapénèmes	Monobactames
	

Figure 16. Structure des différentes β -lactamines

La différence entre les différentes BL vient de la nature du cycle associé au noyau β -lactame, à l'exception des monobactames où le noyau est isolé. Les pénicillines ont un cycle thiazolidine, les céphalosporines ont un cycle dihydrothiazine et les carbapénèmes ont un cycle thiazolidine avec un carbone à la place du soufre.

2.2 Epidémiologie de l'allergie aux β -lactamines

La prévalence et l'incidence sont des paramètres de santé publique indispensables pour analyser l'état de progression des maladies au sein des populations. Ils représentent respectivement le pourcentage de cas existants et le pourcentage de nouveaux cas sur une période donnée. Plusieurs challenges viennent compliquer le calcul précis de l'incidence et la prévalence réelle de l'allergie aux BL. D'une part, la sensibilité des tests diagnostiques actuels n'est pas assez élevée pour connaître le nombre réel de patients allergiques. En effet, la sensibilité des tests de référence (*i.e.* patch test, prick test et test intradermiques) varie entre 2.6% dans le diagnostic des hypersensibilités indépendantes des anticorps jusqu'à 70% dans le diagnostic des cas d'hypersensibilités médiées par les anticorps (Torres *et al.* 2001, Torres *et al.* 2009, Castells *et al.* 2019). D'autre part, les études épidémiologiques mises en place relatent rarement l'ensemble des réactions allergiques et/ou l'ensemble des molécules incriminées (Thong et Tan 2010).

Les pénicillines sont les antibiotiques les plus prescrits avec l'**amoxicilline** en tête de liste (Macy 2014). Aux Etats-Unis, 8% de la population a un historique d'allergie à la pénicilline (Macy 2014). En Europe, l'amoxicilline (+/- acide clavulanique) représente 50% du total des allergies médicamenteuses. Les pénicillines sont ainsi la cause la plus fréquente d'allergie médicamenteuse avec une prévalence comprise entre 6 et 25% selon les pays (Mirakian *et al.* 2015, Torres *et al.* 2019, Castells *et al.* 2019). L'incidence de l'allergie aux pénicillines aux Etats-Unis en 2007 était estimée à 1,5% pour les femmes et 1,1% pour les hommes sur une étude de 411 534 patients (Macy et Poon K-Y 2009). L'amoxicilline est la BL la plus souvent mise en cause dans les allergies aux BL. Elle est suivie de l'ampicilline et en moindre quantité d'autres pénicillines et des céphalosporines (1%) (Fernandez *et al.* 2017). Les signes cliniques les plus fréquents sont les **réactions cutanées**, telles que l'urticaire ou l'exanthème maculopapuleux, qui représentent 75% des réactions aux BL (Gomes et Demoly 2005, Chaabane *et al.* 2009, Castells *et al.* 2019). Les réactions anaphylactiques (dépendantes des anticorps) sont des réactions plus rares puisqu'elles se produisent seulement dans 0.0005% (administration par voie orale) à 0,001% (administration parentérale) des administrations de BL (Vardakas *et al.* 2018, Blumenthal *et al.* 2019).

Ces réactions allergiques peuvent présenter des prédispositions génétiques. En effet, le déclenchement de DILI après l'exposition à la flucloxacilline est fortement associé avec les molécules **HLA-B*57 :01** (Daly *et al.* 2009). En effet, l'activation des LT des patients avec des DILI induite par la flucloxacilline montraient des réactions spécifiques des molécules HLA-B*57 :01 (Monshi *et al.* 2013, Willemin *et al.* 2014). Egalement, l'apparition de DILI suite à l'administration d'amoxicilline-acide clavulanique a été associée dans plusieurs études avec les molécules **HLA-DRB1*15 :01**, les molécules

HLA-DQB1*06 :02 et les molécules **HLA-A*02 :01** dans les populations européennes (Lucena *et al.* 2011, White *et al.* 2015, Taylor *et al.* 2020). Néanmoins, le dépistage HLA n'est pas utilisé en routine pour prévenir l'allergie aux pénicillines du fait de sa faible valeur de prédiction positive. En outre, l'ensemble des patients allergiques ne possède pas la prédisposition génétique (Castells *et al.* 2019).

2.3 Les formes cliniques de l'allergie aux β -lactamines

Les BL sont responsables d'un large nombre de réactions allergiques dont la plus fréquente est l'urticaire allergique (Castells *et al.* 2019). Dans cette partie, nous détaillerons les différentes formes cliniques qui sont retrouvées dans l'allergie aux BL.

2.3.1 Les réactions d'hypersensibilités dépendantes des anticorps

Les réactions d'hypersensibilités dépendantes de la sécrétion d'anticorps sont les réactions les plus souvent retrouvées dans le cadre de l'allergie aux BL (Romano *et al.* 2017). Ces réactions sont identifiées chez les patients grâce à l'utilisation de prick-tests et les tests intradermiques à lecture immédiate (Chaabane *et al.* 2009). Parmi ces réactions, plusieurs études ont permis de montrer que la manifestation la plus fréquente chez les patients était l'**urticaire allergique** (36,7 à 37,5%) suivi de l'angio-oedème (19,1 à 37,5%) et du choc anaphylactique (3,7 à 17,6%) (Nettis *et al.* 2001, Bousquet *et al.* 2007). Dans la majorité des cas (39,5%), ces symptômes apparaissaient moins d'une heure après l'administration de la molécule (second contact) ou, plus rarement (9,5% des cas), entre 1 et 6 heures après (Bousquet *et al.* 2007). Dans ces études, la BL le plus souvent responsable était l'amoxicilline et plus rarement la flucloxacilline et certaines céphalosporines (Azevedo *et al.* 2018).

2.3.2 L'exanthème maculopapuleux

L'exanthème maculopapuleux est la réaction retardée la plus fréquente lors de l'allergie aux BL. En effet, une étude finlandaise réalisée sur 947 cas de réactions allergiques médicamenteuses cutanées a démontré que 81% de ces réactions étaient des exanthèmes maculopapuleux (Lammintausta et Kortekangas-Savolainen 2004). Parmi ces patients, les BL étaient mises en cause dans plus de 70% des cas. Ces résultats étaient confirmés par plusieurs autres études montrant que les BL les plus impliquées étaient l'amoxicilline et plus rarement certaines céphalosporines (céphalexine et

céfaclor), la pipéracilline et la BP (Romano *et al.* 2009, Zambino *et al.* 2013, Pinho *et al.* 2016, Atanaskovic-markovic *et al.* 2016).

2.3.3 Le syndrome de Stevens-Johnson et la nécrose épidermique toxique

Dans certains cas, les patients développent des réactions cutanées plus graves telles que le SSJ et le TEN. Une étude épidémiologique allemande conduite sur 315 cas de SSJ et 259 cas de TEN a montré que les antibiotiques étaient la cause la plus fréquente (34% des SSJ et 40% des TEN) (Schopf *et al.* 1991). Dans cette étude, les hommes étaient deux fois plus à risque que les femmes dans le SSJ alors que ce rapport était inversé pour les cas de TEN (*i.e.* deux fois plus de risque pour les femmes). Ces lésions évoluaient vers le décès du patient dans 1% des SSJ et dans 34% des TEN. Les BL les plus impliquées étaient l'amoxicilline et la pénicilline V. Ces résultats ont également été montrés par l'étude de Wong *et al.* sur 17 patients atteints de SSJ/TEN identifiant les BL comme la cause médicamenteuse la plus fréquente (Wong *et al.* 1999). Les symptômes cliniques décrits dans ces études étaient caractéristiques avec un érythème bulleux et une perte de peau allant de 10% dans les SSJ à 46% dans les cas de TEN accompagnés de troubles intestinaux (diarrhées et vomissements), de myalgie et de léthargie. Dans certaines études, ces symptômes pouvaient également se compliquer avec une septicémie, de l'anémie et une pneumonie (Dalli *et al.* 2007).

2.3.4 Le syndrome de DRESS

Plusieurs études ont relevé des cas de DRESS après l'administration de BL. L'étude de Aouam *et al.* a notamment reporté deux cas de DRESS après l'administration de céfotaxime (Aouam *et al.* 2012). Dans cette étude, les symptômes apparaissaient après 4 semaines de traitement avec de la fièvre, des rashs cutanés prurigineux et des œdèmes de la face. Les résultats sanguins montraient une hyperéosinophilie avec une hyperlymphocytose. Ces symptômes avaient complètement disparus 4 semaines après l'arrêt de la céfotaxime. Les mêmes symptômes étaient observés dans l'étude de Diaz-Mancebo *et al.* où l'introduction d'amoxicilline-acide clavulanique avait accentué l'hyperleucocytose avec une soudaine dyspnée et une pneumonie à éosinophiles (Diaz-Mancebo *et al.* 2012). Une étude prospective française conduite sur 10 patients atteints de DRESS confirmait également le rôle majeur de l'amoxicilline dans ces réactions allergique (70% des cas) (Ben-Said *et al.* 2015).

2.3.5 La pustulose exanthématique aiguë généralisée

Plusieurs études rapportent des cas de PEAG suite à l'administration de BL bien que cela reste des formes rares (Beylot *et al.* 1996, Roujeau 2005). Mysore et Ghuloom ont reporté un cas de PEAG suite à l'administration de trois BL différentes : la pipéracilline, la ceftazidime et le méropénème (Mysore et Ghuloom 2003). Lors de ces trois épisodes, les symptômes cliniques apparaissaient une semaine après l'administration de la molécule avec un érythème sévère accompagné de pustule sur l'ensemble du corps. Les résultats biologiques et les coupes histologiques montraient une hyperleucocytose et un œdème superficiel du derme avec des infiltrats de LT (CD4+ et CD8+). Bommarito *et al.* ont également répertorié un cas de PEAG suite à l'administration d'amoxicilline-acide clavulanique (Bommarito *et al.* 2013). Le patient avait un tableau clinique similaire à celui décrit précédemment avec un érythème accompagné de fièvre et d'une hyperleucocytose à neutrophiles. Une étude rétrospective conduite sur 5 ans a permis de montrer que les BL étaient la cause majeure de PEAG représentant 73,7% des cas de cette étude (Thienvibul *et al.* 2015). Dans cette étude, 15% de ces cas était détectés suite à l'administration de carbapénèmes (imipénème et méropénème) et 10% suite à l'administration d'amoxicilline. Les symptômes apparaissaient en moyenne 3 jours après la prise médicamenteuse et se présentaient sous la forme d'un érythème avec des pustules superficielles accompagnées dans 68,4% des cas d'hyperleucocytose à neutrophiles, dans 52,6% des cas de fièvre et dans 31,6% des cas d'œdème facial. Pour chacune de ces études, la résolution des lésions était spontanée après une dizaine de jours à l'arrêt du médicament.

2.3.6 Drug-induced liver injury

L'allergie aux BL peut également se manifester sous la forme de DILI (Björnsson 2017). Björnsson et Hoofnagle ont établi une classification des molécules médicamenteuses les plus impliquées dans les DILI. Cette classification compte 4 groupes classés de A (plus de 50 cas) à D (1 à 3 cas) selon les cas de DILI répertoriés depuis les années 1950 (Björnsson et Hoofnagle 2015).

L'association **amoxicilline-acide clavulanique** est la principale cause d'hépatite médicamenteuse classée parmi la catégorie A (Larrey *et al.* 1992, Cundiff et Joe 2007, Leitner *et al.* 2010, Meng *et al.* 2016, deLemos *et al.* 2016). En effet, au cours d'une étude prospective de deux ans sur les DILI en Islande, 35 252 patients ont été traités par l'amoxicilline-acide clavulanique. Au total, 1 patient sur 2350 a développé une DILI. Chez les patients hospitalisés, le risque s'est avéré plus élevé puisque les DILI étaient retrouvées chez 1 sur 729 patients traités (Björnsson *et al.* 2013). Cette différence entre les patients ambulatoires et les patients hospitalisés n'était pas connue. Il est possible

que les patients les plus malades soient plus sensibles aux DILI ou que l'administration des antibiotiques par voie intraveineuse favorise l'apparition de réactions allergiques. Pour autant, il n'existe pas de données sur l'impact de la voie d'administration sur le déclenchement des DILI. Les lésions hépatiques dues à l'amoxicilline-acide clavulanique étaient typiques des DILI retardées apparaissant 16 à 30 jours après le début du traitement avec l'apparition d'une cholestase et d'un ictère (Lucena *et al.* 2006). Une étude épidémiologique espagnole a permis de montrer que les hommes étaient plus fréquemment atteints de DILI que les femmes (60% d'hommes contre 40% de femmes) (deLemos *et al.* 2016).

Concernant les autres pénicillines incriminées, une étude épidémiologique suédoise a permis de montrer que la **flucloxacilline** était la deuxième BL la plus fréquemment mis en cause dans les DILI (Björnsson et Olsson 2005). L'incidence de la survenue de DILI après la prise de flucloxacilline est élevée puisqu'elle est estimée entre 6,1 et 8,5 cas pour 100 000 patients traités comparée à celle de la pénicilline V qui est de 0,3 pour 100 000 patients traités (Li *et al.* 2009, Wing *et al.* 2017). Le mécanisme impliqué dans le déclenchement des DILI liées à la flucloxacilline peut s'expliquer par différents mécanismes résumés dans la Figure 17. D'une part, la flucloxacilline en elle-même est capable de se conjuguer aux protéines (notamment la HSA et le CYP3A4) pour déclencher l'activation des LT CD8+ par la théorie de l'haptène avec, dans certains cas, une restriction pour les molécules HLA-B*57:01 (Jenkins *et al.* 2009, Carey et van Pelt 2005, Monshi *et al.* 2013, Waddington *et al.* 2020). Il a également été démontré que la flucloxacilline pouvait déclencher l'activation des LT CD8+ via le mécanisme du p-i concept avec une restriction aux molécules HLA-B*57:01 (Wuillemin *et al.* 2013). Concernant la restriction aux molécules HLA-B*57:01, une étude récente a également permis de montrer que la flucloxacilline était capable de modifier les peptides présentés par ces molécules déclenchant ainsi l'activation des LT CD8+ par altération du répertoire peptidique du soi (Puig *et al.* 2021). En effet dans cette étude, les cellules traitées par la flucloxacilline présentaient une quantité plus importante de peptides contenant des tryptophanes sur la position carboxy-terminale avec des molécules de flucloxacilline hapténisées sur les lysines, ce qui déclenchait l'activation des LT CD8+. D'autre part, il a également été démontré que le métabolite produit par le CYP3A4 (la 5-hydroxyméthyl flucloxacilline) était également capable de s'hapténiser avec les protéines laissant suggérer un mécanisme d'activation des LT CD8+ par la théorie de l'haptène (Jenkins *et al.* 2009, Weaver *et al.* 2020). Il a également été démontré que ce métabolite pouvait engendrer une cytotoxicité directe sur les cellules épithéliales biliaires (Lakehal *et al.* 2001). L'activation des LT CD8+ cytotoxiques qui résulte de ces mécanismes déclenche la destruction des cellules épithéliales biliaires et des hépatocytes (Nattrass *et al.* 2014, Nattrass *et al.* 2015). Les signes cliniques qui en découlent sont caractéristiques de la flucloxacilline et surviennent entre 1 et 45 jours après le début du traitement avec une hépatite

cholestatique non douloureuse accompagnée d'un ictère et d'une élévation des phosphatases alcalines et de la bilirubine (Olsson *et al.* 1992, Davies *et al.* 1994, Li *et al.* 2009, Wing *et al.* 2017).

Certains cas de DILI suite à l'administration de **céphalosporines** ont également été rapportés. Dans la littérature, 25 cas ont été reportés suite à l'administration de céfazoline et 15 cas ont été reportés suite à l'administration de ceftriaxone depuis les années 1950 (Björnsson et Hoofnagle 2015). Une étude sur la cohorte DILIN entre les années 2004 et 2012 a relevé 19 cas de DILI suite à l'administration de céfazoline devenant ainsi le 6^{ème} médicament le plus responsable de DILI dans cette étude (Alqahtani *et al.* 2015). Les lésions hépatiques apparaissent 1 à 3 semaines après le début du traitement en prophylaxie pré-opératoire (en intraveineuse) sous la forme de cholestases.

Le déclenchement de DILI suite à l'administration de **BP** ou de **pénicilline V** est beaucoup plus rare. En effet, seuls 9 cas de DILI ont été rapportés suite à l'administration de BP depuis les années 1950 la classant dans la catégorie C (Björnsson et Hoofnagle 2015).

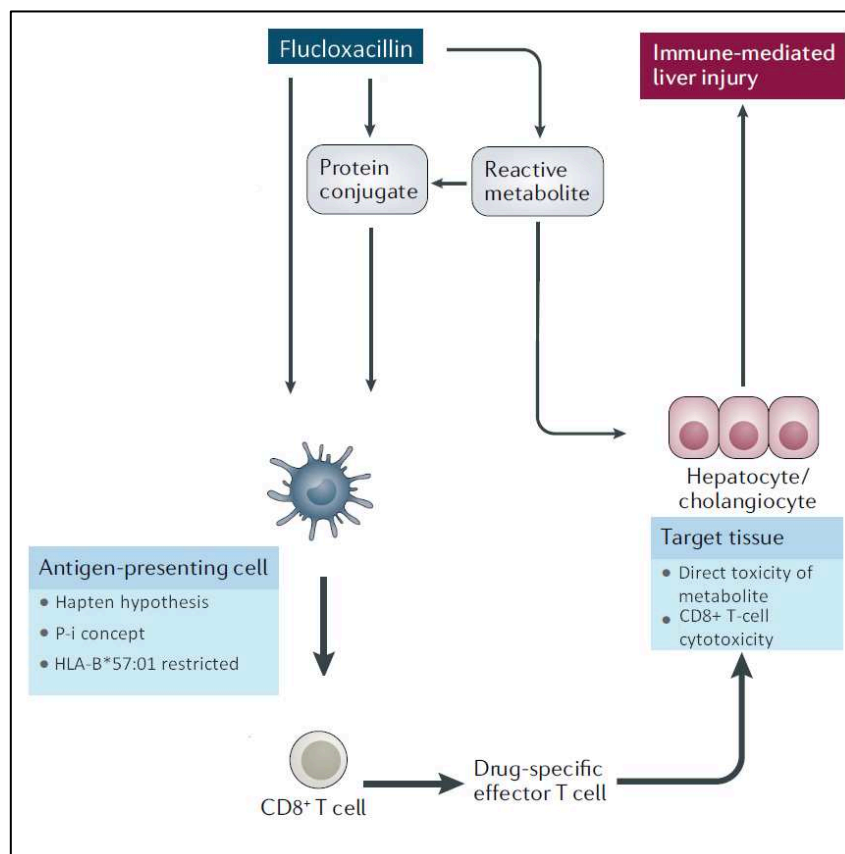


Figure 17. Le mécanisme hépatotoxique de la flucloxacilline (adaptée de Weaver et al. 2020)

La flucloxacilline peut engendrer des hépatites médicamenteuses en se conjuguant aux protéines et en activant les LT CD8+ par le mécanisme de l'haptène ou par un mécanisme de p-i concept restreint aux molécules HLA-B*57:01. Elle peut également engendrer ces effets hépatotoxiques via son métabolite qui peut également agir comme un haptène ou engendrer une toxicité directe sur les cholangiocytes.

Chapitre 3 : Allergie et environnement

I. Une augmentation croissante des allergies

Les maladies allergiques affectent 500 millions de personnes, soit 15% de la population mondiale (Linneberg 2000, Laaidi *et al.* 2011). Aucune étude ne s'est intéressée à l'augmentation des allergies médicamenteuses, néanmoins, les études épidémiologiques semblent s'accorder pour décrire une nette augmentation des allergies à travers le monde (Holt et Thomas 2005, Platts-mills 2015). Plusieurs études se sont intéressées à l'augmentation de la prévalence des cas de **rhinites allergiques** passant de 4 à 8% en Suisse (Skoner 2001), passant de 13,4% à 19,1% aux Etats-Unis (United States Environmental Protection Agency 2008, Mims 2014), doublant pour la Suède et quadruplant en Angleterre sur une dizaine d'années (Åberg 1989, Fleming et Crombie 1987, Howarth 1998). Certaines études épidémiologiques se sont concentrées sur l'augmentation des **allergies alimentaires** montrant une augmentation de la prévalence de 1,2% par décennie (Sicherer 2011, Savage et Johns 2015). Certains travaux ont également montré une augmentation des réactions anaphylactiques alimentaires (détection d'IgE spécifiques) passant de 1.2 à 2.4 pour 100 000 admissions hospitalières en Grande-Bretagne (Tang et Mullins 2016). Ce chiffre a également doublé aux Etats-Unis et en Nouvelle-Zélande entre 2000 et 2011 (Kool *et al.* 2016, Tang et Mullins 2016, Motosue *et al.* 2018). La plus grande augmentation est observée en Australie passant de 5,6 à 8,2 pour 100 000 admissions entre 1998 et 2012 (Mullins *et al.* 2015, Tang et Mullins 2016). Ces augmentations des réactions allergiques ont été également mesurées pour l'**asthme** avec un doublement de la prévalence de l'asthme chez l'enfant aux Etats-Unis et en Australie sur une vingtaine d'années (Figure 18) (Eder *et al.* 2006, United States Environmental Protection Agency 2008, Subbarao *et al.* 2009, Laaidi *et al.* 2011, Platts-mills 2015, Dharmage *et al.* 2019).

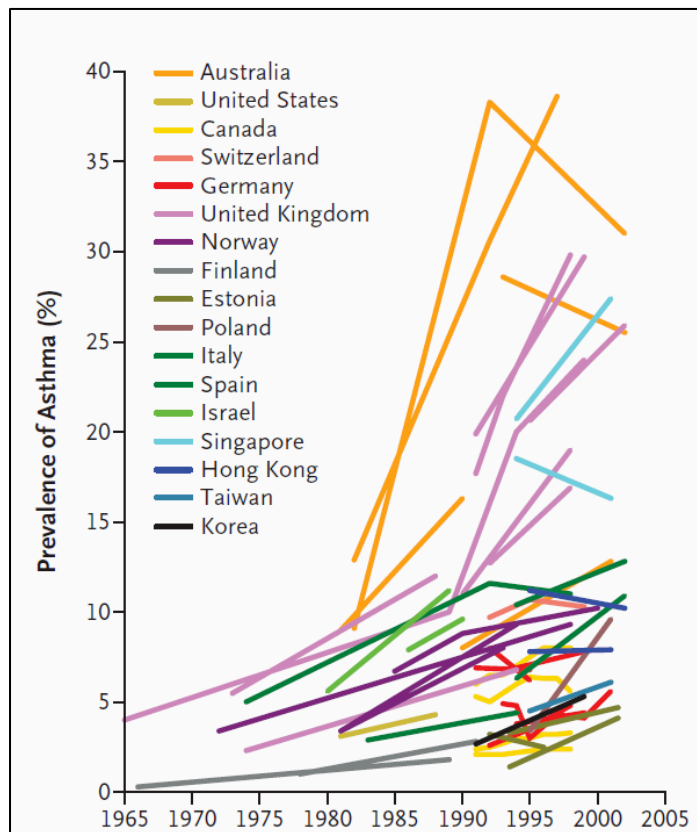


Figure 18. Augmentation de la prévalence de l'asthme à travers le monde (adaptée d'Eder et al. 2006)

Nous observons actuellement une augmentation mondiale des réactions allergiques. Cette figure représente l'augmentation de la prévalence de l'asthme (%) à travers 17 pays du monde entre les années 1965 et 2005.

II. Influence des facteurs environnementaux

Dans les études citées précédemment, la période de temps sur laquelle a été mesurée l'augmentation des allergies est trop restreinte pour imputer de tels changements à des modifications génétiques de la population. C'est pourquoi, les facteurs dits « environnementaux », que nous étudierons dans la partie suivante, sont particulièrement suspectés (Wüthrich 1989, Howarth 1998). Dans cette partie, nous détaillerons les facteurs environnementaux connus pour influencer le déclenchement des allergies.

2.1 Les conditions climatiques

Le climat, et plus particulièrement le réchauffement climatique, peut influencer le déclenchement des maladies allergiques (Laaidi *et al.* 2011). Ce phénomène a particulièrement été étudié dans l'allergie aux pollens puisque le réchauffement climatique modifie les aires de répartition des producteurs de pollens allergisants en allongeant la saison de floraison et la quantité de pollen produite (Damialis *et al.* 2007, D'Amato et Cecchi 2008, Laaidi *et al.* 2011). Il a ainsi été montré que la production d'IgE spécifiques chez des personnes exposées aux pollens était plus forte lorsque les températures étaient plus élevées (Ahlholm *et al.* 1998). Ceci semblerait s'expliquer par le fait que les conditions climatiques seraient capables d'influencer la composition du grain de pollen et d'augmenter son potentiel allergisant (Ahlholm *et al.* 1998, Levetin et Van de Water 2008). Ce phénomène a été démontré notamment dans la composition du pollen de bouleau avec une augmentation des quantités d'allergène *Betula verrucosa* 1 (Bet v1) de façon proportionnelle à l'augmentation des températures (Ahlholm *et al.* 1998, Levetin et Van de Water 2008). Egalement avec l'ambrosie, un réchauffement de 3,5°C entraînait une augmentation de 30 à 50% de la quantité d'allergène *Ambrosia artemisifolia* 1 (Amb a1) (Ziska *et al.* 2003).

2.2 La pollution atmosphérique

Le déclenchement des allergies coïncidant avec les pics de pollution, la pollution atmosphérique est ainsi devenu l'un des principaux axes de recherche dans l'étude de l'augmentation des allergies environnementales (Trasande et Thurston 2005, Bonay et Aubier 2007, Baeza et Marano 2007, Pénard-Morand et Annesi-Maesano 2008). Les composés les plus étudiés sont les particules de diesel (DEP) qui sont suspectées d'être la cause de l'augmentation des allergies induites par le trafic autoroutier (Montnemery *et al.* 2003, Pénard-Morand et Annesi-Maesano 2004, Heinrich et Wichmann 2004). Une étude de l'exposition aux DEP chez 14 volontaires asthmatiques (concentrations équivalentes à un pic de pollution) a montré le déclenchement d'une crise marquée par l'augmentation de l'hyperréactivité bronchique, l'augmentation de la résistance des voies respiratoire et l'augmentation de la production d'IL-6 dans les expectorations (Nordenhäll *et al.* 2001). Des résultats similaires ont également été démontré avec des modèles murins (Sagai *et al.* 1996, Takano *et al.* 1997).

Au niveau de l'effet adjuvant des DEP sur la réponse allergique face à un allergène, plusieurs études ont montré *in vivo* que les DEP avaient une action synergique avec les allergènes au niveau

respiratoire en augmentant la production d'IgE spécifiques et en favorisant une réponse lymphocytaire Th2 favorisant les allergies (Nel *et al.* 1998, Pandya *et al.* 2002, Pénard-Morand et Annesi-Maesano 2008, Samuelsen *et al.* 2008). Ceci a notamment été démontré avec l'ambrosie où la concentration nasale d'IgE spécifiques chez l'Homme est augmentée après l'exposition aux DEP en comparaison avec l'exposition à l'allergène seul (Diaz-Sanchez *et al.* 1997). Egalement, chez la souris, la production d'anticorps spécifiques de l'ovalbumine est plus importante après une exposition combinée avec les DEP (Muranaka *et al.* 1986, Miyabara *et al.* 1998, Heo *et al.* 2001).

Le mécanisme d'action proposé pour expliquer l'effet des DEP sur l'allergie respiratoire est un effet signal de danger/adjuvant. En effet, Provoost *et al.* ont montré une augmentation de l'expression des marqueurs d'activation (CD86) et de la migration des DCs pulmonaires chez les souris instillées avec des DEP (Provoost *et al.* 2009). Dans cette étude, les DCs traitées induisaient une augmentation de la réponse lymphocytaire dans les ganglions lymphatiques du médiastin caractérisée par une augmentation de la prolifération des LT (Provoost *et al.* 2009). Ces résultats furent appuyés par l'équipe de Porter *et al.* montrant *in vitro* l'augmentation de l'activation des DCs humaines exposée aux DEP (0,1-100 µg.mL⁻¹ pendant 48 heures) (Porter *et al.* 2007). Cette activation était caractérisée par une augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe II et de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-6, IFN-γ et IL-12) (Porter *et al.* 2007).

Ce mécanisme de signal de danger pourrait être un mécanisme indirect. En effet, Bleck *et al.* ont démontré une activation indirecte des DCs exposées aux DEP se produisant en réponse à l'augmentation de la sécrétion de thymic stromal lymphopoietin (TSLP) par les cellules épithéliales pulmonaires. Dans cette étude, l'activation des DCs était bloquée par l'utilisation d'anticorps anti-TSLP (Bleck *et al.* 2007). Cette activation indirecte pourrait également se faire via l'inflammation induite par les DEP. Effectivement, l'exposition de volontaires sains à des doses élevées DEP induisait une réponse inflammatoire caractérisée par une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires qui pourraient être détectées comme signaux de danger par les DCs (Diaz-Sanchez *et al.* 1996, Salvi *et al.* 1999, Nordenhäll *et al.* 2000).

2.3 Les infections virales

L'immunité hétérologue est l'un des mécanismes proposés pour expliquer l'impact des infections virales dans le déclenchement de l'allergie médicamenteuse (Almeida *et al.* 2019). Ce modèle se développe en plusieurs étapes clés : **(1)** Le patient possède des CPA avec un allèle HLA à risque favorisant le développement de l'allergie médicamenteuse **(2)** le patient a une primo-infection

par un virus où les peptides viraux sont présentés via les molécules HLA à risque ce qui déclenche une prolifération en grande quantité de LT mémoires réactifs vis-à-vis de cet allèle HLA (3) plus tard au cours de sa vie, ce patient est exposé au médicament qui est « accidentellement » reconnu via une réactivité croisée de ces LT mémoires, ce qui déclenche l'allergie médicamenteuse (White *et al.* 2015) (Figure 19A). Concernant les pathogènes qui peuvent être responsables de cette immunité hétérologue, la famille des *herpesviridae* (human herpes virus, HHV) est la principale source d'antigènes persistants et de LT « cross-réactifs » de longue durée. En effet, les HHV sont des agents pathogènes omniprésents qui se distinguent par leur capacité à générer une infection virale de longue durée avec une latence cellulaire (Virgin *et al.* 2009). La conséquence directe de cette infection est la génération et la survie d'une large quantité de LT mémoires potentiellement réactifs vis-à-vis d'un allèle HLA à risque. Il a été démontré que ces LT mémoires spécifiques des virus de cette famille représentaient 40% du répertoire total de LT CD4+ et 10% du répertoire total de LT CD8+ chez des patients infectés par le cytomégalovirus (CMV) (Komanduri *et al.* 2001, Sester *et al.* 2002, Sylwester *et al.* 2005). La survie de ces populations de LT mémoires est maintenue par les antigènes viraux produits lors des ré-activations virales périodiques. A la suite de cela, l'activation de ces LT mémoires par le médicament peut se faire par différents mécanismes (théorie de l'haptène, p-i concept, altération du répertoire peptidique du soi) (Figure 19B) (White *et al.* 2015).

Ce mécanisme est particulièrement suspecté dans les cas d'hypersensibilité à la carbamazépine. En effet, l'hypothèse est que les réactions allergiques cutanées graves (SSJ/NET) induites suite à l'administration de carbamazépine pourraient être expliquées par une infection due à un virus HHV cutané tel que le HSV-1 (Human Simplex Virus), HSV-2 ou le virus de la varicelle (White *et al.* 2015). Ce virus serait présenté spécifiquement par les molécules **HLA-B*15 :02** déclenchant l'activation de LT CD8+ réactifs capables de reconnaître la carbamazépine par réactivité croisée. L'hypothèse de l'immunité hétérologue a également été formulée dans l'hypersensibilité à l'abacavir où les symptômes plus généralisés pourraient s'expliquer par une infection à un virus HHV systémique (tel que le CMV, le virus Epstein Barr ou l'HHV-6) qui serait présenté de façon spécifique via les molécules **HLA-B*57 :01**. Les LT mémoires générés pourraient par la suite être capables de reconnaître l'abacavir par réactivité croisée (White *et al.* 2015).

Plusieurs études ont également démontré un effet « signal de danger » des infections virales favorisant ainsi le déclenchement des réactions allergiques (Sullivan et Shear 2001, Pirmohamed *et al.* 2002). Le virus de la grippe (*influenza virus*) et les virus HSV-1 et -2 sont notamment connus pour déclencher respectivement l'activation du TLR7 et du TLR9, de façon dépendante de l'adaptateur MyD88 (Lund *et al.* 2004, Ichinohe *et al.* 2009). Le signal de danger médié par les infections virales est également suspecté en clinique dans l'augmentation de l'apparition des rashes cutanés allergiques suite

à l'administration d'ampicilline en présence du virus Epstein Barr (Pullen *et al.* 1967, Shiohara et Kano 2007). Les virus HHV-6 et -7 et le CMV ont également été mis en cause dans l'augmentation du risque de déclencher une forme sévère du DRESS en réaction à l'allopurinol (Suzuki *et al.* 1998, Descamps *et al.* 2003), à la sulfasalazine (Tohyama *et al.* 1998), et à la phénytoïne (Aihara *et al.* 2001).

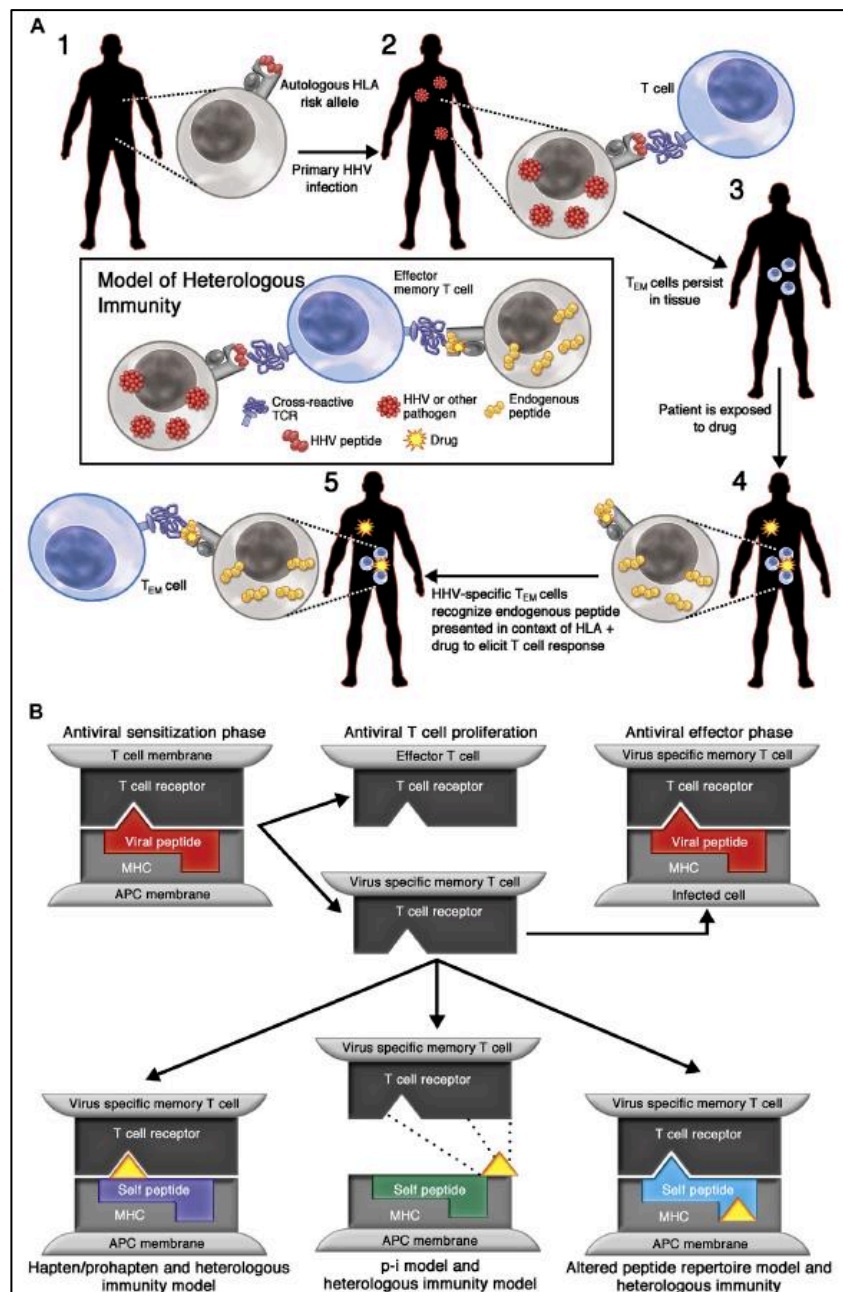


Figure 19. Le modèle de l'immunité hétérologue (adaptée de White *et al.* 2015)

(A) Le mécanisme de l'immunité hétérologue comporte trois étapes clés : (1) la présence d'un allèle HLA à risque (2) une primo-infection virale qui déclenche la prolifération de LT réactifs vis-à-vis du virus présentés par l'allèle HLA à risque (3) une réactivité croisée de ces LT qui reconnaissent accidentellement le médicament administré plus tard au cours de la vie du patient **(B)** l'activation des LT peut se faire par différents mécanismes : la théorie de l'haptène, le pharmacological-interaction concept (p-i concept) ou l'altération du répertoire peptidique du soi.

III. Les signaux de danger immunologiques et l'allergie médicamenteuse

3.1 Les différents types de signaux de danger associés aux molécules chimiques et aux médicaments

La présence de signaux de danger déclenche l'activation des DCs vers un phénotype mature orientant la réponse vers une réponse immunogène (Gallucci et Matzinger 2001). Ces signaux de danger sont des signaux pro-adjuvants indispensables au déclenchement de la réponse lymphocytaire, néanmoins, leur nature n'est pas toujours connue en particulier dans l'allergie aux BL.

Dans certains cas, l'antigène joue directement le rôle de signal de danger (Pallardy et Bechara 2017). C'est le cas du nickel qui est un ligand direct du récepteur TLR4 (Schmidt *et al.* 2010, Rachmawati *et al.* 2013) induisant une activation des voies des MAPK, NF- κ B et JAK-stat (Aiba *et al.* 2003, Boislevé *et al.* 2005, Antonios *et al.* 2009, Bechara *et al.* 2017). Cette cascade d'activation se traduit phénotypiquement sur les DCs par l'augmentation des marqueurs d'activation CD83/CD86, l'augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe II et la production de cytokines pro-inflammatoires (Coutant *et al.* 1999, Manome *et al.* 1999, Tuschl *et al.* 2000). Dans le cadre de l'allergie médicamenteuse, la néviparine est connue pour avoir un effet signal de danger via son métabolite hépatique oxydé (Zhang *et al.* 2013). L'activation nécessaire au déclenchement de l'allergie est donc produite par l'allergène lui-même.

Dans certaines situations, l'antigène induit la production de signaux de danger via l'interaction avec son environnement (Martin *et al.* 2011). C'est le cas du DNCB qui, par sa réactivité chimique, déclenche la production d'ERO responsables de la fragmentation de l'acide hyaluronique cutané en fragments de faible poids moléculaire (Byamba *et al.* 2010, Esser *et al.* 2012, Heo *et al.* 2018). Ces derniers sont des ligands des récepteurs TLR2 et TLR4 (Esser *et al.* 2012) qui déclenchent l'activation des DCs (Coutant *et al.* 1999, Manome *et al.* 1999, Tuschl *et al.* 2000) et l'activation des voies MAPK et NF- κ B (Aiba *et al.* 2003). Les études montrent que cette activation est significativement réduite par l'ajout d'anti-oxydant (N-acétyl-cystéine), ce qui appuie davantage l'implication des ERO comme signaux de danger produits par le DNCB (Byamba *et al.* 2010).

Un troisième scénario peut se former lorsque, comme c'est le cas pour les BL, l'antigène est inerte et complètement dépourvu d'effet signal de danger intrinsèque. Le déclenchement de l'allergie est ainsi favorisé par des signaux pro-adjuvants extérieurs et indépendants qui proviennent de l'environnement (*e.g.* conditions climatiques, pollution atmosphérique, infections virales), du terrain

génétique ou du terrain pathologique du patient (Pallardy et Bechara 2017). Par exemple, certains contextes pathologiques induisent des conditions pro-inflammatoires (fibrose pulmonaire, rejet de greffe) où les cellules stressées/endommagées produisent de l'ATP dans le compartiment extracellulaire jouant ainsi le rôle de signal de danger. Dans ces études, l'ATP déclenche une activation du récepteur P2X7 et de l'inflammasome NLRP3 aboutissant à l'activation des DCs et à la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β) (Figure 20) (Riteau *et al.* 2010, Amores-iniesta *et al.* 2017, Savio *et al.* 2018). Dans le cadre de l'allergie aux BL, la nature des signaux de danger qui déclenchent l'allergie est encore inconnue. C'est pourquoi, dans ce travail de thèse, nous nous intéressons à l'origine de ces signaux de danger que nous aborderons dans la partie suivante.

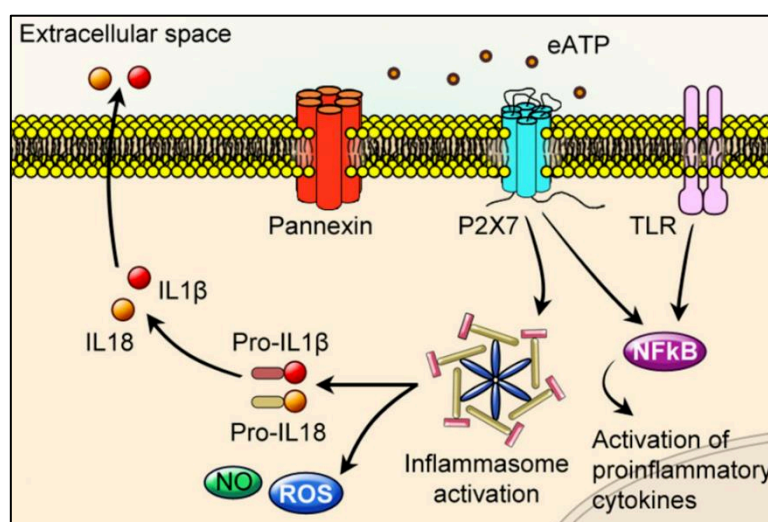


Figure 20. L'ATP extracellulaire comme signal de danger détecté par le récepteur P2X7 (adaptée de Savio *et al.* 2018)

Dans certains contextes pathologiques, les cellules endommagées produisent de l'ATP dans le compartiment extracellulaire qui, après liaison au récepteur P2X7, déclenche l'activation de l'inflammasome et de la voie NF κ B. L'activation de ces voies de signalisation aboutit à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires en particulier l'IL-1 β .

3.2 L'origine des signaux de danger dans l'allergie médicamenteuse

L'hypothèse la plus souvent explorée afin d'expliquer l'origine des signaux de danger impliqués dans le déclenchement de l'allergie médicamenteuse est la présence d'infections virales ou bactériennes chez le patient. En effet, ces pathogènes font partie de la famille des PAMP dont l'effet signal de danger favorise le déclenchement des allergies médicamenteuses (Gust *et al.* 2007).

Dans le cadre de l'allergie aux BL, les antibiotiques sont donnés aux patients dans des contextes pathologiques pro-adjuvants par nature : le LPS en cas d'infection bactérienne qui est reconnu par le TLR4 (Hemmi et Akira 2005, Martin *et al.* 2010), l'IL-1 β dans les contextes inflammatoires (Gallucci et Matzinger 2001, Gallo et Gallucci 2013), la présence de certains virus dont l'ADN est un ligand direct des récepteurs TLR (Cella *et al.* 2000, Diebold *et al.* 2004, Lund *et al.* 2004, Ichinohe *et al.* 2009) ou encore l'hyperthermie, en cas de fièvre, dont certaines études ont démontré un effet signal de danger indirect lié à l'augmentation de l'expression du TLR4 à la surface des DCs (Yan *et al.* 2007, Zhao *et al.* 2007) et le relargage de certaines HSP (70 et 90) responsables de l'activation des DCs (reconnues comme DAMP) (Basu et Srivastava 2003, Tournier *et al.* 2003, Schildkopf *et al.* 2011). L'étude de Lavergne *et al.* a permis de tester un large panel de signaux de danger pouvant être présents lors d'un traitement antibiotique : le LPS, l'enterotoxine staphylococcique B, les protéines du virus de la grippe, certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ), des molécules de l'inflammation (prostaglandine E2, complément sérique humain, protéine C activée), des réactifs oxydants (buthionine sulfoximide, H₂O₂) et l'hyperthermie (37,5-39,5°C). La présence de ces signaux de danger augmenterait la formation d'adduits sulfaméthoxazole-protéine à l'intérieur des moDCs (Lavergne *et al.* 2009). Dans cette étude, ces signaux de danger avaient des effets synergiques entre eux laissant suggérer un potentiel « effet cocktail » pro-adjuvant en vie réelle. Selon ces études, le contexte pathologique pourrait ainsi favoriser le déclenchement des réactions allergiques par divers mécanismes : soit en favorisant les réactions d'hapténisation médicament-protéine, soit en augmentant l'activation des CPA (Gruchalla 2001).

Néanmoins, les signaux de danger évoqués ci-dessus font partie de la physiologie de l'infection et sont *a priori* présents chez l'ensemble des patients traités par des antibiotiques. Pourtant, seul un faible pourcentage de ces patients développera une allergie aux BL. L'hypothèse que nous détaillerons dans ce travail de thèse est que d'autres signaux de danger environnementaux pourraient venir s'additionner à ceux de l'infection et favoriser le déclenchement de l'allergie médicamenteuse. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'effet signal de danger des polluants environnementaux a déjà été incriminé dans l'augmentation des allergies cutanées et respiratoires (Nel *et al.* 1998, Pénard-Morand et Annesi-Maesano 2008, Samuelsen *et al.* 2008). Afin d'étudier l'impact de l'environnement

sur le déclenchement de l'allergie aux BL, nous avons choisi comme modèle d'étude les **nanoparticules de silice amorphe (aSNP)**, un additif alimentaire largement répandu qui pourrait être un potentiel signal de danger exogène environnemental.

IV. Les nanoparticules et le système immunitaire : le cas des nanoparticules de silice amorphe

Nous avons pu exposer précédemment que de nombreux facteurs environnementaux, tels que le climat, la pollution atmosphérique ou encore les infections virales sont susceptibles d'avoir un effet adjuvant/signal de danger et potentialiser le déclenchement d'une réponse immunitaire. Parmi eux, l'apparition d'une nouvelle famille de polluants, les nanoparticules, soulèvent actuellement des questions quant à leurs effets sur les réactions allergiques (Farrera et Fadeel 2015). Ce travail de thèse s'est intéressé à comprendre l'impact de l'exposition environnementale aux nanoparticules sur les mécanismes allergiques. Nous avons choisi comme modèle d'étude les aSNP avec l'hypothèse que cet additif alimentaire puisse se retrouver en co-exposition avec les BL prises par voie orale et potentialiser le déclenchement de la réaction allergique.

4.1 Définitions, utilisations et réglementations des nanoparticules de silice amorphe

4.1.1 Définition des nanoparticules

D'après les différents règlements en vigueur, un nanomatériau est un matériau insoluble ou bio-persistant, dont l'une ou plusieurs des dimensions sont inférieures à **100 nm** (Regulation (EC) No 1223/2009, Regulation (EU) No 1169/2011). Cette définition intègre les agglomérats et les agrégats dont la dimension est supérieure à 100 nm mais dont les particules primaires conservent les propriétés de la nano-échelle (Regulation (EC) No 1223/2009, Regulation (EU) No 1169/2011). Les nanomatériaux sont nommés différemment selon qu'ils possèdent une (nano-feuillets), deux (nanotubes) ou l'ensemble (nanoparticules) de leurs dimensions dans le domaine nanométrique. Les nanoparticules sous leur forme primaire peuvent se rassembler par des liaisons faibles (agglomérat) ou des liaisons fortes (agrégat).

4.1.2 La réglementation des nanoparticules

A ce jour, aucune réglementation spécifique ne régit la manipulation des nanomatériaux en France. Le programme européen REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) reconnaît les propriétés spécifiques des nanomatériaux mais ne possède aucune disposition spécifique. De même, l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (Food and Drug Administration ou FDA) régit les nanomatériaux par la réglementation en vigueur pour leur équivalent non-nanoparticulaire. Les nanomatériaux sont donc considérés comme des agents chimiques dont la prévention en termes d'exposition est assurée par le code du travail. Le décret 2012-232 (Décret No 2012-232) a rendu obligatoire la déclaration annuelle de la fabrication, de l'importation ou de la distribution des substances à l'état nanoparticulaire. Egalement en 2013, le règlement européen sur l'information du consommateur rend la mention « nano » obligatoire sur les étiquettes des denrées alimentaires composées de nanoparticules (Règlement (UE) No 1169/2011). Néanmoins, cette mention ne s'appliquant que sur les additifs contenant plus de 50% de nanomatériaux et en exemptant les additifs utilisés depuis plusieurs années, l'association Agir pour l'Environnement n'avait relevé aucune mention « nano » sur les produits alimentaires entre 2016 et 2017 (Laboratoire national de métrologie et d'essais 2016). Progressivement, différentes dispositions sont mises en œuvre pour réussir à évaluer les risques toxiques liés à l'utilisation de nanoparticules. L'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) a mis en place un programme de développement de tests des nanomatériaux manufacturés harmonisés sur le plan international. Egalement, REACH et l'ECHA (Agence Européenne des Produits Chimiques) sont actuellement en collaboration pour l'élaboration de tests d'évaluation du risque des nanomatériaux (ECHA/NR/19/35).

4.1.3 Les modes de production des nanoparticules de silice amorphe

La silice amorphe peut être divisée en deux catégories : la forme naturelle (terre de diatomée) et la silice amorphe synthétique (SAS) qui regroupe l'ensemble des aSNP (Figure 21). Il existe différents modes de production des aSNP (Figure 21) : la **voie humide** permet de produire les gels de silice et la silice précipitée, alors que la **voie thermique** aboutit à la production de silice pyrogénique (ou fumée de silice) qui a été utilisée dans notre étude (OECD SIDS 2004). L'ensemble de ces aSNP sont regroupées sous la même dénomination de dioxyde de silicium (ou additif E551) avec le même numéro CAS (dioxyde de silicium, 7631-86-9) d'où l'importance de la caractérisation des nanoparticules utilisées.

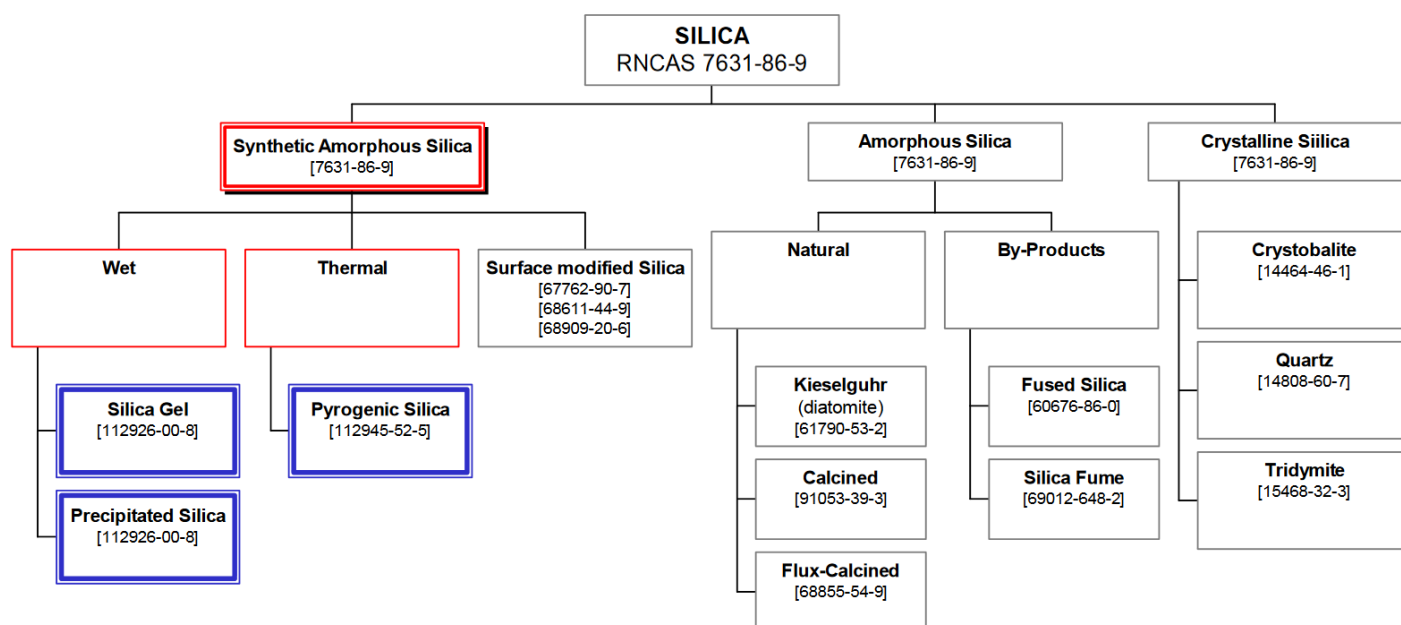


Figure 21. Mode de production des nanoparticules de silice amorphe (adaptée de OECD SIDS 2004)

Les aSNP peuvent être produites selon deux processus : par la voie thermique qui produit de la silice pyrogénique (ou fumée de silice) ou par la voie humide qui permet la production de silice précipitée et de gels de silice.

4.1.4 Les utilisations des nanoparticules de silice amorphe

En 2014, les aSNP étaient les deuxièmes nanoparticules les plus produites en France avec 155 071 tonnes par an (Anses 2014). Ces aSNP sont utilisées en grande quantité dans de nombreux produits du quotidien comme l'alimentation (agent antiagréant), les produits cosmétiques (agent émulsifiant), les matériaux de construction (amélioration des propriétés rhéologiques), les couches pour enfants (agent absorbant) et les médicaments (capacité d'encapsulation). Notre étude s'est particulièrement intéressée à leur utilisation sous la forme de l'additif alimentaire E551, largement répandu dans les produits alimentaires en poudre tels que le sucre, le sel ou encore les épices (Dekkers *et al.* 2010). La consommation quotidienne d'E551 a été estimée à **9,4 mg/kg/j** ce qui est bien au-dessus de certains calculs récents de Non-Observed Adverse Effect Level (NOAEL) (van Kesteren *et al.* 2015, Tassinari *et al.* 2020). De plus, l'exposition de l'épithélium intestinal aux aSNP à l'échelle nanoparticulaire a été confirmée par l'étude de Peters *et al.* après la digestion gastrique *in vitro* de produits alimentaires communs contenant de l'E551 (Peters *et al.* 2012). De ce fait, la population

générale est particulièrement exposée aux aSNP ce qui soulève des questions de sécurité quant à l'utilisation de telles nanoparticules (Murugadoss *et al.* 2017).

4.2 Caractéristiques des nanoparticules et impact sur les systèmes biologiques

Au cours du cycle de vie d'un nanomatériau, la proportion de nanoparticules qui s'individualisent des agglomérats ou des agrégats ne peut être anticipée. Il est donc nécessaire de caractériser le matériel utilisé tant au niveau de son état aggloméré ou agrégé qu'au niveau de sa forme primaire. Cette caractérisation est d'autant plus importante que l'ensemble des aSNP sont regroupées sous le même numéro CAS (dioxyde de silicium, 7631-86-9). Les nouvelles mesures de réglementation ont ainsi poussé l'approfondissement de la caractérisation des nanoparticules, jusqu'à présent insuffisante. En 2006, l'OCDE a fixé les éléments essentiels pour la caractérisation physico-chimique des nanomatériaux (Anses 2014). Le projet a été révisé en 2012 et publié par l'ISO (Organisation Internationale de Normalisation) qui a fixé les paramètres suivants comme nécessaires à l'évaluation du risque toxique :

- Taille des particules primaires / distribution granulométrique
- Taille des agrégats/agglomérats
- Forme des particules
- Surface spécifique
- Composition chimique avec le taux d'impuretés
- Chimie de surface
- Potentiel zêta ou charge de surface
- Solubilité et dispersibilité

La taille et la surface des nanoparticules jouent un rôle important dans leur toxicité (Powers *et al.* 2007, Gatoo *et al.* 2014). Au niveau pulmonaire, la faible taille des particules favorise une entrée plus profonde dans les voies respiratoires augmentant ainsi le passage dans la circulation systémique et la toxicité (Oberdörster *et al.* 2005). Jani *et al.* ont également montré que le passage de la barrière intestinale était d'autant plus élevé que la taille des nanoparticules diminuait (Jani *et al.* 1990). La diminution de la taille des nanoparticules conduit également à une augmentation exponentielle de leur surface spécifique, les rendant ainsi plus réactives avec leur environnement (Gatoo *et al.* 2014).

Napierska *et al.* a ainsi montré que les aSNP de petite taille (14-15 nm) étaient plus cytotoxiques sur les cellules endothéliales humaines (lignée EAHY926, provenant de veines ombilicales) comparées aux nanoparticules de plus grosse taille (19-60 nm) (Napierska *et al.* 2009). Ces résultats ont également été confirmés par Toda *et al.* qui, suite à la sensibilisation de souris BALB/C à l'ovalbumine, a montré que le potentiel adjuvant des aSNP était d'autant plus important que la taille des particules diminuait (Toda et Yoshino 2016). Certaines études d'évaluation de la toxicité pulmonaire (Oberdörster *et al.* 2005, Li *et al.* 2019) et hépatique (Li *et al.* 2011) ont également appuyé ces résultats avec une augmentation de la toxicité de façon inversement proportionnelle avec la taille des aSNP. Généralement, cette augmentation de la toxicité liée à la taille des particules s'explique par une meilleure internalisation dans les cellules (Gatoo *et al.* 2014). L'étude de Gratton *et al.*, conduite avec des particules de synthèse d'une taille allant de 100 nm à 5 µm, a ainsi montré que les nanoparticules les plus petites (100 et 150 nm) étaient celles qui étaient le mieux internalisées dans les cellules HeLa (Gratton *et al.* 2008).

La forme des nanoparticules est également susceptible d'influencer l'internalisation cellulaire et la toxicité (Powers *et al.* 2007, Gatoo *et al.* 2014). Ceci a notamment été évoqué dans l'étude de Gratton *et al.* où la forme cylindrique des particules de synthèse (100 nm à 5µm) favorisait l'internalisation (75%) dans les cellules HeLa par rapport à la forme cubique (45%) (Gratton *et al.* 2008). Dans cette étude, les particules les plus internalisées étaient celles possédant la longueur de cylindre la plus élevée. Ce mécanisme pourrait s'apparenter à celui utilisé par les champignons et les bactéries dont la reconnaissance et l'internalisation cellulaire se fait principalement via leur forme en bâtonnet (Gratton *et al.* 2008). Néanmoins, plusieurs études montrent que l'internalisation de particules sphériques est plus facile, et donc moins toxique, que l'internalisation de particules cylindriques (Verma et Stellacci 2010, Gatoo *et al.* 2014). Il a également été observé que les fibres de dioxyde de titane étaient plus cytotoxiques que le dioxyde de titane sphérique, provoquant des difficultés d'internalisation (« phagocytoses frustrées ») et une réaction inflammatoire dans les macrophages alvéolaires murins (Hamilton *et al.* 2009). Une étude de Park *et al.* a également montré que les nanotubes de carbone cylindriques avait un effet inhibiteur sur les canaux potassium trois fois plus important que les nanoparticules de fullerène sphérique, soulignant l'influence de la forme sur leur toxicité (Park *et al.* 2003). Concernant la silice, l'influence de la forme sur la toxicité est appuyée par le fait que la silice cristalline est classée comme cancérigène pour l'Homme (groupe 1 du CIRC, Centre International de Recherche sur le Cancer) alors que la silice amorphe est considérée comme sûre et donc utilisée en large quantité dans les additifs alimentaires.

La charge des nanoparticules influence également leur réactivité avec les systèmes biologiques (Gatoo *et al.* 2014). La plupart des études ont observé un effet toxique accru des particules chargées positivement (King Heiden *et al.* 2007, Bhattacharjee *et al.* 2010). Ces effets pourraient

s'expliquer en partie par une interaction électrostatique ce qui déclencherait une lyse cellulaire (Goodman *et al.* 2004). Les études sur les dendrimères Starburst (4.5 nm), très étudiées pour l'administration médicamenteuse sélective, ont également confirmé ces résultats. Les dendrimères cationiques (conjuguées avec des groupements amines) induisaient des effets toxiques en altérant la croissance et le développement des embryons de poisson zèbre alors que les dendrimères anioniques (conjuguées avec des groupements acides carboxyliques) n'induisaient aucun effet toxique (King Heiden *et al.* 2007). De même, les aSNP chargées positivement (groupements amines) montraient une cytotoxicité accrue avec une diminution de l'activité mitochondriale et une augmentation de la production d'ERO intracellulaires comparées aux particules chargées négativement (groupements acides carboxyliques) ou neutres qui n'induisaient pas d'effet toxique (Bhattacharjee *et al.* 2010).

L'état d'agrégation des nanoparticules influence également leur toxicité (Gatoo *et al.* 2014). En effet, le niveau d'agrégation peut faire varier la taille, la charge et donc les interactions des nanoparticules avec leur environnement. L'équipe de Wick *et al.* a d'ailleurs observé *in vitro* que les nanotubes de carbone agglomérés étaient plus toxiques que les nanotubes dispersés (Wick *et al.* 2007). Cet état d'agrégation a d'ailleurs été décrit comme l'une des principales causes de la toxicité des nanotubes de carbone (Gatoo *et al.* 2014). Ces résultats ont également été appuyés par l'équipe de Sayes *et al.* montrant que les nanoparticules de fullerène agrégées étaient plus toxiques que les fullerènes solubles (Sayes *et al.* 2004). L'hypothèse pour expliquer ce mécanisme est que l'état d'agrégation pourrait influencer sur l'effet immunoadjuvant des matériaux. Cela a notamment été étudié avec les anticorps recombinants monoclonaux dont l'agrégation déclenche une augmentation de l'activation des DCs et une réponse lymphocytaire accrue (Morgan *et al.* 2019, Nabhan *et al.* 2019, Nabhan *et al.* 2020a, Nabhan *et al.* 2020b).

4.3 L'immunotoxicité des nanoparticules de silice amorphe

Les nanoparticules interagissent avec le système immunitaire via différentes voies d'exposition chez l'Homme. Les voies principales sont : **la voie respiratoire, la voie digestive et la voie cutanée**. Les DCs résidentes présentes aux portes d'entrée de l'organisme vont alors détecter ces particules au cours de l'échantillonnage de leur environnement, ce qui peut aboutir à des effets immunotoxiques (Farrera et Fadeel 2015). Outre leurs effets cytotoxiques, ces nanoparticules peuvent également engendrer des effets immunomodulateurs que nous détaillerons dans les parties suivantes.

4.3.1 La détection et l'internalisation des nanoparticules de silice amorphe par les cellules du système immunitaire

Les effets immunotoxiques des nanoparticules dépendent en premier lieu de leur capacité à être détectées et internalisées par les cellules du système immunitaire. Les cellules phagocytaires ont particulièrement été étudiées car ce sont les cellules qui arrivent en première ligne face aux nanoparticules. De plus, ces cellules semblent jouer le rôle de réservoir aboutissant à une accumulation chronique (Orr *et al.* 2010). Au cours du développement des médicaments, cette séquestration dans les macrophages hépatiques est l'obstacle majeur du ciblage thérapeutique des nanoparticules vers les tissus périphériques (Orr *et al.* 2010). Le **récepteur scavenger A (SR-A)** et le **récepteur Macrophage receptor with collagenous structure (MARCO)** ont été identifiés comme les principaux récepteurs « scavengers » impliqués dans l'internalisation des aSNP (Chao *et al.* 2001, Hamilton *et al.* 2006, Orr *et al.* 2010, Hirai *et al.* 2012b). Dans ces études, l'internalisation des aSNP était proportionnelle à l'expression du récepteur et significativement diminuée dans les cellules où l'expression du récepteur était inhibée (Hamilton *et al.* 2006, Orr *et al.* 2010). L'étude de Hirai *et al.* a également permis de montrer que la détection des aSNP par les récepteurs « scavengers » sur les DCs favorisait la présentation croisée de l'ovalbumine en orientant son internalisation vers la voie cytosolique (Hirai *et al.* 2012b).

Les ligands détectés par les récepteurs « scavengers » de la classe A sont généralement internalisés par une endocytose médiée par les **clathrines** ou les **cavéolines** (Zhu *et al.* 2011). Plusieurs études ont effectivement montré que les aSNP étaient internalisées par ces mécanismes avec des molécules de surface préférentielles selon le type de cellules étudiées (Besic Gyenge *et al.* 2011, Wu *et al.* 2015). Des mécanismes de **phagocytose** et de **macropinocytose** ont également été évoqués pour expliquer l'internalisation cellulaire des aSNP (Besic Gyenge *et al.* 2011, Rancan *et al.* 2012, Vallhov *et al.* 2012, Winkler *et al.* 2017).

L'internalisation des aSNP semblent donc être particulièrement dépendant du type cellulaire étudié ainsi que la taille des objets internalisés. Cette internalisation des nanoparticules par les cellules de l'immunité innée pourrait déclencher différents effets immunotoxiques que nous décrirons dans les parties suivantes.

4.3.2 Les effets cytotoxiques des nanoparticules de silice amorphe

Les aSNP ont longtemps été considérées comme hautement compatibles par rapport à leur homologue cristallin. En effet, la FDA considère les aSNP comme « Generally Recognized As Safe » (GRAS) et leur cancérogénicité est « inclassable » par le CIRC. Concernant la toxicité des aSNP, plusieurs études montrent que l'exposition pulmonaire aux aSNP provoque une réponse inflammatoire réversible chez la souris (Arts *et al.* 2007, Napierska *et al.* 2010, Sun *et al.* 2016). Egalement, l'instillation intra-trachéale répétée d'aSNP pendant 3 semaines entraîne des effets pro-fibrotiques pulmonaires et un défaut de clairance aboutissant à une bio-persistence des nanoparticules dans les poumons (Sun *et al.* 2016). Au niveau de la voie orale qui est sollicitée avec l'additif E551, certaines études ont montré que l'exposition aux aSNP induisait une cytotoxicité sur les cellules intestinales (Gehrke *et al.* 2012). Des effets cytotoxiques ont également été démontrés *in vitro* après l'exposition aux aSNP notamment sur les macrophages (Kim *et al.* 2009, Nabeshi *et al.* 2011), sur les DCs (Kang et Lim 2012), sur les LC (Nabeshi *et al.* 2010b) et sur les lymphocytes (Adreeva *et al.* 2013, Rajiv *et al.* 2016). Face à la toxicité des aSNP, l'INRS (Institut National de Santé et Sécurité au Travail) a défini leurs valeurs limites d'exposition respiratoire à 10 mg/m³ d'air inspiré soit 5 mg/m³ dans la fraction alvéolaire.

4.3.3 Les effets immunoadjuvants des nanoparticules de silice amorphe

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré l'effet pro-adjuvant des aSNP sur les CPA telles que les macrophages ou les DCs qui sont les premières cellules à entrer en contact avec ces nanoparticules aux portes d'entrée de l'organisme. Tout d'abord dans les macrophages, l'exposition aux aSNP pyrogéniques et précipitées déclenchait une réponse caractérisée par une augmentation de l'expression des gènes pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF- α), une activation de l'inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) et une augmentation de la production d'ERO (Lucarelli *et al.* 2004, Park et Park 2009, Di Cristo *et al.* 2015, Yang *et al.* 2016).

Ces effets ont également été observés dans les DCs avec une augmentation de l'expression des marqueurs d'activation (CD80, CD86, CMHII) et également une activation de l'inflammasome NLRP3 (Vallhov *et al.* 2007, Winter *et al.* 2011, Vallhov *et al.* 2012, Kang et Lim 2012, Gómez *et al.* 2017). Dans les DCs, cette activation était également accompagnée d'une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF- α) (Winter *et al.* 2011, Kang et Lim 2012, Winkler *et al.* 2017). Certaines études ont également démontré que les modifications phénotypiques induites par les aSNP sur les DCs avaient un impact sur la réponse lymphocytaire T. En effet, l'étude de Vallhov *et al.* a montré que les moDCs exposées aux aSNP mésoporeuses induisaient une

augmentation des lignées LT CD4+ sécrétrices d'IFN- γ , d'IL-4 et d'IL-13 (Vallhov *et al.* 2012) et l'équipe de Chen *et al.* a montré que les DCs murines DC2.4 exposées à des aSNP modifiées (groupement alkyne, carboxyle ou hydroxyle) induisaient une augmentation des lignées LT CD8+ sécrétrices d'IFN- γ et d'IL-2 (Chen *et al.* 2014).

Au niveau des études *in vivo*, les effets pro-adjuvant des aSNP ont été montrés par plusieurs études observant une augmentation de la réaction allergique à l'ovalbumine chez la souris (Brandenberger *et al.* 2013, Shannahan et Brown 2014, Han *et al.* 2016, Toda et Yoshino 2016, Meldrum *et al.* 2017). Cette augmentation se traduisait par une augmentation du taux d'IgE circulant, par une infiltration éosinophilique ainsi que par la production de cytokines pro-inflammatoires induisant une réponse mixte Th1, Th2 et Th17. Dans ces études, la toxicité était dépendante de la taille des aSNP : les nanoparticules les plus petites avaient l'effet adjuvant le plus important (Toda et Yoshino 2016). L'effet pro-adjuvant des aSNP a également été démontré *in vivo* sur un modèle murin de dermatite atopique avec une augmentation de la sécrétion des IgE et un renforcement de la réponse lymphocytaire Th2 (Hirai *et al.* 2012a).

Le mécanisme suspecté pour expliquer l'effet adjuvant des aSNP est que ces dernières pourraient être reconnues comme un nouveau type de signal de danger appelé les **NAMP (Nanoparticle-associated Molecular Patterns)** (Fadeel 2012, Gallo et Gallucci 2013, Farrera et Fadeel 2015, Pallardy *et al.* 2017). En effet, une étude de modélisation a montré que les récepteurs TLR1, TLR2 et TLR6 exprimaient des sites d'affinités pour certaines nanoparticules (nanotubes de carbones et fullerènes) (Turabekova *et al.* 2014). Ces résultats appuyaient donc l'hypothèse que les nanoparticules pourraient être reconnues comme des signaux de danger via ces récepteurs induisant des effets pro-adjuvants. En outre, une étude sur des souris BALB/c sensibilisées à l'ovalbumine a montré que l'effet pro-adjuvant des nanoparticules d'oxyde de zinc était dépendant des récepteurs TLR 2, 4 et 6 (Roy *et al.* 2014). Dans cette étude, l'augmentation de l'expression des récepteurs TLR dans les macrophages murins était également accompagnée de l'augmentation de l'expression de l'adaptateur MyD88 dont plusieurs études ont montré l'implication dans les effets pro-inflammatoires induits par les aSNP (Roy *et al.* 2014, Winkler *et al.* 2017, Liu *et al.* 2021). Une étude récente propose un mécanisme pour expliquer l'effet signal de danger des aSNP (Liu *et al.* 2021). Dans cette étude, les aSNP induisaient une production massive d'ERO et une activation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules endothéliales de veine ombilicale ce qui déclenchait la production de la protéine HMGB1 par ces cellules. La protéine HMGB1 étant un signal de danger endogène (DAMP), sa sécrétion induisait une augmentation de l'expression des récepteurs TLR2, TLR4 et TLR9 aboutissant à l'activation de la voie de signalisation NF- κ B dépendante de l'adaptateur MyD88. Cette étude permettait donc pour la première fois d'expliquer

l'effet pro-adjuvant des aSNP par un mécanisme lié à la production de signaux de danger (Liu *et al.* 2021).

4.3.4 Les effets immunomodulateurs médiés par la corona des nanoparticules

Dans leur environnement, les nanoparticules ne restent pas sous leur forme primaire mais se recouvrent rapidement et spontanément d'une couche de protéines que l'on appelle **la corona** (Walczyk *et al.* 2010, Casals *et al.* 2010, Farrera et Fadeel 2015). La composition dynamique de cette corona influence fortement l'immunotoxicité des nanoparticules puisqu'elle constitue ce que les cellules « voient » au premier contact (Walczyk *et al.* 2010, Lundqvist *et al.* 2011, Farrera et Fadeel 2015). Les effets de la corona peuvent s'expliquer par les nouvelles propriétés physico-chimiques qu'elle confère aux nanoparticules (taille, charge, surface) (Gräfe *et al.* 2015) ou par sa composition riche en signaux de danger.

Dutta *et al.* ont ainsi montré que l'effet anti-inflammatoire des nanotubes de carbone était dû à l'albumine contenue dans la corona des nanoparticules (Dutta *et al.* 2007). En effet, cette albumine altérée/endommagée serait reconnue par les récepteurs « scavengers » déclenchant l'inhibition de la cyclo-oxygénase 2 et la diminution des effets pro-inflammatoires induits par une exposition au LPS dans la lignée RAW 264.7 (Dutta *et al.* 2007). Dans cette étude, les effets anti-inflammatoires observés étaient réversibles après inhibition de la liaison de l'albumine aux nanoparticules. La corona peut également induire des effets pro-adjuvants sur les cellules du système immunitaire. L'équipe de Deng *et al.* a ainsi démontré l'influence de la corona des nanoparticules d'or sur leur toxicité (Deng *et al.* 2011). Dans cette étude, les nanoparticules d'or adsorbaient sélectivement le fibrinogène ce qui déclenchait son dépliement. Cette conformation anormale de la protéine induisait une activation du récepteur Mac-1 sur les THP-1 et ainsi l'activation de la voie NF- κ B et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Lorsque les composants de la corona sont des signaux de danger (*e.g.* polluants, endotoxines), les nanoparticules pourraient également servir de « cheval de troie » et induire une activation directe sur les cellules de l'immunité innée (Vallhov *et al.* 2007, Fadeel 2012).

L'immunotoxicité induite par la corona des nanoparticules peut s'expliquer, dans certains cas, par une augmentation de l'internalisation cellulaire. En effet, Kapralov *et al.* ont démontré que la composition de la corona modifiait l'internalisation des nanotubes de carbone (Kapralov *et al.* 2012). L'analyse par spectrométrie de masse a montré que les nanotubes de carbone adsorbaient sélectivement deux types de phospholipides après avoir été en contact avec le liquide de lavage broncho-alvéolaire murin : la phosphatidylcholine et le phosphatidylglycérol (Kapralov *et al.* 2012). La

présence de cette corona lipidique favorisait significativement l'internalisation des nanotubes de carbone par les macrophages *in vitro* (Kapralov *et al.* 2012). Ces résultats étaient également appuyés par l'équipe de Kreuter *et al.* montrant l'influence de la corona des nanoparticules de poly(butyl cyanoacrylate) sur le passage de la barrière hémato-encéphalique. Dans cette étude, le recouvrement des nanoparticules par les apolipoprotéines B et E augmentait le passage de la barrière induisant ainsi l'effet anti-nociceptif attendu (Kreuter *et al.* 2002).

PRESENTATION DU TRAVAIL

Présentation du travail

L'objectif de ce travail a été de comprendre l'impact de l'environnement sur les mécanismes allergiques impliqués dans l'allergie aux BL. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à deux aspects de cet environnement : l'exposition environnementale et l'environnement à l'échelle cellulaire. Pour cela, notre travail s'est divisé en trois parties. Dans la première partie, nous avons étudié l'impact de l'exposition environnementale aux aSNP sur l'activation des LT CD4+ reconnaissant les BL. Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à l'environnement cellulaire et son impact sur l'orientation de la réponse lymphocytaire T CD8+ dirigée contre la BP. Enfin, dans une dernière partie, nous avons développé une approche fondée sur le poids de la preuve (weight of evidence approach) afin de déterminer le risque allergique des molécules médicamenteuses en cours de développement.

I. Etude de l'effet signal de danger des nanoparticules et leur impact sur la réponse des lymphocytes T reconnaissant les β -lactamines

Les BL représentent 75% des allergies qui surviennent à l'hôpital et 8% de la population américaine a un historique d'allergie à la pénicilline (Macy 2014, Torres *et al.* 2019, Castells *et al.* 2019). Les réactions allergiques observées s'expliquent par le fait que les BL agissent comme des haptènes et se conjuguent avec la HSA pour induire une réaction immunitaire (Yvon *et al.* 1988, Meng *et al.* 2011, Nhim *et al.* 2013, Scornet *et al.* 2016, Azoury *et al.* 2018). Cependant, la présence du bioconjugué HSA-BL seul ne permet pas d'induire la maturation des DCs. Cette maturation n'est possible qu'en présence de signaux d'alarme, appelés « signaux de danger » (Matzinger 1994, Matzinger 2002, Gallucci et Matzinger 2001) qui vont alerter les DCs sur le caractère néfaste de l'antigène détecté et la nécessité de l'éliminer. La nature de ces signaux de danger a d'ores et déjà été identifiée pour certaines molécules allergisantes comme le DNCB ou le nickel (Schmidt *et al.* 2010, Esser *et al.* 2012, Rachmawati *et al.* 2013). Néanmoins, l'origine des signaux de danger impliqués dans le déclenchement de l'allergie aux BL est encore inconnue.

L'hypothèse de ce travail est que certains signaux de danger environnementaux pourraient s'additionner à ceux de l'infection bactérienne (endotoxines, hyperthermie) et favoriser le déclenchement de l'allergie médicamenteuse. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'implication des signaux de danger a été démontrée dans plusieurs études pour expliquer le déclenchement de

l'allergie médicamenteuse (Reilly *et al.* 2000, Pirmohamed *et al.* 2002, Seguin et Uetrecht 2003, Pacitto *et al.* 2007, Ogeese *et al.* 2017). En outre, l'implication des polluants environnementaux dans le déclenchement des allergies cutanées et respiratoires a également été démontré (Nel *et al.* 1998, Pénard-Morand et Annesi-Maesano 2008, Samuelsen *et al.* 2008). L'objectif est ainsi d'étudier l'impact de polluants environnementaux sur l'immunisation dirigée contre les petites molécules et l'implication dans l'allergie, ce qui est encore peu étudié dans la littérature. Cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi la présence d'un répertoire de lymphocyte T spécifique de la BP n'est pas suffisante pour déclencher un terrain allergique chez les donneurs sains (Nhim *et al.* 2013, Azoury *et al.* 2018). Ainsi, l'allergie ne serait pas conditionnée uniquement par l'existence d'un répertoire de LT naïfs spécifiques du médicament mais également par la présence de signaux pro-adjuvants assez puissants pour déclencher une immunisation puis une réaction allergique (Pirmohamed *et al.* 2002, Seguin et Uetrecht 2003, Pacitto *et al.* 2007).

Dans cette première partie de ce travail de thèse, nous avons donc évalué l'impact de l'exposition aux aSNP, un modèle de polluant environnemental, sur l'activation du répertoire de LT CD4+ reconnaissant les BL. Comme nous l'avons vu dans les parties précédentes, ces nanoparticules sont très répandues dans l'alimentation (additif E551) et pourraient donc se retrouver en co-exposition avec les BL au niveau des DCs gastriques résidentes ou dans la circulation sanguine. Notre hypothèse est que ces nanoparticules pourraient jouer le rôle de signaux de danger en activant les DCs ce qui favoriserait le déclenchement d'une réaction immunitaire dirigée contre le médicament (Fadeel 2012, Gallo et Gallucci 2013, Farrera et Fadeel 2015, Pallardy *et al.* 2017).

Dans un premier temps, l'objectif de cette première partie a été de développer un modèle de co-culture allogénique composé de DCs et de LT CD4+ permettant d'évaluer l'effet pro-adjuvant des nanoparticules sur les DCs humaines (**Article n°1**). Nous avons ensuite utilisé le modèle développé pour mesurer le potentiel pro-adjuvant des aSNP (**Article n°2, soumis**). Nous avons pu montrer que les aSNP induisaient une augmentation de l'activation des DCs avec une augmentation de l'expression des marqueurs d'activation CD83 et CD86 ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (CXCL-8 et CXCL-12). Grâce au modèle de co-culture allogénique (**Article n°1**), nos résultats ont permis de montrer que les modifications phénotypiques induites par les aSNP sur les DCs déclenchaient une augmentation la réponse lymphocytaire T caractérisée par une augmentation de la prolifération des LT CD4+ ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-9, IL-17A et F). Afin d'étudier l'effet pro-adjuvant des aSNP dans le contexte de l'allergie médicamenteuse, nous avons ensuite développé un modèle de co-culture autologue composé de DCs exposées avec le bioconjugué HSA-BP (+/- aSNP) et de LT CD4+ naïfs. L'exposition des DCs aux aSNP induisait également une augmentation significative de l'activation des LT CD4+ naïfs reconnaissant la

BP (**Résultats complémentaires**). Nos perspectives concernant cette étude sont de comprendre si les aSNP sont capables de favoriser une orientation de la réponse lymphocytaire spécifique de la BP (Th1, Th2, Th17). D'après nos expériences préliminaires et le développement d'un modèle de co-culture non polarisé, cette augmentation de l'activation du répertoire de LT spécifiques de la BP semblerait être orientée vers une réponse pro-allergique Th2 avec une augmentation de la génération de lignées spécifiques sécrétant de l'IL-5 comparée aux lignées non exposées aux aSNP.

En résumé, cette première partie nous a permis de montrer que certains facteurs environnementaux tels que les aSNP pouvaient jouer le rôle de signal de danger et favoriser le déclenchement d'une réponse lymphocytaire pro-allergique Th2 dirigée contre le médicament. De tels effets pro-adjuvants pourraient intervenir seuls ou en effet cocktail lors de l'allergie médicamenteuse en vie réelle.

II. Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'activation des lymphocytes T CD8+ reconnaissant les β -lactamines : impact de l'environnement cellulaire

Les BL sont responsables d'allergies médicamenteuses qui peuvent être médiées par deux types de LT : les LT CD4+ et les LT CD8+ (Pichler 2003, Pichler et al. 2010, Pichler et Hausmann 2016). Récemment, l'existence d'un répertoire de LT CD4+ naïfs spécifiques de la BP conjuguée à la HSA a été démontrée (Nhim *et al.* 2013, Scornet *et al.* 2016, Azoury *et al.* 2018). Ces LT CD4+ sont suspectés d'être responsables des réactions d'hypersensibilités de type I (médiées par la sécrétion d'IgE) observées chez les patients avec des angio-oedèmes, des urticaires ou encore des chocs anaphylactiques. Lors de ces réactions, le bioconjugué extracellulaire HSA-BP est internalisé par les DCs et apprêté grâce aux protéases endosomales (*i.e.* cathepsine). Les peptides générés sont exposés via les molécules du CMH de classe II aux LT CD4+ naïfs (Nhim *et al.* 2013, Scornet *et al.* 2016, Azoury *et al.* 2018).

Néanmoins, certaines réactions allergiques graves telles que les DILI ne dépendent pas des LT CD4+ mais sont causées par les effets cytotoxiques des LT CD8+. Ces réactions sont imprévisibles et peuvent aller jusqu'à engager le pronostic vital des patients avec des hépatites fulminantes. Le mécanisme qui gouverne l'activation du répertoire de LT CD8+ et conduit à la mort des hépatocytes reste encore peu connu. L'objectif de cette deuxième partie du travail a donc été d'identifier les conditions cellulaires favorisant l'activation du répertoire de LT CD8+ cytotoxiques.

Les antigènes endogènes sont apprêtés par les DCs grâce à la voie endogène. Les peptides générés par le protéasome sont conjugués aux molécules du CMH de classe I et sont présentés aux LT CD8+. Le mécanisme par lequel les médicaments, qui sont des antigènes extracellulaires, induisent une activation des LT CD8+ est encore mal compris. Bechara *et al.* ont permis de montrer que le bioconjugué extracellulaire HSA-BP n'était pas reconnu par les LT CD8+ ce qui a permis d'exclure les mécanismes de présentation croisée (Amigorena and Savina 2010, Joffre *et al.* 2012, Bechara *et al.* 2019).

Nos résultats montrent que la molécule médicamenteuse est capable d'entrer sous sa forme libre à l'intérieur des DCs ce qui déclenche l'activation du répertoire de LT CD8+ reconnaissant la BP. Notre hypothèse est que la BP libre pourrait se conjuguer à l'intérieur des DCs ce qui déclencherait des mécanismes d'apprêtement dépendants du protéasome et une activation des LT CD8+. Nos résultats ont permis de montrer que la HSA pouvait être internalisée par les DCs aboutissant à une réaction d'hapténisation intracellulaire avec la BP libre préalablement internalisée (HSA-BP intracellulaire). Ces résultats ont été confirmés avec des modèles de co-culture autologue où les LT CD8+ reconnaissant la BP n'étaient activés qu'en présence du bioconjugué HSA-BP intracellulaire. Nos résultats de cinétique de formation du bioconjugué HSA-BP intracellulaire à l'intérieur des DCs ont confirmé que le bioconjugué se formait progressivement au bout d'une heure d'incubation dans un milieu contenant 10 mg.mL^{-1} de HSA. Nous avons également pu identifier des peptides-BP formés à l'intérieur DCs grâce à la spectrométrie de masse.

En résumé, nos résultats ont permis de montrer que l'environnement cellulaire impactait considérablement l'hapténisation intracellulaire du médicament. Lorsque les DCs sont dans un environnement riche en HSA, ce qui pourrait modéliser une présence dans le foie, l'hapténisation intracellulaire du médicament est favorisée. De ce fait, l'antigène peut être détecté comme un antigène intracellulaire et est préférentiellement orienté vers la voie endogène. Les peptides générés sont alors conjugués aux molécules du CMH I et déclenchent une activation des LT CD8+ cytotoxiques. Ces résultats pourraient ainsi permettre de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires du déclenchement des DILI induites par les BL.

III. Application du modèle d'étude aux molécules médicamenteuses en cours de développement

Les hypersensibilités médicamenteuses sont des réactions de type B qui correspondent aux réactions imprévisibles dites idiosyncratiques (Pichler 2003). Ces réactions représentent un problème de santé publique majeur car elles sont totalement indépendantes de la pharmacologie du médicament. De ce fait, elles sont rarement détectées au cours des phases non cliniques et cliniques et peuvent engendrer des arrêts tardifs du développement du médicament, des retraits d'AMM et des surcoûts liés à la prise en charge des patients affectés.

A l'aide du modèle d'étude exposé précédemment, l'objectif de cette troisième partie a été de construire une approche par le poids de l'évidence (weight of evidence approach) afin de prédire le risque allergique d'une molécule médicamenteuse en cours de développement. Cette approche nous a permis de construire le calcul d'un score allergisant en fonction du comportement de la **molécule mère A** et de son **métabolite B**. La molécule mère ne possédait pas de répertoire de LT CD4+ spécifique. En revanche, nous avons pu montrer l'existence d'un répertoire de LT CD4+ naïfs reconnaissant le **métabolite B** avec une présentation spécifique par les molécules HLA-DR. Nos résultats d'étude de l'influence du milieu cellulaire sur l'activation de ce répertoire nous ont également permis de montrer que cette activation semblait s'expliquer par la formation de bioconjugué HSA-métabolite.

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats nous ont permis de montrer un potentiel effet allergisant de la molécule médicamenteuse testée. L'allergie serait causée par son métabolite réactif (la molécule **B**) qui est capable de former un bioconjugué avec la HSA et d'activer un répertoire de LT CD4+ naïfs spécifique. Les perspectives seraient de continuer plus en profondeur dans cette étude en analysant les peptides responsables de l'activation du répertoire de LT. Ces peptides pourraient être testés ce qui permettrait de calculer un score allergisant final de la molécule médicamenteuse. Outre l'étude spécifique de cette molécule médicamenteuse, cette étude prometteuse permet d'envisager des modèles cellulaires *in vitro* permettant de prédire la survenue d'effets indésirables allergiques au cours du développement du médicament.

RESULTATS

Résultats

I. Etude de l'effet signal de danger des nanoparticules et leur impact sur la réponse des lymphocytes T reconnaissant les β -lactamines (Articles n°1 et n°2)

1.1 Article n°1 et n°2 : étude de l'effet signal de danger des nanoparticules de silice amorphe

Notre hypothèse de travail est que les facteurs environnementaux, tels que les nanoparticules, pourraient induire des effets pro-adjuvants sur le système immunitaire et favoriser le déclenchement de l'allergie aux BL.

L'objectif de l'**article n°1** (Feraý *et al.* 2020) a été de développer le modèle d'étude de l'effet pro-adjuvant des nanoparticules sur les cellules du système immunitaire. Ces effets pro-adjuvants ont d'ores et déjà été montré avec les DEP ou certaines nanoparticules (Provoost *et al.* 2009, Schanen *et al.* 2013, Shannahan et Brown 2014, Meldrum *et al.* 2017, Himly *et al.* 2017). Néanmoins, la majorité des travaux ont été conduits sur des modèles de DCs murines et se sont concentrés sur la première étape de la réponse immunitaire, c'est-à-dire l'activation des CPA telles que les macrophages ou les DCs (Winter *et al.* 2011, Kang et Lim 2012, Winkler *et al.* 2017). Cependant, l'utilisation de modèles cellulaires murins apporte un biais dans l'extrapolation des résultats à l'Homme et seul un faible nombre d'étude utilisent des modèles humains (Vallhov *et al.* 2007). De plus, l'étude exclusive des CPA est trop restreinte et ne permet pas de décrire la globalité de la réponse immunitaire qui englobe également la réponse lymphocytaire. L'**article n°1** (Feraý *et al.* 2020) a donc permis de construire un modèle de co-culture *in vitro* permettant de compléter le faible nombre d'études s'intéressant aux impacts des nanoparticules sur la réponse lymphocytaire (Vallhov *et al.* 2012, Schanen *et al.* 2013, Barillet *et al.* 2019). Grâce à ces résultats, nous avons pu démontrer que le rapport DC : LT et la durée d'incubation étaient des facteurs critiques pour l'établissement de ce modèle de co-culture. Ces deux paramètres influençaient particulièrement la variabilité inter-donneur et la prolifération basale des LT, ce qui était susceptible de masquer l'effet pro-adjuvant induit par les nanoparticules et ainsi de faire baisser la sensibilité du test. Nos résultats suggéraient un design d'étude avec au minimum trois rapports DC : LT différents sur un temps de co-culture de 5 jours afin d'obtenir la meilleure puissance du modèle.

L'objectif de l'article suivant a été d'utiliser le modèle préalablement établi pour évaluer l'effet signal de danger des aSNP sur les deux premières étapes de la réaction immunitaire (**article n°2, soumis**). En effet, la toxicité de ces nanoparticules était encore peu étudiée malgré le fait qu'elles soient largement répandues dans l'alimentation et que certains signes de toxicité aient déjà été soulevés dans la littérature, en particulier sur les réactions allergiques (Brandenberger *et al.* 2013, Shannahan et Brown 2014, Han *et al.* 2016, Toda et Yoshino 2016, Meldrum *et al.* 2017). Nos résultats ont permis de montrer que les aSNP augmentaient significativement l'activation des moDCs se traduisant par une augmentation de l'expression des marqueurs d'activation (CD86, CD83 et CXCR4) ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (CXCL-8 et CXCL-12). Le modèle de co-culture allogénique développé dans l'**article n°1** nous a ensuite permis de montrer que les modifications phénotypiques induites par les aSNP sur les DCs avaient un impact sur la réponse lymphocytaire T caractérisé par une augmentation de la prolifération des LT ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (l'IL 9 et de l'IL-17A et F). Pour conclure, ces résultats permettaient de soulever un effet pro-adjuvant des aSNP pouvant avoir un impact sur le déclenchement des réactions allergiques.

Article

How to Address the Adjuvant Effects of Nanoparticles on the Immune System

Alexia Feray ¹, Natacha Szely ¹, Eléonore Guillet ¹, Marie Hullo ¹, François-Xavier Legrand ², Emilie Brun ³, Marc Pallardy ¹ and Armelle Biola-Vidamment ^{1,*} 

¹ Université Paris-Saclay, Inserm, Inflammation, Microbiome and Immunosurveillance, 92290 Châtenay-Malabry, France; alexia.feray@universite-paris-saclay.fr (A.F.); natacha.szely@universite-paris-saclay.fr (N.S.); eleonore.guillet@universite-paris-saclay.fr (E.G.); marie.hullo@gmail.com (M.H.); marc.pallardy@universite-paris-saclay.fr (M.P.)

² Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris Sud, 92296 Châtenay-Malabry, France; francois-xavier.legrand@universite-paris-saclay.fr

³ Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie Physique, 91405 Orsay, France; emilie.brun@universite-paris-saclay.fr

* Correspondence: armelle.biola-vidamment@universite-paris-saclay.fr

Received: 31 January 2020; Accepted: 25 February 2020; Published: 28 February 2020



Abstract: As the nanotechnology market expands and the prevalence of allergic diseases keeps increasing, the knowledge gap on the capacity of nanomaterials to cause or exacerbate allergic outcomes needs more than ever to be filled. Engineered nanoparticles (NP) could have an adjuvant effect on the immune system as previously demonstrated for particulate air pollution. This effect would be the consequence of the recognition of NP as immune danger signals by dendritic cells (DCs). The aim of this work was to set up an in vitro method to functionally assess this effect using amorphous silica NP as a prototype. Most studies in this field are restricted to the evaluation of DCs maturation, generally of murine origin, through a limited phenotypic analysis. As it is essential to also consider the functional consequences of NP-induced DC altered phenotype on T-cells biology, we developed an allogeneic co-culture model of human monocyte-derived DCs (MoDCs) and CD4⁺ T-cells. We demonstrated that DC:T-cell ratios were a critical parameter to correctly measure the influence of NP danger signals through allogeneic co-culture. Moreover, to better visualize the effect of NP while minimizing the basal proliferation inherent to the model, we recommend testing three different ratios, preferably after five days of co-culture.

Keywords: amorphous silica nanoparticles; monocyte-derived dendritic cells; MoDCs; maturation; danger signal; DC:T-cell co-culture; in vitro models and methods; nanotoxicology

1. Introduction

With the widespread production and use of nanomaterials, the growing exposure of workers but also of consumers in everyday life raises concerns about potential health risks [1], strengthening the need for relevant methods to evaluate their immunosafety [2]. Assessing how engineered nanoparticles (NP) could interact with the immune system [3,4] and more specifically could promote the development of allergic diseases or exacerbate the severity of established allergic conditions is still a matter of concern. Experimental in vitro models must be developed to address and to monitor these effects [5]. The challenge is to select the most relevant cells and endpoints using a simple, robust and representative model.

Most of the work regarding NP-induced immunomodulation has been focused on the activation of key immune cells [6–8]. Innate immune cells such as macrophages and dendritic cells (DCs) are

predominantly exposed to nanomaterials due to their phagocytic properties and to their relative abundance at the entry sites such as skin, airways or the gastrointestinal tract [9]. Indeed, DCs patrolling the blood or residing in peripheral tissues actively capture NP [10].

Two main differentiation stages are currently described for DCs, namely “immature” and “mature” [11]. As sentinel cells of the innate immune system, immature DCs encounter and internalize invading pathogens, but are also tissue scavengers, capturing apoptotic or necrotic cells. Their functional maturation is a process, initiated by signals from the microenvironment and characterized by the acquisition of fundamental properties: antigen processing and presentation, migration and ability to activate antigen-specific naïve T-cells in secondary lymphoid organs. Indeed, upon maturation, DCs increase the expression of major histocompatibility complex-II (MHC-II) and co-stimulatory molecules, express higher levels of chemokine receptors and secrete cytokines, working in concert to stimulate specific immune responses. DCs maturation can be triggered by the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMP) or endogenous “danger” signals called damage-associated molecular patterns (DAMP) through a battery of pattern-recognition receptors (PRRs) expressed both outside and inside of the cells [12]. The “danger theory” was proposed by Polly Matzinger twenty-five years ago [13] to explain how the immune system could inappropriately “see” innocuous antigens such as allergens or food antigens as dangerous, even though they are not. The “danger signals” would act on DCs, in aseptic conditions, in a similar manner to the microbial molecular patterns. Therefore, the question to be addressed is whether engineered NP could act as danger signals, as previously suggested for ultrafine or diesel exhaust particles [14] and could be considered as NAMPs (nanoparticle-associated molecular patterns) [15–17].

As terminally differentiated post-mitotic cells, primary DCs isolated from blood are available in limited amounts. Because no stable cell line fully recapitulates the immunological features of primary DCs [18], studies on NP interactions with DCs use either murine bone marrow-derived DCs (BMDCs) [6,19,20] or more rarely human blood monocyte-derived DCs (MoDCs) [21–23], which can both be differentiated *in vitro* in a DC-like phenotype [24]. Extrapolation from animal to human remains challenging due to poor species overlap notably concerning toll-like receptors (TLR) expression [25]. The aim of this work was to set up a method to assess the adjuvant or “danger like” effect of NP on human DCs.

We selected amorphous silica nanoparticles (aSNP) which have been poorly studied despite a large exposure of the population through drugs, food [26] or cosmetic products. *In vitro* studies showed that airway exposure to aSNP could enhance allergen sensitization, suggesting an adjuvant potential for these NP [27,28]. So far, most of the *in vitro* studies dedicated to aSNP remained limited to the phenotype analysis of DCs [6,23,29,30]. We showed that aSNP ($12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) increased the expression of CD83, CD86 and CXCR4 markers on human DCs in a concentration-dependent manner, suggesting that these aSNP significantly affected MoDCs maturation (Feraï et al, in preparation). It is essential to consider the global adjuvant effect on the two first steps of the immune response, namely DCs activation leading to T-cell proliferation. Thus, we propose to complete these studies by developing an allogeneic co-culture model of human MoDCs and CD4+ T-cells.

This work describes the process to be followed in order to develop an *in vitro* model properly assessing the potential adjuvant effect of NP. We showed that the DC:T-cell ratios and the duration of the co-culture are critical parameters to correctly measure the influence of danger signals induced by NP in an allogeneic co-culture. To better visualize the effect of NP while keeping the basal proliferation inherent to the model as low as possible, we suggest testing at least three different ratios, preferably after five days of co-culture. We also recommend a careful selection of test concentrations based on realistic exposures and limiting cytotoxicity to maintain MoDCs function.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Materials

According to the manufacturer, the specific surface of the fumed silica NP (S5505, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), determined by BET (Brunauer-Emmett-Teller), is $196 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ (batch SLBR6988V). The NP suspension was prepared from fumed silica dry powder dispersed in filtered ultrapure water at a final concentration of $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The suspension was then left for 8 h in a water bath at 80°C to remove contaminations. Before each experiment, an intermediate dilution at a concentration of $500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ was prepared in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 medium (supplemented with Glutamax, 1 mM sodium pyruvate, $0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ streptomycin and $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ penicillin). The suspension was sonicated for 15 min prior to MoDCs treatment.

2.2. Characterization of aSNP

The hydrodynamic diameter of particles was determined at 25°C by Dynamic Light Scattering using a Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, UK) operating at a fixed scattering angle at 90° and equipped with a Helium-Neon laser source with a wavelength of 633 nm. Measurements were performed in disposable 4 mL cuvettes with a 1 cm optical pathway and four optical faces (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) containing an appropriate volume (1 mL) of the sample, prepared as described above, after dilution to $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in the desired medium. The hydrodynamic diameter values were calculated using the Stokes-Einstein equation assuming a spherical shape of the particles. The particle size profile was obtained from the intensity-weighted distribution and the hydrodynamic diameter value corresponds to the median diameter derived from the cumulative distribution curve. The ζ -potential measurements were carried out with the same instrument at 25°C by laser doppler velocimetry at a detection angle of 17° in DTS 1060 disposable cells (Malvern Instruments, Malvern, UK). Due to the ionic strength of the samples leading to high conductivity, measurements were performed using the monomodal mode and the Smoluchowski approximation was used to convert the electrophoretic mobility to ζ -potential. Values are given as mean values of ten measurements.

For transmission electron microscopy experiments, $2 \text{ } \mu\text{L}$ of $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ aqueous suspension of NP was deposited onto a formvar/carbon coated copper grid and observed using a JEOL 1400 transmission electron microscopy (TEM) instrument (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) operating at 120 kV. Analysis of recorded images was performed using the ImageJ software (1.52 version, National Institute for Health, Bethesda, MD, USA).

2.3. Endotoxin Detection

Possible endotoxin contamination (endotoxins $> 0.05 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$) was analyzed with the limulus amoebocyte lysate (LAL) assay (GenScript, Piscataway, NJ, USA).

2.4. Generation of Primary Cultures of Human Dendritic Cells

Human DCs were derived from monocytes isolated from human peripheral blood supplied by the French Blood Bank (EFS, Rungis, France). Healthy donors gave their written consent for the use of blood donation for research purposes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were sorted from buffy coats by density centrifugation on a Ficoll gradient. Monocytes were then isolated through positive magnetic selection using MidiMacs separation columns and anti-CD14+ antibodies coated on magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Finally, CD14 cells were differentiated in immature MoDCs for 4 days in RPMI 1640 supplemented with GlutaMAX (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France), 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France), $550 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rh-GM-CSF, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), $550 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ interleukin-4 (rh-IL4, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), 1 mM sodium pyruvate (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France), $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ streptomycin and $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ penicillin (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France).

2.5. Phenotypic Analysis

After 16 h of exposure to either 0, 12.5 or 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ aSNP, MoDCs were collected, washed with phosphate-buffered saline (PBS, Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France) and incubated for 20 min at 4 °C with APC-conjugated HLA-DR monoclonal antibody (mAbs) or with appropriate isotype control antibody (IgG1-APC) (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). After incubation, MoDCs were washed with PBS and then analyzed on a FACS Attune NxT[®] acoustic focusing cytometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Results were expressed as the relative fluorescence intensities (RFI) using the corrected mean fluorescence intensity (cMFI) as follows:

$$cMFI = MFI - MFI_{\text{control isotype}} \quad (1)$$

$$RFI = \frac{cMFI_{\text{treated cells}}}{cMFI_{\text{untreated cells}}} \quad (2)$$

2.6. Co-Culture of MoDCs and CD4+ T-Cells

CD4+ T cells were isolated from PBMC by positive selection using midi-MACS separation columns and anti-CD4 antibodies coated on magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) (Figure 1). These T-cells were confirmed to have a purity greater than 95%, based on CD4 expression evaluated by flow cytometry (561841, RPA-T4, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). CD4+ T lymphocytes were labeled with 0,5 mM carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen, Saint Aubin, France), following the manufacturer's instructions. MoDCs were stimulated by 0 or 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of aSNP for 16 h and then washed and co-cultured with allogeneic CD4+ T-cells at different DC:T-cell ratios for 5 or 6 days, in RPMI 1640 Glutamax supplemented with 10% FCS in round-bottom 96 well plates (Cellstar, Greiner bio-one, Courtaboeuf, France) (Figure 1). The number of T-cells (10^5 T-cells/well) remained unchanged while the number of DCs evolved for each ratio tested: 1:5 (1 DCs for 5 T-cells i.e., 20 000 MoDCs/well), 1:10 (10 000 MoDCs/well), 1:20 (5000 MoDCs/well), 1:50 (2000 MoDC/well) and 1:100 (1000 MoDC/well). Analysis of T-cell proliferation was assessed by flow cytometry, on a FACS Attune NxT[®] acoustic focusing cytometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

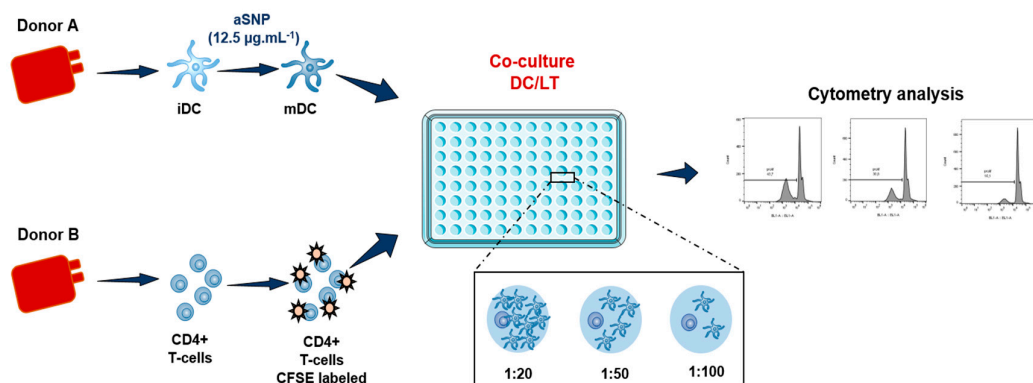


Figure 1. Allogeneic model of DCs and CD4 + T-cells co-culture with the different ratios tested. Cells are incubated in presence or absence of 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of aSNP for 16 h. Treated MoDCs are co-cultured with allogeneic CD4+ T-cells labeled with CFSE at a ratio of 1:20 (1 MoDC for 20 CD4+ T-cells), 1:50 and 1:100). Proliferation is quantified after 5 or 6 days of co-culture as the percentage of CFSE^{low} CD4+ T-cells.

3. Results and Discussion

3.1. Characterization of Amorphous Silica Nanoparticles

We used commercial amorphous silica NP supplied by Sigma–Aldrich (S5505). This fumed silica nanopowder is presented by the manufacturer as having an average primary particle size of 14 nm and a surface area of $200 \pm 25 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. A precise characterization of the size, spherical shape and homogeneity of the fumed silica in water was carried out by transmission electron microscopy (TEM). The particles form branched, three-dimensional chain-like aggregates of variable lengths (Figure 2). The main characteristics of aSNP used in this study are summarized in Table 1.

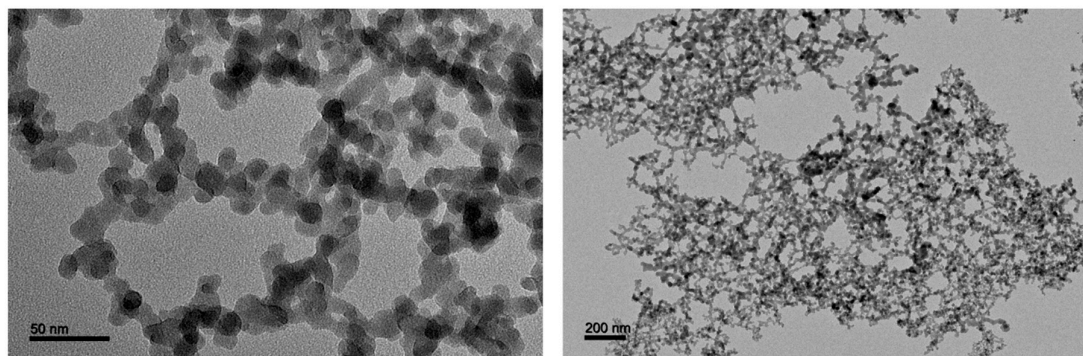


Figure 2. Typical TEM images of unstained fumed silica nanoparticles suspended in water. Aqueous suspension of nanoparticles was deposited onto a formvar/carbon coated copper grid and observed using a JEOL 1400 TEM instrument operating at 120 kV. Analysis of recorded images was performed using ImageJ 1.52 software.

Table 1. Characteristics of aSNP.

Reference	Specific Surface Area ¹	Nominal Primary Particle Diameter ¹	Primary Particle Diameter ²	DLS Distribution ³	ζ-Potential Value ³
S5505, Sigma-Aldrich (batch SLBR6988V)	$196 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	14 nm	$14.4 \pm 4.3 \text{ nm}$	$201 \pm 22 \text{ nm}$ $9.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$	$-26.5 \pm 2.1 \text{ mV}$

¹ Data provided by the supplier, ² Analyzed by TEM, ³ in RPMI 1640

Endotoxin levels were systematically measured for each particle preparation with the limulus amoebocyte lysate (LAL) assay to ensure that the effects measured were not attributable to this contaminant [31]. All the batches tested ($n = 8$) showed values below the threshold of positivity ($0.05 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$).

3.2. Assessing the Effects of Amorphous Silica Nanoparticles on the Expression of Major Histocompatibility Complex Class II and co-stimulatory Molecules in Human Dendritic Cells

We conducted this study using human DCs, which represent the most efficient antigen presenting cells in capturing, processing and presenting antigens for lymphocyte activation. To avoid interspecies variability, we chose human MoDCs, which can be differentiated in vitro in a DC-like phenotype in the presence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-4 [24]. The GM-CSF in vitro cultured DCs is the most common and recognized DCs type used in studies of human DCs biology. These cells show similarities in physiology, morphology, and function to conventional myeloid DCs.

Immature DCs (iDCs) display a phenotype characterized by low surface expression of MHC-II molecules and co-stimulatory molecules such as CD80, CD86 and CD40 [32]. When detecting molecular patterns identified as danger signals, DCs undergo a program of maturation resulting in morphological and phenotypical changes. If in vitro immature DCs exhibit a round shape and a smooth membrane, mature DCs gain a rough surface with multiple dendrites and pseudopodia [33], as shown in Figure S1

in presence of aSNP. Moreover, scattering of light can be used to measure volume (by forward scatter) and morphological complexity (by side scatter) of cells by flow cytometry. These parameters are conventionally abbreviated as FSC and SSC respectively. Representative FSC and SSC density plots are presented on Figure S1b and illustrate a slight increase in SSC in presence of aSNP or with LPS, consistent with MoDCs activation. MHC-II and co-stimulatory molecules are upregulated at the cell surface. New interleukin and chemokine receptors are also expressed allowing T-cell stimulation and improving their ability to migrate to secondary lymphoid tissues [11].

Our goal was first to define the appropriate readouts and settings to evaluate MoDCs maturation. In a preliminary work, we selected the incubation time and concentrations to be tested based on cytotoxicity assays. Considering that NP could have the potential to alter immune cell responses at concentrations far below those inducing cytotoxicity, and that functional assays need to be conducted on viable cells, we defined a threshold of 30% cytotoxicity not to be exceeded. Given the cytotoxicity of aSNP and the short moDCs lifespan in vitro, incubation times longer than 24 h wouldn't be achievable. Indeed, following their activation, DCs are known to progress toward apoptotic cell death. Typical incubation times to assess DCs phenotype range from overnight (approximately 16 h) to 24 h [6,29]. We chose a 16-h incubation time which allowed to evidence a significant effect of NP on DCs phenotype while complying with the 30% cytotoxicity threshold limit, in order to maintain their ability to activate an effective immune response.

According to the literature, the expression of co-stimulatory molecules such as CD40, CD80 and CD86 is frequently used as a marker of successful MoDCs maturation [7,20–23]. These markers have also emerged as the most relevant in our experiences. CD83 is recognized as a surface marker that distinguishes immature and mature human DCs populations and is considered as one of the best markers for identifying mature dendritic cells [34]. HLA-DR can also be used as an indicator of the iDC maturation process. Interestingly, the expression of the results as a percentage of positive cells (Figure 3a) may not allow to evidence the increase in HLA-DR expression, as also observed by Vallhov et al [21]. A high expression of MHC-II molecules is inherent to the MoDCs model [11]. Hence, it appears necessary to present the results as RFIs instead of the percentage of positive cells (Figure 3b). Indeed, RFIs allowed us to show that aSNP induced a significant increase in MHC-II molecules expression at $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figure 3b).

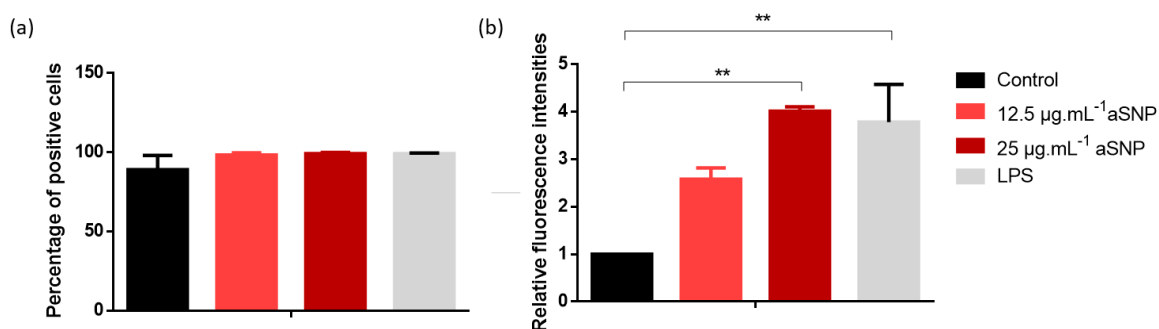


Figure 3. Nanoparticles induced HLA-DR expression. Cells were incubated in the presence or absence of LPS as a positive control, or 12.5 and $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of aSNP for 16 h. Cells were then collected, washed and the surface expression of HLA-DR was assessed by FACS analysis. Untreated DCs were used as negative control. Results are expressed as percentage of positive cells (a) or relative fluorescence intensities (b) and represented the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. Tukey's honest significance test was employed in conjunction with One-Way ANOVA **: $p < 0.01$.

We established, using the panel presented above, that aSNP ($12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) dose-dependently increased the expression of CD83, CD86 and CXCR4 markers on human MoDCs (Feraý et al., in preparation), suggesting that cells could be in a relatively mature state after the incubation with NP.

3.3. Assessing the Effect of Dendritic Cells Treated with Amorphous Silica Nanoparticles on Allogeneic T-Cell Proliferation

3.3.1. Influence of DC:T-Cell Ratios on T-Cell Proliferation

Due to their phenotypic modifications, mature MoDCs can become immunogenic and promote the proliferation of CD4⁺ T-cells. To evaluate the impact of MoDCs maturation on the lymphocyte response, we developed a human mixed lymphocyte reaction (MLR) assay consisting in co-culturing CD4⁺ T-cells with allogeneic MoDCs. The MLR provides a simple and efficient in vitro model in the area of cellular immunology for the study of T-cell activation and proliferation. Specifically, we tested several DC:T-cell ratios in order to optimize the sensitivity of the method. Indeed, although co-stimulatory molecules and cytokines are known to be a prerequisite for productive DC-T-cell interactions, the ratio of stimulating DCs and responding T-cells is also known to influence T-cell responses in vitro [35].

To avoid excessive cytotoxicity, MoDCs were stimulated or not with the lowest concentration of aSNP ($12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 16 h and then washed and co-cultured with allogeneic CD4⁺ T-cells labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) at various DC:T-cell ratios. Proliferation was assessed after six days of co-culture as the percentage of CFSE^{low} CD4⁺ T-cells (Figure 4). We first evaluated the influence of the following DC:T-cell ratios: 1:5 (corresponding to 1 MoDC per 5 T-cells), 1:10 (1 MoDC per 10 T-cells) and 1:20 (1 MoDC per 20 T-cells) (Figure 4).

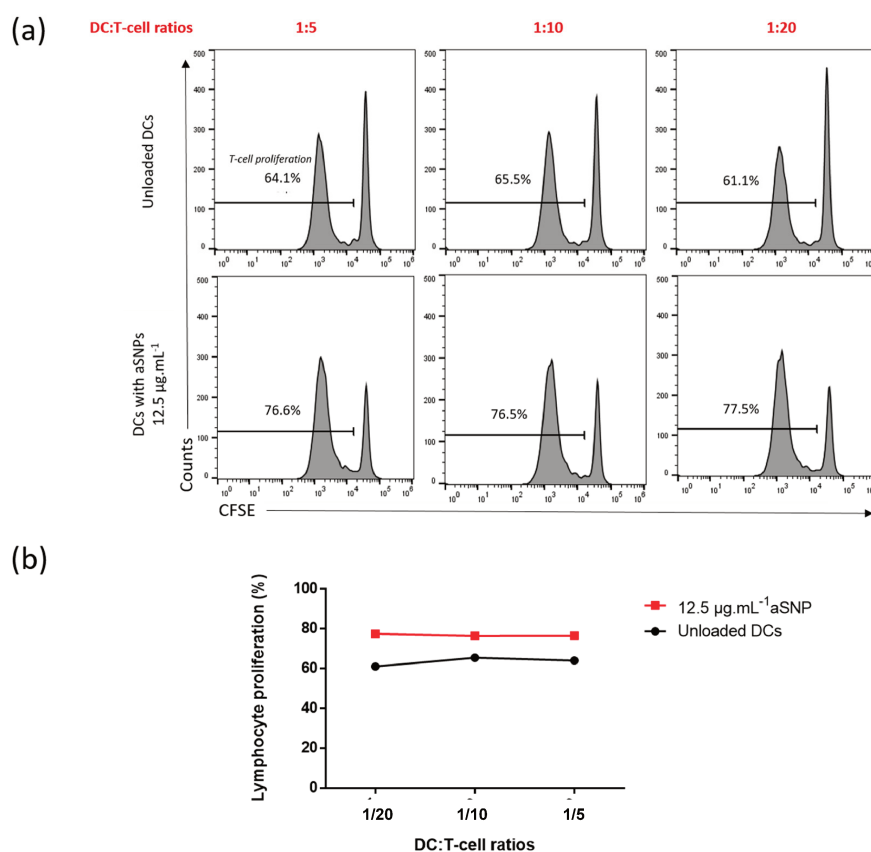


Figure 4. Lymphocyte proliferation reached a plateau at high ratios after 6 days of co-culture. Cells were incubated in the presence or absence of $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of aSNP for 16 h. Treated MoDCs were co-cultured with allogeneic CD4⁺ T-cells labeled with CFSE at the ratios of 1:5 (1 MoDC per 5 CD4⁺ T-cells), 1:10 and 1:20). Proliferation was quantified after 6 days of co-culture as the percentage of CFSE^{low} CD4⁺ T-cells. Untreated DCs were used as negative control. Results are shown as percentage of lymphocyte proliferation using FACS histogram (a) or curve (b) for a representative experiment.

Allogeneic MoDCs induced basal T-cell proliferation ranging from 61.1% to 64.1% at the highest ratio of 1:5 (Figure 4a). In presence of aSNP, the T-lymphocyte proliferation slightly increased, reaching a maximal value around 77%, regardless of the ratio tested (Figure 4). We could clearly visualize (Figure 4b) that at the high ratios of 1:5 and 1:10, T-cell proliferation reached a plateau. These results suggest that, considering the nature of the DCs stimulation, a high stimulator/responder ratio leads to a saturation in T-cell proliferation masking the NP effect, as also observed with carbon black NP [19]. In the following experiments, we decided to decrease DC:T-cell ratios, to reduce T-cell proliferation below this saturation threshold and increase the sensitivity of the method.

To tackle this issue, we kept the 1:20 ratio that emerged as the most appropriate in the previous experience and added the 1:50 (1 MoDC per 50 T-cells) and 1:100 (1 MoDC per 100 T-cells) ratios (Figure 5). First, we observed that reducing the DC:T-cell ratios from 1:20 to 1:100 decreased the basal proliferation from 74.4% to 44.9% (Figure 5a). With the latter value being far below the saturation threshold, the effect of NP on T-cell proliferation was better assessed. Indeed, at the ratio of 1:20 the NP-induced proliferation increase was about 7.9% whereas it reached 19.2% for the 1:100 ratio (Figure 5a). With this latter ratio, the sensitivity noticeably increased (Figure 5b).

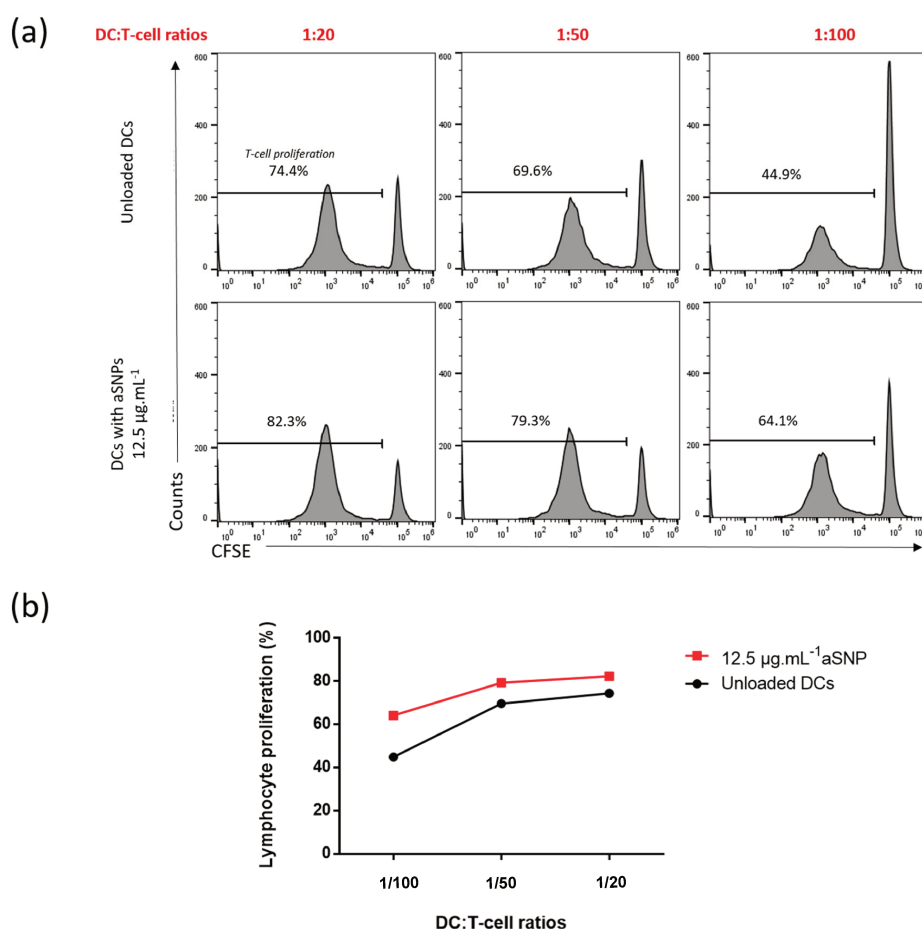


Figure 5. Low ratios allowed a better visualization of the increase in lymphocyte proliferation after 6 days of co-culture. Cells were incubated in the presence or absence of 12.5 µg.mL⁻¹ of aSNP for 16 h. Treated MoDCs were co-cultured with allogeneic CD4⁺ T-cells labeled with CFSE at a ratio of 1:20 (1 moDC for 20 CD4⁺ T-cells), 1 :50 and 1 :100). Proliferation was quantified after 6 days of co-culture as the percentage of CFSE^{low} CD4⁺ T-cells. Untreated DCs were used as negative control. Results are shown as percentage of lymphocytes proliferation using FACS histogram (a) or curve (b) for a representative experiment.

Altogether, these results underline the importance of systematically testing at least three ratios for each experiment. These observations also demonstrate the interest of low ratios. There are only few studies using the co-culture of T-cells and DCs to assess the functional DCs maturation in presence of NP, concerning carbon black [19] and CeO₂/TiO₂ [23] NP. Koike et al. [19] demonstrated that murine BM-DC treated with carbon black NP could enhance T-cell proliferation in a MLR-test. The authors used two ratios: 1.25% (2.5×10^3 DC for 2×10^5 T cells) and 2.5% (5×10^3 DC for 2×10^5 T cells) which reached a saturation threshold, especially for 56 nm carbon black NP [19]. A third ratio, for example 5%, would have probably increased the sensitivity of the method. Schanen et al. [23] used human DCs and naive T-cells with a single optimized ratio of 1:400. They observed that TiO₂ NP had a modest immunostimulatory effect on T-cells, leading them to the co-administration of the mitogens PHA and PMA, to increase the proliferative response. This low response to the NP alone, which could be attributed to the use of naive T-cell, would have warranted, as suggested above, to test more ratios including a higher relative amount of stimulator cells.

3.3.2. Influence of the co-Culture Duration on T-Cell Proliferation and Assessment of Nanoparticles Effects

Although the interaction between DCs and T-cells under physiological conditions is unlikely to be as static and long lasting as in cell culture plates, the in-depth review of the literature led us to test 2 different co-culture durations which are commonly used to study T cell activation by the mixed-leukocyte-reaction [22,23,36]. As suggested above, reducing the basal T-cell proliferation improved the sensitivity of the model. To further decrease this proliferation, we decided to reduce the co-culture duration from six to five days (Figure 6). We retained the three ratios selected above which proved to be effective in detecting NP-induced T-cell proliferation (1:100, 1:50 and 1:20). Interestingly, in comparison to what was observed at day 6 (D6), allogeneic MoDCs induced a lower basal proliferation at day 5 (D5), ranging from 16.1 to 43.7% (Figure 6a). The ratio 1:100 allowed to substantially reduce the proliferation to 16.1% after five days of co-culture compared to 44.9% after six days. Consequently, T-cells showed a strong proliferative response when MoDCs were stimulated with aSNP (Figures 6a and 5b). If the NP-induced proliferation increase was already observable after 6 days of co-culture (Figure 5), it seemed clearly more pronounced after five days (Figure 6b), reaching a value of about 30% for both ratios 1:50 and 1:100. The five days co-culture setting allowed to significantly increase the sensitivity for detecting NP effects using this co-culture model.

To better visualize the effect of NP in our experiments, we calculated the differences between proliferations obtained with unloaded DCs and with aSNP-loaded DCs, after five (D5) or six days (D6) of co-culture. The results obtained in three independent experiments are shown in Figure 7. We observed that the differences in proliferation were evidenced in both culture conditions, albeit at a higher level at D5 than at D6, confirming the results showed previously in a representative experiment (Figure 6). This way of representing the results is particularly illustrative of the improvement brought by the reduction in co-culture time. Moreover, these results emphasize once again the importance of considering a range of ratios. To conclude, we recommend selecting the five-days co-culture conditions, and to test at least three different ratios to assess the adjuvant effect of NP.

The present study demonstrates that the MLR-induced T-cell proliferation assay is suitable for the evaluation of the immunomodulatory potential of NP. Nevertheless, the main drawback when using *ex vivo* differentiated human primary DCs is the donor-to-donor variability [8]. The heterogeneity of haplotypes between DCs and T-cells donors may lead to elevated basal proliferation that can even mask the adjuvant effect of NP. Moreover, in addition to unavoidable variations in cell yield, we clearly observed a donor-dependent fluctuation in MoDCs activation, depending on the donor's health, quality of life and even seasons. For all these reasons, it was essential to optimize the experimental conditions to minimize this variability, particularly by reducing the co-culture time and the DC:T-cell ratios. It appears also essential to carry out the experiments on at least three to five different donors.

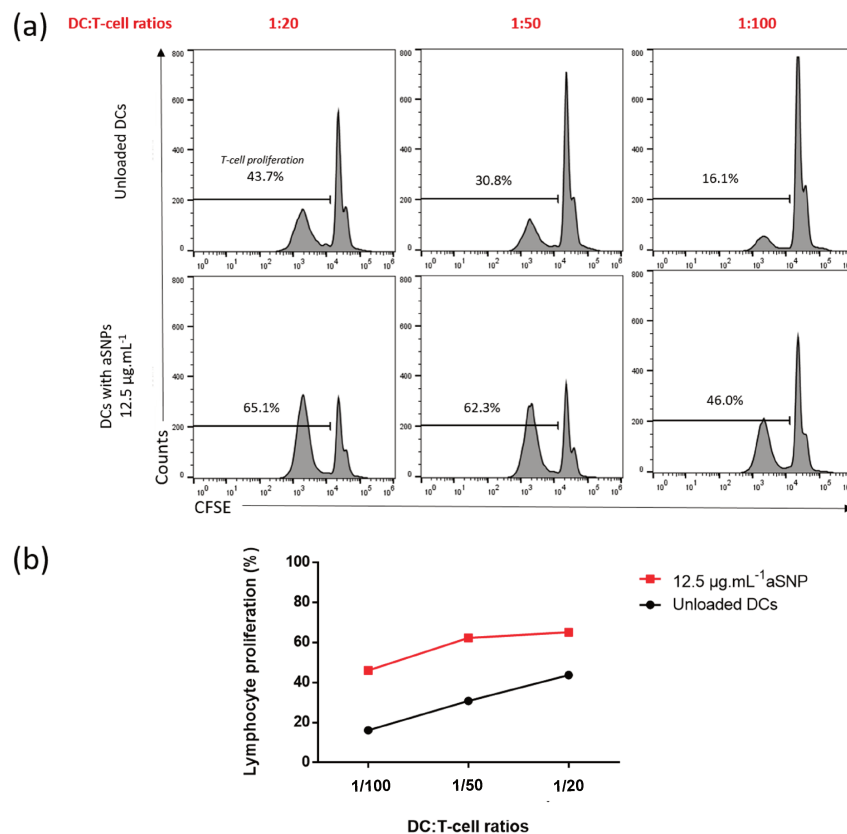


Figure 6. aSNP induced an increase in lymphocyte proliferation after 5 days of co-culture. Cells were incubated in the presence or absence of $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of aSNP for 16 h. Treated MoDCs were co-cultured with allogeneic CD4⁺ T-cells labeled with CFSE at ratios of 1:20 (1 moDC for 20 CD4⁺ T-cells), 1:50 and 1:100). Proliferation was quantified after 5 days of co-culture as the percentage of CFSE^{low} CD4⁺ T-cells. Untreated DCs were used as negative control. Results are shown as percentage of lymphocyte proliferation using FACS histogram (a) or curve (b) for a representative experiment.

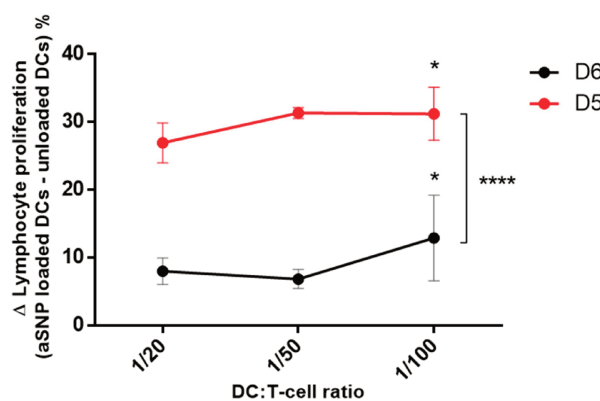


Figure 7. The 5-days incubation period is optimal to highlight lymphocyte proliferation augmentation induced by aSNP. Cells were incubated in the presence or absence of $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of aSNP for 16 h. Treated MoDCs were co-cultured with allogeneic CD4⁺ T-cells labeled with CFSE at ratios of 1:20 (1 moDC for 20 CD4⁺ T-cells), 1 :50 and 1 :100). Proliferation was quantified after 5 or 6 days of co-culture as the percentage of CFSE^{low} CD4⁺ T-cells. Untreated DCs were used as negative control. Results are showed as the Δ (aSNP loaded DC-unloaded DCs), corresponding to the proliferation of NP-treated DCs-proliferation of untreated DCs, and represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. Tukey's honest significance test was employed in conjunction with Two-way ANOVA *: statistically significant compared to 1:20 ratio with $p < 0.05$, ****: $p < 0.0001$.

4. Conclusions

Our human allogeneic model of co-culture allows to show the pro-adjuvant effect of aSNP at the two first steps of the immune response: DCs activation and T-cell proliferation. These findings highlight the importance of assessing NP effects on immune cell function beyond the standard endpoints such as oxidative stress or cytotoxicity. As a result, it seems essential to complete the phenotypic characterization of DCs maturation by a functional test exploring their ability to promote the proliferation of CD4⁺ T-cells. We propose a five-days co-culture including a wide range of ratios, from 1:5 to 1:100, in order to minimize basal proliferation values and to avoid the proliferation saturation that would prevent the effect of NP from being detected.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2079-4991/10/3/425/s1>, Figure S1. Morphological and dimensional modifications of dendritic cells in presence of amorphous silica nanoparticles.

Author Contributions: Conceptualization, M.P. and A.B.-V.; Formal analysis, A.F.; Funding acquisition, M.P.; Investigation, A.F., E.G., M.H., F.-X.L. and E.B.; Methodology, N.S.; Supervision, M.P. and A.B.-V.; Writing—original draft, A.F. and A.B.-V.; Writing—review & editing, N.S. and M.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by INSERM institutional grants and the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of ANSES (PNREST 2015/032, Silimmun Grant).

Acknowledgments: Alexia Feray and Eléonore Guillet were fellows of DIM Qi2 (Réseau de recherche Qualité de l'air en Ile-de-France). This work was supported by Paris Region in the framework of DIM Qi2. The authors thank Myriam Nabhan for her valuable help in the microscopy experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Shannahan, J.H.; Brown, J.M. Engineered nanomaterial exposure and the risk of allergic disease. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *14*, 95–99. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Oostingh, G.J.; Casals, E.; Italiani, P.; Colognato, R.; Stritzinger, R.; Ponti, J.; Pfaller, T.; Kohl, Y.; Ooms, D.; Favilli, F.; et al. Problems and challenges in the development and validation of human cell-based assays to determine nanoparticle-induced immunomodulatory effects. *Part Fibre Toxicol.* **2011**, *8*, 8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Boraschi, D.; Italiani, P.; Palomba, R.; Decuzzi, P.; Duschl, A.; Fadeel, B.; Moghimi, S.M. Nanoparticles and innate immunity: New perspectives on host defence. *Semin. Immunol.* **2017**, *34*, 33–51. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Drasler, B.; Sayre, P.; Steinhauser, K.G.; Petri-Fink, A.; Rothen-Rutishauser, B. In vitro approaches to assess the hazard of nanomaterials. *NanoImpact* **2017**, *8*, 99–116. [\[CrossRef\]](#)
- Najafi-Hajivar, S.; Zakeri-Milani, P.; Mohammadi, H.; Niazi, M.; Soleymani-Goloujeh, M.; Baradaran, B.; Valizadeh, H. Overview on experimental models of interactions between nanoparticles and the immune system. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *83*, 1365–1378. [\[CrossRef\]](#)
- Winter, M.; Beer, H.D.; Hornung, V.; Kramer, U.; Schins, R.P.; Forster, I. Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO₂ nanoparticles in murine dendritic cells. *Nanotoxicology* **2011**, *5*, 326–340. [\[CrossRef\]](#)
- Deville, S.; Bare, B.; Piella, J.; Tirez, K.; Hoet, P.; Monopoli, M.P.; Dawson, K.A.; Puentes, V.F.; Nelissen, I. Interaction of gold nanoparticles and nickel(II) sulfate affects dendritic cell maturation. *Nanotoxicology* **2016**, *10*, 1395–1403. [\[CrossRef\]](#)
- Pfaller, T.; Colognato, R.; Nelissen, I.; Favilli, F.; Casals, E.; Ooms, D.; Leppens, H.; Ponti, J.; Stritzinger, R.; Puentes, V.; et al. The suitability of different cellular in vitro immunotoxicity and genotoxicity methods for the analysis of nanoparticle-induced events. *Nanotoxicology* **2010**, *4*, 52–72. [\[CrossRef\]](#)
- Lambrecht, B.N. Dendritic cells and the regulation of the allergic immune response. *Allergy* **2005**, *60*, 271–282. [\[CrossRef\]](#)
- Oberdorster, G.; Oberdorster, E.; Oberdorster, J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113*, 823–839. [\[CrossRef\]](#)

11. Lutz, M.B.; Schuler, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: Which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* **2002**, *23*, 445–449. [[CrossRef](#)]
12. Gallo, P.M.; Gallucci, S. The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **1994**, *12*, 991–1045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. de Haar, C.; Kool, M.; Hassing, I.; Bol, M.; Lambrecht, B.N.; Pieters, R. Lung dendritic cells are stimulated by ultrafine particles and play a key role in particle adjuvant activity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2008**, *121*, 1246–1254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Fadeel, B. Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune system. *Swiss Med. Wkly.* **2012**, *142*, w13609. [[CrossRef](#)]
16. Pallardy, M.J.; Turbica, I.; Biola-Vidamment, A. Why the Immune System Should Be Concerned by Nanomaterials? *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 544. [[CrossRef](#)]
17. Vita, A.A.; Royse, E.A.; Pullen, N.A. Nanoparticles and danger signals: Oral delivery vehicles as potential disruptors of intestinal barrier homeostasis. *J. Leukoc. Biol.* **2019**, *106*, 95–103. [[CrossRef](#)]
18. van Helden, S.F.; van Leeuwen, F.N.; Figdor, C.G. Human and murine model cell lines for dendritic cell biology evaluated. *Immunol. Lett.* **2008**, *117*, 191–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Koike, E.; Takano, H.; Inoue, K.; Yanagisawa, R.; Kobayashi, T. Carbon black nanoparticles promote the maturation and function of mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Chemosphere* **2008**, *73*, 371–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Zhu, R.; Zhu, Y.; Zhang, M.; Xiao, Y.; Du, X.; Liu, H.; Wang, S. The induction of maturation on dendritic cells by TiO₂ and Fe₃O₄@TiO₂ nanoparticles via NF-kappaB signaling pathway. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2014**, *39*, 305–314. [[CrossRef](#)]
21. Vallhov, H.; Gabrielsson, S.; Stromme, M.; Scheynius, A.; Garcia-Bennett, A.E. Mesoporous silica particles induce size dependent effects on human dendritic cells. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3576–3582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Barillet, S.; Fattal, E.; Mura, S.; Tsapis, N.; Pallardy, M.; Hillaireau, H.; Kerdine-Romer, S. Immunotoxicity of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Influence of surface properties on dendritic cell activation. *Nanotoxicology* **2019**, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hargadon, K.M. Murine and Human Model Systems for the Study of Dendritic Cell Immunobiology. *Int. Rev. Immunol.* **2016**, *35*, 85–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Perkins, D.J.; Vogel, S.N. Inflammation: Species-specific TLR signalling—Insight into human disease. *Nat. Rev.* **2016**, *12*, 198–200. [[CrossRef](#)]
25. Younes, M.; Aggett, P.; Aguilar, F.; Crebelli, R.; Dusemund, B.; Filipič, M.; Frutos, M.J.; Galtier, P.; Gott, D.; Gundert-Remy, U.; et al. Re-evaluation of silicon dioxide (E 551) as a food additive. *EFSA J.* **2018**, *16*. [[CrossRef](#)]
26. Brandenberger, C.; Rowley, N.L.; Jackson-Humbles, D.N.; Zhang, Q.; Bramble, L.A.; Lewandowski, R.P.; Wagner, J.G.; Chen, W.; Kaplan, B.L.; Kaminski, N.E.; et al. Engineered silica nanoparticles act as adjuvants to enhance allergic airway disease in mice. *Part Fibre Toxicol.* **2013**, *10*, 26. [[CrossRef](#)]
27. Han, H.; Park, Y.H.; Park, H.J.; Lee, K.; Um, K.; Park, J.W.; Lee, J.H. Toxic and adjuvant effects of silica nanoparticles on ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice. *Respir. Res.* **2016**, *17*, 60. [[CrossRef](#)]
28. Kang, K.; Lim, J.S. Induction of functional changes of dendritic cells by silica nanoparticles. *Immune Netw.* **2012**, *12*, 104–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Winkler, H.C.; Kornprobst, J.; Wick, P.; von Moos, L.M.; Trantakis, I.; Schraner, E.M.; Bathke, B.; Hochrein, H.; Suter, M.; Naegeli, H. MyD88-dependent pro-interleukin-1beta induction in dendritic cells exposed to food-grade synthetic amorphous silica. *Part Fibre Toxicol.* **2017**, *14*, 21. [[CrossRef](#)]
30. Schanen, B.C.; Das, S.; Reilly, C.M.; Warren, W.L.; Self, W.T.; Seal, S.; Drake, D.R., 3rd. Immunomodulation and T helper TH₁/TH₂ response polarization by CeO₂ and TiO₂ nanoparticles. *PLoS ONE* **2013**, *3*, e62816. [[CrossRef](#)]
31. Li, Y.; Fujita, M.; Boraschi, D. Endotoxin Contamination in Nanomaterials Leads to the Misinterpretation of Immunosafety Results. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 472. [[CrossRef](#)]
32. Tan, J.K.; O'Neill, H.C. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J. Leukoc. Biol.* **2005**, *78*, 319–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Kim, M.K.; Kim, J. Properties of immature and mature dendritic cells: Phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. *Rsc Adv.* **2019**, *9*, 11230–11238. [[CrossRef](#)]
34. Aerts-Toegaert, C.; Heirman, C.; Tuybaerts, S.; Corthals, J.; Aerts, J.L.; Bonehill, A.; Thielemans, K.; Breckpot, K. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37*, 686–695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hopken, U.E.; Lehmann, I.; Droese, J.; Lipp, M.; Schuler, T.; Rehm, A. The ratio between dendritic cells and T cells determines the outcome of their encounter: proliferation versus deletion. *Eur. J. Immunol.* **2005**, *35*, 2851–2863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Gallais, Y.; Szely, N.; Legrand, F.X.; Leroy, A.; Pallardy, M.; Turbica, I. Effect of growth hormone and IgG aggregates on dendritic cells activation and T-cells polarization. *Immunol Cell Biol* **2017**, *95*, 306–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

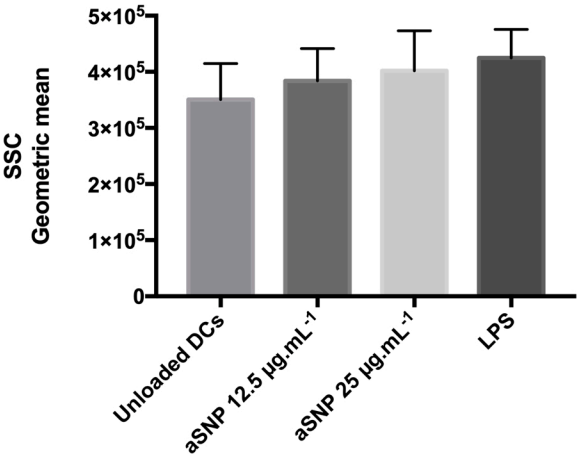
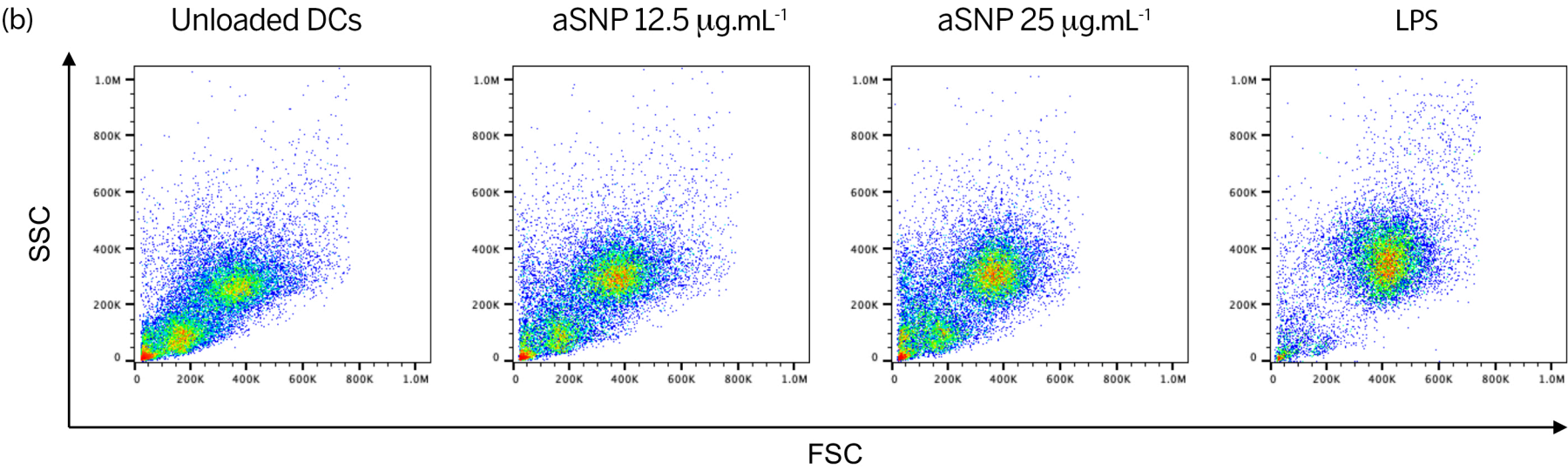
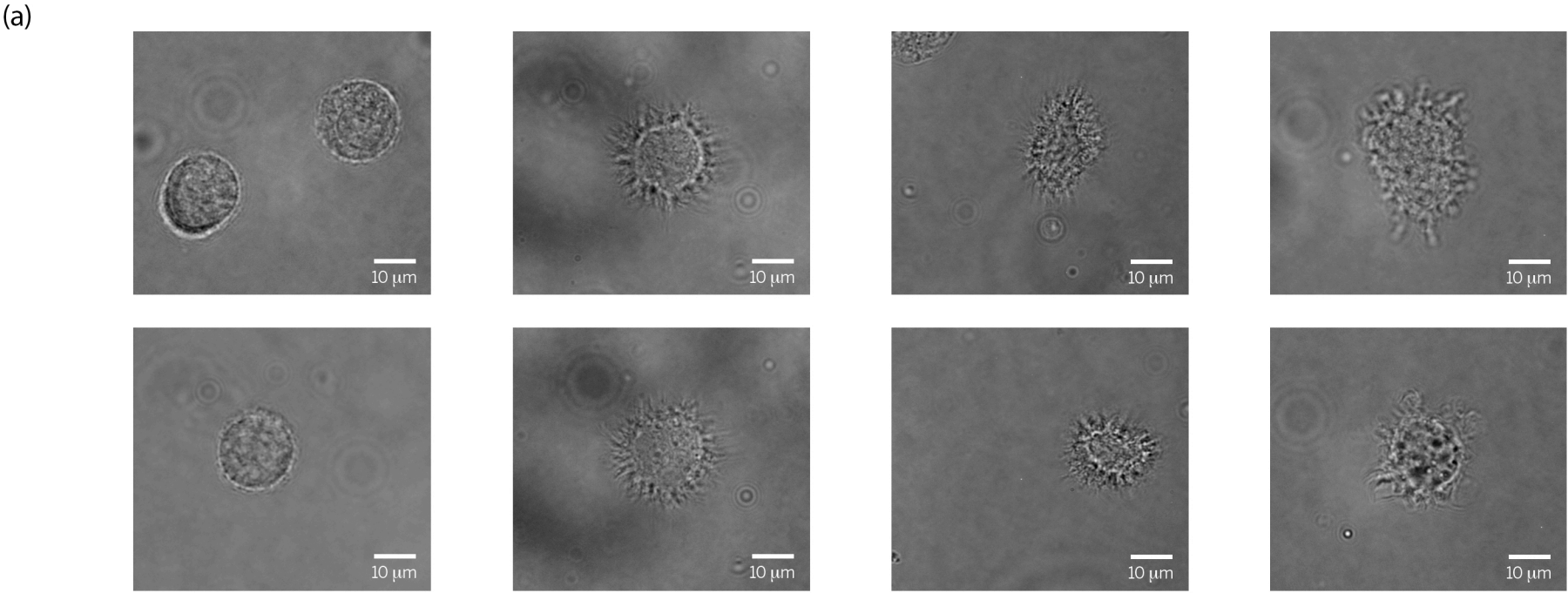


Figure S1. Morphological and dimensional modifications of dendritic cells in presence of amorphous silica nanoparticles.
(a) Cells were incubated in the presence or absence of LPS as a positive control, or 12.5 and 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of aSNP for 16 hours. Cells were then collected, washed with PBS and analyzed with the Nikon Eclipse 280i microscope using the x100 objective.
(b) Cells were treated as in (a) and analysed by FACS. Representative FSC and SSC density plots. The results of four independent experiments are presented on the right panel.

Amorphous silica nanoparticles trigger human dendritic cell maturation and CD4 + T-lymphocyte activation

Journal:	<i>Toxicological Sciences</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Feray, Alexia; Université Paris-Saclay, Inserm, Inflammation microbiome immunosurveillance Hullo, Marie; Université Paris-Saclay, Inserm, Inflammation microbiome immunosurveillance Guillet, Eléonore; Université Paris-Saclay, Inserm, Inflammation microbiome immunosurveillance Szely, Natacha; Université Paris-Saclay, Inserm, Inflammation microbiome immunosurveillance Legrand, François-Xavier; Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris-Saclay Brun, Emilie; Université Paris-Saclay UFR Sciences, CNRS, Institut de Chimie Physique Rabilloud, Thierry; CEA de Grenoble, IRIG/CBM, UMR CNRS 5249 Pallardy, Marc; INSERM, University Paris-Sud, UMR S 996 Biola-Vidamment, Armelle; Université Paris-Saclay, Inserm, Inflammation microbiome immunosurveillance
Category - Please select one category that is most applicable to your manuscript.:	Nanotoxicology
Key Words:	amorphous silica nanoparticles, dendritic cells, danger signal, T-lymphocytes, Immunotoxicology

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

Amorphous silica nanoparticles trigger human dendritic cell maturation and CD4 + T-lymphocyte activation

Alexia Feray¹, Marie Hullo¹, Eléonore Guillet¹, Natacha Szely¹, François-Xavier Legrand², Emilie Brun³,
Thierry Rabilloud⁴, Marc Pallardy¹ and Armelle Biola-Vidamment^{1,*}

1. Université Paris-Saclay, Inserm, Inflammation, Microbiome and Immunosurveillance, 92290, Châtenay-Malabry, France.
2. Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris Saclay, 92296, Châtenay-Malabry, France
3. Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie Physique, 91405, Orsay, France.
4. UMR CNRS 5249, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, CEA-Grenoble, 17 avenue des Martyrs, 38 054 Grenoble Cedex 09, France.

***Corresponding author:** Armelle Biola-Vidamment, INSERM UMR-996, Faculté de pharmacie, Université Paris-Saclay, 5 rue JB Clément, 92296 Châtenay-Malabry cedex, France. Phone: 33-1 46 83 59 80. Fax: 33-1 46 83 54 96. E-mail: armelle.biola-vidamment@universite-paris-saclay.fr.

Keywords amorphous silica nanoparticles, dendritic cells, danger signal, T-lymphocytes, immunotoxicology.

Running head Amorphous SiO₂ nanoparticles activate human dendritic cells

Abstract

Innate immune cells such as dendritic cells (DCs) sense and engulf nanomaterials, eliciting potentially an adverse and unexpected immune response. Indeed, nanomaterials, as previously described for combustion-derived particles, can be recognized as danger signals, enabling DCs to undergo a maturation process, to migrate to regional lymph nodes and to activate naive T-lymphocytes. Amorphous silica nanoparticles (aSNP) are widely used as food additives, cosmetics or construction materials. We hypothesized that aSNP could participate to the onset of allergic reactions through dendritic cells targeting. The aim of this work was to evaluate *in vitro* the effects of aSNP on human DCs functions and T-cell activation. Human monocyte-derived DCs (moDCs) were exposed overnight to fumed silica nanoparticles. Cell viability, phenotypical changes, cytokines production and allogeneic CD4⁺ T-cells proliferation were measured. Our results showed that aSNP significantly upregulated the surface expression of CD86, CD83 and CXCR4 activation markers. Secretions of pro-inflammatory cytokines (CXCL-8 and CXCL-12) were significantly enhanced in a dose-dependent manner in the moDCs culture supernatants. In an allogeneic co-culture, aSNP-activated moDCs significantly increased T-lymphocyte proliferation at all T-cell:DC ratios compared to unloaded moDCs. Moreover, analysis of co-culture supernatants for the production of T-cell-derived cytokines showed a significant increase of IL-9 and IL-17A and F, as well as an upregulation of IL-5, consistent with the pro-inflammatory phenotype of treated-moDCs described above. Taken together, these results suggest that aSNP can induce moDCs maturation and could act as adjuvants enhancing immunogenicity.

Impact statement

Amorphous silica NP promote the two first steps of adaptive immune response by increasing the maturation of human DCs and triggering a T-lymphocyte response, characterized by increased proliferation and cytokine secretion. aSNP could then act as adjuvants of the immune system and may promote allergic reactions in occupational and everyday life in the context of mixed exposure situations.

Introduction

Silica is among the most common natural components found in the earth’s crust and its nanoparticles became one of the three most produced nanomaterials worldwide in 2013 (Liljenström et al. 2013). Amorphous silica nanoparticles (aSNP) have long been considered as highly biocompatible when compared to their crystalline counterparts. Indeed, the Food and Drug Administration (FDA) considers aSNP as "Generally Recognized As Safe" (GRAS) and their carcinogenicity is "unclassifiable" (group 3) according to the International Agency for Research on Cancer (IARC). The most used aSNP is fumed silica, a pyrolytic synthetic aSNP, which is present in everyday products such as cosmetics as an anti-setting or emulsifying agent (Sccs and Hoet 2016). The anti-caking effects of these nanoparticles are extensively exploited since around fifty years with the widespread food additive E 551 in dehydrated products such as salt, sugar, cocoa or soups (Winkler et al. 2016; Younes et al. 2018). Fumed silica aSNP are also incorporated into concrete to improve its mechanical properties. Nevertheless, the high potential of volatile powders inhalation during manufacturing processes or use in workplace raises safety issues. Besides, aSNP belong to the OECD list of prioritized engineered NP having relevance in the workplace. Exposure may occur at different levels depending on the procedures and protective measures implemented. Concerning general population, daily exposure to E551 has been estimated at 9.4 mg.bw⁻¹.d⁻¹, well above the non-observed adverse effect level of 5 mg.bw⁻¹.d⁻¹ (Tassinari et al. 2020; van Kesteren et al. 2015). *In vitro* gastric dissolution experiments demonstrated that the gut epithelium would be predominantly exposed to nanosized silica structure (Peters et al. 2012).

Pulmonary exposure to aSNP causes a reversible inflammatory response in mice (Arts et al. 2007; Napierska et al. 2010; Sun et al. 2016). Interestingly, repetitive intratracheal instillation of fumed silica every week for 3 consecutive weeks resulted in profibrotic effects in the lung and biopersistence linked to a defect in lung clearance (Sun et al. 2016). Moreover, several studies have shown that ingestion of aSNP induced intestinal inflammation (Jani et al. 1990).

Once in circulation, phagocytic cells such as macrophages and dendritic cells (DCs) are among the first and main cell types that uptake and process nanoparticles (Gustafson et al. 2015). DCs are professional

antigen presenting cells that reside in non-lymphoid tissues in an immature antigen-capturing state. Located at the gates of antigen entry, DCs ensure a constant sampling of their environment. Intestinal, skin and pulmonary DCs, predominantly located underneath the epithelial basement membrane, sense and capture antigens and present sampled antigens to T-lymphocytes recognizing specifically the antigen. However, depending on the cellular microenvironment and its effect on DC phenotype, the consequence can be either an immunogenic or tolerogenic immune response (Lutz and Schuler 2002; Tan and O'Neill 2005).

In the presence of various stimuli such as “danger signals” present in the vicinity of DCs (Gallo and Gallucci 2013), they undergo a maturation process resulting in the up-regulation of major histocompatibility complex class II (MHC II), co-stimulatory molecules, cytokines and chemokine receptors. DCs migrate then to regional lymph nodes to present the antigen and to activate specific naive T-lymphocytes (Worbs et al. 2017). Classic danger signals are mostly derived from pathogens and released during infections (Pathogen-Associated Molecular patterns, PAMPs) or can result from tissue damages and necrotic dying cells (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs) (Pradeu and Cooper 2012). The newly man-made emerging danger signals may activate DCs in aseptic conditions either directly or indirectly, in a similar manner to the microbial molecular patterns (Fadeel 2012; Pallardy et al. 2017). Thus, it is postulated that, as previously suggested for ultrafine or diesel exhaust particles (de Haar et al. 2008), immune cells could sense nanomaterials which could then be designated as NAMPs (Nanoparticles-Associated Molecular Patterns) (Farrera and Fadeel 2015; Gallo and Gallucci 2013).

In vitro studies have explored danger signal effects of aSNP by focusing on the activation of key immune cells such as DCs (Chen et al. 2018; Himly et al. 2017; Mocan et al. 2016; Shannahan and Brown 2014). Indeed, an increased activation of murine bone marrow DCs with CD86 and MHC class II upregulation along with the production of IL-1 β (Winter et al. 2011) and TNF- α pro-inflammatory cytokines (Kang and Lim 2012) were demonstrated. More recently, internalization of food-grade fumed silica nanoparticles was evidenced in murine steady-state DCs, as well as secretion of IL-1 β in a

Myd88-dependent mechanism (Winkler et al. 2017). Only few studies have been performed on human DCs to address their functionality of phenotypic changes upon exposure to NPs (Barillet et al. 2019; Vallhov et al. 2007; Vallhov et al. 2012).

In the context of understanding how aSNP could participate to an inappropriate activation of the immune system, the aim of this work was to evaluate the effects of aSNP on human DCs expression of maturation markers and cytokine secretion and to explore the ability of these mature DCs to efficiently trigger allogeneic T-lymphocytes response.

Materials and methods

Reagents and materials

According to the manufacturer, the specific surface of the fumed silica NP (S5505, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), determined by BET (Brunauer-Emmett-Teller), is $196 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ (batch SLBR6988V). The NP suspension was prepared from fumed silica dry powder dispersed in filtered ultrapure water at a final concentration of 50 mg.mL^{-1} . The suspension was then left for 8 hours in a water bath at 80°C to sterilize the suspension. Before each experiment, an intermediate dilution at a concentration of $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ was prepared in RPMI 1640 medium supplemented with Glutamax, 1mM sodium pyruvate, 0.1 ng.mL^{-1} streptomycin and 100 U.mL^{-1} penicillin (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France). The suspension was sonicated for 15 minutes prior to DCs treatment.

Characterization of fumed silica nanoparticles

The hydrodynamic diameter of particles was determined at 25°C by Dynamic Light Scattering (DLS) using a Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Orsay, France) operating at fixed scattering angle at 90° and equipped with a Helium-Neon laser source with a wavelength of 633 nm. Measurements were performed in disposable 4-mL cuvettes with 1-cm optical pathway and four optical faces (Sarstedt, Marnay, France) containing an appropriate volume (1 mL) of sample, prepared as described above, after dilution to $125 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ in the desired medium. The hydrodynamic diameter values were

calculated using the Stokes-Einstein equation assuming a spherical shape of the particles. The particle size profile was obtained from the intensity-weighted distribution and the hydrodynamic diameter value corresponds to the median diameter derived from the cumulative distribution curve. The ζ -potential measurements were carried out with the same instrument at 25°C by laser doppler velocimetry at a detection angle of 17° in DTS 1060 disposable cells (Malvern Instruments, Orsay, France) loaded with approximately 1 mL of each sample diluted to 375 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ in the desired medium. Due to the ionic strength of the samples leading to high conductivity, measurements were performed using the monomodal mode and the Smoluchowski approximation was used to convert the electrophoretic mobility to ζ -potential. Values are given as mean values of ten measurements. For transmission electron microscopy experiments, 2 μL of 1 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ aqueous suspension of NP was deposited onto a formvar/carbon coated copper grid and observed using a JEOL 1400 transmission electron microscopy (TEM) instrument (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) operating at 120 kV. Analysis of recorded images was performed using the ImageJ software (1.52 version, National Institute for Health, Bethesda, MD, USA).

Endotoxin detection

Possible endotoxin contamination was analyzed with the limulus amoebocyte lysate (LAL) assay (GenScript, Piscataway, NJ, USA). All the batches tested ($n=8$) have shown values below the threshold of endotoxin positivity (0.05 EU. mL^{-1}).

Generation of primary cultures of human moDCs

Human monocyte-derived dendritic cells (moDCs) were derived from monocytes isolated from human peripheral blood supplied by the French Blood Bank (EFS, Rungis, France). Healthy donors gave their written consent for the use of blood donation for research purposes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were sorted from buffy coats by density centrifugation on a Ficoll gradient. Monocytes were then isolated through positive magnetic selection using MidiMacs separation columns and anti-

CD14⁺ antibodies coated on magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Finally, CD14⁺ cells were differentiated in immature moDCs for 4 days in RPMI 1640 supplemented with GlutaMAX (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France), 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France), 550 U.mL⁻¹ granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rh-GM-CSF, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), 550 U.mL⁻¹ interleukin-4 (rh-IL4, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), 1 mM sodium pyruvate (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France), 100 µg.mL⁻¹ streptomycin and 100 U.mL⁻¹ penicillin (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France).

In vitro exposure of immature moDCs to fumed silica nanoparticles

After proper differentiation, immature human moDCs were collected, washed, and resuspended in fresh complete culture medium (RPMI supplemented with 10 % FCS, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 ng.mL⁻¹ streptomycin and 100 U.mL⁻¹ penicillin) at a final density of 10⁶ cells.mL⁻¹. Cells were then exposed overnight either to 0, 12.5 or 25 µg.mL⁻¹ of sonicated aSNP (fumed silica S5505, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) or to 25 ng.mL⁻¹ of lipopolysaccharide (LPS, ref:L6529, Escherichia coli, serotype 055-B5, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) as a positive control of moDCs activation. Cells were exposed in the absence of FCS to limit the formation of aggregates and corona for the first hour of exposition. Then, the medium was returned to 10% FCS for the proper survival of the cells during the next hours.

Cytotoxicity assay

Viability was assessed by labeling with propidium iodide (PI, Invitrogen, Saint Aubin, France). After treatment with aSNP at 0, 12.5 and 25 µg.mL⁻¹, cells were incubated with PI at 6.25 mg.L⁻¹ and the percentage of viability was measured by flow cytometry.

Phenotypic analysis

To assess the effects of aSNP exposure on moDCs phenotype, several surface maturation markers were studied. After overnight exposure to either 0, 12.5 or 25 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ aSNP or 25 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$ LPS, moDCs were collected, washed with PBS and incubated for 20 minutes either with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (mAbs) or with appropriate isotype control antibodies (IgGs). The following mAbs were used: CD80 (FITC-Mouse anti-human CD80/FITC Mouse IgG1 Isotype control, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), CD83 (PE-Mouse anti-human CD83/PE Mouse IgG1 Isotype control, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), CD86 (APC-Mouse anti-human CD86/APC Mouse IgG1 Isotype control, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), CXCR-4 (APC Mouse anti-human CD184/APC Mouse IgG1 Isotype control, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), CD40 (FITC-Mouse anti-human CD40/FITC Mouse IgG1 Isotype control, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and PDL-1 (FITC-Mouse anti-human CD274/FITC Mouse IgG1 Isotype control, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). After incubation, moDCs were washed with PBS and then analyzed on a FACS Attune NxT[®] acoustic focusing cytometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Results were expressed as the fold increase of the positive cells percentage compared to control (untreated moDCs).

Co-culture of moDCs and CD4⁺ T-cells

As previously described (Feray et al. 2020), CD4⁺ T-cells were isolated from PBMC by positive selection with midiMACS separation columns and anti-CD4 antibodies coated on magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). These T-cells were confirmed to have purity greater than 95%, based on CD4 expression evaluated by flow cytometry (561841, RPA-T4, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). CD4⁺ T-lymphocytes, were labeled with 0.5 mM carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, Invitrogen, Saint Aubin, France), following the manufacturer's instruction. MoDCs were stimulated by 0, 12.5 or 25 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ of aSNP or 25 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$ of LPS (positive control for danger signal effects) for 16 hours and then washed and co-cultured with allogeneic CD4⁺ T-cells at a 1:20 (1 moDC for 20 CD4⁺ T-cells), 1:50 (1 moDC for 50 CD4⁺ T-cells) or 1:100 (1 moDC for 100 CD4⁺ T-cells) DC:T-

cell ratio for five days, in RPMI 1640 Glutamax (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France) supplemented with 10% FCS in round-bottom 96 well plates (Cellstar, Greiner bio-one, Courtaboeuf, France) as previously described (Feray et al. 2020). A DC:T-cell co-culture loaded with the mitogen phytohaemagglutinin (PHA, Invitrogen, Saint Aubin, France) was used as positive control for T-cell proliferation. Analysis of T-cell proliferation was assessed as the CFSE_{low} cells by flow cytometry, on a FACS Attune NxT® acoustic focusing cytometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Cytokine quantification in cell culture supernatants

MoDCs mono- or co-culture supernatants were measured in duplicate for IL-1 β , IL-6, CXCL-8, IL-12p40, CCL-2 (MCP-1), CXCL-12 and CXCL-10 (IP-10), IL-17A, IL-17F, IL-5, IL-13, IL-9, IFN- γ , IL-10 and IL-22 using Meso Scale Discovery multiplex assay (MSD, Rockville, MA, USA) following manufacturer's instructions.

Results

Characterization of nanoparticles

A precise characterization of the size, spherical shape and homogeneity of the fumed silica in water was carried out by transmission electron microscopy (TEM). Nanoparticles appeared fused together as chain-like aggregates (figure 1A). The primary median size of the nanoparticles, determined by TEM, was 14.4 ± 5.3 nm (figure 1B) which is in the same range as the values determined by Sun *et al.* (Sun et al. 2016) and by Winkler *et al.* (Winkler et al. 2017). Moreover, the TEM study showed the formation of larger aggregates derived directly from inter-particle interactions. According to the DLS measurements (figure S1), fumed silica in RPMI 1640 medium led to a bimodal distribution with a first mean population centered on 123 ± 53 nm and a second one at 8.7 ± 0.3 μ m, testifying of agglomeration and/or aggregation processes. The addition of 1% of FCS to the medium also led to a bimodal distribution. However, the size corresponding to the first main population increased to 2.2 ± 1.1 μ m while the second population remained unchanged (hydrodynamic diameter close to 8.5 ± 0.8 μ m). Supplementation with 10% FCS did not greatly change the sizes of the two populations (1.5 ± 0.6

1
2
3 μm and $7.7 \pm 1.9 \mu\text{m}$) but led to an increase in the proportion of the second population. Optical
4
5 microscopy, and in particular granulomorphometry (data not shown), was used to search for additional
6
7 details but the contrast between the particles and the buffer was weak in the same manner as
8
9 previously described by Doi (Doi 1982). The ζ -potential value for fumed silica in RPMI 1640 was -22.5
10
11 $\pm 1.4 \text{ mV}$ and was reduced to $-13.5 \pm 1.5 \text{ mV}$ and to $-8.5 \pm 1.9 \text{ mV}$ in presence of 1% and 10% of FCS
12
13 respectively (figure 1C). This decrease, even at low serum concentration, suggests that a protein layer
14
15 is formed on particles (Monopoli et al. 2011). Moreover, based on a sensitive LAL assay, fumed silica
16
17 nanoparticles were free of endotoxin contamination (data not shown).
18
19

20 21 **Cytotoxicity of fumed silica nanoparticles**

22
23 Phagocytic cells, such as DCs, are suspected to be sensitive to NP cytotoxicity because reaching an
24
25 important intracellular load. To analyze the cytotoxicity of aSNPs, human moDCs were incubated
26
27 overnight with 12.5, 25 and $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of fumed silica NP and cell viability was analyzed by flow
28
29 cytometry using PI staining. Noticeably, in all conducted experiments, the first hour of incubation was
30
31 performed in absence of FCS in order to evaluate the toxic potential of naked particles. Results showed
32
33 that fumed silica NP decreased moDCs viability in a concentration-dependent manner (figure S2). The
34
35 $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ concentration was highly cytotoxic with a 60% cell mortality. Both the 12.5 and $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$
36
37 concentrations were below the 30% cytotoxicity established threshold and showed no statistical
38
39 difference in viability with untreated moDCs.
40
41
42

43 **Fumed silica nanoparticles modulated moDCs phenotype**

44
45 The capacity of fumed silica NP to induce the maturation of human moDCs was assessed using final
46
47 concentrations of 12.5 and $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ according to cytotoxicity results. To examine the phenotypic
48
49 changes of moDCs, cells were incubated with 12.5 and $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of fumed silica NP for 1 hour in
50
51 absence of FCS and the following 15 hours in 10% FCS containing culture medium. LPS was used as a
52
53 positive control for moDCs maturation. The maturation status of the moDCs was assessed using FACS
54
55 analysis and measurement of CD80, CD86, CD83, CD40, CXCR4 and PDL-1 molecule expressions.
56
57 Expressions of CD86, CD83 and CXCR4 molecules augmented in a dose-dependent manner reaching
58
59
60

1
2
3 statistical significance for 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of fumed silica NP (figure 2). CD40 and PDL-1 expressions also
4
5 slightly augmented but did not reach statistical significance. The LPS positive control led to an increase
6
7 in CD40, CD80, CD83, CD86 and PDL-1 expressions (figure 2). Taken together, our findings suggested
8
9 that aSNP significantly affected moDCs maturation.
10
11
12
13

14 **Fumed silica nanoparticles induced the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines** 15 16 **by moDCs**

17
18 To further document the effect of fumed silica NP on human moDCs phenotype, we assessed the
19
20 production of pro-inflammatory cytokines and chemokines from particles-treated cells. Again, moDCs
21
22 were exposed to 12.5 or 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of aSNP for 1 hour in absence of FCS and the following 15 hours in
23
24 10% FCS containing culture medium. The moDCs culture supernatants were collected and analyzed
25
26 using U-PLEX MSD technology for IL-1 β , IL-6, CXCL-8, IL-23, CCL-2 (MCP-1), CXCL-12, CXCL-10 (IP-10)
27
28 and TNF- α production. Secretions of CXCL-8 and CXCL-12 were significantly enhanced in a
29
30 concentration-dependent manner in the presence of 12.5 to 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of fumed silica NP (figure 3).
31
32 IL-23 and TNF- α secretions were slightly augmented but did not reach significance. From these results,
33
34 we showed that fumed silica NP were able to increase the production of pro-inflammatory cytokines
35
36 and chemokines by moDCs showing a specific signature.
37
38
39
40
41
42

43 **MoDCs stimulated with fumed silica nanoparticles enhanced CD4+ T-cell proliferation**

44
45 To evaluate the functional consequences of moDCs maturation provoked by fumed silica NP, we
46
47 analyzed the capacity of moDCs treated with fumed silica NP to augment allogeneic CD4+ T-cell
48
49 proliferation. To limit the cytotoxicity induced by NP during the allogeneic co-culture, we decided to
50
51 expose moDCs at the lowest concentration (12.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) of fumed silica NP. Treated moDCs were
52
53 then washed and co-cultured with allogeneic CD4+ T-cells loaded with CFSE at several DC:T-cell ratios.
54
55 Proliferation was assessed after five days of co-culture as the percentage of CFSE_{low} CD4+ T-cells. A
56
57 DC:T-cell co-culture stimulated with PHA was used as positive control for T-cell proliferation and LPS-
58
59
60

1
2
3 treated moDCs as a positive control for danger signal effects. T-cells alone proliferation was assimilated
4 to the background noise (figure 4A). Using a 1:20 DC:T-cell ratio, the addition of non-treated allogeneic
5 moDCs induced a basal T-cell proliferation of about 30% that was statistically increased by the
6 exposure of moDCs to fumed silica NP (figure 4A). Interestingly, T-cell proliferation levels triggered by
7 fumed silica NP were comparable with those induced by LPS, a well-known danger signal (figure 4A).
8 Among the variables that regulate the activation of CD4⁺ T-cells by DCs, the maturation state of the
9 DCs and the relative amounts of stimulating moDCs and responding CD4⁺ T-cells are of particular
10 importance (Hopken et al. 2005). As previously described, the use of several DC:T-cell ratios is
11 particularly important to confirm the NP effect and to increase the sensitivity of the method (Feraý et
12 al. 2020). We then tested the following ratios: 1:100 (corresponding to 1 moDC per 100 T-cells), 1:50
13 (1 moDC for 50 T-cells) and 1:20 (1 moDC for 20 T-cells). We observed that reducing the DC:T-cell
14 ratios from 1:20 to 1:100 decreased the basal proliferation (figure 4B). Consequently, T-cells showed
15 a higher index of proliferation when moDCs were stimulated with aSNP. The increase in T-lymphocytes
16 proliferation in presence of aSNP-treated moDCs was statistically significant for all tested ratios
17 compared to unloaded moDCs (figure 4B).
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 **Fumed silica nanoparticles increased the production of IL-9 and IL-17A/F by CD4⁺ T-cells**

40 To better evaluate the CD4⁺ T-cell response, we then analyzed the production of T-cell cytokines in
41 the co-culture supernatants (Figure 5). Results showed that when moDCs were exposed to 12.5 µg.mL⁻¹
42 of fumed silica NP, the production of IL-9, IL-17A and IL-17F in the supernatant of co-cultures was
43 significantly augmented. Moreover, an increase in IL-5 production was also observed but was non-
44 significant due to the high variability of the results. IFN-γ, IL-22 and IL-13 were also augmented but the
45 levels were also not statistically different from controls. Interestingly, aSNP caused a more significant
46 production of IL-9 than LPS (figure 5).
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

As a first-line defense against non-self-entities, DCs are depicted as sentinels of the immune system, actively sampling the antigenic environment and sensing danger. Nanomaterials may be considered as “emerging” danger signals activating DCs either directly or indirectly as a result of cell injury (Gallo and Gallucci 2013; Pallardy et al. 2017), enabling them to undergo a full maturation process, to migrate to regional lymph nodes and to activate naive T-lymphocytes (Pallardy et al. 2017). Our results showed that aSNP mimicked danger signals recognized by human DCs. This effect is likely to guide the immune response towards an allergic phenotype (Shannahan and Brown 2014). Indeed, as previously described for air pollution particles such as diesel exhaust particles (de Haar et al. 2008), there are increasing evidences for an impact of nanomaterials on allergic airway disease (Meldrum et al. 2017) or on skin sensitization (Yoshioka et al. 2017), particularly upon co-exposure with chemicals. However, significant gaps remain concerning the underlying mechanisms leading to the effect of nanomaterials on DCs, and more importantly on the relevance of experimental models used to the human situation. Several studies have previously addressed the effects of different nanomaterials on murine DCs (Kang and Lim 2012; Winkler et al. 2017; Winter et al. 2011) but there is a lack of studies attempting to address these effects on human DCs (Barillet et al. 2019; Feray et al. 2020; Vallhov et al. 2012). We specifically explored NPs impact on human DCs *in vitro* using an integrated model able to measure the consequences of DC phenotype alterations by aSNP on T-cell responses.

The physicochemical properties of NP are known to influence their interactions with DCs. Manufactured aSNP consist of complex structures of aggregates and agglomerates and usually have no external dimensions of less than 100 nm, as confirmed by our characterization experiments. Upon exposure to biological fluids, NP do not stay “naked” but become coated by biomolecules forming a “corona” (Monopoli et al. 2012). Our results are consistent with the presence of such a corona when aSNP were in contact with culture media containing proteins. The observed decrease of the ζ potential in presence of FCS is probably related to corona formation resulting from the masking of the negative charges of the silanol groups by proteins. Moreover, increase in the hydrodynamic diameter

demonstrated the formation of aggregates. Consequently, we decided to expose human moDCs to aSNP in the absence of FCS during the first hour to directly assess the effect of aSNP.

The “danger theory” was proposed by Polly Matzinger twenty-five years ago (Matzinger 1994) and explained how immune responses could take place without infection. Among the patterns capable of sounding the alarm in aseptic conditions, Gallo and Gallucci proposed the NAMPs (Gallo and Gallucci 2013). The criteria to identify danger signals comprise DC activation and maturation and the ability to regulate their migratory properties. In our study, DCs maturation was clearly evidenced by phenotypical modifications of human moDCs with increased expression of CD83, CD86 and CXCR4 on the cell surface. CD83 is a membrane-bound glycoprotein considered as one of the hallmark of fully matured DCs (Prechtel and Steinkasserer 2007). CXCR4 bind the widely expressed chemokine CXCL12 that play a role in mature DCs trafficking through the afferent lymphatic vessels to the lymph nodes. aSNP-induced moDCs activation was supported by an increase in the secretion of pro-inflammatory cytokines, particularly CXCL-8 and CXCL-12. These phenotypical modifications were unlikely due to contamination by LPS since the aSNP used did not contain detectable levels of endotoxins (Li et al. 2017). Using human moDC, Vallhov *et al.* tested 0.5, 5 or 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of the high surface area mesoporous silica nano- (270 nm) and microparticles (2.5 μm) and found no significant effect on CD83 and MHC class II expression and a reduced expression of the CD40 and CD80 costimulatory molecules (Vallhov et al. 2007). Consistent with our results, Winter *et al.* (Winter et al. 2011) demonstrated on murine BMDCs that amorphous fumed silica nanoparticles significantly increased the expression of MHC-II as well as CD80 and CD86. More recently, Winkler *et al.* suggested that food-grade synthetic amorphous silica could activate immature murine DCs with a weak upregulation of CD40 and CD86 expressions and release of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) (Winkler et al. 2017). Concerning cytokines secretion, Hetland *et al.* (Hetland et al. 2001), Veranth *et al.* (Veranth et al. 2007) and Gualtieri *et al.* (Gualtieri et al. 2012) demonstrated the ability of aSNP to increase the release of IL-6 and CXCL-8 by human epithelial cell lines (A549 or BEAS-2B). Similarly, Kasper *et al.* (Kasper et al. 2011) demonstrated in an *in vitro* model mimicking the alveolar-capillary barrier that, when apically

exposed to aSNP, co-cultures showed a release of IL-6 and CXCL-8 at the basolateral side. In the RAW 264.7 macrophage-like cell line, aSNP increase the gene expression of *IL-1*, *IL-6* and *TNF- α* (Park and Park 2009) or the persistent production of IL-6 and TNF- α (Torres et al. 2020). Surface reactivity of fumed silica NP is closely linked to the density of silanol groups, which appear as key molecular moieties (Pavan et al. 2019; Pavan et al. 2020) mediating electrostatic interactions with membrane phospholipids and inflammasome activation at the origin of cell phenotype modifications (Sun et al. 2015). Therefore, in the literature, the pro-inflammatory effects appear more pronounced with pyrogenic fumed silica NP than with precipitated amorphous silica NP (Di Cristo et al. 2016; Zhang et al. 2012).

In most cases, the ultimate consequence of functional DCs maturation for the immune response is T-cell activation. The increase in lymphocyte proliferation clearly indicates the activation state of CD4 + T-lymphocytes, which is only possible after productive interaction with activated DCs. We addressed the consequences of aSNP-induced DC phenotype alterations on T-lymphocytes activation using a allogeneic DC:T-cell co-culture model. Our results showed a strong augmentation of T-cell proliferation when moDCs were stimulated with aSNP. Interestingly, this effect was comparable to LPS, a well-known danger signal. This increase in T-cell proliferation was accompanied by an increase in T-cell cytokine secretion, notably IL-17A/F and IL-9. IL-5 was also increased but in a non-significant manner. These results are consistent with the pro-inflammatory phenotype of DCs described above and with the danger signal hypothesis. The production of such cytokines suggested that these activated T-cells could preferentially adopt a Th2 and Th17 orientation, but this remains to be explored. There are only few studies in the literature using co-culture of T-cells and DCs to assess the functional DCs maturation in presence of NP. Those conducted on carbon black (Koike et al. 2008) and CeO₂/TiO₂ NP (Schanen et al. 2013) suggested that these nanomaterials could drive the polarization of the T-cell response. Vallhov *et al.* showed that mesoporous aSNP increase the expression of CD86 on human moDCs with effects on T-cell polarization with IFN- γ , IL-4 and IL-13 production (Vallhov et al. 2007; Vallhov et al. 2012).

In conclusion, silica toxicity is generally considered closely linked to its crystallinity. It is indeed commonly assumed that amorphous forms of silica are highly biocompatible and inert while crystalline silica has largely demonstrated its hazard. However, recent studies challenged the assumed biocompatibility of aSNP, particularly with immune cells (Himly et al. 2017; Mocan et al. 2016; Shannahan and Brown 2014). These observations suggested that a comprehensive evaluation of their actual immunotoxicity must be carried out. In this work, we demonstrated using human cells that fumed silica NP promoted the two first steps of adaptive immune response by increasing the maturation of human DCs and triggering a T-lymphocyte response, characterized by increased proliferation and cytokine secretion. Given their effects on DCs activation, aSNP could act as adjuvants of the immune system and may promote allergic reactions in occupational and everyday life in the context of mixed exposure situations.

List of abbreviations

aSNP : amorphous silica nanoparticles ; DCs : dendritic cells ; moDCs : monocyte-derived dendritic cells ; MHC-II : major histocompatibility complex class II ; LPS : lipopolysaccharide ; PHA : phytohaemagglutinin ; DLS : dynamic light scattering ; LAL : limulus amoebocyte lysate ; PBMC : peripheral blood mononuclear cells ; PI : propidium iodide ; CFSE : carboxyfluorescein succinimidyl ester.

Data links

Not applicable.

Conflicts of Interest (COI)

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Funding

The French National Research Program for Environmental and Occupational Health of ANSES funded the study (PNREST 2015/032, Silimmun Grant). Alexia Feray is a recipient of a LERMIT (Laboratoire d'excellence en recherche sur le médicament et l'innovation thérapeutique) PhD fellowship.

Acknowledgments

Alexia Feray and Eléonore Guillet were master fellows of DIM QI2 (Réseau de recherche Qualité de l'air en Ile-de-France). The present work has benefited from the CYTOMETRY / ELECTRONIC MICROSCOPY / LIGHT MICROSCOPY facility of Imagerie - Gif, (<http://www.i2bc.paris-saclay.fr>), member of IBISA (<http://www.ibisa.net>), supported by “France - BioImaging” (ANR - 10 - INBS - 04 - 01), and the Labex “Saclay Plant Sciences” (ANR-10-LABX-0040-SPS).

Figure legends

Figure 1. Characterization of fumed silica nanoparticles

A. Typical TEM images of unstained fumed silica nanoparticles suspended in water. B. Distribution histogram and cumulative distribution of the primary nanoparticle size determined by TEM (Total count: 334 particles). C. ζ -potential variations of fumed silica nanoparticles in RPMI 1640 with or without fetal bovine serum (ζ -potential data are represented as mean $\pm$ SEM of ten independent measurements). ****: $p < 0.0001$, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Figure 2. Fumed silica nanoparticles modulated moDCs phenotype

Cells were incubated with 12.5 and 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of fumed silica nanoparticles for 16 hours. LPS was used as a positive control. Cells were then collected, washed and the maturation status of the moDCs was assessed by FACS analysis. Unloaded moDCs were used as control. Results were expressed as fold increase of percentage of positive cells compared to untreated cells and represented the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. *: $p < 0.05$ one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (statistics for LPS are not shown).

Figure 3. Fumed silica nanoparticles induced moDCs inflammatory cytokines and chemokines secretion

Cells were incubated with 12.5 and 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of fumed silica nanoparticles for 16 hours. LPS was used as a positive control. The moDCs culture supernatants were collected and analyzed using U-PLEX MSD technology. Untreated moDCs were used as control. Results were expressed in quantity of detected cytokines (pg.mL^{-1}) and represented the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Figure 4. MoDCs treated with fumed silica nanoparticles increased allogeneic T-cell proliferation

- A. Cells were incubated with 12.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of fumed silica nanoparticles for 16 hours. LPS and PHA were used as positive controls. Treated moDCs were co-cultured with allogeneic CD4⁺ T-cells loaded with CFSE at a ratio of 1 moDC for 20 CD4⁺ T-cells. Proliferation was measured after 5 days of co-culture as the percentage of CFSE^{low} CD4⁺ T-cells. Untreated moDCs were used as control. Results were expressed as percentage of increase in lymphocyte proliferation and represented the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. *: $p < 0.05$, ****: $p < 0.0001$, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.
- B. Fumed silica nanoparticles increased T-cell proliferation at all DC:T-cell tested ratio. Cells were incubated with 12.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of fumed silica nanoparticles for 16 hours. LPS and PHA were used as positive controls. Treated moDC were co-cultured with allogeneic CD4⁺ T-cells loaded with CFSE at different ratios: 1:100 (1 moDC per 100 T-cells), 1:50 (1 moDC for 50 T-cells) and 1:20 (1 moDC for 20 T-cells). Proliferation was measured after 5 days of co-culture as the percentage of CFSE^{low} CD4⁺ T-cells. Untreated moDCs were used as control. Results were expressed as percentage of increase in lymphocyte proliferation and represented the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. **: $p < 0.01$, two-way ANOVA and Sidak's multiple comparison test.

Figure 5. Fumed silica nanoparticles increased the production of IL-9 and IL-17A/F by CD4+ T-cells

Cells were incubated with 12.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of fumed silica nanoparticles for 16 hours. LPS and PHA were used as positive controls. Treated moDCs were co-cultured with allogeneic CD4+ T-cells loaded at a ratio of 1 moDC for 20 CD4+ T-cells. On day 5, cytokines levels were measured in co-culture supernatants using U-PLEX MSD technology. Untreated moDCs were used as control. Results were expressed in quantity of detected cytokines (pg.mL^{-1}) and represented the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Supplementary figures

Figure S1. Size distribution of fumed silica nanoparticles

Intensity-weighted size distribution profiles of fumed silica nanoparticles in pure RPMI 1640, in RPMI 1640 supplemented with 1% of Fetal Calf Serum and in RPMI 1640 supplemented with 10% of Fetal Calf Serum were obtained using Dynamic Light Scattering. Each measure was repeated ten times.

Figure S2. Fumed silica nanoparticles effect on moDCs viability

MoDCs were incubated with 12.5, 25 and 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of fumed silica nanoparticles for 16 hours. Cells were then collected, washed and cell viability analyzed by flow cytometry using propidium iodide staining. Results were expressed in percentage of cell mortality and represented the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

References list

- Arts JH, Muijsers H, Duistermaat E, Junker K, Kuper CF. 2007. Five-day inhalation toxicity study of three types of synthetic amorphous silicas in wistar rats and post-exposure evaluations for up to 3 months. *Food Chem Toxicol.* 45(10):1856-1867.
- Barillet S, Fattal E, Mura S, Tsapis N, Pallardy M, Hillaireau H, Kerdine-Romer S. 2019. Immunotoxicity of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Influence of surface properties on dendritic cell activation. *Nanotoxicology.* 13(5):606-622.
- Chen L, Liu J, Zhang Y, Zhang G, Kang Y, Chen A, Feng X, Shao L. 2018. The toxicity of silica nanoparticles to the immune system. *Nanomedicine (Lond).* 13(15):1939-1962.
- de Haar C, Kool M, Hassing I, Bol M, Lambrecht BN, Pieters R. 2008. Lung dendritic cells are stimulated by ultrafine particles and play a key role in particle adjuvant activity. *J Allergy Clin Immunol.* 121(5):1246-1254.
- Di Cristo L, Movia D, Bianchi MG, Allegri M, Mohamed BM, Bell AP, Moore C, Pinelli S, Rasmussen K, Riego-Sintes J et al. 2016. Proinflammatory effects of pyrogenic and precipitated amorphous silica nanoparticles in innate immunity cells. *Toxicol Sci.* 150(1):40-53.
- Doi K. 1982. Structure changes in amorphous silica by neutron-irradiation. *J Non-Cryst Solids.* 51(3):367-380.
- Fadeel B. 2012. Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune system. *Swiss Med Wkly.* 142:w13609.
- Farrera C, Fadeel B. 2015. It takes two to tango: Understanding the interactions between engineered nanomaterials and the immune system. *Eur J Pharm Biopharm.* 95(Pt A):3-12.
- Feray A, Szely N, Guillet E, Hullo M, Legrand FX, Brun E, Pallardy M, Biola-Vidamment A. 2020. How to address the adjuvant effects of nanoparticles on the immune system. *Nanomaterials (Basel).* 10(3).
- Gallo PM, Gallucci S. 2013. The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. *Front Immunol.* 4:138.
- Gualtieri M, Skuland T, Iversen TG, Lag M, Schwarze P, Bilanicova D, Pojana G, Refsnes M. 2012. Importance of agglomeration state and exposure conditions for uptake and pro-inflammatory responses to amorphous silica nanoparticles in bronchial epithelial cells. *Nanotoxicology.* 6(7):700-712.
- Gustafson HH, Holt-Casper D, Grainger DW, Ghandehari H. 2015. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. *Nano Today.* 10(4):487-510.
- Hetland RB, Schwarze PE, Johansen BV, Myran T, Uthus N, Refsnes M. 2001. Silica-induced cytokine release from a549 cells: Importance of surface area versus size. *Hum Exp Toxicol.* 20(1):46-55.
- Himly M, Mills-Goodlet R, Geppert M, Duschl A. 2017. Nanomaterials in the context of type 2 immune responses-fears and potentials. *Front Immunol.* 8:471.
- Hopken UE, Lehmann I, Droese J, Lipp M, Schuler T, Rehm A. 2005. The ratio between dendritic cells and t cells determines the outcome of their encounter: Proliferation versus deletion. *Eur J Immunol.* 35(10):2851-2863.
- Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT. 1990. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: Quantitation and particle size dependency. *J Pharm Pharmacol.* 42(12):821-826.
- Kang K, Lim JS. 2012. Induction of functional changes of dendritic cells by silica nanoparticles. *Immune Netw.* 12(3):104-112.
- Kasper J, Hermanns MI, Bantz C, Maskos M, Stauber R, Pohl C, Unger RE, Kirkpatrick JC. 2011. Inflammatory and cytotoxic responses of an alveolar-capillary coculture model to silica nanoparticles: Comparison with conventional monocultures. *Part Fibre Toxicol.* 8(1):6.
- Koike E, Takano H, Inoue K, Yanagisawa R, Kobayashi T. 2008. Carbon black nanoparticles promote the maturation and function of mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Chemosphere.* 73(3):371-376.
- Li Y, Fujita M, Boraschi D. 2017. Endotoxin contamination in nanomaterials leads to the misinterpretation of immunosafety results. *Front Immunol.* 8:472.

- Liljenström C, Lazarevic D and Finnveden G. Silicon-based nanomaterials in a life-cycle perspective, including a case study on self-cleaning coatings. 2013.
- Lutz MB, Schuler G. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: Which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23(9):445-449.
- Matzinger P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 12:991-1045.
- Meldrum K, Guo C, Marczylo EL, Gant TW, Smith R, Leonard MO. 2017. Mechanistic insight into the impact of nanomaterials on asthma and allergic airway disease. *Part Fibre Toxicol.* 14(1):45.
- Mocan T, Matea CT, Iancu C, Agoston-Coldea L, Mocan L, Orasan R. 2016. Hypersensitivity and nanoparticles: Update and research trends. *Clujul Med.* 89(2):216-219.
- Monopoli MP, Aberg C, Salvati A, Dawson KA. 2012. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol.* 7(12):779-786.
- Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, Elia G, Lynch I, Bombelli FB, Dawson KA. 2011. Physical-chemical aspects of protein corona: Relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 133(8):2525-2534.
- Napierska D, Thomassen LC, Lison D, Martens JA, Hoet PH. 2010. The nanosilica hazard: Another variable entity. *Part Fibre Toxicol.* 7(1):39.
- Pallardy MJ, Turbica I, Biola-Vidamant A. 2017. Why the immune system should be concerned by nanomaterials? *Front Immunol.* 8:544.
- Park EJ, Park K. 2009. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol Lett.* 184(1):18-25.
- Pavan C, Delle Piane M, Gullo M, Filippi F, Fubini B, Hoet P, Horwell CJ, Huaux F, Lison D, Lo Giudice C et al. 2019. The puzzling issue of silica toxicity: Are silanols bridging the gaps between surface states and pathogenicity? *Part Fibre Toxicol.* 16(1):32.
- Pavan C, Santalucia R, Leinardi R, Fabbiani M, Yakoub Y, Uwambayinema F, Ugliengo P, Tomatis M, Martra G, Turci F et al. 2020. Nearly free surface silanols are the critical molecular moieties that initiate the toxicity of silica particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117(45):27836-27846.
- Peters R, Kramer E, Oomen AG, Rivera ZE, Oegema G, Tromp PC, Fokkink R, Rietveld A, Marvin HJ, Weigel S et al. 2012. Presence of nano-sized silica during in vitro digestion of foods containing silica as a food additive. *ACS Nano.* 6(3):2441-2451.
- Pradeu T, Cooper EL. 2012. The danger theory: 20 years later. *Front Immunol.* 3:287.
- Prechtel AT, Steinkasserer A. 2007. Cd83: An update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Arch Dermatol Res.* 299(2):59-69.
- Sccs, Hoet PH. 2016. Opinion of the scientific committee on consumer safety (sccs) - revision of the opinion on the safety of the use of silica, hydrated silica, and silica surface modified with alkyl silylates (nano form) in cosmetic products. *Regul Toxicol Pharmacol.* 74:79-80.
- Schanen BC, Das S, Reilly CM, Warren WL, Self WT, Seal S, Drake DR, 3rd. 2013. Immunomodulation and t helper th(1)/th(2) response polarization by ceo(2) and tio(2) nanoparticles. *PloS one.* 8(5):e62816.
- Shannahan JH, Brown JM. 2014. Engineered nanomaterial exposure and the risk of allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 14(2):95-99.
- Sun B, Pokhrel S, Dunphy DR, Zhang H, Ji Z, Wang X, Wang M, Liao YP, Chang CH, Dong J et al. 2015. Reduction of acute inflammatory effects of fumed silica nanoparticles in the lung by adjusting silanol display through calcination and metal doping. *ACS Nano.* 9(9):9357-9372.
- Sun B, Wang X, Liao YP, Ji Z, Chang CH, Pokhrel S, Ku J, Liu X, Wang M, Dunphy DR et al. 2016. Repetitive dosing of fumed silica leads to profibrogenic effects through unique structure-activity relationships and biopersistence in the lung. *ACS Nano.* 10(8):8054-8066.
- Tan JK, O'Neill HC. 2005. Maturation requirements for dendritic cells in t cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J Leukoc Biol.* 78(2):319-324.
- Tassinari R, Di Felice G, Butteroni C, Barletta B, Corinti S, Cubadda F, Aureli F, Raggi A, Narciso L, Tait S et al. 2020. Hazard identification of pyrogenic synthetic amorphous silica (nm-203) after sub-chronic oral exposure in rat: A multitarget approach. *Food Chem Toxicol.* 137:111168.

- Torres A, Dalzon B, Collin-Faure V, Diemer H, Fenel D, Schoehn G, Cianferani S, Carriere M, Rabilloud T. 2020. How reversible are the effects of fumed silica on macrophages? A proteomics-informed view. *Nanomaterials* (Basel). 10(10).
- Vallhov H, Gabrielsson S, Stromme M, Scheynius A, Garcia-Bennett AE. 2007. Mesoporous silica particles induce size dependent effects on human dendritic cells. *Nano Lett.* 7(12):3576-3582.
- Vallhov H, Kupferschmidt N, Gabrielsson S, Paulie S, Stromme M, Garcia-Bennett AE, Scheynius A. 2012. Adjuvant properties of mesoporous silica particles tune the development of effector T cells. *Small.* 8(13):2116-2124.
- van Kesteren PC, Cubadda F, Bouwmeester H, van Eijkeren JC, Dekkers S, de Jong WH, Oomen AG. 2015. Novel insights into the risk assessment of the nanomaterial synthetic amorphous silica, additive e551, in food. *Nanotoxicology.* 9(4):442-452.
- Veranth JM, Kaser EG, Veranth MM, Koch M, Yost GS. 2007. Cytokine responses of human lung cells (beas-2b) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Part Fibre Toxicol.* 4:2.
- Winkler HC, Kornprobst J, Wick P, von Moos LM, Trantakis I, Schraner EM, Bathke B, Hochrein H, Suter M, Naegeli H. 2017. MyD88-dependent pro-interleukin-1 β induction in dendritic cells exposed to food-grade synthetic amorphous silica. *Part Fibre Toxicol.* 14(1):21.
- Winkler HC, Suter M, Naegeli H. 2016. Critical review of the safety assessment of nano-structured silica additives in food. *J Nanobiotechnology.* 14(1):44.
- Winter M, Beer HD, Hornung V, Kramer U, Schins RP, Forster I. 2011. Activation of the inflammasome by amorphous silica and tio₂ nanoparticles in murine dendritic cells. *Nanotoxicology.* 5(3):326-340.
- Worbs T, Hammerschmidt SI, Forster R. 2017. Dendritic cell migration in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 17(1):30-48.
- Yoshioka Y, Kuroda E, Hirai T, Tsutsumi Y, Ishii KJ. 2017. Allergic responses induced by the immunomodulatory effects of nanomaterials upon skin exposure. *Front Immunol.* 8:169.
- Younes M, Aggett P, Aguilar F, Crebelli R, Dusemund B, Filipič M, Frutos MJ, Galtier P, Gott D, Gundert-Remy U et al. 2018. Re-evaluation of silicon dioxide (e 551) as a food additive. *EFSA Journal.* 16(1).
- Zhang H, Dunphy DR, Jiang X, Meng H, Sun B, Tarn D, Xue M, Wang X, Lin S, Ji Z et al. 2012. Processing pathway dependence of amorphous silica nanoparticle toxicity: Colloidal vs pyrolytic. *J Am Chem Soc.* 134(38):15790-15804.

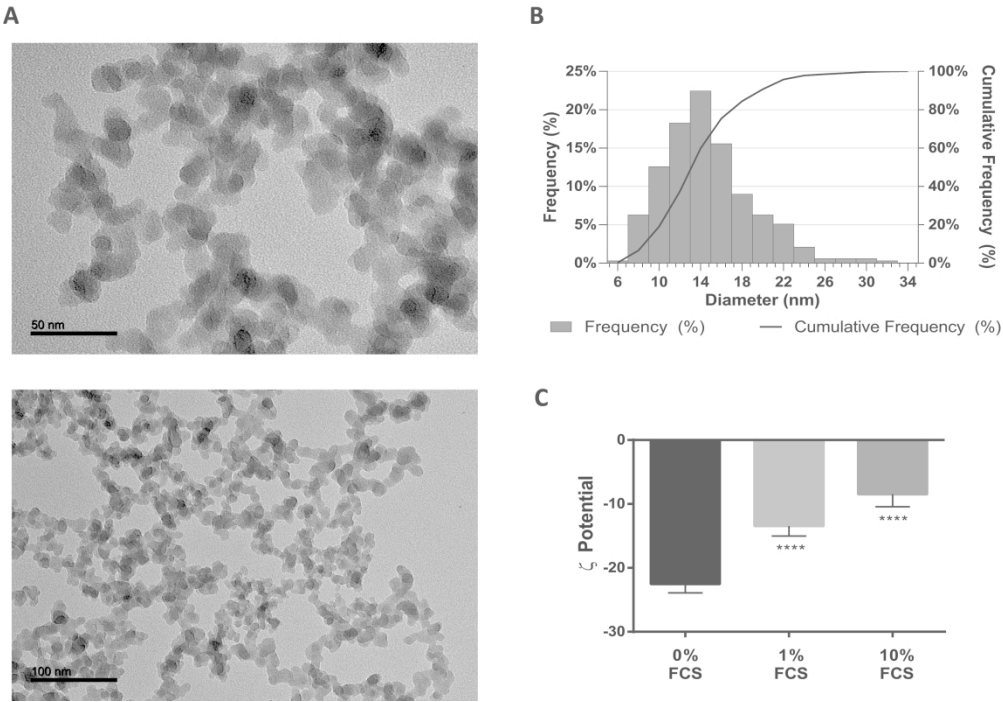


Figure 1. Characterization of fumed silica nanoparticles. A. Typical TEM images of unstained fumed silica nanoparticles suspended in water. B. Distribution histogram and cumulative distribution of the primary nanoparticle size determined by TEM (Total count: 334 particles). C. ζ -potential variations of fumed silica nanoparticles in RPMI 1640 with or without fetal bovine serum (ζ -potential data are represented as mean $\pm$ SEM of ten independent measurements). ****: $p < 0.0001$, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

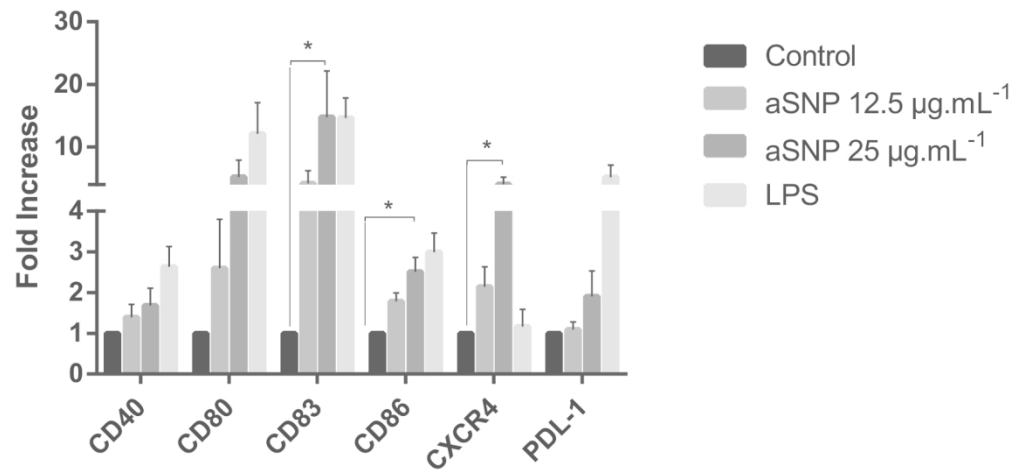


Figure 2. Fumed silica nanoparticles modulated moDCs phenotype. Cells were incubated with 12.5 and 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of fumed silica nanoparticles for 16 hours. LPS was used as a positive control. Cells were then collected, washed and the maturation status of the moDCs was assessed by FACS analysis. Untreated moDCs were used as control. Results were expressed as fold increase of percentage of positive cells compared to untreated cells and represented the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. *: $p < 0.05$ one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test (statistics for LPS are not shown).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

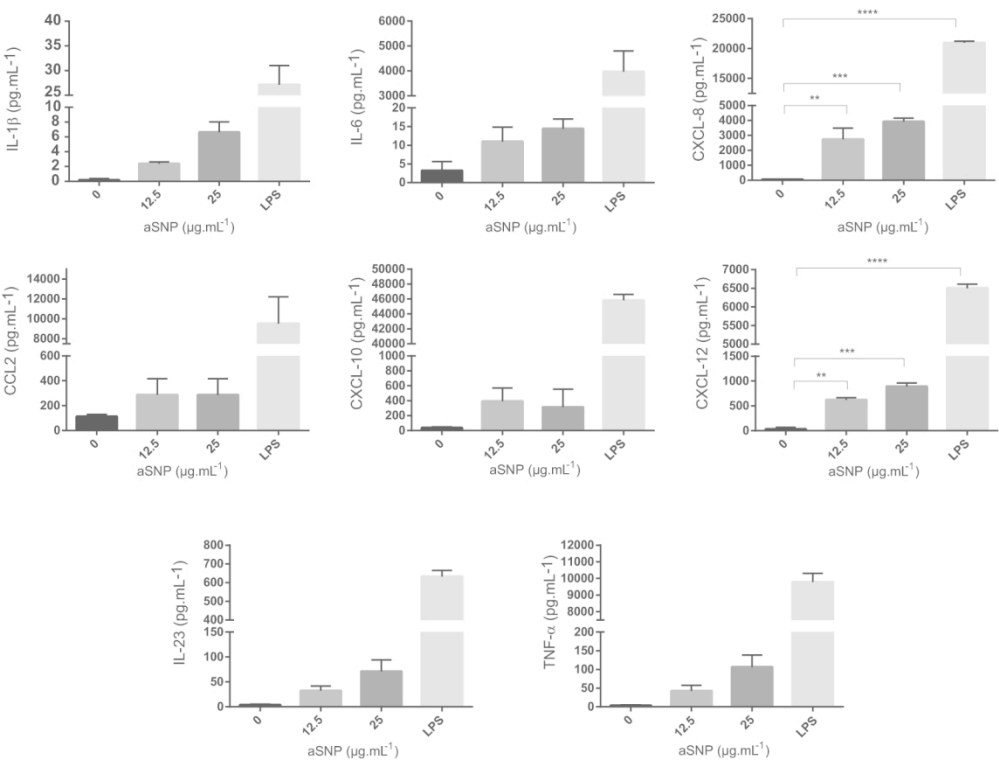


Figure 3. Fumed silica nanoparticles induced moDCs inflammatory cytokines and chemokines secretion. Cells were incubated with 12.5 and 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of fumed silica nanoparticles for 16 hours. LPS was used as a positive control. The moDCs culture supernatants were collected and analyzed using U-PLEX MSD technology. Unloaded moDCs were used as control. Results were expressed in quantity of detected cytokines (pg.mL^{-1}) and represented the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

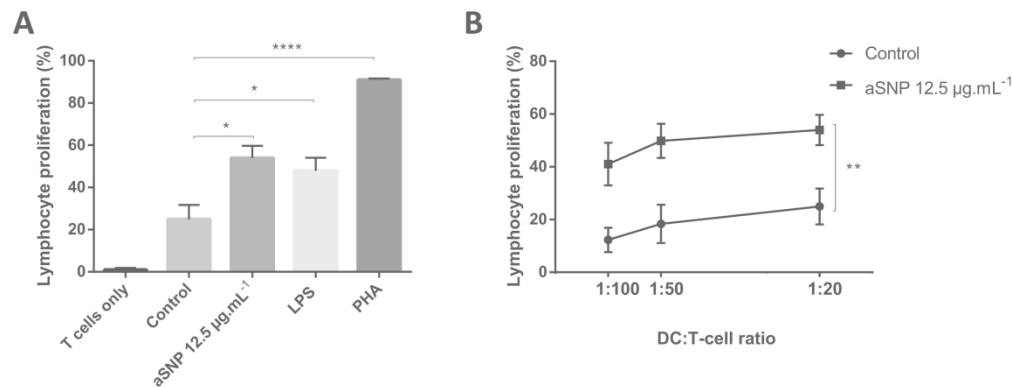


Figure 4. MoDCs treated with fumed silica nanoparticles increased allogeneic T-cell proliferation. A. Cells were incubated with 12.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of fumed silica nanoparticles for 16 hours. LPS and PHA were used as positive controls. Treated moDCs were co-cultured with allogeneic CD4⁺ T-cells loaded with CFSE at a ratio of 1 moDC for 20 CD4⁺ T-cells. Proliferation was measured after 5 days of co-culture as the percentage of CFSE^{low} CD4⁺ T-cells. Untreated moDCs were used as control. Results were expressed as percentage of increase in lymphocyte proliferation and represented the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. *: $p < 0.05$, ****: $p < 0.0001$, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. B. Fumed silica nanoparticles increased T-cell proliferation at all DC:T-cell tested ratio. Cells were incubated with 12.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of fumed silica nanoparticles for 16 hours. LPS and PHA were used as positive controls. Treated moDC were co-cultured with allogeneic CD4⁺ T-cells loaded with CFSE at different ratios: 1:100 (1 moDC per 100 T-cells), 1:50 (1 moDC for 50 T-cells) and 1:20 (1 moDC for 20 T-cells). Proliferation was measured after 5 days of co-culture as the percentage of CFSE^{low} CD4⁺ T-cells. Untreated moDCs were used as control. Results were expressed as percentage of increase in lymphocyte proliferation and represented the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. **: $p < 0.01$, two-way ANOVA and Sidak's multiple comparison test.

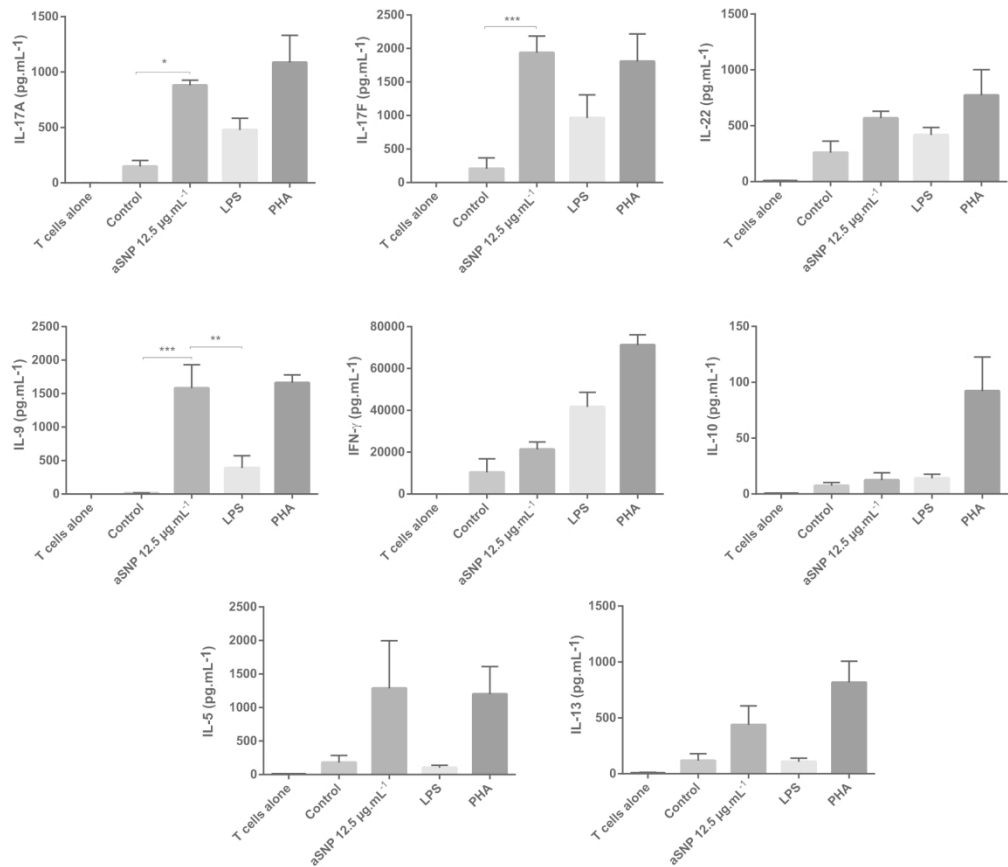


Figure 5. Fumed silica nanoparticles increased the production of IL-9 and IL-17A/F by CD4+ T-cells. Cells were incubated with 12.5 μg.mL⁻¹ of fumed silica nanoparticles for 16 hours. LPS and PHA were used as positive controls. Treated moDCs were co-cultured with allogeneic CD4+ T-cells loaded at a ratio of 1 moDC for 20 CD4+ T-cells. On day 5, cytokines levels were measured in co-culture supernatants using U-PLEX MSD technology. Untreated moDCs were used as control. Results were expressed in quantity of detected cytokines (pg.mL⁻¹) and represented the mean ± SEM of three independent experiments. *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001 one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Amorphous silica nanoparticles trigger human dendritic cell maturation and CD4 + T-lymphocyte activation

Alexia Feray, Marie Hullo, Eléonore Guillet, Natacha Szely, François-Xavier Legrand, Emilie Brun, Thierry Rabilloud, Marc Pallardy and Armelle Biola-Vidamment

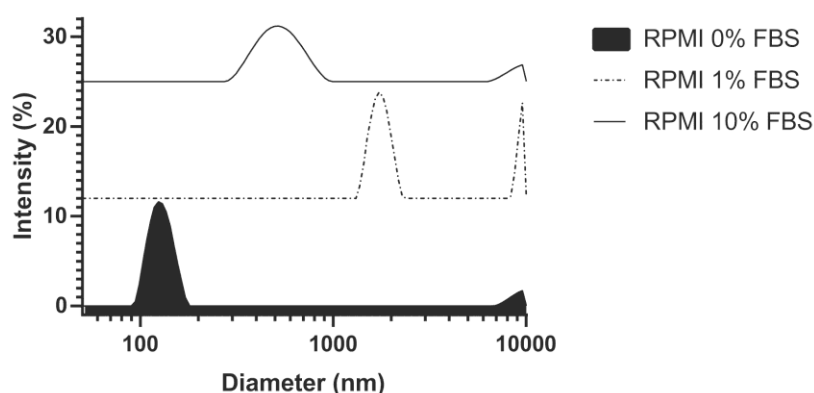


Figure S1. Size distribution of fumed silica nanoparticles

Intensity-weighted size distribution profiles of fumed silica nanoparticles in pure RPMI 1640, in RPMI 1640 supplemented with 1% of Fetal Calf Serum and in RPMI 1640 supplemented with 10% of Fetal Calf Serum were obtained using Dynamic Light Scattering. Each measure was repeated ten times.

Amorphous silica nanoparticles trigger human dendritic cell maturation and CD4 + T-lymphocyte activation

Alexia Feray, Marie Hullo, Eléonore Guillet, Natacha Szely, François-Xavier Legrand, Emilie Brun, Thierry Rabilloud, Marc Pallardy and Armelle Biola-Vidamment

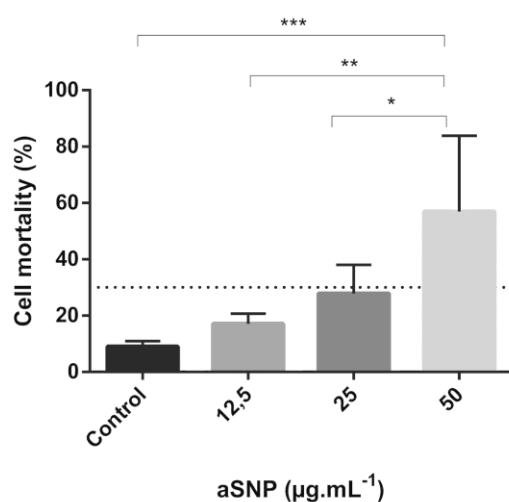


Figure S2. Fumed silica nanoparticles effect on moDCs viability

MoDCs were incubated with 12.5, 25 and 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of fumed silica nanoparticles for 16 hours.

Cells were then collected, washed and cell viability analyzed by flow cytometry using propidium iodide staining.

Results were expressed in percentage of cell mortality and represented the mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

1.2 Résultats complémentaires : étude de l'impact des nanoparticules de silice amorphe sur la réponse lymphocytaire T dirigée contre les β -lactamines

1.2.1 Introduction

Nos précédents résultats ont permis de démontrer les effets pro-adjuvants des aSNP sur les cellules du système immunitaire dans un modèle de co-culture allogénique (**Article n°2, soumis**). L'objectif à la suite de ce travail était d'étudier l'impact de cet effet signal de danger sur la taille du répertoire de LT CD4⁺ reconnaissant la BP. En effet, ces nanoparticules étant utilisées comme additifs alimentaires, il est possible qu'elles se retrouvent en co-exposition par voie orale avec les BL, dont la nature des signaux de danger à l'origine du déclenchement de l'allergie reste encore inconnue. Notre hypothèse est que les aSNP, comme modèle d'un agent environnemental, pourraient jouer le rôle de signaux de danger en activant les DCs ce qui déclencherait une réaction immunitaire dirigée contre le médicament qui, initialement, n'est pas perçu comme un danger. Pour répondre à cette question, nous avons élaboré un modèle de co-culture autologue avec des moDCs [exposées au médicament (HSA-BP) en présence ou en absence d'aSNP] et des LT CD4⁺ naïfs humains. Nos résultats ont permis de confirmer l'effet pro-adjuvant des aSNP sur la réponse lymphocytaire T spécifique du bioconjugué HSA-BP. En outre, nos résultats préliminaires ont également montré un impact des aSNP sur la polarisation des LT CD4⁺ reconnaissant le médicament avec une augmentation des lignées de LT sécrétant de l'IL-5. Ces résultats suggéraient un effet pro-allergisant (Th2) des aSNP favorisant ainsi le développement de l'allergie médicamenteuse.

1.2.2 Matériel et méthodes

Le modèle de co-culture autologue polarisé

Les LT CD4⁺ naïfs sont isolés par purification magnétique négative (Naive CD4⁺ T cell Isolation Kit II human, Miltenyi Biotec Paris, France). La pureté est évaluée par la mesure de l'expression des marqueurs CD4, CD45RA et CCR7 par cytométrie en flux (supérieure à 90%). Les moDCs immatures sont ensuite incubées avec le bioconjugué HSA-BP à 10 μ M dans un milieu RPMI sans protéines. Au bout d'une heure, les aSNP (12,5 μ g.mL⁻¹) sont ajoutées ou non pour une durée de 16 heures. Pendant la première heure, les cellules sont exposées en l'absence de sérum pour limiter la

formation d'agrégats. Ensuite, le milieu est ramené à 10% de sérum humain AB pour la survie des cellules (SAB, Human serum from human male AB plasma, USA origin, Sterile-filtered, H4522, Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Le lendemain, les cellules sont lavées et mises en culture avec les LT CD4⁺ naïfs au rapport 1 :10 (10 000 moDCs par puits pour 100 000 LT) dans un milieu RPMI 1640 à 10% de SAB (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France) **supplémenté avec de l'IL-12** (10 ng.mL⁻¹, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (Invitrogen, Saint Aubin, France), de l'IL-6 (10000 U.mL⁻¹, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) et de la primocine (5 µg.mL⁻¹) (Invitrogen, Saint Aubin, France). Les LT CD4⁺ naïfs sont ensuite restimulés de façon similaire trois fois à 7 jours d'intervalle avec des moDCs chargées comme précédemment en présence d'IL-2 (10 U.mL⁻¹) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), et d'IL-7 (5 ng.mL⁻¹) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Un ELISpot-IFN- γ est réalisé une semaine après la troisième restimulation afin de détecter les lignées lymphocytaires T spécifiques du bioconjugué HSA-BP. Les plaques de nitrocellulose (96 puits, Millipore, Guyancourt, France) sont incubées avec un anticorps de capture IgG1 humain anti-IFN- γ (1-D1K, Mabtech, Augustendalstorget, Suède) pendant une nuit à 4°C. Les plaques sont ensuite saturées avec du milieu de culture RPMI supplémenté avec 10% de SVF sur la nuit à 4°C. Ces plaques sont ensuite lavées et utilisées pour établir une co-culture avec les LT CD4⁺ induits précédemment et des moDCs préalablement chargées avec la HSA-BP ou la HSA (témoin) dans un milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SAB au ratio 1 :10 (3000 moDCs pour 30 000 LT). La co-culture est incubée sur la nuit à 37°C. Le lendemain, les cellules sont éliminées des plaques et un anticorps secondaire biotinylé IgG1 murin anti-IFN- γ (7B6-1, Mabtech, Augustendalstorget, Suède) est ajouté pendant 2 heures à 37°C. Les plaques sont ensuite lavées et incubées avec une solution d'extravidine pendant 1 heure à température ambiante. Ces plaques sont ensuite lavées puis incubées avec du substrat (nitro-blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) jusqu'à l'apparition des premiers spots. Les spots sont comptés par un lecteur de plaque ELISpot Autoimmun Diagnostika (AID, Straßberg, Allemagne). Une lignée de LT CD4⁺ est jugée positive si le nombre de spots est supérieur à 30 spots et supérieur à deux fois le nombre de spot obtenus par le bruit de fond (co-culture avec des moDCs chargées uniquement avec de la HSA).

Le modèle autologue non polarisé

Les LT CD4⁺ naïfs sont isolés par purification magnétique négative (Naive CD4⁺ T cell Isolation Kit II human, Miltenyi Biotec Paris, France). La pureté est évaluée par la mesure de l'expression des marqueurs CD4, CD45RA et CCR7 par cytométrie (supérieure à 90%). Les moDCs immatures sont ensuite incubées avec le bioconjugué HSA-BP à 10µM dans un milieu RPMI non supplémenté. Au bout

d'une heure, les aSNP ($12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sont ajoutées ou non pour une durée de 16 heures. Pendant la première heure, les cellules sont exposées en l'absence de sérum pour limiter la formation d'agrégats. Ensuite, le milieu est ramené à 10% de SAB pour la survie des cellules (SAB, Human serum from human male AB plasma, USA origin, Sterile-filtered, H4522, Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Le lendemain, les cellules sont lavées et mises en culture avec les LT CD4⁺ naïfs avec un rapport 1 :10 (10 000 moDCs par puits pour 100 000 LT) dans un milieu RPMI à 10% de SAB supplémenté avec de l'IL-6 (10000 U.mL^{-1} , R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) et de la primocine ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Invitrogen, Saint Aubin, France) **mais sans IL-12 pour éviter de polariser les LT**. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs sont ensuite re-stimulés de façon similaire trois fois à 7 jours d'intervalle avec des moDCs chargées comme précédemment en présence d'IL-2 (10 U.mL^{-1}) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), et d'IL-7 (5 ng.mL^{-1}) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Afin de détecter les lignées lymphocytaires T spécifiques du bioconjugué HSA-BP, les surnageants des co-cultures sont récoltés 1 semaine après la troisième restimulation et la sécrétion d'IFN- γ , d'IL-5 et d'IL-17A est mesurée par électrochemiluminescence sur la plateforme multiplex Meso Scale Discovery (MSD, Rockville, MA, USA) en suivant les instructions du fabricant. Une lignée LT CD4⁺ est jugée spécifique de la HSA-BP si la concentration de cytokines sécrétées est supérieure à deux fois celle retrouvée dans le bruit de fond (c'est-à-dire les lignées qui ont été restimulées avec des moDCs chargées uniquement avec de la HSA). Une lignée est jugée polarisée si elle ne sécrète qu'une seule des trois cytokines mesurées (simple positive).

1.2.3 Résultats

Les nanoparticules de silice amorphe augmentent l'activation des LT CD4⁺ reconnaissant la HSA-BP

Afin d'étudier l'effet des aSNP sur la réponse lymphocytaire dirigée contre le médicament, les moDCs traitées par le bioconjugué HSA-BP sont exposées ou non aux aSNP puis mises en co-culture avec les LT CD4⁺ naïfs. Le test ELISpot-IFN- γ réalisé après 3 restimulations nous a permis d'observer que sur les 6 donneurs sains testés, la fréquence de LT CD4⁺ naïfs activés par la HSA-BP était statistiquement plus élevée lorsque les moDCs étaient incubées en présence des aSNP. En effet, la fréquence moyenne obtenue en présence de aSNP était de **0,643** LT CD4⁺ naïfs reconnaissant la HSA-BP par millions de LT CD4⁺ naïfs circulants comparée à **0,198** LT CD4⁺ naïfs reconnaissant la HSA-BP par millions de LT CD4⁺ naïfs circulants pour la fréquence moyenne en absence de aSNP (Figure 22).

Ces résultats suggèrent donc que les aSNP pourraient jouer un rôle pro-adjuvant sur la réponse lymphocytaire T spécifique de la HSA-BP.

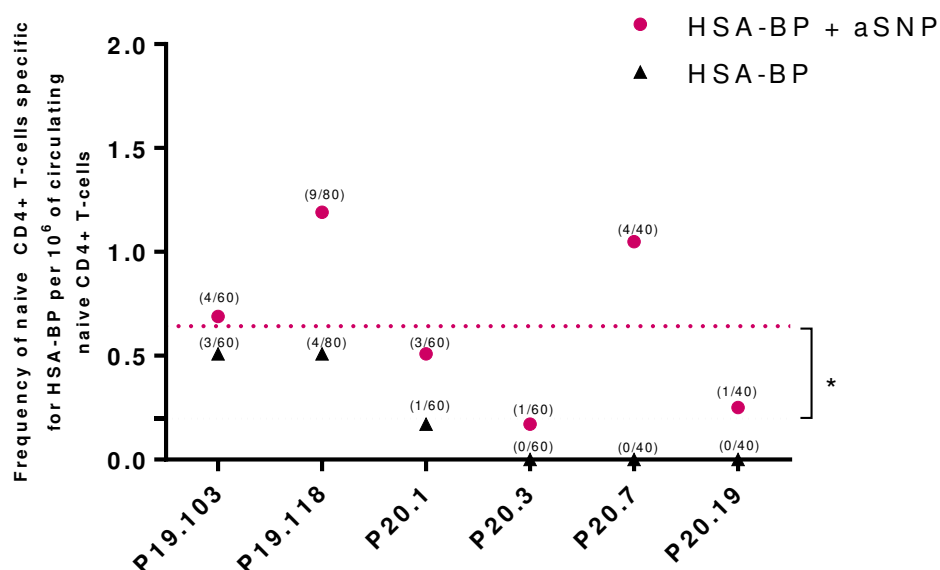


Figure 22. Les nanoparticules de silice amorphe augmentent l'activation des lymphocytes T CD4+ naïfs reconnaissant la HSA-BP

Les moDCs sont incubées avec 10 μM de HSA-BP en présence ou en absence de 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'aSNP pendant 16 heures (dont 1 heure sans sérum). Les moDCs sont ensuite lavées puis mises en co-culture avec des LT CD4 + naïfs autologues avec un rapport DC : LT de 1 moDC pour 10 LT CD4 + (1 :10) en présence d'IL-12. La moitié des lignées LT CD4+ naïves est restimulée avec les moDCs HSA-BP et l'autre moitié avec les moDCs exposées à la HSA-BP et aux aSNP. L'activation des LT CD4+ naïfs reconnaissant la HSA-BP est mesurée après 3 semaines de restimulations grâce à la technique ELISpot IFN- γ . Les résultats représentent la fréquence de LT CD4+ naïfs reconnaissant la HSA-BP par million de LT CD4+ naïfs circulants calculée grâce à la loi de Poisson. Le graphique représente les données de 6 expériences indépendantes. *: $p < 0,05$, analyse statistique par le test de facteurs appariés Wilcoxon.

Les nanoparticules de silice amorphe favorisent la sécrétion d'IL-5 par les lignées de LT reconnaissant le médicament

Afin d'étudier l'effet des aSNP sur la polarisation des LT CD4+ reconnaissant la HSA-BP, nous avons développé un modèle de co-culture autologue non polarisé. Pour cela, la co-culture est établie de façon similaire à ce qui a été décrit précédemment à la différence que les milieux ne sont pas

supplémentés en IL-12. La sécrétion d'IFN- γ , d'IL-5 et d'IL-17A est ensuite mesurée par électrochemiluminescence après 3 restimulations. Ce modèle nous a permis d'étudier la polarisation naturelle des LT en réponse aux DCs chargée avec la HSA-BP et préalablement exposées aux aSNP. Nous avons observé une signature cytokinique des lignées de LT reconnaissant la HSA-BP restimulées avec les DCs exposées aux nanoparticules. En effet, un total de **6/30 lignées sécrétant de l'IL-5** ont été identifiées en présence d'aSNP comparées à seulement **1/30 lignée sécrétant de l'IL-5** en absence des nanoparticules (Figure 23). Les aSNP n'avaient cependant pas d'effet sur les lignées sécrétant de l'IFN- γ (1/30) ou de l'IL-17A (0/30). Ces résultats suggèrent que les aSNP pourraient agir comme des signaux pro-allergisants en favorisant une réponse allergique Th2 dirigée contre le médicament.

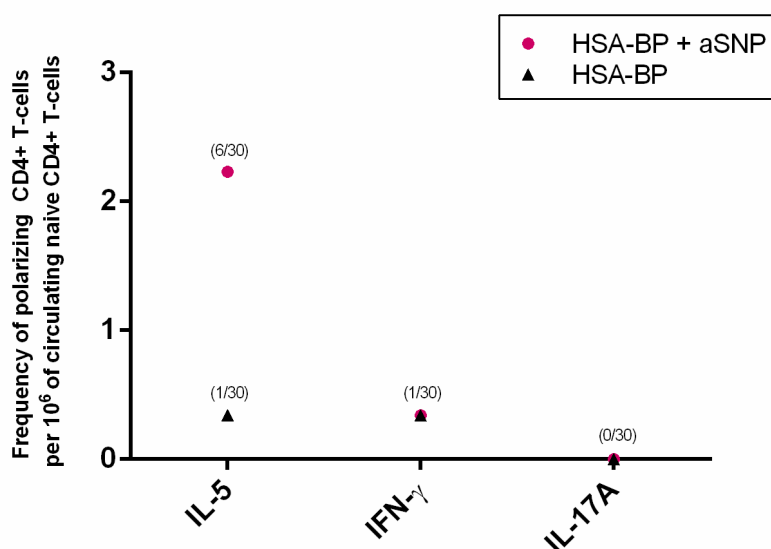


Figure 23. Les nanoparticules de silice amorphe orientent la polarisation du répertoire de lymphocytes T CD4+ naïfs reconnaissant la HSA-BP vers une réponse Th2

Les moDCs sont incubées avec 10 μ M de HSA-BP en présence ou en absence de 12,5 μ g.mL⁻¹ d'aSNP pendant 16 heures (dont 1 heure sans sérum). Les moDCs sont ensuite lavées puis mises en co-culture avec des LT CD4+ naïfs autologues avec un rapport DC : LT de 1 moDC pour 10 lymphocytes T CD4 + (1 :10). La moitié des lignées LT CD4+ naïves est restimulée avec les moDCs HSA-BP et l'autre moitié avec les moDCs exposées à la HSA-BP et aux aSNP. Après trois restimulations, les surnageants de co-cultures sont récoltés et la sécrétion d'IFN- γ , d'IL-5 et d'IL-17A est mesurée par électrochemiluminescence sur une plateforme multiplex MSD. Le graphique représente les résultats d'une expérience.

II. Article n°3: Intracellular haptentation of benzylpenicillin with human serum albumin in dendritic cells trigger CD8+ T-cell activation (en préparation)

L'allergie aux BL est responsable de signes cliniques divers allant de l'urticaire aux hépatites cytolytiques. Une telle hétérogénéité s'explique par des mécanismes immunologiques différents. En effet, les LT CD4+ sont responsables des réactions médiées par la sécrétion d'anticorps alors que les LT CD8+ sont responsables des réactions cytotoxiques. Plusieurs études de notre équipe ont contribué à mieux comprendre l'immunisation des LT CD4+ face à la BP (Nhim *et al.* 2013, Scornet *et al.* 2016, Azoury *et al.* 2018). Cependant, les mécanismes qui gouvernent l'activation des LT CD8+ sont encore mal compris. Récemment, les travaux du laboratoire ont permis de montrer que le bioconjugué HSA-BP extracellulaire, responsable de l'activation des LT CD4+ reconnaissant la BP, n'était pas reconnu par les LT CD8+, laissant suggérer un mécanisme différent et excluant les mécanismes de présentation croisée (Bechara *et al.* 2019).

Dans cet **article n°3**, nous avons émis l'hypothèse que la BP pourrait entrer sous sa forme libre dans les DCs pour s'hapténiser avec des protéines intracellulaires. Le bioconjugué formé serait alors reconnu comme un antigène intracellulaire et serait orienté vers la voie endogène d'apprêtement par les DCs déclenchant ainsi l'activation des LT CD8+. L'objectif de ce travail a donc été de mieux comprendre les conditions cellulaires qui favoriseraient cette hapténisation intracellulaire. Nos résultats d'imagerie nous ont permis de confirmer que la BP était capable d'entrer sous sa forme libre dans les DCs dès la première heure d'incubation. Une fois la BP internalisée, les cellules étaient lavées et mises dans un milieu dit « de récupération » afin de laisser l'apprêtement de l'antigène se conduire. Afin d'identifier quelles protéines intracellulaires étaient capables de se conjuguer avec la BP libre à l'intérieur des DCs, nous avons testé quatre milieux de récupération différents : le RPMI 1640 nu, l'AIMV, le RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF et de l'IMDM supplémenté avec 10% de SAB. Nos résultats ont montré que les profils d'hapténisation intracellulaire étaient différents en fonction de la composition du milieu de récupération. Nos résultats ont montré que seules les DCs incubées dans un milieu riche en HSA (AIMV, IMDM 10% SAB ou RPMI 1640 à 10 mg.mL⁻¹ de HSA) formaient un bioconjugué médicamenteux au niveau intracellulaire, appuyant ainsi le rôle de cette protéine dans l'hapténisation intracellulaire de la BP libre. Par la suite, nos expériences de spectrométrie de masse et de western blot ont permis de confirmer la présence d'un bioconjugué HSA-BP formé au niveau intracellulaire de façon progressive à partir de 30 minutes d'incubation dans un milieu contenant de la HSA. En outre dans les expériences de co-culture autologues, les LT CD8+ naïfs reconnaissant la BP libre n'étaient activés qu'en présence de HSA dans le milieu cellulaire « de récupération ».

Ces résultats ont permis de montrer que l'environnement cellulaire impactait considérablement le processus d'hapténisation du médicament et le type de LT activés. Une fois la BP libre internalisée dans les DCs, la présence d'un milieu cellulaire riche en HSA favoriserait l'hapténisation intracellulaire de la BP libre et l'activation des LT CD8+ cytotoxiques. La HSA étant particulièrement abondante dans le foie où elle est synthétisée, ces résultats pourraient permettre de mieux comprendre le mécanisme de déclenchement des DILI en réponse aux BL.

INTRACELLULAR HAPTENATION OF BENZYL PENICILLIN WITH HUMAN SERUM ALBUMIN IN HUMAN DENDRITIC CELLS TRIGGER CD8+ T-CELL ACTIVATION

Alexia FERAY¹, Rami BECHARA¹, Natacha SZELY¹, Stéphanie NICOLAY², Emmanuel NONY³, Delphine JOSEPH⁴, Marc PALLARDY¹

¹*Inflammation, Microbiome and Immunosurveillance, INSERM, UMR996, université Paris-Saclay, 92290 Châtenay-Malabry, France*

²*IPSIT, université Paris-Saclay, 92290 Châtenay-Malabry, France*

³*Institut de Recherches Internationales Servier, 92284 Suresnes, France*

⁴*BioCIS, CNRS, université Paris-Saclay, 92290 Châtenay-Malabry, France*

ABSTRACT

Background: Beta-lactams allergy is the most commonly reported drug allergy and constitutes an important health problem. Recently, we showed the pre-existence of a naive CD4+ T-cell repertoire recognizing benzylpenicillin (BP) conjugated to human serum albumin (HSA). These naive CD4+ T-cells may contribute to antibody-dependent anaphylaxis, the most common allergic outcome observed with beta-lactams. However, this HSA-BP extracellular bioconjugate was not recognized by CD8+ T-cells suggesting another mechanism for triggering cytotoxic CD8+ T-cells activation responsible of drug induced liver injury (DILI). Our results showed that free BP could be at the origin of this CD8+ T-cell activation. The proposed mechanism would involve intracellular formation of bioconjugates between BP and intracellular HSA in dendritic cells (DCs) followed by MHC class I-dependent presentation to naive CD8+ T-cells.

Objective: The objective of this study was therefore to identify the cellular and molecular mechanisms of BP recognition by CD8+ T-cells.

Methods: Co-cultures were established with naive CD8+ T-cells and autologous DCs loaded with free BP in a serum free medium. DCs were washed, incubated in a recovery medium (with or without HSA) and then co-cultured with naive CD8+ T-cells. The latter were restimulated once a week using the

same protocol and specific CD8+ T-cell activation was measured after 3 restimulations using an IFN- γ ELISpot assay.

Results: We were able to detect a naive CD8+ T-cells repertoire recognizing free BP in 8 out of 9 tested healthy donors. We observed that intracellular haptentation of BP occurred only when the recovery medium contained HSA. These results were confirmed with autologous co-cultures of DCs and CD8+ T-cells that recognized free BP only in the presence of a HSA-rich recovery medium. The intracellular HSA-BP bioconjugate identified by mass spectrometry and western blot was formed progressively and in a dose-dependent manner during the incubation of DCs in HSA.

Conclusion: This work demonstrates for the first time an alternative haptentation mechanism with HSA taking place in the intracellular compartment of DCs. HSA and free BP enter independently into DCs leading to the progressive formation of intracellular HSA-BP bioconjugate that is recognized by CD8+ T-cells. As the liver is the organ of synthesis of HSA, these results may provide a better understanding of the pathogenesis of DILI caused by CD8+ T-cells in response to beta-lactams.

INTRODUCTION

Beta-lactam (BL) allergy is an important public health issue with symptoms commonly ranging from anaphylaxis to more delayed reactions such as drug-induced liver injury (DILI) (Pichler 2003, Roujeau 2005). BL allergy accounts for 75% of allergies that occur in hospitals and 8% of the United States population has a record of penicillin allergy (Gomes and Demoly 2005, Macy 2014). Immunisation of patients to BL at the origin of allergic mechanisms follows the hapten hypothesis where molecules bind to proteins to acquire immunogenicity. The conjugate between proteins and BL is then detected by dendritic cells (DCs) triggering a specific immunological response (Yvon *et al.* 1988, Magi *et al.* 1995, Brander *et al.* 1995, Meng *et al.* 2011, Ariza *et al.* 2012, Ariza *et al.* 2014).

BL allergy also includes serious clinical outcomes such as DILI that are mediated by cytotoxic CD8+ T-cells. These reactions are unpredictable and serious by nature: the prognosis might be fatal

with fulminant hepatitis. As a result, there is a considerable interest in understanding the pathogenesis features of BL-induced CD8⁺ T-cell reactions to develop more efficient methods for their prediction and diagnosis. Most of the research on BL-mediated DILI has used the flucloxacillin as a model. Indeed, after amoxicillin, flucloxacillin is the second BL most frequently responsible for DILI (Björnsson and Olsson 2005). Regarding the mechanism involved, flucloxacillin and its metabolite (5-hydroxymethyl flucloxacillin) are able to conjugate with proteins, in particular HSA and CYP3A4 (Carey and van Pelt 2005, Jenkins *et al.* 2009), to trigger the activation of CD8⁺ T-cells (Puig *et al.* 2021) with significant association with the expression of HLA-B*57:01 molecules (Monshi *et al.* 2013, Waddington *et al.* 2020, Weaver *et al.* 2020).

Antigens can be processed by DCs in two different ways. Extracellular antigens are endocytosed and oriented to the exogenous pathway where they undergo early endosome acidification triggering their proteolysis by endosomal proteases (Neefjes *et al.* 2011, Jurewicz and Stern 2018). Resulting peptides are then conjugated to MHC class II molecules and presented to CD4⁺ T-cells. Intracellular antigens are directed to the endogenous pathway where they are taken up by the proteasome to be fractionated into peptides and presented to CD8⁺ T-cells via MHC class I molecules (Holland *et al.* 2013, Heijmans *et al.* 2020). Note that the so called “cross-presentation” mechanism allows extracellular antigens presentation via MHC class I molecules triggering cytotoxic responses (Amigorena and Savina 2010, Joffre *et al.* 2012). Our group demonstrated that extracellular HSA-BP did not trigger CD8⁺ T-cell activation in contrast to what studies previously showed for naive CD4⁺ T-cells repertoire, suggesting that cross-presentation was not at the origin of naive CD8⁺ T-cells activation (Nhim *et al.* 2013, Azoury *et al.* 2018, Bechara *et al.* 2019). Recently, several studies showed that protein-binding of BL can occur in the intracellular compartment of DCs with proteins such as elongation factors 1 α and 2, heat shock protein 70 (HSP 70) and α -enolase (Ariza *et al.* 2014, Sánchez-Gómez *et al.* 2017, Waddington *et al.* 2020).

HSA is the most abundant protein in human serum and, therefore, is considered as the primary target for BL haptenation. Several studies have demonstrated the presence of HSA-BL bioconjugates in

the blood of allergic patients (Yvon *et al.* 1988, Yvon *et al.* 1989, Yvon *et al.* 1990, Brander *et al.* 1995, Meng *et al.* 2011). Haptenation with HSA has been demonstrated with many BL including BP (Meng *et al.* 2011, Nhim *et al.* 2013, Scornet *et al.* 2016, Azoury *et al.* 2018, Bechara *et al.* 2019), flucloxacillin (Jenkins *et al.* 2009), amoxicillin (Ariza *et al.* 2012), ampicillin (Magi *et al.* 1995), piperacillin (Whitaker *et al.* 2011, Jenkins *et al.* 2013) and aztreonam (Jenkins *et al.* 2013).

We raised the hypothesis that in certain conditions, HSA can be present in the intracellular compartment of DCs being a likely target for free BL. In this work, we loaded DCs with human HSA and then exposed them to free BP. Results obtained with an autologous DC:CD8⁺ T-cell co-culture confirmed that DCs stimulated naive CD8⁺ T-cells only in the presence of HSA. Mass-spectrometry experiments confirmed the presence of intracellular BP-HSA conjugates.

METHODS

Generation of primary cultures of human monocyte-derived dendritic cells

Human DCs were derived from monocytes (moDCs) isolated from human peripheral blood supplied by the French Blood Bank (EFS, Rungis, France). Healthy donors gave their written consent for the use of blood donation for research purposes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were sorted from buffy coats by density centrifugation on a Ficoll gradient. Monocytes were then isolated through positive magnetic selection using MidiMacs separation columns and anti-CD14 antibodies coated on magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The purity of CD14 cells was assessed by flow cytometry (FACS Attune NxT®, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and was greater than 95%. CD14 positive cells were differentiated in immature moDCs after 4 days in RPMI 1640 supplemented with GlutaMAX (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France), 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France), 550 U.mL⁻¹ granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rh-GM-CSF, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), 550 U.mL⁻¹ interleukin-4 (rh-IL4, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), 1 mM sodium pyruvate (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France), 100 µg.mL⁻¹ streptomycin and 100 U.mL⁻¹ penicillin (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin,

France). DCs immature phenotype was controlled by flow cytometry (FACS Attune NxT® acoustic focusing cytometer, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) using anti-CD83 (<5%), anti-CD86 (<30%), anti-CD1a (>70%) and anti-DC-SIGN (>90%) antibodies (BD Biosciences, Rungis, France).

Western blots and detection of benzylpenicillin-derived cellular adducts

MoDCs were treated with two different concentrations of BP (2 and 5 mM) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) for 1 hour in RPMI 1640 medium without proteins then washed in PBS and kept in recovery media (AIMV, RPMI without protein, RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, RPMI 1640 supplemented with 10 mg.mL⁻¹ of HSA or IMDM supplemented with 10% of human serum (SAB)) for 0 to 3 hours. Thirty micrograms of protein from cell lysates were loaded on 12% polyacrylamide gels (TGX Stain-Free FastCast; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Proteins were transferred to PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories). Membranes were then incubated with a mouse anti-penicillin monoclonal antibody (Pen9, Abcam, Cambridge, UK) or anti-HSA antibody (Abcam) to detect the formation of the corresponding adducts. Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (ChemiDoc XRS+, Bio-Rad Laboratories) and controlled in relation to the total charge deposit of each well in the gel.

Generation of naive CD8+ recognizing benzylpenicillin

Naive CD8+ T-cells were isolated from PBMCs by magnetic selection (Miltenyi Biotec). Isolation of naive CD8+ T-cells was performed using a two-step procedure. First, naive T-cells were enriched by depletion of non-naive T-cells and NK cells using a cocktail of biotin-conjugated antibodies and anti-biotin microbeads. In a second step, the enriched naive T-cells were labelled with anti-CD8 microbeads for subsequent positive selection of the CD8+ naive T-cells. Percentage of CD8+ CD45RA+CCR7+ T-cells (always >95%) was evaluated using flow cytometry (FACS Attune NxT® acoustic focusing cytometer, ThermoFisher Scientific). The following monoclonal antibodies were used: CD8-APC (BD Biosciences, Rungis, France), CD45RA-FITC (BD Biosciences), CCR7-FITC (Miltenyi Biotec), and

appropriate isotype controls were also used to determine the non-specific staining. MoDCs were loaded with free BP (2 mM) and β 2-microglobulin (5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Sigma-Aldrich) in RPMI 1640 without protein for 1 hour then cells were washed and kept in a recovery media (AIMV or RPMI 1640 supplemented with 10% FCS) during 16 hours in presence of 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of LPS (Sigma-Aldrich). In both cases, moDCs were washed and 10^4 cells were added to 10^5 autologous naive CD8+ T-cells per round-bottom microwell containing 200 μL of resting media supplemented with 11 000 U/mL of rh-IL-6 and 10 ng/mL rh-IL-12 (R&D Systems, Lille, France). T-cells were restimulated on day 7, 14, and 21, with autologous moDCs loaded as described above with rh-IL-2 (60 U/mL) (R&D Systems) and rh-IL-7 (5 ng/mL) (R&D Systems). Rh-IL-15 (25 ng/mL) (R&D Systems) was also added at day 21.

ELISpot assay

IFN- γ ELISpot assay (MabTech, Nacka Strand, Sweden) was performed after 16 hours of co-culturing T-cells and moDCs loaded with free BP (2 mM) according to the manufacturer's instructions. The number of spot was determined using the AID ELISpot Reader system (AID, Strassberg, Germany). Unloaded moDCs were used as control. T-cell lines were considered specific for BP when the spot count was over 30 spots and at least two fold higher for BP-loaded moDCs compared to unloaded moDCs.

Confocal microscopy experiments

MoDCs were exposed to fluorescent penicillin V (Bocillin, 150 μM , ThermoFisher Scientific) for 1 hour in RPMI 1640 without proteins to avoid any extracellular haptentation. After incubation, cells were washed and incubated during 16 hours in RPMI 1640 at 10 mg.mL^{-1} of HSA (Sigma-Aldrich) in presence of 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of LPS. After incubation, cells were washed, fixed and permeabilized (Invitrogen eBioscience, ThermoFisher Scientific) to be observed in Fluoromount-G™ Mounting Medium, with DAPI (ThermoFisher Scientific). Fluorescence images were performed using a Leica TCS SP8 Confocal Laser Scanning Microscope (Leica Microsystems, Germany) with an HC PL APO CS2 63x/1.40 oil immersion objective and equipped with a 405 nm diode and a WLL Laser for excitation. Images were

acquired using Leica SP8 LAS X software (Version 3.5.5; Leica Microsystems, Germany) and processed using the FIJI/ ImageJ software. To analyze the signal in the whole cell, either several images in different Z positions for the same cell or z-stacks were acquired. For z-stack, optical sectioning was performed each 0.9 μm along the z axis.

Mass spectrometry experiments

MoDCs were exposed to free BP (40 mM) for 1 hour in RPMI 1640 without proteins to avoid extracellular haptentation. BP concentration was higher compared to co-culture experiments to augment the quantity of haptentated peptides. MoDCs were then washed and incubated for 3 hours in RPMI 1640 with 10 mg.mL⁻¹ of HSA. Proteins were loaded and separated by 10% SDS-PAGE (Bio-rad). A short migration was then performed allowing proteins to penetrate the gel, and gels were stained with Coomassie colloidal blue (EZblue, Sigma–Aldrich) to recover a 2mm bands containing HSA and derivated forms. A reduction/alkylation step was performed with dithiothreitol (10 mM) and iodoacetamide 55 mM. Pieces of gels were rehydrated at 4°C in 12 ng. μL^{-1} sequencing grade modified trypsin (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), solubilized in 25 mM of ammonium carbonate during 1 hour and then digested at 37°C overnight. After tryptic digestion, peptides were extracted by incubating gel pieces in extraction solvent (0.1% formic acid and 50% acetonitrile). Peptides solution were pooled according to their composition, concentrated to reach a final volume of 50 μL . Samples analysis was performed with a Waters Xevo G2-XS QToF - ACQUITY UPLC M-Class system run by Masslynx v4.1 (Waters, Guyancourt, France). Buffers were 0.1% formic acid in water (buffer A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (bufB). For each sample, 1 to 4 μL of samples were loaded onto a C18 trap column NanoE MZ Sym C18 5 μm 180 μm x 20 mm (Waters), at 20 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ and desalted with 99.5% of buffer A. After 2 min, the precolumn was connected to a C18 nanocolumn NanoE MZ HSS C18 T3, 1,7 μm 75 μm x 100 mm (Waters). Peptides were separated using a linear gradient from 5 to 85% of buffer B for 100 min at 300 nL. min^{-1} . One run took 120 min, including the regeneration and the equilibration steps. Column temperature was set to 40°C.

We conducted two mass spectrometry experiments: the first one used data independent acquisition (DIA) mode. This technique focuses on a narrow mass window of precursors and acquires MS/MS data from all precursors detected within that window. This mass window is then stepped across the entire mass range, systematically collecting MS/MS data from every mass and from all detected precursors. For DIA, peptides search was performed with the following parameters: enzymatic cleavage by trypsin, digestion with two to three possible misscleavages, static modifications of carbamidomethylated lysine and potential modifications of oxidized Methionine and BP addition on lysine. Only peptides reaching a score of 5 or more were taken onto account. Uniprot KB/SwissProt Human (9606) and HSA (P02768) databases were used combined with a homemade contaminant database (trypsin, keratine, etc.). FDR was less than 4%. The identified proteins were filtered with a minimum of three fragments per peptide, seven fragments per protein, and one peptide per protein. The second experiment used data dependent acquisition (DDA) mode where the mass spectrometer selects the most intense peptide ions in a first stage of tandem mass spectrometry, and then they are fragmented and analyzed in a second stage of tandem mass spectrometry.

Statistics

Naive CD8+ T-cells frequency was estimated using the Poisson distribution law which is a standard probabilistic model for describing random occurrences (Venturi *et al.* 2008, Nhim *et al.* 2013, Azoury *et al.* 2018):

$$Frequency = \frac{-Ln(\frac{Number\ of\ negative\ T\ cell\ lines}{Total\ number\ of\ T\ cell\ lines\ tested})}{Number\ of\ naive\ CD8 + Tcells\ per\ well}$$

RESULTS

1. Frequency of the naive CD8+ T-cells repertoire recognizing benzylpenicillin

Previous studies showed that extracellular HSA-BP did not trigger CD8+ T-cell activation excluding cross-presentation mechanisms (Bechara *et al.* 2019). Our hypothesis was that the free BP molecule binding to an intracellular component could activate CD8+ T-cells. Using fluorescent penicillin (Bocillin), we were able to confirm by confocal microscopy the internalization of the free drug inside human moDCs after one hour of incubation in RPMI 1640 free of proteins (Figure 1A). CD8+ T-cell activation was confirmed by exposing moDCs to free BP (2 mM) in co-culture with naive CD8+ T-cells. After 3 restimulations in the same conditions, results of ELISpot IFN- γ showed the presence of a naive CD8+ T-cell repertoire recognizing free BP in 8 out of the 9 healthy donors tested. The mean frequency calculated using the Poisson distribution law was **0.75** naive CD8+ T-cell recognizing free BP per million of circulating naive CD8+ T-cells (Figure 1B).

2. Binding to human proteins is needed for CD8+ T-cell activation

Since BP act as a hapten, binding to proteins is necessary to generate immunogenic epitopes. We hypothesized that the free form of BP becomes antigenic by direct binding with intracellular proteins in moDCs. To determine intracellular proteins able to bind to free BP, moDCs (previously exposed to BP) were kept in different recovery media in the presence of human and bovine proteins. These media were the following: AIMV containing approximately 10 mg.mL⁻¹ of HSA, RPMI 1640 protein-free, RPMI 1640 supplemented with 10 % FCS containing approximately 10 mg.mL⁻¹ of bovine serum albumin (BSA) and IMDM supplemented with 10 % of human serum AB (SAB) containing approximately 10 mg.mL⁻¹ of HSA. Our results confirmed that free BP binds with intracellular proteins in moDCs depending on the cellular medium (Figure 2A). BP-adducts occurred in a greater extent with human proteins and in a concentration-dependent fashion. Western-blot results using anti-BP antibody revealed a major band around 65 kDa. This band was present in both media containing human proteins (AIMV and IMDM 10% SAB) (Figure 2A). Based on the molecular weight and the

composition of the different media, the major candidate protein for intracellular binding was HSA. A minor band revealed with anti-BP antibody was found around 30 kDa but was also present in protein-free RPMI suggesting a non-specific signal (Fig 2A).

To confirm the necessity of human proteins, in particular HSA, for human CD8⁺ T-cells activation, we conducted an autologous co-culture with moDCs loaded as previously described but using RPMI 10% FCS as the recovery medium. Results showed no CD8⁺ T-cell activation in the absence of human proteins, further supporting human proteins and HSA as a strong candidate for intracellular binding of free BP (Figure 2B).

3. Internalisation of HSA in human dendritic cells

Previous studies demonstrated intracellular binding of BL with endogenous proteins such as elongation factors (Ariza *et al.* 2014, Sánchez-Gómez *et al.* 2017, Waddington *et al.* 2020). We then addressed the question of whether HSA, our candidate protein, was already present in DCs as described previously with other proteins or had to be internalized from the extracellular space for naive CD8⁺T-cells activation to occur.

We found that HSA was absent in the CD14⁻ fraction and in CD14⁺ monocytes used for moDCs generation (Figure 3A). Using western blot and HSA-Rhodamine, we then assessed HSA internalization in moDC. Results indicated a rapid internalization of HSA since 30 minutes of incubation measured by western blot (Figure 3B) and flow cytometry (Figure 3C). HSA was internalized in all DCs (Figure 3C). Consequently, both free BP and HSA can enter in moDC suggesting that intracellular binding can occur.

4. Identification of HSA-BP conjugates in DCs

We showed that HSA and free BP can enter separately into DCs and we identified a BP-protein conjugate with a molecular weight close to 65 kDa. The next objective was therefore to formally identify the BP-protein conjugate as BP-HSA and the position of the amino-acid that bind BP. Kinetics of intracellular formation of HSA-BP bioconjugate was also measured. MoDCs previously exposed to free BP were washed and incubated in RPMI 1640 containing only 10 mg.mL^{-1} of HSA from 0 to 3 hours. Cell samples were then analyzed by western blot. HSA-BP conjugates was evidenced since 1 hour of incubation and augmented until 3 hours (Figure 4A).

We conducted two mass spectrometry experiments that confirmed our hypothesis. The first experiment used the DIA mode and allowed us to identify around 10 intracellular peptides haptenated with BP. These peptides were also found in a much greater quantity in the positive control (HSA-BP) but absent in the negative control (HSA). However, the quantity of peptides obtained in DIA was not abundant enough to obtain the precise peptide sequences. To identify these sequences we extrapolated them from their m/z value relative to the peptides obtained with the HSA-BP control sample. We therefore ran the same samples with DDA mode, allowing us to confirm the haptenation of BP on lysine 588 of the HSA. Other positions could not be formally identified.

DISCUSSION

Beta-lactam allergy is responsible for various clinical symptoms ranging from immediate reactions such as urticaria to more delayed reactions such as DILI. These reactions are mainly mediated by two different types of T-cells: CD4⁺ T-cells govern the immediate antibody-mediated reactions while delayed reactions are mediated by CD8⁺ T-cells. These CD8⁺ T-cell-mediated cytotoxic reactions to BL are poorly studied and the mechanisms still need to be understood.

Our precedent results showed that the extracellular HSA-BP bioconjugate, although responsible for the activation of CD4⁺ T-cells (Nhim *et al.* 2013, Azoury *et al.* 2018), was not able to

trigger naive CD8⁺ T-cell activation (Bechara *et al.* 2019). These findings suggested that cross-presentation was not at the origin of the CD8⁺ T-cell activation in patients. We then hypothesized an endogenous pathway where free BP could bind to intracellular proteins in DCs generating MHC-class I associated peptides.

Using confocal microscopy our results confirmed the internalization of the free BP molecule within DCs during the first hour of incubation. We then demonstrated that internalization of free BP in DCs conducted to naive CD8⁺ T-cells activation in autologous co-cultures. These results were in agreement with those previously published by our group (Bechara *et al.* 2019). In view of the low molecular weight of BP (approximately 334.39 g. mol⁻¹) and its hydrophobicity (Log P = 1.8), the BP molecule is probably internalized by passive diffusion inside DCs (Lipinski *et al.* 1997, Pontier *et al.* 2001).

We then raised the hypothesis that free BP has to bind to an intracellular protein internalized from the incubation media. DCs were incubated 16 hours with either AIMV, IMDM 10% SAB or RPMI 1640 supplemented with 10 mg.mL⁻¹ HSA before being co-cultured with CD8⁺ T-cells. Western-blot analysis using anti-BP antibody showed a major band at 65 kDa suggesting a strong binding of free BP in a dose-dependent fashion. Interestingly, the 65 kDa band was only found in the presence of medium containing HSA (AIMV, RPMI 10% SAB) or pure HSA. Medium containing bovine proteins (RPMI 10% FCS) allowed intracellular binding of free BP in a much lower amount. Moreover, when naive CD8⁺ T-cells were co-cultured with moDCs in the absence of HSA, activation of CD8⁺ T-cells was not possible, confirming the necessity of the presence and uptake of HSA inside DCs for CD8⁺ lymphocytes stimulation.

HSA is a highly reactive protein due to the numerous lysine residues it contains and is already known to bind to BP (Yvon *et al.* 1990, , Jenkins *et al.* 2009, Whitaker *et al.* 2011, Meng *et al.* 2011, Ariza *et al.* 2012, Jenkins *et al.* 2013, Scornet *et al.* 2016, Azoury *et al.* 2018). The most BP-reactive lysines have been identified (Lysines 159, 525, and 212) allowing the formation of immunodominant BP-

peptides recognized by cells from both healthy and allergic donors (Scornet *et al.* 2016, Azoury *et al.* 2018). Several studies have identified conjugation of BL with endogenous proteins. Ariza *et al.* identified intracellular haptentation of amoxicillin with propionyl coenzyme A and pyruvate carboxylase in RAW264.7 macrophages (Ariza *et al.* 2014). Sánchez-Gómez *et al.* also demonstrated intracellular haptentation of amoxicillin with Elongation Factor 2, HSP-70, and α -enolase in the RPMI 8866 B-cell line (Sánchez-Gómez *et al.* 2017). Recently, the work of Waddington *et al.* identified haptentation of flucloxacillin with various intracellular proteins including 14-3-3 proteins and Elongation Factor 1 α in C1R-B*57:01 cells (Waddington *et al.* 2020). However, all the proteins identified in these works were endogenous proteins initially present in the cells. The originality of our finding relies on the fact that HSA was not intrinsically present in neither CD14 positive monocytes nor moDCs differentiated from monocytes.

Numerous past studies have focused on the mechanisms of HSA internalization inside DCs. After two minutes of incubation with HSA, vesicles are formed and have an estimated size between 0.5 and 3 μm characteristic of macropinosomes (Sallusto *et al.* 1995, Larsson *et al.* 1995, Larsson *et al.* 1997). These results were consistent with those obtained in the literature also demonstrating macropinocytosis of HSA-drug bioconjugates in different cell types (HeLa cells, pancreatic cell lines MIA PaCa-2 and BxPC-3) (Ichimizu *et al.* 2019, Liu *et al.* 2019). When we incubated DCs with HSA or HSA-Rhodamine for 3 hours we found a rapid internalization of HSA into the moDCs, since 30 minutes.

Once we demonstrated that free BP and HSA were able to enter into DCs in an independent manner, the objective of the following experiments was to characterize the formation of intracellular HSA-BP bioconjugate. We incubated BP-treated moDCs in RPMI medium containing 10 mg.mL^{-1} of HSA to establish the kinetics of bioconjugate formation using western blot. We were able to observe results consistent with those obtained with the internalization of HSA and Bocillin since the formation of the intracellular HSA-BP bioconjugate also started since 30 minutes of incubation. This rapid intracellular bioconjugate formation was supported by the high natural reactivity between HSA and BP molecules previously described (Yvon *et al.* 1990, Brander *et al.* 1995, Meng *et al.* 2011). The formation

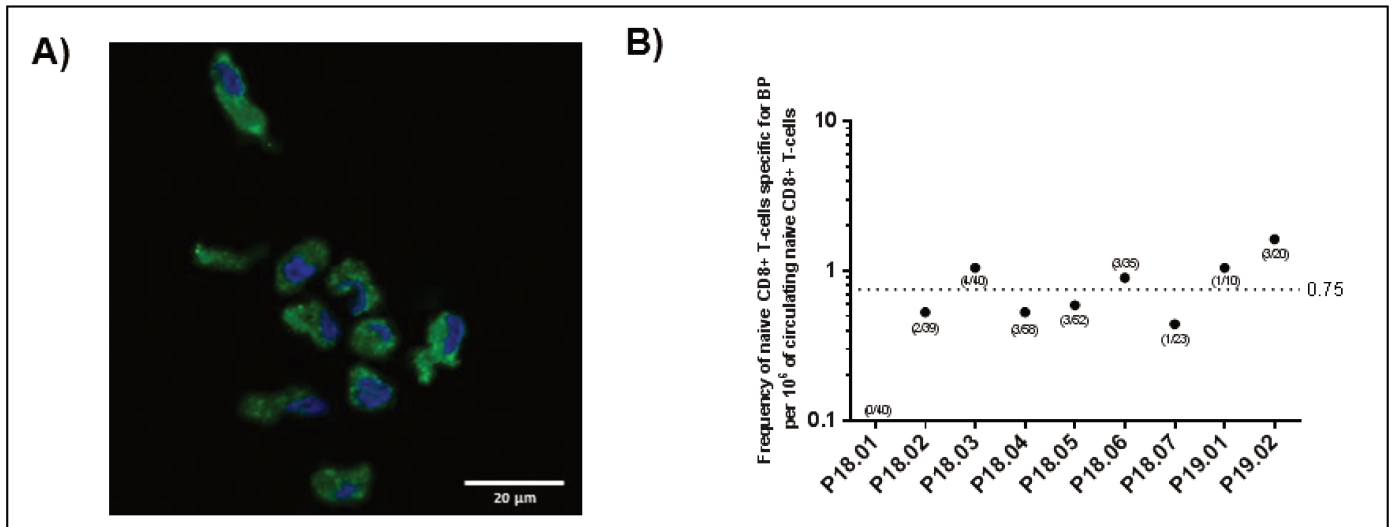
of the intracellular HSA-BP bioconjugate was then confirmed using mass spectrometry. The DIA mode allowed us to identify about 10 HSA unique peptides bound to a BP molecule. The low abundance of intracellular BP-peptides did not allow us to obtain their precise sequence, which was therefore extrapolated from the HSA-BP control synthesized in the laboratory. The DDA mode allowed us to confirm the haptentation of BP on one of the lysines of HSA (lys 588).

CONCLUSION

In this work, we found that HSA and free BP are internalized in DCs leading to the formation of a HSA-BP bioconjugate. This neo-formed antigen is detected as an intracellular antigen and is therefore directed to the endogenous pathway by DCs. The peptides produced are then presented to naive CD8⁺ T-cells triggering their activation. As HSA is the major protein in human plasma, we believed that HSA is constantly internalized in DCs with a rapid turnover since we did not find HSA in DCs upon purification. In the case of the concomitant presence of both HSA and BP, bioconjugates are formed leading to peptides generation, MHC class I association and presentation. The presence of CD8⁺ cells bearing a TCR recognizing peptide-BP complexes can then lead to their activation upon interaction with DCs. The results of our study could thus provide a better understanding of the mechanisms of BL recognition by CD8⁺ T-cells at the origin of DILI.

FIGURES

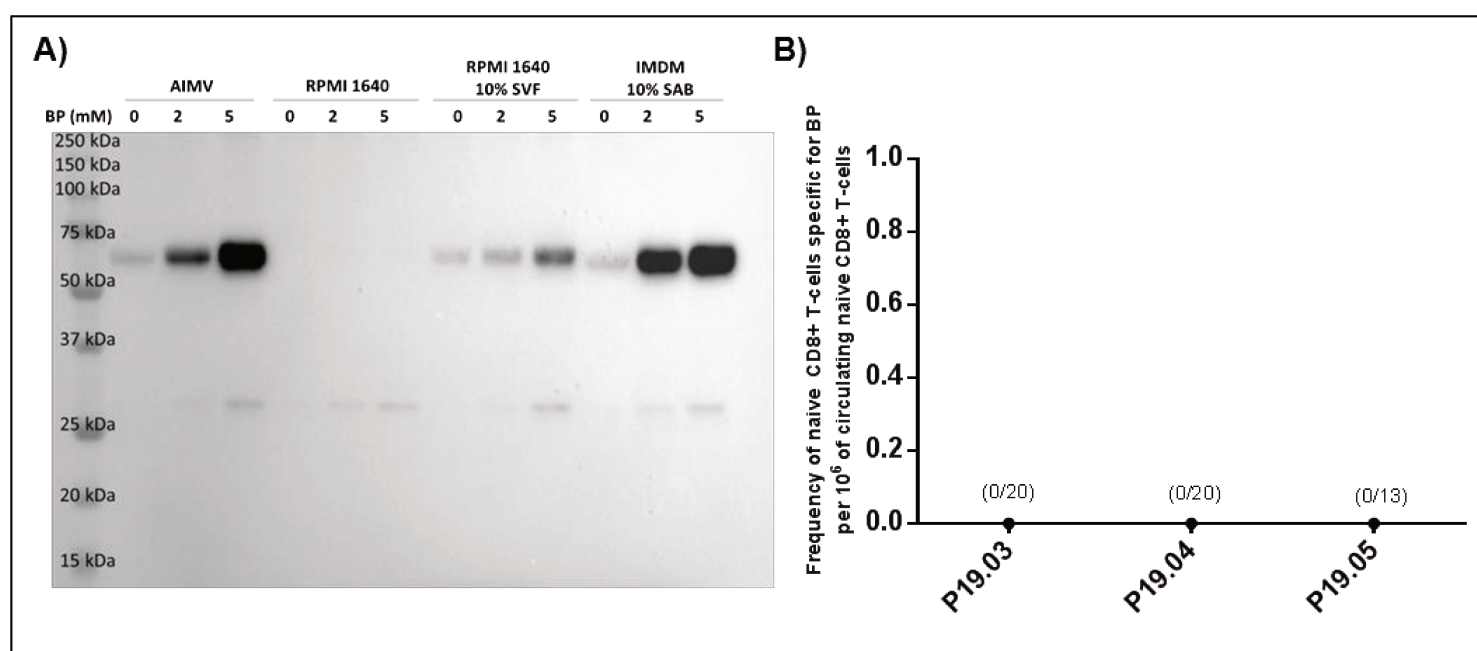
Figure 1. Internalization of free BP by human moDCs results in activation of a CD8+ T cell repertoire recognizing BP



A. MoDCs were exposed to fluorescent penicillin V (Bocillin at $150 \mu\text{M}$) for 1 hour in RPMI 1640 without proteins to avoid any extracellular binding. After incubation, cells were washed and incubated for 16 hours in RPMI 1640 with 10 mg.mL^{-1} of HSA in presence of $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of LPS. The next day, moDCs were washed, fixed and permeabilized. Confocal microscopy using Fluoromount mounting medium with DAPI was used with a z-stack of $0.9 \mu\text{m}$ to assess the signal of Bocillin in the whole DCs. DAPI-labeled cell nuclei appeared in blue and bodipy-labeled Bocillin appeared in green.

B. MoDCs were exposed to free BP (2 mM) for 1 hour in RPMI 1640 without proteins to avoid any extracellular haptentation. After incubation, moDCs were washed and incubated for 16 hours in AIMV (containing HSA) in presence of $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of LPS. The next day, moDCs were washed and placed in co-culture with naive CD8+ T-cells in the presence of IL-12. After 3 restimulations in the same conditions, activation of naive BP-specific CD8 + T-cells was measured using ELISpot IFN- γ . The results are expressed as the frequency of naive CD8 + T-cells recognizing BP per million of circulating naive CD8 + T-cells using the Poisson's law. Results from 9 independent experiments.

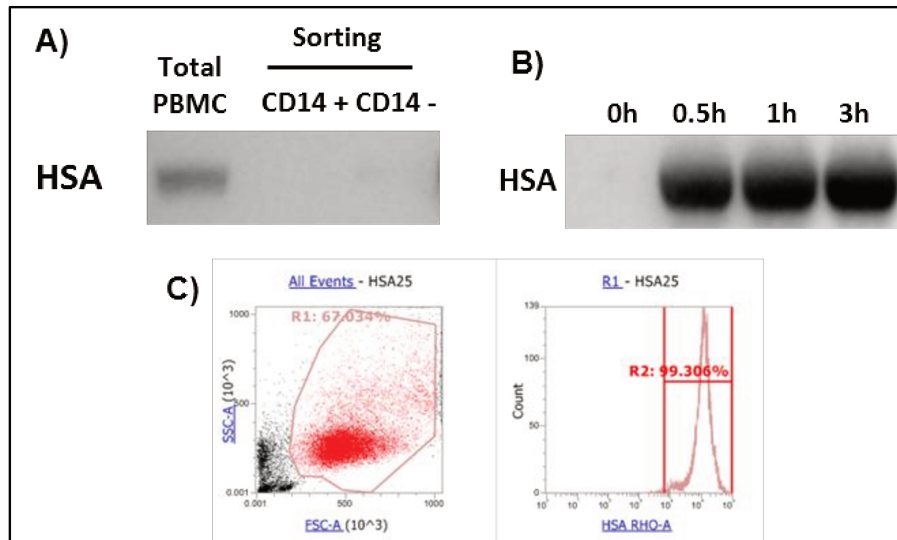
Figure 2. Binding to human proteins is needed for CD8+ T-cell activation



A. MoDCs were exposed to free BP (2 and 5 mM) for 1 hour in RPMI 1640 without proteins to avoid extracellular binding. MoDCs were then washed and incubated for 3 hours in recovery medium (AIMV, RPMI 1640, RPMI 1640 with 10% FCS or IMDM with 10% SAB). Whole cellular extracts were then analyzed by western blot using anti-penicillin antibody (Pen-9). Representative experiment out of 4 independent experiments.

B. MoDCs were exposed to free BP (2 mM) for 1 hour in RPMI 1640 without proteins to avoid extracellular binding. MoDCs were then washed and incubated for 16 hours in RPMI 1640 with 10% FCS (no HSA) in presence of 1 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ LPS. The next day, moDCs were washed and co-cultured with naive CD8+ T-cells in the presence of IL-12. After 3 restimulations, activation of naive CD8+ T-cells was measured using IFN- γ ELISpot. Results are expressed as the frequency of naive CD8+ T-cells recognizing BP per million circulating naive CD8+ T-cells using the Poisson's law. Results from 3 independent experiments.

Figure 3. Internalization of HSA in human dendritic cells

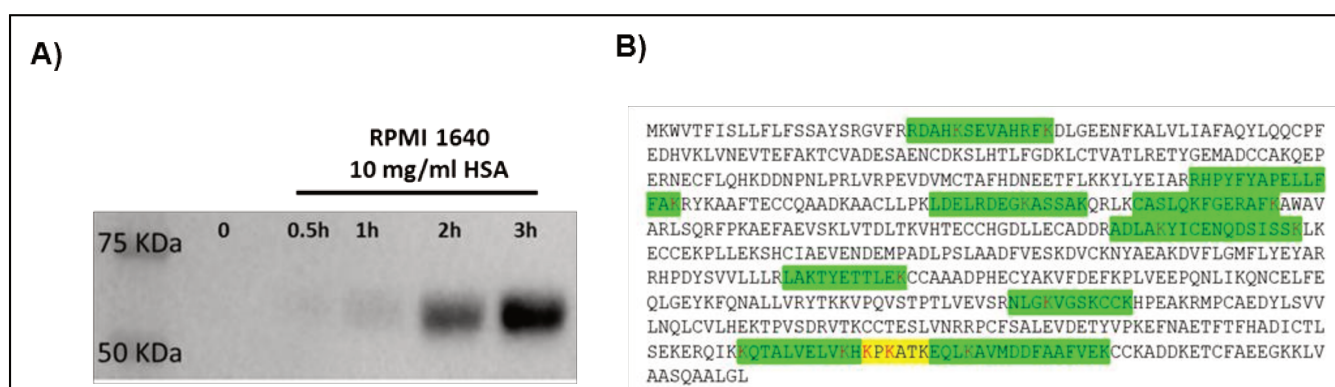


A. PBMCs were sorted from human whole blood by density centrifugation on a Ficoll gradient. CD14+ monocytes were then isolated by positive magnetic selection using MidiMacs separation columns and anti-CD14 antibodies coated on magnetic beads. At the end of the purification step, all samples were collected and whole cellular extracts were analyzed by western blot using anti-HSA antibody. Representative experiment out of 4 independent experiments.

B. Immature moDCs were incubated in RPMI 1640 medium with 10 mg.mL^{-1} of HSA. A cell sample was collected and washed at different incubation times (0, 0.5 hour, 1 hour, 3 hours) to measure HSA internalization by western blot with anti-HSA antibody. The graph represents one representative experiment out of 4 independent experiments.

C. Immature moDCs were incubated in RPMI 1640 medium with $25 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ of HSA-Rhodamine for 3 hours. After incubation, moDCs were washed and the internalization of HSA-Rhodamine was measured by flow cytometry. Representative experiment out of 3 independent experiments.

Figure 4. Intracellular HSA-BP bioconjugate are formed in DCs upon incubation with both BP and HSA



A. MoDCs were exposed to free BP (2 mM) for 1 hour in RPMI 1640 without proteins to avoid extracellular binding. Cells were then washed and incubated for 0, 0.5 hour, 1 hour, 2 hours or 3 hours in RPMI 1640 with 10 mg.mL⁻¹ of HSA. MoDCs were then recovered, washed and whole cellular extracts analyzed by western blot using anti-penicillin antibody (Pen-9).

B. MoDCs were exposed to free BP (40 mM) for 1 hour in RPMI 1640 without proteins to avoid extracellular binding. MoDCs were then washed and incubated for 3 hours in RPMI 1640 with 10 mg.mL⁻¹ of HSA. Whole cellular extracts were loaded in a 10% acrylamide gel and bands were analyzed using nLC-MS/MS. following the protocol previously described. The HSA sequence is shown and the peptide sequence coverage is highlighted in green and yellow. Haptened lysines appeared in red.

III. Application du modèle d'étude aux molécules médicamenteuses en cours de développement

3.1 Introduction

3.1.1 Le score d'immunisation

Les hypersensibilités médicamenteuses sont des réactions idiosyncratiques qui sont totalement indépendantes de la pharmacologie du médicament. De ce fait, elles sont rarement détectées au cours des phases non cliniques et cliniques et peuvent provoquer des arrêts tardifs du développement du médicament, des retraits d'AMM et des surcoûts liés à la prise en charge des patients affectés. A l'aide des modèles cellulaires *in vitro* exposés précédemment, l'objectif de cette troisième partie du projet a été de construire une approche par le poids de l'évidence (weight of evidence approach) afin de prédire le risque d'immunisation d'une molécule médicamenteuse en cours de développement. Cette approche associe quatre événements *in silico* et *in vitro* en fonction du comportement de la molécule mère et de son métabolite (Tableau 1) :

- 1) Réactivité chimique** de la molécule (ou de son métabolite) avec les protéines environnantes : formation de bioconjugués (complexe protéine-médicament ou protéine-métabolite).
- 2) Effet signal de danger** de la molécule médicamenteuse (ou de son métabolite) : capacité de déclencher l'activation des DCs humaines.
- 3)** Interactions de la molécule médicamenteuse (ou de son métabolite) avec les molécules du **CMH** ou le **TCR** : approche *in silico* et test *in vitro*.
- 4)** Identification d'un **répertoire de LT naïfs** reconnaissant la molécule ou le métabolite et/ou le bioconjugué molécule-protéine/métabolite-protéine : modèle de co-culture autologue avec des moDCs et des LT CD4+ ou des LT CD8+ naïfs humains.

Chacune de ces expériences mime un événement qui peut contribuer à l'immunisation. Ces quatre paramètres sont évalués grâce à des coefficients qui permettront le calcul du score d'immunisation final permettant d'évaluer le potentiel pro-allergisant de la molécule.

	Réactivité chimique : formation des bioconjugués protéine-médicament et protéine-métabolite	Effet signal de danger sur les DCs humaines	Interactions avec les molécules du CMH et le TCR	Identification d'un répertoire de LT naïfs reconnaissant la molécule ou son métabolite
Méthodes	Identification des bioconjugués protéine-médicament et/ou protéine-métabolite (western blot, spectrométrie de masse)	Mesure de l'expression des marqueurs d'activation à la surface des moDCs (CD80, CD83, CD86, CMHII, CD40, CXCR4) et de la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires	Prévision des interactions des peptides (théorie de l'haptène) ou des molécules libres (p-i concept) avec le CMH ou le TCR par différents tests [tests <i>in vitro</i> ou par l'outil IEDB <i>in silico</i> (immune epitope database)]	Identification d'un répertoire de LT naïfs (CD4+ ou CD8+) reconnaissant le médicament
Calcul des coefficients	Fixation démontrée avec une protéine : Coefficient = 1 Fixation démontrée avec plusieurs protéines : Coefficient = 2 Fixation démontrée de manière covalente : Coefficient +1 Fixation démontrée avec la molécule et son métabolite : Coefficient +1	Augmentation de x marqueurs par la molécule parent : Coefficient = $x * 0,5$ Augmentation de y marqueurs par le métabolite : Coefficient + $y * 0,5$	Interaction de la molécule parent démontrée <i>in silico</i> : Coefficient + 1 Interaction de la molécule parent confirmée <i>in vitro</i> : Coefficient + 1 Interaction du métabolite démontrée <i>in silico</i> : Coefficient + 1 Interaction du métabolite confirmée <i>in vitro</i> : Coefficient + 1	Présence d'un répertoire de LT CD4+ : Coefficient + 2 Présence d'un répertoire de LT CD4+ et de LT CD8+ : Coefficient + 2 Absence d'un répertoire : Coefficient = 0
Score	Score d'immunisation = (coefficient réactivité chimique + coefficient effet signal de danger + coefficient interactions CMH) * coefficient répertoire LT			

Tableau 1. Calcul du score d'immunisation d'une molécule médicamenteuse

Cette approche fondée sur le poids de l'évidence permet de calculer un score d'immunisation en fonction du comportement de la molécule médicamenteuse et de son métabolite dans les quatre événements suivants : (1) la réactivité chimique avec les protéines environnantes (2) l'effet signal de danger sur les DCs (3) l'interaction avec les molécules du CMH ou le TCR (4) la présence d'un répertoire de LT naïfs CD4+ et/ou CD8+. Les coefficients obtenus permettent de calculer un score d'immunisation selon le calcul suivant : Score d'immunisation = (coefficient réactivité chimique + coefficient effet signal de danger + coefficient interactions CMH) * coefficient répertoire LT.

Pour valider le développement de ce calcul, nous l'avons exploité avec deux molécules médicamenteuses étudiées au laboratoire et dans la littérature : la BP (Tableau 2) et le sulfaméthoxazole (SMX) (Tableau 3).

3.1.2 Le cas de la benzylpénicilline

	Réactivité chimique : formation des bioconjugués protéine-médicament et protéine-métabolite	Effet signal de danger sur les DCs humaines	Interactions avec les molécules du CMH et le TCR	Identification d'un répertoire de LT naïfs reconnaissant la molécule ou son métabolite
Résultats	La BP et ses métabolites sont capables de se conjuguer de manière covalente avec plusieurs protéines du sérum humain : la HSA, les chaînes lourdes d'immunoglobulines et la transferrine (Magi <i>et al.</i> 1995, Meng <i>et al.</i> 2011, Ariza <i>et al.</i> 2012, Nhim <i>et al.</i> 2013, Ariza <i>et al.</i> 2014, Azoury <i>et al.</i> 2018)	La BP n'active pas les DCs humaines (résultats obtenus au cours de la thèse de Cathy Nhim en 2013)	Les peptides BP immunodominants identifiés (PT-BP, KV-BP, et FS-BP) interagissaient avec les molécules du CMH <i>in silico</i> et <i>in vitro</i> (Men <i>et al.</i> 2011, Nhim <i>et al.</i> 2013, Scornet <i>et al.</i> 2016, Azoury <i>et al.</i> 2018)	Identification d'un répertoire de LT CD4+ naïfs et d'un répertoire de LT CD8+ naïfs reconnaissant la HSA-BP et la BP (Nhim <i>et al.</i> 2013, Azoury <i>et al.</i> 2018, Bechara <i>et al.</i> 2019)
Coef.	= 2 (plusieurs protéines) + 1 (fixation covalente) + 1 (métabolite)	= 0	= 1 (molécule parent <i>in silico</i>) + 2 (molécule parent et métabolite <i>in vitro</i>)	= 2 + 2
Score	Score d'immunisation final = (4 + 0 + 3) * 4 = 28			

Tableau 2. Calcul du score d'immunisation de la benzylpénicilline

Le score d'immunisation de la BP a été calculé avec les paramètres suivant : score = [4 (conjugaison de la BP et ses métabolites avec plusieurs protéines de manière covalente) + 0 (pas d'activation des DCs) + 3 (interaction des peptides-BP avec les molécules du CMH démontrée *in silico* et *in vitro* pour la molécule parent et *in vitro* pour le métabolite)] * 4 (identification d'un répertoire de LT CD4+ et CD8+ naïf reconnaissant la BP). BP = benzylpénicilline

3.1.3 Le cas du sulfaméthoxazole

	Réactivité chimique : formation des bioconjugués protéine- médicament et protéine- métabolite	Effet signal de danger sur les DCs humaines	Interactions avec les molécules du CMH et le TCR	Identification d'un répertoire de LT naïfs reconnaissant la molécule ou son métabolite
Résultats	Le métabolite SMX- NO est capable de se conjuguer de manière covalente avec la HSA, la transferrine et la glutathion-S- transférase (Tatake <i>et al.</i> 1991, Lavergne <i>et al.</i> 2009, Callan <i>et al.</i> 2009, Tailor <i>et al.</i> 2019)	Le SMX et son métabolite SMX-NO augmentent l'expression de CD40 à la surface des DCs humaines (Sanderson <i>et al.</i> 2007)	Le SMX-NO interagit avec les molécules du CMH <i>in vitro</i> (Schnyder <i>et al.</i> 1997, Naisbitt <i>et al.</i> 2002)	Identification d'un répertoire de LT CD4+ et de LT CD8+ spécifique du SMX (Schnyder <i>et al.</i> 1997, von Greyerz <i>et al.</i> 1999, Schnyder <i>et al.</i> 2000, Burkhart <i>et al.</i> 2001, Ogees <i>et al.</i> 2015)
Coef.	= 2 (plusieurs protéines) + 1 (fixation covalente)	= 0,5 (molécule parent) + 0,5 (métabolite)	= 1	= 2 + 2
Score	Score d'immunisation final = (3 + 1 + 1) * 4 = 20			

Tableau 3. Calcul du score d'immunisation du sulfaméthoxazole

Le score d'immunisation du SMX a été calculé avec les paramètres suivant : score = [2 (conjugaison avec plusieurs protéines de manière covalente) + 1 (activation des DCs démontrée sur un marqueur avec le SMX et son métabolite) + 1 (interaction avec les molécules du CMH démontrée *in vitro*)] * 4 (identification d'un répertoire de LT CD4+ et CD8+ naïfs reconnaissant le SMX). SMX = sulfaméthoxazole

Cette approche nous a permis d'évaluer le score d'immunisation de deux molécules médicamenteuses étudiées dans la littérature. L'objectif du projet de thèse a ensuite été d'appliquer ce modèle pour une molécule inconnue en cours de développement. Nos résultats ont permis de calculer de façon préliminaire un score d'immunisation de 2 car la **molécule parent A** ne possédait pas de répertoire de LT spécifique. En revanche, nous avons montré l'existence d'un répertoire de LT CD4+ naïfs reconnaissant le **métabolite B** uniquement en présence de HSA dans le milieu cellulaire, ce qui sous-tend un mécanisme d'hapténisation extracellulaire. Dans nos expériences, le **métabolite B** était

être préférablement présenté aux LT CD4⁺ via les molécules HLA-DR. L'immunisation pourrait ainsi être causée par le métabolite **B** qui serait capable de former un bioconjugué avec la HSA et d'activer un répertoire de LT CD4⁺ naïfs.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Cultures primaires de cellules dendritiques humaines

Les moDCs humaines sont dérivées de monocytes isolés à partir de sang périphérique humain fourni par l'EFS (Rungis, France). Les donneurs sains ont donné leur consentement écrit pour l'utilisation du don de sang à des fins de recherche. Les PBMC sont triées à partir de couches leucocytaires par centrifugation de densité sur un gradient de Ficoll. Les monocytes sont ensuite isolés par sélection magnétique positive en utilisant des colonnes de séparation MidiMacs et des anticorps anti-CD14 fixés sur des billes magnétiques (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne). Enfin, les monocytes CD14 positifs sont différenciés en moDCs immatures pendant 4 jours dans du RPMI 1640 supplémenté en GlutaMAX (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France), 10% de SVF décomplémenté par la chaleur (SVF, Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France), 550 U.mL⁻¹ de rh-GM-CSF (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne), 550 U.mL⁻¹ de rh-IL4 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne), du pyruvate de sodium 1 mM (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France), 100 µg.mL⁻¹ de streptomycine et de 100 U. mL⁻¹ de pénicilline (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France).

3.2.2 Modèle de co-culture autologue

Les LT CD4⁺ naïfs sont isolés par purification magnétique négative (Naive CD4⁺ T cell Isolation Kit II human, Miltenyi Biotec Paris, France). La pureté est évaluée par la mesure de l'expression des marqueurs CD4, CD45RA et CCR7 par cytométrie (supérieure à 90%). Les moDCs immatures sont ensuite incubées avec la molécule parent (**A**) ou le métabolite (**B**) à 1 mM dans le milieu AIMV (Gibco, Invitrogen, Saint Aubin, France) pendant 16 heures en présence de LPS à 1 µg.mL⁻¹. Pour l'étude de l'hapténisation du métabolite, les moDCs sont exposées au métabolite (**B**) à 1 mM dans un milieu RPMI 1640 sans protéines ou un RPMI 1640 à 10 mg.mL⁻¹ de HSA pendant 3 heures (en présence de LPS à 1 µg.mL⁻¹). Les DCs sont ensuite lavées et mises en culture avec les LT CD4⁺ naïfs au rapport 1 :10 (10 000 moDCs par puits pour 100 000 LT) dans le milieu RPMI à 10% de SVF supplémenté avec de l'IL-12 (10 ng.mL⁻¹, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), de l'IL-6 (10000 U.mL⁻¹, R&D Systems,

Minneapolis, MN, USA) et de la primocine ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, Invitrogen, Saint Aubin, France). Les LT CD4+ naïfs sont ensuite re-stimulés de façon similaire trois fois à 7 jours d'intervalle avec des moDCs chargées comme précédemment en présence d'IL-2 (10 U.mL^{-1} , R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), et d'IL-7 (5 ng.mL^{-1} , R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

3.2.3 Mesure de l'activation du répertoire de lymphocytes T CD4+ naïfs par la technique ELISpot

Un ELISpot-IFN- γ est réalisé une semaine après la troisième restimulation afin de détecter les lignées lymphocytaires T spécifiques. Les plaques de nitrocellulose (96 puits, Millipore, Guyancourt, France) sont incubées avec un anticorps de capture IgG1 humain anti-IFN- γ (1-D1K, Mabtech, Augustendalstorget, Suède) pendant une nuit à 4°C. Les plaques sont ensuite saturées avec du milieu RPMI à 10% de SVF sur la nuit à 4°C. Ces plaques sont ensuite lavées et utilisées pour établir une co-culture avec les LT CD4+ induits précédemment et des moDCs préalablement chargées comme décrit précédemment dans le milieu RPMI à 10% de SVF au rapport 1 :10 (3000 moDCs pour 30 000 LT). La co-culture est incubée sur la nuit à 37°C. Le lendemain, les cellules sont éliminées des plaques et un anticorps secondaire biotinylé IgG1 murin anti-IFN- γ (7B6-1, Mabtech, Augustendalstorget, Suède) est ajouté pendant 2 heures à 37°C. Les plaques sont ensuite lavées et incubées avec une solution d'extravidine pendant 1 heure à température ambiante. Ces plaques sont ensuite lavées puis incubées avec du substrat (nitro-blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate, NBT/BCIP, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) jusqu'à l'apparition des premiers spots. Les spots sont comptés par un lecteur de plaque ELISpot Autoimmun Diagnostika (AID, Straßberg, Allemagne). Une lignée de LT CD4+ est jugée positive si le nombre de spots est supérieur à 30 spots et supérieur à deux fois le nombre de spot obtenus dans le bruit de fond (co-culture avec des moDCs non chargées).

Dans l'objectif d'identifier les voies d'apprêtement empruntées, un deuxième test ELISpot est réalisé sur les lignées de LT CD4+ détectées comme positives lors du premier test ELISpot. Pour identifier les molécules du CMH impliquées, les moDCs sont traitées par la molécule **B** selon le protocole établi précédemment. Ces cellules sont ensuite lavées et mises en plaque nitrocellulose avec les LT spécifiques en ajoutant $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'anticorps anti-CMH II (**HLA-DQ**, Beckman Coulter ref : IM0416 Pasadena, California, USA ; **HLA-DR**, Biolegend ref : 307602, San Diego, California, USA ; **HLA-DP**, Abcam ref : ab20897, Cambridge, UK) pendant 16 heures avant de réaliser le second test ELISpot.

3.3 Résultats

3.3.1 Les voies métaboliques des molécules étudiées

Les voies métaboliques majeures chez le rat ont été identifiées par le laboratoire X. La **molécule parent A** a un métabolisme hépatique. Cette molécule peut être métabolisée par diverses enzymes dans le foie. Le métabolite majeur, que nous avons utilisé dans notre étude, est le **métabolite B** qui est produit par l'action des N-acétyl-transférases.

3.3.2 Identification du répertoire de lymphocytes T CD4+ naïfs reconnaissant les molécules A et B

L'objectif de cette étude a d'abord été d'identifier le répertoire de LT CD4+ reconnaissant les molécules **A** et **B**. Pour cela, les moDCs immatures sont incubées avec la **molécule parent A** ou le **métabolite B** puis elles sont mises en culture avec les LT CD4+ naïfs. Le test ELISpot-IFN- γ réalisé après 3 restimulation a permis de montrer que l'ensemble des 4 donneurs sains testés présentait un répertoire de LT CD4+ naïfs reconnaissant le **métabolite B** avec une fréquence moyenne de **1,82** LT naïfs reconnaissant la molécule B par million de LT CD4+ naïfs circulant (Figure 24). Dans nos expériences, aucun répertoire de LT reconnaissant la **molécule parent A** n'a pu être identifié.

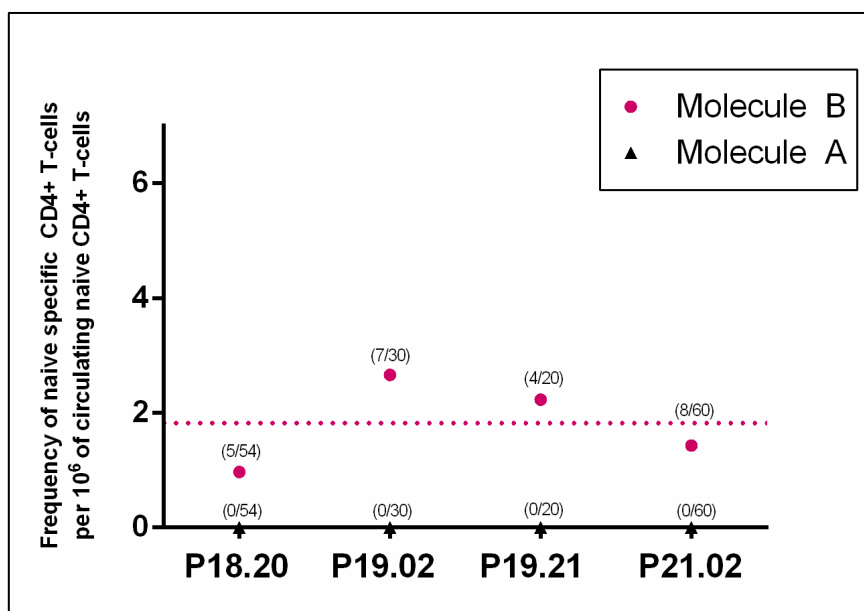


Figure 24. Identification du répertoire de lymphocytes T CD4+ naïfs reconnaissant la molécule B

Les moDCs sont incubées avec 1mM de molécule parent A ou de métabolite B pendant 16 heures en présence de LPS. Ces moDCs sont ensuite lavées puis mises en co-culture avec des LT CD4 + naïfs autologues avec un rapport DC : LT de 1 moDC pour 10 lymphocytes T CD4 + (1 :10) en présence d'IL-12. La moitié des lignées LT CD4+ naïves ont été restimulées avec les moDCs traitées avec la molécule A et l'autre moitié avec les moDCs exposées à la molécule B. L'activation des LT CD4+ naïfs a ensuite été mesurée après 3 semaines de restimulations grâce à la technique ELISpot IFN- γ . Les résultats sont représentés sous la forme de fréquence de LT CD4+ naïfs spécifiques par million de LT CD4+ naïfs circulants calculée grâce à la loi de Poisson. Le graphique représente les données de 4 expériences indépendantes.

3.3.3 Mécanismes de reconnaissance du métabolite B par les lymphocytes T CD4+ naïfs

Afin d'étudier les mécanismes de reconnaissance du **métabolite B** par les LT CD4+ naïfs, les lignées positives ont été récupérées pour effectuer un second test ELISpot IFN- γ en présence d'anticorps bloquant les molécules du CMH de classe II (HLA-DP, DQ ou DR). Ces résultats nous ont permis d'identifier une spécificité de présentation des peptides-**métabolite B** par les molécules HLA-DR (Figure 25A). En effet, nous avons observé une diminution statistiquement significative du nombre de spots IFN- γ lorsque les molécules HLA-DR étaient bloquées par les anticorps dans les DCs chargées avec le **métabolite B**.

L'objectif suivant a été de mieux comprendre les mécanismes d'hapténisation du **métabolite B**. Pour cela, nous avons chargé les moDCs avec le **métabolite B** dans un milieu contenant (RPMI 1640

supplémenté avec 10 mg.mL^{-1} de HSA) ou ne contenant pas (RPMI 1640 nu) de HSA. Le test ELISpot IFN- γ nous a permis d'observer que les LT CD4+ naïfs ne sont activés que lorsque les DCs sont chargées avec le **métabolite B** en présence de HSA dans le milieu cellulaire, laissant suggérer un mécanisme d'hapténisation avec cette protéine (Figure 25B). En effet, lorsque l'incubation des moDCs avait lieu dans le RPMI supplémenté avec 10 mg.mL^{-1} de HSA, nous détectons en moyenne **1.06 LT naïfs reconnaissant le métabolite B par million de LT CD4+ naïfs circulant**, alors qu'aucune lignée n'était détectée en absence de HSA.

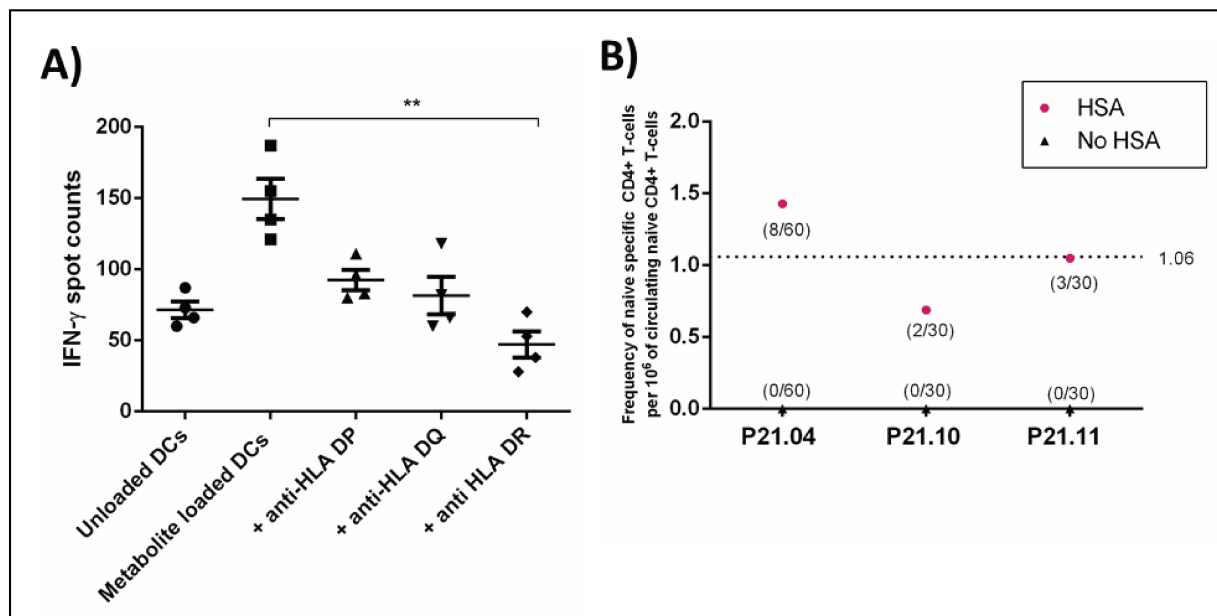


Figure 25. La reconnaissance du métabolite B par les lymphocytes T CD4+ est dépendante des molécules HLA-DR et de la présence d'albumine humaine

A) Les lignées positives identifiées grâce au premier test ELISpot IFN- γ sont restimulées avec des moDCs chargées comme précédemment. Lors de l'établissement de la coculture avec les LT CD4+ naïfs, les anticorps anti-CMH II ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ anti-HLA-DP, DQ ou DR) sont ajoutés. Un second test ELISpot IFN- γ est ensuite réalisé. Le graphique représente les résultats obtenus pour 4 lignées indépendantes. **: $p < 0,01$ analyse statistique par le test de Kruskal-Wallis.

B) Les moDCs sont incubées avec 1 mM du métabolite B dans du RPMI 1640 sans protéines ou dans du RPMI 1640 supplémenté avec 10 mg.mL^{-1} d'albumine humaine (HSA) et $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de LPS pendant 3 heures. Les cellules sont ensuite lavées puis mises en co-culture avec des LT CD4+ naïfs autologues en présence d'IL-12 dans du milieu RPMI à 10% de SVF. La moitié des lignées LT CD4+ naïves sont restimulées avec les moDCs traitées en absence de HSA et l'autre moitié avec les moDCs traitées en présence de HSA. L'activation des LT CD4+ naïfs spécifiques est mesurée après 3 semaines de restimulations grâce à la technique ELISpot IFN- γ . Les résultats sont représentés sous la forme de fréquence de LT CD4+ naïfs reconnaissant la molécule B par million de LT CD4+ naïfs circulants calculée grâce à la loi de Poisson. Le graphique représente les données obtenues lors de trois expériences indépendantes.

Ces résultats nous ont permis d'établir le tableau de calcul du score d'immunisation suivant (Tableau 4). Le **métabolite B** semble pouvoir se conjuguer à la HSA de manière covalente puisque le chargement en RPMI ne permettait pas l'activation du répertoire de LT reconnaissant la molécule (Figure 25B). L'activation sur les moDCs n'a pas encore été étudiée dans notre étude ce qui ne permet pas de calculer ce coefficient. Concernant les interactions avec le CMH et le TCR, nous avons pu montré *in vitro* que la présentation aux LT CD4+ naïfs semblait être dépendante des molécules HLA-DR, permettant l'obtention d'un coefficient de 1 (Figure 25A). Pour finir, le dernier coefficient obtenu était de 2 grâce au répertoire de LT CD4+ naïfs reconnaissant le métabolite identifié dans notre étude (figure 24). Grâce au calcul décrit précédemment, le score d'immunisation préliminaire de la molécule inconnue est donc de 6.

	Réactivité chimique : formation des bioconjugués protéine- médicament et protéine- métabolite	Effet signal de danger sur les DCs humaines	Interactions avec les molécules du CMH et le TCR	Identification d'un répertoire de LT naïfs reconnaissant la molécule ou son métabolite
Résultats	Le métabolite B semble pouvoir se conjuguer à la HSA pour induire l'activation des LT CD4+ naïfs	Non étudié	Interactions du métabolite B avec les molécules HLA-DR démontrée <i>in vitro</i>	Identification d'un répertoire de LT CD4+ spécifique du métabolite B. Cependant, aucun répertoire n'est détecté avec la molécule parent A.
Coef.	= 1 (une protéine) + 1 (fixation covalente)	= 0	= 1	= 2
Score	Score d'immunisation préliminaire = (2+1) * 2 = 6			

Tableau 4. Calcul du score d'immunisation de la molécule inconnue

Le score d'immunisation de la molécule inconnue a été calculé selon le comportement de la molécule parent A et du métabolite B avec les paramètres suivant : score = [2 (conjugaison de manière covalente du métabolite B avec la HSA) + 1 (interaction du métabolite B avec les molécules du CMH démontrée *in vitro*)] * 2 (identification d'un répertoire de LT CD4+ reconnaissant le métabolite B).

DISCUSSION GENERALE

Discussion générale

L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer l'impact de l'environnement sur le déclenchement des hypersensibilités aux BL. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à deux aspects de cet environnement : l'exposition environnementale et l'environnement à l'échelle cellulaire. Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de l'exposition environnementale aux aSNP sur les DCs et les conséquences fonctionnelles au niveau de la réponse lymphocytaire spécifique de la BP. Ces nanoparticules ont induit un effet « signal de danger » sur les cellules de l'immunité innée et favorisé une immunisation dirigée contre le médicament. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'environnement cellulaire et son impact sur l'orientation de la réponse lymphocytaire dirigée contre le médicament. Les résultats obtenus ont permis de montrer qu'un environnement riche en HSA, tel que le foie où sont métabolisés la majorité des médicaments, pourrait favoriser une réaction d'hapténisation intracellulaire de la BP libre aboutissant à une activation des LT CD8+ naïfs. Enfin, grâce à l'ensemble de notre stratégie d'étude, nous avons pu appliquer ces modèles pour une meilleure évaluation du risque allergique en développant le calcul d'un score d'immunisation. La discussion générale de ce travail suivra donc les trois axes principaux de recherche énoncés précédemment.

L'ensemble de ces résultats ont abouti à trois publications : un premier article a été publié dans *Nanomaterials*, un deuxième article est en cours de révision pour le journal *Toxicological Sciences* et le troisième article est en fin de préparation.

I. Etude de l'effet signal de danger des nanoparticules et leur impact sur la réponse des lymphocytes T reconnaissant les β -lactamines

La première partie du projet s'est intéressée à l'impact des facteurs environnementaux sur la réponse lymphocytaire spécifique des BL. Nous avons choisi comme modèle les aSNP qui sont des nanoparticules particulièrement répandues dans l'alimentation, les produits cosmétiques et les matériaux de construction. De ce fait, la population générale et les travailleurs sont particulièrement exposés ce qui soulève des questions de sécurité d'autant plus que de nombreuses études mettent en avant les effets pro-adjuvants des nanoparticules sur les cellules de l'immunité innée (Fadeel 2012,

Gallo et Gallucci 2013, Farrera et Fadeel 2015, Pallardy *et al.* 2017). Cependant, les aSNP étant considérées comme sûres par la FDA, les études sur les risques toxicologiques restent encore limitées.

Certains travaux ont étudié l'effet des aSNP sur des DCs murines (Winter *et al.* 2011, Kang and Lim 2012, Winkler *et al.* 2017) mais un manque d'information persiste sur l'effet de telles nanoparticules sur les DCs humaines (Vallhov *et al.* 2012, Feray *et al.* 2020). Afin d'évaluer les effets pro-adjuvants des aSNP, nous avons choisi d'utiliser un modèle de DCs humaines (les moDCs) qui représente l'un des modèles de CPA professionnelles les plus pertinent (Mallon *et al.* 1999, León *et al.* 2005). En effet, les moDCs issues de monocytes humains permettent d'éviter les interférences liées à l'espèce et ont montré des similarités physiologiques, morphologiques et fonctionnelles avec les stades immatures de différenciation des DCs humaines (Millard *et al.* 2002). Ces DCs peuvent également être différenciées en DCs matures grâce à l'exposition à divers signaux de danger ce qui en fait un modèle d'étude idéal pour évaluer l'impact des aSNP sur la maturation et la fonctionnalité des DCs humaines (Yao *et al.* 2020). Les temps d'incubation qui permettent d'évaluer les effets des aSNP sur les DCs sont généralement compris entre 16 et 24 heures (Winter *et al.* 2011, Winkler *et al.* 2017). Nous avons choisi un temps d'incubation de 16 heures ce qui permet d'observer l'effet pro-adjuvant des aSNP tout en gardant un seuil de toxicité inférieur à 30% pour maintenir la fonctionnalité des DCs (Feray *et al.* 2020). Les moDCs sont exposées aux aSNP sans sérum la première heure pour limiter l'agrégation et la formation de corona, puis le RPMI 1640 est ensuite supplémenté avec 10% de SVF. Ce protocole a été établi pour que les moDCs soient exposées aux aSNP sous leur forme primaire et agrégée afin de refléter un large panel de conditions d'exposition qui pourront être retrouvées, par exemple, dans le tube digestif (Peters *et al.* 2012). Effectivement, l'étude de Peters *et al.* a montré que l'état d'agrégation des aSNP variait tout au long du tube digestif alternant des formes primaires dans la salive et l'intestin et des formes agrégées dans le tube gastrique (Peters *et al.* 2012).

Dans notre étude, l'activation des moDCs a été démontrée par une augmentation de l'expression des marqueurs CD83, CD86 et CXCR4. D'après la littérature, le marqueur CD83 est le marqueur le plus pertinent dans l'étude de l'activation des DCs car il est fortement exprimé dans les DCs matures (Prechtel and Steinkasserer 2007). L'expression des marqueurs de co-stimulation tels que CD40, CD80 et CD86 est également étudiée comme marqueur de l'activation des DCs (Vallhov *et al.* 2007, Zhu *et al.* 2014, Barillet *et al.* 2019). L'augmentation de l'expression du récepteur CXCR4 a également lieu dans les DCs matures et induit la migration de ces cellules vers les organes lymphoïdes afin de présenter l'antigène détecté. Le modèle moDCs exprime fortement les molécules HLA-DR, dont l'expression est également étudiée comme marqueur d'activation des DCs. Il est donc nécessaire d'exprimer les résultats sous forme d'intensité de fluorescence relative (RFI) afin d'observer l'effet des nanoparticules (Feray *et al.* 2020). L'expression de ces résultats sous forme de pourcentage de cellules

positives ne permet pas de voir l'augmentation de l'expression induite par les aSNP (Vallhov *et al.* 2007). Dans notre étude, l'activation des DCs était également appuyée par l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, particulièrement CXCL-8 et CXCL-12. Nos résultats des tests de microbiologie et tests LAL nous ont permis de confirmer que ces modifications phénotypiques n'étaient pas provoquées par une contamination bactérienne. Nos observations sont en accord avec les travaux de Winter *et al.* démontrant sur un modèle de DCs murines que les aSNP augmentaient significativement l'expression des molécules du CMH II, CD80 et CD86 (Winter *et al.* 2011). Plus récemment, Winkler *et al.* ont également suggéré que les aSNP de qualité alimentaire pourraient activer les DCs murines avec une augmentation des molécules de co-stimulation CD40 et CD86 ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF- α) (Winkler *et al.* 2017). Concernant la sécrétion de cytokines, Hetland *et al.* (Hetland *et al.* 2001) et Gualtieri *et al.* (Gualtieri *et al.* 2012) ont démontré la capacité des aSNP à augmenter la sécrétion d'IL-6 et de CXCL-8 sur des lignées de cellules épithéliales humaines (A549 et BEAS-2B). De même, Kasper *et al.* ont démontré dans un modèle *in vitro* de barrière alvéolaire que les aSNP augmentait la sécrétion d'IL-6 et de CXCL-8 dans les co-cultures (Kasper *et al.* 2011). Park *et al.* ont également montré que les aSNP augmentaient l'expression génique de l'IL-1, de l'IL-6 et du TNF- α dans la lignée cellulaire de macrophages RAW 264.7 (Park et Park 2009).

La conséquence fonctionnelle d'une augmentation de la maturation des DCs est l'augmentation de l'activation des LT, ce qui marque le déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative. Cependant, la majorité des études s'arrêtent à l'étude des effets sur les DCs sans aller jusqu'à l'étude des effets sur la réponse lymphocytaire (Vallhov *et al.* 2007, Winter *et al.* 2011, Kang and Lim 2012, Winkler *et al.* 2017). Nous avons choisi d'étudier les conséquences fonctionnelles des modifications phénotypiques des moDCs sur la réponse lymphocytaire grâce au modèle de co-culture allogénique. La puissance de ce modèle s'explique par le caractère étranger des deux types cellulaires mis en co-culture. Les DCs et les LT allogéniques réagissent entre eux induisant une prolifération lymphocytaire basale. Ce modèle permet donc d'étudier purement l'effet signal de danger d'un composé sans ajouter d'antigène extérieur. Il est néanmoins nécessaire de choisir un rapport DC : LT et une durée d'incubation adéquats afin de limiter cette prolifération basale qui pourrait masquer l'effet des nanoparticules (Feray *et al.* 2020). Pour cela, nous avons testé trois rapports DC : LT sur un temps de co-culture de 5 jours afin d'obtenir la meilleure sensibilité et la meilleure puissance du modèle. Nos résultats ont montré que l'exposition des moDCs aux aSNP induisait une augmentation de la prolifération des LT. De façon intéressante, ces effets sont comparables avec ceux obtenus avec le LPS, un signal de danger bien identifié dans la littérature (Hemmi et Akira 2005, Martin *et al.* 2010). Cette augmentation de la prolifération lymphocytaire est accompagnée d'une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les LT notamment l'IL-9 et les IL-17A et F. La sécrétion d'IL-5 est

également augmentée de manière non significative. Ces résultats sont cohérents avec le phénotype pro-inflammatoire des DCs identifié dans la première partie des résultats (Zhu *et al.* 2010, Deenick *et al.* 2011, Walsh et Mills 2013). La production de telles cytokines laisse suggérer que les LT activés pourraient préférentiellement adopter une orientation Th2 et Th17. Seul un faible nombre d'études ont utilisé le modèle de co-culture allogénique (également appelé Mixed Lymphocyte Reaction, MLR) afin d'étudier les effets immunomodulateurs des nanoparticules. Les travaux menés sur le noir de carbone (Koike *et al.* 2008) et les nanoparticules de dioxyde de titane (Schanen *et al.* 2013) ont également confirmé que ces nanomatériaux pourraient influencer la réponse des LT. Koike *et al.* ont ainsi montré que les modifications phénotypiques induites sur les DCs murines (augmentation de l'expression des molécules CD86) par les nanoparticules de noir de carbone avaient des conséquences fonctionnelles sur la réponse lymphocytaire caractérisées par une augmentation de la prolifération (Koike *et al.* 2008). Egalement, dans l'étude de Schanen *et al.*, l'augmentation de la maturation des moDCs (augmentation de l'expression des molécules CD83, CD86 et CCR7) induite par les nanoparticules de titane avait également un impact sur la réponse lymphocytaire avec une augmentation de la prolifération des LT et une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires signant une polarisation Th1 (IFN- γ et TNF- α) (Schanen *et al.* 2013). Les différences de signatures cytokiniques entre notre étude et la littérature pourraient être dû aux différences physico-chimiques des nanoparticules étudiées induisant une modification de la réponse lymphocytaire.

L'objectif suivant a donc été de confirmer l'effet signal de danger des aSNP et leurs effets sur la polarisation de la réponse lymphocytaire dans le cadre de l'allergie à la pénicilline. En effet, la nature des signaux de danger impliqués dans le déclenchement des allergies aux BL n'est pas encore connue. Plusieurs études ont démontré que l'hypothèse du signal de danger pourrait expliquer le déclenchement des allergies médicamenteuses (Uetrecht 2005, Ogees et al. 2017). Par exemple, l'halothane et l'isoniazide déclenchent une augmentation des transaminases chez la majorité des patients (Wright et al. 1975, Byrd et al. 1979) ce qui représente un signal de danger significatif qui pourrait être à l'origine du déclenchement de l'immunisation et donc de l'allergie (Séguin et Uetrecht 2003). Plusieurs études montrent également que l'acide tiénilique induit un stress oxydant, de l'inflammation et de la cytotoxicité qui sont considérés comme des signaux de danger par les cellules et pourraient être responsables du déclenchement des hépatites médicamenteuses (Pacitto *et al.* 2007). L'une des hypothèses pour expliquer la nature des signaux de danger dans l'allergie aux BL est que ces antibiotiques sont administrés aux patients dans des contextes pathologiques pro-adjuvants par nature : le LPS en cas d'infection bactérienne, l'IL-1 β dans l'inflammation, le virus de la grippe en cas d'infection virale, l'hyperthermie en cas de fièvre ou encore dans la majeure partie des cas avec le stress oxydant (Lavergne et al. 2009). Cependant, les signaux de danger évoqués ci-dessus font partie de la physiologie de l'infection et sont présents chez l'ensemble des patients sous antibiotiques.

Pourtant, seul un faible pourcentage de ces patients s'immunise et développe une allergie aux BL. Par conséquent, notre hypothèse est que d'autres signaux de danger environnementaux, telles que les aSNP, pourraient s'additionner à ceux de l'infection et favoriser l'immunisation et donc le déclenchement d'allergie au médicament. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'effet signal de danger des polluants environnementaux a déjà été incriminé dans l'augmentation des allergies cutanées et respiratoire (Nel *et al.* 1998, Pénard-Morand et Annesi-Maesano 2008, Samuelsen *et al.* 2008). Cette hypothèse permettrait également d'expliquer la présence d'un répertoire de LT spécifiques de la BP chez les donneurs sains (Nhim *et al.* 2013, Azoury *et al.* 2018). Ainsi, l'allergie ne serait pas conditionnée uniquement par l'existence d'un répertoire de LT naïfs spécifique du médicament mais également par la présence de signaux pro-adjuvants assez puissants pour déclencher la réaction immunitaire. De plus, les aSNP sont très répandues dans l'alimentation où elles sont utilisées en tant qu'additif émulsifiant et antiagglomérant (additif E 551), qui est présent sous forme nanoparticulaire après ingestion de produits alimentaires communs (Dekkers *et al.* 2010, Peters *et al.* 2012). De par leur administration par voie orale, une co-exposition entre les BL et les aSNP pourrait avoir lieu dans le tube digestif ou dans la circulation générale. Ces nanoparticules pourraient donc jouer le rôle de signal de danger en activant les DCs qui déclencheraient une réaction immunitaire dirigée contre le médicament qui, initialement, n'est pas considéré comme un danger par le système immunitaire.

Afin de comprendre l'impact de l'effet signal de danger des aSNP sur le déclenchement de la réponse immunitaire dirigée contre la BP, nous avons développé un modèle de co-culture autologue. L'objectif de ce modèle était de mettre en culture des DCs et des LT venant d'un même donneur afin de se rapprocher de la physiologie humaine. Ainsi, les deux types cellulaires autologues n'induisant pas de réaction immunitaire basale, il est possible d'intégrer un antigène extérieur. L'antigène qui a été intégré dans notre modèle était le bioconjugué HSA-BP qui est à l'origine de l'activation du répertoire de LT CD4⁺ naïfs spécifiques de la BP (Nhim *et al.* 2013, Scornet *et al.* 2016, Azoury *et al.* 2018). Les moDCs ont été incubées avec 10 μ M de HSA-BP pendant 1 heure avant d'ajouter 12,5 μ g.mL⁻¹ de aSNP. L'objectif de cette méthode était de permettre aux moDCs immatures d'internaliser le bioconjugué HSA-BP efficacement avant d'être activées par les aSNP. Nos résultats ont montré que les aSNP augmentaient statistiquement le nombre de lignées de LT CD4⁺ naïfs activées par la HSA-BP. Ces résultats ont permis de confirmer les effets pro-adjuvants des aSNP en l'appliquant à un répertoire de LT spécifique des BL. Nos résultats préliminaires avec le modèle de co-culture autologue non polarisé ont également permis de montrer que les aSNP semblaient augmenter la sécrétion d'IL-5 par les lignées de LT CD4⁺ activées par le médicament, laissant suggérer une polarisation Th2. Dans la littérature, seul un faible nombre d'étude ont utilisé un modèle autologue pour évaluer l'effet des nanoparticules sur l'activation et la polarisation des LT. Les travaux de Vallhov *et al.* ont été conduit

avec un modèle autologue de moDCs et de LT CD4+ naïfs humains sur une période de 7 jours de co-culture. Ces résultats ont permis de montrer que les aSNP mésoporeuses augmentaient l'expression des molécules CD86 sur les moDC humaines avec des effets mixtes sur la polarisation des LT caractérisés par une augmentation de la production d'IFN- γ , d'IL-4 et d'IL-13 (Vallhov *et al.* 2012). Cependant, lors de cette étude les LT CD4+ naïfs n'étant pas complètement activés au septième jour de co-culture, il a donc été nécessaire d'ajouter un anti-CD3 provoquant l'activation complète de l'ensemble des LT naïfs (Judokusumo *et al.* 2012). Dans notre modèle, nous avons choisi de ne pas utiliser ce stimulus pour préserver la polarisation du répertoire de LT spécifique de la BP. Par conséquent, il a été nécessaire d'augmenter le nombre de restimulations pour déclencher une activation spécifique du répertoire de LT CD4+ naïfs (Martin *et al.* 2010). Ces résultats constituent la première étude permettant d'observer l'effet des nanoparticules sur un répertoire de LT spécifique d'un antigène. Nos résultats sont en accord avec différentes études ayant déjà identifié un effet pro-Th2 des nanoparticules (Himly *et al.* 2017). En effet, les travaux de Diaz-Sanchez *et al.* (Diaz-Sanchez *et al.* 1996) ont montré que les particules de diesel induisaient une augmentation de la production d'IgE au niveau du naso-pharynx avec une augmentation des allergies respiratoires chez des volontaires sains. Ces particules étaient également impliquées dans l'augmentation de la réponse Th2 dirigée contre l'allergène des acariens (Brandt *et al.* 2015). Egalement, les travaux de Wang *et al.* ont montré que les nano-feuillets de graphène et les nanotubes de carbone augmentaient les réponses inflammatoires Th2 avec un mécanisme dépendant de la sécrétion d'IL-33 (Wang *et al.* 2013). Concernant les aSNP, deux études *in vivo* sont en accord avec nos résultats, montrant que l'instillation intranasale de aSNP chez la souris induit une augmentation de la réponse allergique à l'ovalbumine caractérisée par une augmentation du taux d'IgE dans le sérum, une augmentation de l'infiltration des éosinophiles et la sécrétion de cytokines Th2 et Th17 (Brandenberger *et al.* 2013, Han *et al.* 2016). Au vu des résultats prometteurs de nos dernières expériences, les perspectives sont de répéter ces travaux afin de pouvoir confirmer l'effet pro-allergisant Th2 des aSNP sur la réponse immunitaire dirigée contre le médicament.

II. Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'activation des lymphocytes T CD8+ spécifiques des β -lactamines : impact de l'environnement cellulaire

L'allergie aux BL est l'allergie médicamenteuse la plus fréquente et constitue un véritable problème de santé publique. Ces réactions sont dues au fait que ces molécules agissent comme des haptènes, c'est-à-dire qu'elles se conjuguent à des protéines de haut poids moléculaire pour être détectée par les DCs. Cette reconnaissance ajoutée aux signaux de danger détectés par les DCs déclenche une réponse immunitaire adaptative qui peut être médiée par deux types de LT : les LT CD4+ et les LT CD8+. Récemment, l'existence d'un répertoire de LT CD4+ naïfs spécifiques de la BP conjuguée à la HSA et l'identification de peptides immunodominants ont été démontrés (Nhim *et al.* 2013, Scornet *et al.* 2016, Azoury *et al.* 2018). Ces LT CD4+ sont suspectés d'être responsables des réactions d'hypersensibilités de type I (médiées par la sécrétion d'IgE) comme par exemple les angio-oedèmes, l'urticaire ou l'asthme. Lors de ces réactions, le bioconjugué extracellulaire HSA-BP est internalisé par les DCs et apprêté grâce aux protéases endosomale (*e.g.* la cathepsine). Les peptides produits sont exposés via les molécules du CMH de classe II aux LT CD4+ naïfs. Cependant, certaines réactions allergiques graves telles que les DILI ne dépendent pas des LT CD4+ mais sont causées par les effets cytotoxiques des LT CD8+. Le mécanisme qui gouverne l'activation du répertoire de LT CD8+ et conduit à la mort des hépatocytes reste encore peu connu. L'objectif de ces travaux de thèse a donc été de mieux comprendre les mécanismes de reconnaissance de la BP par les LT CD8+ naïfs.

Certains antigènes extracellulaires peuvent être présentés par les DCs via les molécules du CMH de classe I par un mécanisme de présentation croisée (Amigorena et Savina 2010, Joffre *et al.* 2012). Cependant, l'étude de Bechara *et al.* a permis de montrer que le bioconjugué extracellulaire HSA-BP, responsable de l'activation des LT CD4+ naïfs, n'était pas reconnu par les LT CD8+. Ces résultats ont ainsi permis d'exclure les mécanismes de présentation croisée pour expliquer l'activation des LT CD8+ naïfs (Bechara *et al.* 2019). Notre hypothèse a donc été que la molécule médicamenteuse pourrait entrer sous sa forme libre à l'intérieur des DCs et subir une réaction d'hapténisation intracellulaire. De ce fait, l'antigène serait détecté comme un antigène intracellulaire et serait préférentiellement orienté vers une conjugaison aux molécules du CMH I et une présentation aux LT CD8+.

Les premiers résultats que nous avons obtenus ont permis de confirmer l'internalisation de la molécule libre de BP à l'intérieur des DCs et l'activation des lignées de LT CD8+ suite à cette exposition. Afin d'identifier l'environnement cellulaire qui favorisait l'hapténisation intracellulaire du

médicament, nous avons repris le protocole d'exposition des DCs à la BP libre où nous avons modifié le milieu dit « de récupération » dans lequel les moDCs sont incubées sur la nuit avant d'être mises en co-culture avec les LT. Nos résultats ont permis d'identifier différents profils d'hapténisation en fonction du milieu de récupération utilisé. Les milieux riches en HSA (AIMV, IMDM 10% SAB, RPMI 1640 à 10 mg.mL⁻¹ de HSA) induisaient une forte hapténisation intracellulaire de la BP libre avec un effet-dose en fonction de la concentration du médicament. Le milieu avec de l'albumine bovine (RPMI 10% SVF) permettait une hapténisation intracellulaire de la BP libre en quantité beaucoup plus faible. Et le milieu sans protéines (RPMI 1640 nu) n'induisait aucune hapténisation intracellulaire de la BP libre. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de modèles de co-cultures autologue où les LT CD8+ naïfs n'étaient activés que lorsque les moDCs étaient incubées dans un milieu de récupération riche en HSA. Ces résultats laissent suggérer que la HSA serait la protéine majoritaire pour l'hapténisation intracellulaire de la molécule médicamenteuse. En effet, la HSA est une protéine très réactive grâce aux nombreux résidus lysine qu'elle contient et qui sont d'ores et déjà connus pour se conjuguer avec la BP (Yvon *et al.* 1990, Nhim *et al.* 2013, Azoury *et al.* 2018). Les lysines les plus réactives vis-à-vis de la BP ont été identifiées (Lysines 159, 525 et 212) et permettent la formation de peptides-BP immunodominants (PT-BP, KV-BP et FS-BP) reconnus par les cellules des donneurs sains et des patients allergiques (Scornet *et al.* 2016, Azoury *et al.* 2018). Néanmoins, les peptides identifiés dans ces études sont formés à partir du bioconjugué HSA-BP extracellulaire ce qui les diffère de ceux possiblement générés à partir de la HSA-BP intracellulaire.

Seul un faible nombre d'étude se sont intéressées à l'hapténisation intracellulaire des molécules médicamenteuses. L'étude d'Ariza *et al.* a permis d'identifier l'hapténisation intracellulaire de l'amoxicilline avec le propionyl coenzyme A et la pyruvate carboxylase dans les macrophages RAW264.7 (Ariza *et al.* 2014). L'équipe de Sánchez-Gómez *et al.* a également démontré l'hapténisation intracellulaire de l'amoxicilline avec le facteur d'élongation 2 (Elongation Factor 2, EF-2), la protéine de choc thermique 70 (Heat Shock Protein 70, HSP-70) et l' α -enolase dans la lignée de lymphocytes B RPMI 8866 (Sánchez-Gómez *et al.* 2017). Les protéines identifiées dans ces travaux étaient des protéines endogènes initialement présentes dans les cellules. L'originalité de notre étude est qu'il s'agit d'une protéine extracellulaire, c'est-à-dire qu'elle n'est pas présente de façon intrinsèque dans les moDCs et dépend donc de la composition de l'environnement cellulaire. Effectivement, grâce aux techniques de western blot, nous avons pu montrer que la HSA était initialement absente des monocytes CD14 positifs isolés à partir de sang humain, et ainsi également absente de notre modèle de moDCs. L'objectif à ce stade de notre étude était donc de démontrer que la HSA était capable d'être internalisée par les DCs de façon indépendante du médicament pour venir former un bioconjugué dans le compartiment intracellulaire.

Plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes d'internalisation de la HSA à l'intérieur des DCs. Les vésicules observées à l'intérieur des DCs sont formées après seulement deux minutes d'incubation avec la HSA et ont une taille estimée entre 0,5 et 3 μm ce qui est caractéristique des macropinosomes (Sallusto *et al.* 1995, Larsson *et al.* 1995, Larsson *et al.* 1997). Ces résultats étaient cohérents avec ceux obtenus dans la littérature démontrant également la macropinocytose de bioconjugués HSA-médicaments avec différents types cellulaires (cellules HeLa, cellules pancréatiques) (Ichimizu *et al.* 2019, Liu *et al.* 2019). Le but de nos travaux a donc été de confirmer l'internalisation de la HSA à l'intérieur de notre modèle de moDCs. Pour ce faire, nous avons incubé les moDCs avec de la HSA ou de la HSA-Rhodamine pendant 3 heures afin d'étudier son internalisation. Nos résultats ont permis de montrer une internalisation rapide de la HSA à l'intérieur des moDCs, dès 30 minutes d'incubation. Cette internalisation était confirmée par les deux techniques utilisées lors de notre étude : par western blot et par cytométrie en flux.

Une fois que nous avons démontré que la BP libre était capable d'entrer de façon indépendante de la HSA dans les cellules, l'objectif des expériences suivantes a été de démontrer et de caractériser la formation du bioconjugué HSA-BP intracellulaire. Nous avons ainsi incubé des moDCs (préalablement traitées par la molécule libre de BP) dans un milieu RPMI à 10 mg.mL^{-1} de HSA pour établir une cinétique de formation du bioconjugué et l'identifier grâce à la technique du western blot. Nous avons pu observer des résultats cohérents avec ceux obtenus avec l'internalisation de la HSA puisque la formation du bioconjugué HSA-BP intracellulaire débutait également dès 30 minutes. Cette rapidité de formation du bioconjugué appuyait également une haute réactivité naturelle entre la HSA et les molécules de BP. La formation du bioconjugué intracellulaire a ensuite été confirmée par spectrométrie de masse. Le passage des échantillons en spectrométrie de masse nous a permis d'identifier une dizaine de peptides uniques liés à une molécule de BP. Dans notre étude de spectrométrie de masse, la faible abondance des peptides-BP intracellulaires n'a pas permis d'obtenir leur séquence précise qui a donc été extrapolée à partir du témoin HSA-BP synthétisé au laboratoire. Nos futurs objectifs sont de passer les échantillons sur un appareil plus sensible afin d'augmenter l'abondance des peptides et pouvoir prédire leur séquence précise.

En conclusion, l'ensemble des mécanismes présentés dans notre étude décrivent une internalisation indépendante de la molécule de BP libre et de la HSA. Une fois dans le compartiment intracellulaire, le bioconjugué HSA-BP se forme grâce à la réactivité naturelle entre ces deux composés. Ainsi, l'antigène néo-formé est détecté comme un antigène intracellulaire et est donc orienté vers la voie endogène d'apprêtement par les DCs. Bechara *et al.* ont effectivement démontré un apprêtement dépendant du protéasome et des molécules du CMH de classe I (Bechara *et al.* 2019). Les peptides produits sont ensuite présentés aux LT CD8+ naïfs ce qui déclenche leur activation. Ces résultats sont

les premiers à décrire l'impact de l'environnement cellulaire sur l'orientation de la réponse lymphocytaire. La HSA étant une protéine majoritaire du plasma humain, il est possible qu'elle soit fréquemment internalisée par les DCs, d'autant plus dans les organes riches en HSA comme le foie. L'un des mécanismes de pathogénèse des DILI vient du fait que le foie métabolise en grande quantité les médicaments qui vont pouvoir (en tant que molécule mère ou en tant que métabolite) s'hapténiser aux protéines les plus abondantes de cet organe. Les protéines hapténisées sont ainsi des enzymes de métabolisation (*e.g.* CYP450) (Robin *et al.* 1997, Pacitto *et al.* 2007) ou encore la HSA qui est présente en grande quantité dans le foie où elle est synthétisée (Kim et Naisbitt 2016, Waddington *et al.* 2020). Les conjugués médicament-peptides formés sont ensuite exprimés à la surface des hépatocytes et sont détectés et dégradés par les LT CD8+ spécifiques. Cette nécrose hépatocellulaire conduit à une insuffisance hépatique caractéristique des DILI (Kaplowitz 2004, Robin *et al.* 1997). Malgré le fait que les cas de DILI suite à l'administration de BP restent rares (Björnsson et Hoofnagle 2015), les résultats de notre étude ont permis de mieux comprendre les mécanismes décrits dans la littérature et pourraient permettre d'expliquer plus en détail la reconnaissance des BL par les LT CD8+. L'identification des protéines hapténisées dans les réactions impliquant les LT CD8+ pourrait également avoir un intérêt dans le diagnostic *in vitro* des réactions retardées aux BL dont la sensibilité est actuellement très faible (aux alentours de 2.6%) (Torres *et al.* 2001, Torres *et al.* 2009, Castells *et al.* 2019).

III. Application du modèle d'étude aux molécules médicamenteuses en cours de développement

Le développement de nouvelles molécules médicamenteuses est un long processus devant répondre à trois questions principales : (1) est-ce que la molécule candidate active la cible d'intérêt ? (2) est-ce que la molécule candidate est biodisponible par la voie d'administration d'intérêt ? (3) est-ce que la molécule candidate est tolérée par l'organisme ? Les essais de toxicologie non cliniques permettent effectivement d'éliminer un grand nombre de molécules responsables d'effets indésirables fréquents. Cependant, il y a également des effets indésirables rares, telles que l'allergie médicamenteuse, qui ne peuvent pas être détectés au cours du développement du médicament (Whitebread *et al.* 2005). Ce manque de détection peut conduire à des arrêts tardifs du développement ou encore à des retraits d'AMM ce qui engendre des coûts conséquents tant humainement qu'au niveau financier. Ainsi, l'industrie pharmaceutique développe un intérêt grandissant dans le développement de modèles de prédiction précoces des allergies médicamenteuses. Parmi ces modèles, le PLNA (popliteal lymph node assay) a été le premier à être publié en 1981 permettant d'identifier les molécules candidates associées avec des réactions d'hypersensibilités ou des réactions auto-immunes (Gleichmann 1981). Au cours de cet essai, la molécule était administrée par injection sous-cutanée dans la plante du pied de l'animal et la prolifération des LT était mesurée par incorporation de thymidine tritiée dans les ganglions lymphatiques de drainage. En 2005, Weaver *et al.* ont développé le LNPA (lymph node proliferation assay) qui est une combinaison du PLNA décrit précédemment avec le LLNA (local lymph node assay), plus connu dans la sensibilisation cutanée (Weaver *et al.* 2005). Au cours du LNPA, la molécule était administrée par injection sous-cutanée dans la nuque de l'animal et la prolifération des LT était mesurée par le même processus. Cependant, ces pratiques tendent à être considérablement réduites par la règle des 3R (Remplacer, Raffiner, Réduire) qui vise à défendre le bien-être animal dans son utilisation au sein des tests non cliniques (Whritenour *et al.* 2013). De ce fait, il y a un intérêt grandissant pour le développement de modèles *in vitro* dans la prédiction des allergies médicamenteuses.

Plusieurs modèles *in vitro* de prédiction des réactions allergiques ont été développés pour mimer l'allergie respiratoire, alimentaire et cutanée (Kimber *et al.* 2014, Vanbilsen *et al.* 2017, van Vliet *et al.* 2017, Kimber *et al.* 2018). Concernant l'allergie respiratoire et cutanée, les principaux éléments clés identifiés sont **(1)** la formation de complexes haptène-protéine stables **(2)** la présence de signaux de danger **(3)** l'activation des DCs, et **(4)** l'activation, la prolifération et la différenciation des LT (Kimber *et al.* 2014, Kimber *et al.* 2018). Concernant l'allergie alimentaire, les modèles sont définis

selon cinq éléments clés : **(1)** la présence de réactions inflammatoires au niveau de l'épithélium (sécrétion d'ERO et de cytokines pro-inflammatoires) **(2)** l'activation des DCs (sécrétion de cytokines Th2, activation des TLR, augmentation de l'expression des molécules d'activation telles que CD80 et CD86) **(3)** la migration des DCs (augmentation de l'expression des récepteurs de migration CCR7 et CCR4) **(4)** l'activation, la prolifération et la différenciation des LT (sécrétion de cytokines polarisante, détection de cellules exprimant le facteur de transcription GATA-3, activation des voies de transcription), et **(5)** l'activation des LB et la synthèse des IgE spécifiques (augmentation de l'expression des gènes exprimant les Ig, activation des cascades d'activation des LB) (Vanbilsen *et al.* 2017). La présence de l'ensemble de ces éléments clés *in vitro* permet ainsi de conclure à un potentiel effet pro-allergisant de la molécule testée.

L'apparition d'effets indésirables allergiques graves dans la population a entraîné le retrait d'AMM de plusieurs molécules médicamenteuses telles que le zomépirac et la glafénine (Fung *et al.* 2001, Onakpoya *et al.* 2017). En effet, le zomépirac était un anti-inflammatoire non stéroïdien retiré du marché à cause de l'apparition de réactions immunologiques mortelles (Sandler 1985). Les chocs anaphylactiques responsables du décès des patients semblaient être reliés à la formation d'un bioconjugué médicament-protéine entre le métabolite du zomépirac (l'acyl-glucurono-zomépirac) avec la HSA (Smith *et al.* 1985). La glafénine a également été retirée du marché à cause du déclenchement de chocs anaphylactiques mortels apparaissant rapidement (après 30 minutes) et après un deuxième contact avec la molécule ce qui laissait suspecter un mécanisme allergique (Davido *et al.* 1989). Malgré la nécessité de pouvoir détecter de tels effets indésirables allergiques précocement au cours du développement du médicament, aucun test n'a encore été validé. Récemment, un modèle a été élaboré pour prédire de façon précise les événements clés déclenchant les hépatites allergiques liées au diclofénac (Selvaraj *et al.* 2020). Les événements clés décrits dans cette étude étaient : **(1)** la dysfonction mitochondriale (liée au mécanisme toxicologique du diclofénac : l'inhibition de la synthèse d'ATP et l'augmentation du magnésium intracellulaire) **(2)** l'apoptose et la mort cellulaire des hépatocytes (les métabolites du diclofénac induisent de façon directe ou indirecte la mort des hépatocytes qui vont sécréter des signaux DAMPs ce qui déclenche la réponse immunitaire) **(3)** le stress du réticulum endoplasmique et la présence de protéines dépliées (caractéristiques de la réponse allergique au diclofénac) **(4)** l'activation des cellules immunitaires (activation des LT CD8+ et des LT CD4+ avec la sécrétion de cytokines Th2) **(5)** la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (notamment l'IFN- γ et le TNF- α), et **(6)** le déclenchement de réactions inflammatoires (activation de facteurs de transcription impliqués dans les réactions inflammatoires tels que Stat3 et activation des voies de signalisation pro-inflammatoires telles que les MAPK) (Selvaraj *et al.* 2020). Cependant, ces étapes sont spécifiques des DILI induites par le diclofénac rendant difficile leur extrapolation aux autres réactions allergiques médicamenteuses.

L'objectif de nos travaux a donc été de réunir l'ensemble des évènements clés identifiés au cours de ce projet doctoral pour tenter de construire un score de prédiction du risque allergique global d'une molécule médicamenteuse en cours de développement. Pour ce faire, nous avons développé le score d'immunisation calculé à partir de coefficients obtenus selon les quatre évènements clés suivant : **(1)** la réactivité chimique de la molécule (ou de son métabolite) conduit à la formation d'un bioconjugué protéine- médicament ou protéine-métabolite stable **(2)** l'effet signal de danger de la molécule médicamenteuse (ou de son métabolite) conduit à l'activation des DCs **(3)** la présence d'interaction des peptides-médicament ou peptides-métabolite (**théorie de l'haptène**) et/ou de la molécule médicamenteuse (ou son métabolite) sous sa forme libre (**p-i concept**) avec les molécules du CMH et le TCR **(4)** la présence d'un répertoire de LT reconnaissant le médicament (ou son métabolite). Chaque évènement clé permet l'obtention d'un coefficient qui est additionné et multiplié pour donné le score d'immunisation selon le calcul suivant : **score d'immunisation = (Coefficient 1 + Coefficient 2 + Coefficient 3) * Coefficient 4**. Ce calcul a été développé de façon à attribuer un poids plus important au Coefficient 4 (présence du répertoire de LT naïfs reconnaissant la molécule d'intérêt) qui est la condition *sine qua none* au déclenchement de l'immunisation et de la réaction allergique. Par conséquent, l'absence d'un répertoire de LT conduit à l'annulation du score d'immunisation. Ce calcul a été utilisé pour calculer le score de deux molécules médicamenteuses connues : la BP et le SMX. Ces deux molécules induisent des réactions allergiques par la théorie de l'haptène ce qui leur confère respectivement un score de 28 et de 20. Ce calcul a également été appliqué avec une molécule inconnue. Nos résultats ont permis de calculer un score d'immunisation préliminaire de 6 car nos expériences ont montré que le métabolite hépatique majeur, le **métabolite B**, semblait former des complexes métabolites-HSA déclenchant l'activation d'un répertoire de LT CD4+ naïfs spécifiques. En effet, les LT CD4+ naïfs n'étaient activés par le **métabolite B** qu'en présence d'un milieu riche en HSA et cette activation était spécifique des molécules HLA-DR. Cependant, la **molécule parent A** semblait être dépourvue d'effet pro-allergisant, ne possédant pas de répertoire de LT CD4+ naïfs reconnaissant la molécule.

En conclusion de cette étude, la construction d'un modèle d'immunisation aux molécules médicamenteuses pourrait permettre de comprendre plus en profondeur les éventuels mécanismes pro-allergisants de chaque molécule candidate et ainsi éviter les arrêts tardifs du développement du médicament. Ces modèles sont également une aide au développement de biomarqueurs permettant une meilleure évaluation du risque du déclenchement des effets indésirables au médicament. Les perspectives de ce projet sont donc d'appliquer le score d'immunisation à un plus large nombre de molécules afin de valider sa valeur de prédiction.

CONCLUSION

Conclusion et perspectives

Ce projet de recherche a permis de mieux comprendre l'impact de l'environnement sur la réponse lymphocytaire T dirigée contre les médicaments. Nous avons ainsi pu montrer pour la première fois que certains polluants environnementaux du quotidien tels que l'additif alimentaire E551 pourraient avoir des effets pro-allergisants et favoriser le déclenchement d'une réponse immunitaire dirigée contre le médicament. En effet, au cours de cette partie du projet, nous avons d'abord confirmé le rôle de ces nanoparticules comme signal de danger avec une augmentation de l'activation des DCs humaines caractérisée par une augmentation de l'expression des molécules d'activation (CD83, CD86 et CXCR4) et une augmentation de la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (CXCL-8 et CXCL-12). Nos résultats ont également permis de montrer que ces modifications phénotypiques avaient un impact significatif sur la réponse lymphocytaire caractérisée par une augmentation de la prolifération des LT ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'IL-5 par les lignées spécifiques de la BP, laissant suggérer une orientation vers une réponse pro-allergique Th2. Ces travaux originaux ont permis la publication de deux articles (**Articles n°1 et n°2**) respectivement dans les journaux *Nanomaterials* (publié) et *Toxicological Sciences* (en cours de révision). Les perspectives de ces travaux de recherche seraient d'approfondir la caractérisation de l'effet signal de danger des aSNP en explorant l'implication des récepteurs TLR et les voies de signalisations mises en jeu dans l'activation des DCs humaines. Ce modèle d'étude pourrait également être appliqué à d'autres polluants ou cocktails de polluants afin d'évaluer leur potentiel effet adjuvant.

La seconde partie de ce projet a permis de mieux comprendre l'impact de l'environnement cellulaire sur l'orientation de la réponse lymphocytaire face à la BP (Figure 26). Nos travaux ont permis de démontrer que le bioconjugué HSA-BP extracellulaire, responsable de l'activation des LT CD4+ naïfs, n'était pas reconnu par les LT CD8+ naïfs. Ces travaux sont les premiers à appuyer l'impact de la localisation de l'hapténisation du médicament sur la nature de la réponse lymphocytaire. Effectivement, nous avons pu démontrer que les LT CD8+ naïfs étaient activés par le bioconjugué HSA-BP formé dans le compartiment intracellulaire identifié grâce à des techniques de western blot et de spectrométrie de masse. Le mécanisme original de notre étude décrit une internalisation indépendante de la BP libre et de la HSA permettant une réaction d'hapténisation intracellulaire et l'immunisation des LT CD8+ naïfs. Ainsi, la composition du milieu cellulaire influence directement le type de réponse qui pourra être déclenché face au médicament. La HSA étant une protéine majoritaire du plasma humain, elle est probablement internalisée par les DCs et en d'autant plus grande quantité dans les

organes riches en HSA comme le foie. Les résultats de notre étude permettent ainsi de mieux décrire les mécanismes d'hapténisation et de reconnaissance des BL par les LT CD8+ cytotoxiques qui pourraient être à l'origine du déclenchement de DILI. Les perspectives de ces travaux sont de valider ce modèle d'étude avec des molécules connues pour être fréquemment responsables de DILI telles que la flucloxacilline. Ces travaux ont abouti à la préparation d'un article (**Article n°3**) qui sera prochainement soumis dans un journal scientifique.

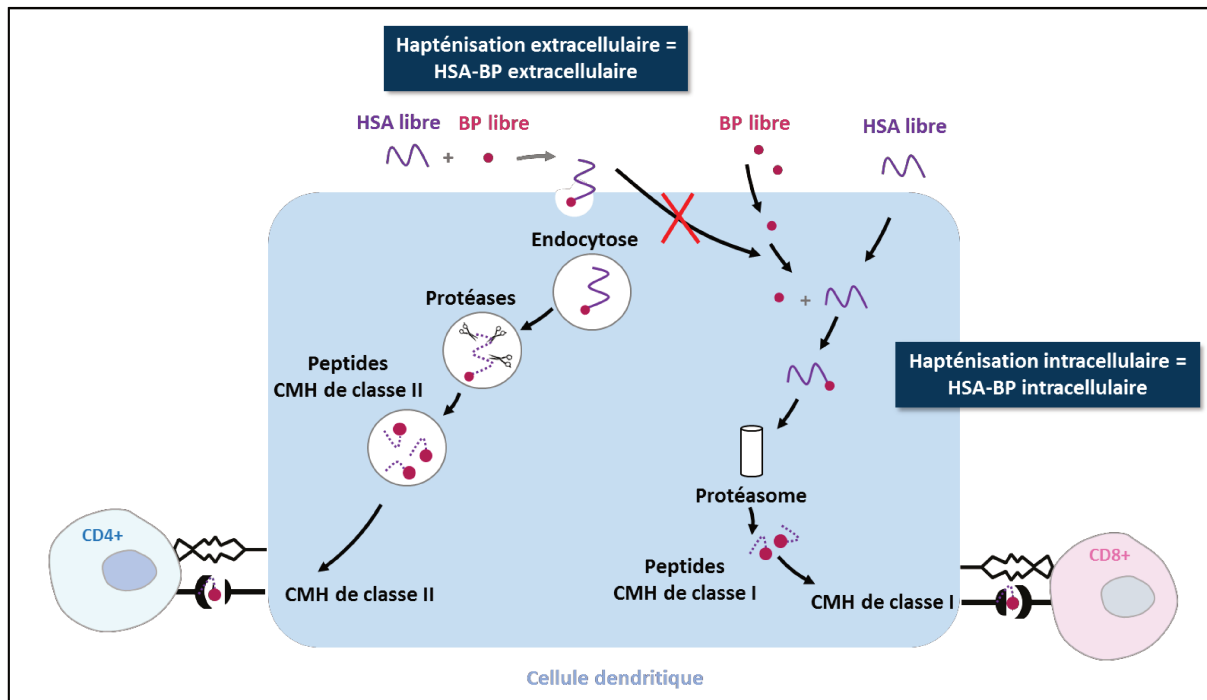


Figure 26. Mécanismes d'hapténisation de la BP et déclenchement des réponses lymphocytaires

L'hapténisation extracellulaire de la HSA avec la BP crée un bioconjugé HSA-BP extracellulaire qui peut être internalisé par endocytose à l'intérieur des DCs. Il est ensuite apprêté par les protéases endosomales et conjugué aux molécules du CMH de classe II ce qui aboutit à l'activation des LT CD4+ naïfs. L'hapténisation intracellulaire de la HSA avec la BP aboutit à la formation d'un bioconjugé intracellulaire qui est orienté vers un apprêtement par le protéasome puis une conjugaison aux molécules du CMH de classe I ce qui déclenche l'activation des LT CD8+ naïfs.

Enfin, la dernière partie de ces travaux de recherche ont permis d'élaborer un score d'immunisation des molécules médicamenteuses. Nous avons ainsi montré que la **molécule inconnue A** avait un potentiel immunogène lié à la réactivité de son **métabolite hépatique B**. Ce métabolite était capable de se conjuguer avec la HSA pour être détecté par les DCs humaines et déclencher

l'activation de LT CD4+ naïfs spécifiques. L'objectif à court terme de ces travaux est de finir la caractérisation du score d'immunisation de cette molécule en étudiant l'effet signal de danger sur les DCs, les interactions avec les molécules du CMH et le TCR *in silico* et *in vitro* ainsi que la potentielle présence d'un répertoire de LT CD8+ naïfs reconnaissant le **métabolite B**. Ces tests cellulaires nous permettront de calculer les coefficients afin de finaliser le score d'immunisation final. Ce calcul a également été utilisé pour calculer le score de deux molécules médicamenteuses connues : la BP et le SMX, qui ont obtenu respectivement un score de 28 et de 20 de par leur mécanisme allergique répondant à la théorie de l'haptène. Les perspectives à plus long terme pourraient être de confirmer et de tester ce modèle de calcul avec d'autres molécules médicamenteuses.

CONTRIBUTIONS

Contributions

Publications

Alexia Feray, Natacha Szely, Eléonore Guillet, Marie Hullo, François-Xavier Legrand, Emilie Brun, Marc Pallardy, Armelle Biola-Vidamment. **How to address the adjuvant effects of nanoparticles on the immune system**. Nanomaterials 2020, 10 (3) 425, DOI: 10.3390/nano10030425.

Alexia Feray, Marie Hullo, Eléonore Guillet, Natacha Szely, François-Xavier Legrand, Emilie Brun, Thierry Rabilloud, Marc Pallardy and Armelle Biola-Vidamment. **Amorphous silica nanoparticles trigger human dendritic cells maturation and CD4+ T-lymphocytes activation**. Tox Sci 2021 (en revisions).

Alexia Feray, Rami Bechara, Natacha Szely, Stéphanie Nicolaj, Emmanuel Nony, Delphine Joseph, Marc Pallardy. **Intracellular haptentation of benzylpenicillin with human serum albumin in human dendritic cells trigger CD8+ T-cell activation** (en preparation).

Communications orales

Alexia Feray, Rami Bechara, Natacha Szely, Nicolas Gigant, Bernard Maillère, Delphine Joseph, Richard Weaver, Marc Pallardy. **Study of the molecular mechanisms for beta lactam allergy**. Immunotoxicology and Chemical Allergy Speciality Section (ITCASS) meeting, Milan, Italie, Septembre 2019

Alexia Feray, Rami Bechara, Natacha Szely, Nicolas Gigant, Bernard Maillère, Delphine Joseph, Richard Weaver, Marc Pallardy. **Mechanisms of the naive CD8+ T-cell repertoire implicated in beta-lactams allergy**. 8ème colloque du LABEX Lermite, Gif-sur-Yvette, France, Novembre 2019

Communications affichées

Alexia Feray, Marie Hullo, Natacha Szely, François-Xavier Legrand, Emilie Brun, Eléonore Guillet, Thierry Rabilloud, Marc Pallardy and Armelle Biola-Vidamment. **Amorphous silica nanoparticles trigger in vitro Human dendritic cell maturation and CD4+ T-cell proliferation.** EUROTOX, Helsinki, Finlande, Septembre 2019

Alexia Feray, Marie Hullo, Natacha Szely, François-Xavier Legrand, Emilie Brun, Eléonore Guillet, Thierry Rabilloud, Marc Pallardy and Armelle Biola-Vidamment. **Amorphous silica nanoparticles trigger in vitro Human dendritic cell maturation and CD4+ T-cell proliferation.** Société de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire (STCM), Paris, France, Juin 2019

Alexia Feray, Rami Bechara, Natacha Szely, Nicolas Gigant, Bernard Maillère, Delphine Joseph, Richard Weaver, Marc Pallardy. **Prediction of drug allergy.** Meeting des laboratoires Servier, Orléans, France, Juillet 2019

Alexia Feray, Rami Bechara, Natacha Szely, Nicolas Gigant, Bernard Maillère, Delphine Joseph, Richard Weaver, Marc Pallardy. **Mechanisms of the naive CD8+ T-cell repertoire implicated in beta-lactams allergy.** 8ème colloque du LABEX Lermite, Gif-sur-Yvette, France, Novembre 2019

Alexia Feray, Rami Bechara, Natacha Szely, Nicolas Gigant, Bernard Maillère, Delphine Joseph, Richard Weaver, Marc Pallardy. **Mechanisms of the naive CD8+ T-cell repertoire implicated in beta-lactams allergy.** Lauréate flash poster, Journée de la recherche, Faculté de pharmacie Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France, Janvier 2020

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

A

Aberg N. Asthma and allergic rhinitis in Swedish conscripts. *Clinical and Experimental Allergy*; 1989;19:59-63

Adreeva ER et al. In vitro study of interactions between silicon-containing nanoparticles and human peripheral blood leukocytes. *Bull Exp Biol Med*. 2013 Jul;155(3):396-8. doi: 10.1007/s10517-013-2161-x

Agence nationale de sécurité sanitaire, alimentation, environnement, travail. Evaluation des risques liés aux nanomatériaux. 2014

Ahlholm, Helander, Savolainen. Genetic and environmental factors affecting the allergenicity of birch (*Betula pubescens* ssp. *czerepanovii* [Orl.] Hämet-Ahti) pollen: Allergenicity of birch pollen. *Clinical & Experimental Allergy*. 1998;28(11):1384-1388. doi:10.1046/j.1365-2222.1998.00404.x

Aihara M, Sugita Y, Takahashi S, Nagatani T, Arata S, Takeuchi K. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome associated with reactivation of cytomegalovirus. *British Journal of Dermatology*. Published online 2001;4.

Alloatti A, Kotsias F, Magalhaes JG, Amigorena S. Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! *Immunol Rev*. 2016;272(1):97-108. doi:10.1111/imr.12432

Almeida C-A. Virus-specific T-cell clonotypes might contribute to drug hypersensitivity reactions through heterologous immunity. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*. Published online 2019;7.

Alqahtani SA, Kleiner DE, Ghabril M, Gu J, Hoofnagle JH, Rockey DC. Identification and Characterization of Cefazolin-Induced Liver Injury. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2015;13(7):1328-1336.e2. doi:10.1016/j.cgh.2014.11.036

Altmann DM, Trowsdale J. Major histocompatibility complex structure and function. *Current Opinion in Immunology*. 1989;2(1):93-98. doi:10.1016/0952-7915(89)90103-9

Amigorena S, Savina A. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*. 2010;22(1):109-117. doi:10.1016/j.coi.2010.01.022

Amores-Iniesta J. Extracellular ATP Activates the NLRP3 Inflammasome and Is an Early Danger Signal of Skin Allograft Rejection. *Cell Reports* 2017;21:3414-3426

Antonios D, Ade N, Kerdine-Römer S, et al. Metallic haptens induce differential phenotype of human dendritic cells through activation of mitogen-activated protein kinase and NF- κ B pathways. *Toxicology in Vitro*. 2009;23(2):227-234. doi:10.1016/j.tiv.2008.11.009

Aouam K, Chaabane A, Toumi A, et al. Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) Probably Induced by Cefotaxime: a Report of Two Cases. *Clinical Medicine & Research*. 2012;10(1):32-35. doi:10.3121/cmr.2011.995

Apanius V, Penn D, Slev PR, Ruff LR, Potts WK. The Nature of Selection on the Major Histocompatibility Complex. 2017;37:51.

Ariza A, Collado D, Vida Y, et al. Study of Protein Haptenation by Amoxicillin Through the Use of a Biotinylated Antibiotic. Silman I, ed. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e90891. doi:10.1371/journal.pone.0090891

Ariza A. et al. Hypersensitivity Reactions to β -Lactams: Relevance of Hapten-Protein Conjugates. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2015; Vol. 25(1): 12-25

Ariza A, Garzon D, Abánades DR, et al. Protein haptenation by amoxicillin: High resolution mass spectrometry analysis and identification of target proteins in serum. *Journal of Proteomics*. 2012;77:504-520. doi:10.1016/j.jprot.2012.09.030

Aronson JK. Joining the DoTS: new approach to classifying adverse drug reactions. *BMJ*. 2003;327(7425):1222-1225. doi:10.1136/bmj.327.7425.1222

Arstila TP. A Direct Estimate of the Human T Cell Receptor Diversity. *Science*. 1999;286(5441):958-961. doi:10.1126/science.286.5441.958

Artik S, von Vultée C, Gleichmann E, Schwarz T, Griem P. Nickel allergy in mice : enhanced sensitization capacity of nickel at higher oxidation states. *The Journal of Immunology*. 1999;163:1143-1152

Arts JHE, Muijsers H, Duistermaat E, Junker K, Kuper CF. Five-day inhalation toxicity study of three types of synthetic amorphous silicas in Wistar rats and post-exposure evaluations for up to 3 months. *Food and Chemical Toxicology* 2007 ; 45 :1856-1867

Atanaskovic-Markovic M, Gaeta F, Medjo B, et al. Non-immediate hypersensitivity reactions to beta-lactam antibiotics in children - our 10-year experience in allergy work-up. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016;27(5):533-538. doi:10.1111/pai.12565

Azevedo J, Gaspar Â, Mota I, et al. Anaphylaxis to beta-lactam antibiotics at pediatric age: Six-year survey. *Allergologia et Immunopathologia.* 2019;47(2):128-132. doi:10.1016/j.aller.2018.07.008

Azoury ME, Filì L, Bechara R, et al. Identification of T-cell epitopes from benzylpenicillin conjugated to human serum albumin and implication in penicillin allergy. *Allergy.* 2018;73(8):1662-1672. doi:10.1111/all.13418

B

Baeza A, Marano F. Pollution atmosphérique et maladies respiratoires. 2007;23:5.

Bakdash G, Sittig SP, Dijk T van, Figdor CG, Vries IJM de. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Front Immunol.* 2013;4. doi:10.3389/fimmu.2013.00053

Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18(1):767-811. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767

Barillet et al. Immunotoxicity of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: influence of surface properties on dendritic cell activation. *Nanotoxicology.* 2019 Jun;13(5):606-622. doi: 10.1080/17435390.2018.1564078

Basu S, Srivastava PK. Fever-like temperature induces maturation of dendritic cells through induction of hsp90. *International Immunology* 2003; 15(9):1053-1061

Bechara R, Antonios D, Azouri H, Pallardy M. Nickel Sulfate Promotes IL-17A Producing CD4+ T Cells by an IL-23-Dependent Mechanism Regulated by TLR4 and Jak-STAT Pathways. *Journal of Investigative Dermatology*. 2017;137(10):2140-2148. doi:10.1016/j.jid.2017.05.025

Bechara R, Feray A, Pallardy M. Drug and chemical allergy: a role for a specific naïve T-cell repertoire ? *Frontiers in Immunology*. 2021

Bechara R, Maillere B, Joseph D, Weaver R, Pallardy M. Identification and characterization of a naïve CD8+ T cell repertoire for benzylpenicillin. *Clin Exp Allergy*. 2019;49:636–643. DOI: 10.1111/cea.13338

Ben-Said B, Arnaud-Butel S, Rozières A, et al. Allergic delayed drug hypersensitivity is more frequently diagnosed in drug reaction, eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome than in exanthema induced by beta-lactam antibiotics. *Journal of Dermatological Science*. 2015;80(1):71-74. doi:10.1016/j.jdermsci.2015.07.014

Besic Gyenge E et al. Uptake and fate of surface modified silica nanoparticles in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Nanobiotechnology* 2011 ; 9:32

Besnard A-G, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur J Immunol*. 2011;41(6):1675-1686. doi:10.1002/eji.201041033

Beylot C, Doutre M-S, Beylot-Barry M. Acute Generalized Exanthematous Pustulosis. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 1996;15(4):244-249

Bharadwaj M, Illing P, Theodossis A, Purcell AW, Rossjohn J, McCluskey J. Drug Hypersensitivity and Human Leukocyte Antigens of the Major Histocompatibility Complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2012;52(1):401-431. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134701

Bhattacharjee S, de Haan LH, Evers NM, et al. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells. *Particle and Fiber Toxicology* 2010 ; 7(25)

Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function, and diversity of class I Major histocompatibility complex molecules. *Annu. Rev. Biochem*. 1990;59:253-288

Björnsson E, Olsson R. Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology*. 2005;42(2):481-489. doi:10.1002/hep.20800

Björnsson ES, Bergmann OM, Björnsson HK, Kvaran RB, Olafsson S. Incidence, Presentation, and Outcomes in Patients With Drug-Induced Liver Injury in the General Population of Iceland. *Gastroenterology*. 2013;144(7):1419-1425. doi:10.1053/j.gastro.2013.02.006

Björnsson ES. Drug-induced liver injury due to antibiotics. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2017;52(6-7):617-623. doi:10.1080/00365521.2017.1291719

Björnsson ES, Hoofnagle JH. Categorization of drugs implicated in causing liver injury: Critical assessment based on published case reports: *Hepatology*, Vol. XX, No. X, 2015 Björnsson and Hoofnagle. *Hepatology*. 2015;63(2):590-603. doi:10.1002/hep.28323

Blanco P, Palucka A, Pascual V, Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2008;19(1):41-52. doi:10.1016/j.cytogfr.2007.10.004

Bleck B, Tse DB, Curotto de Lafaille MA, Zhang F, Reibman J. Diesel Exhaust Particle-Exposed Human Bronchial Epithelial Cells Induce Dendritic Cell Maturation and Polarization via Thymic Stromal Lymphopoietin. *J Clin Immunol*. 2008;28(2):147-156. doi:10.1007/s10875-007-9149-0

Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3:253-257

Blumenthal KG, Peter JG, Trubiano JA, Phillips EJ. Antibiotic allergy. *The Lancet*. 2019;393(10167):183-198. doi:10.1016/S0140-6736(18)32218-9

Bocquet H, Bagot M and Roujeau JC. Drug-Induced pseudolymphoma and drug hypersensitivity syndrome (drug rash with eosinophilia and systemic symptoms : DRESS). *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. 1996 :15(4) :250-257

Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xL. *Immunity*. 1995;3(1):87-98. doi:10.1016/1074-7613(95)90161-2

Boisleve F, Kerdineromer S, Pallardy M. Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF- α ? *Toxicology*. 2005;206(2):233-244. doi:10.1016/j.tox.2004.08.015

Boissonnas A, Scholer-Dahirel A, Simon-Blancal V, et al. Foxp3+ T Cells Induce Perforin-Dependent Dendritic Cell Death in Tumor-Draining Lymph Nodes. *Immunity*. 2010;32(2):266-278. doi:10.1016/j.immuni.2009.11.015

Bommarito L, Zisa G, Delrosso G, Farinelli P, Galimberti M. A case of acute generalized exanthematous pustulosis due to amoxicillin-clavulanate with multiple positivity to beta-lactam patch testing. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2013 ; 45(5):178-180

Bonay et Aubier. Pollution atmosphérique et maladies respiratoires allergiques. *Medecine Sciences* 2007 ; 23 : 187-192

Bousquet PJ, Kvedariene V, Co-Minh H-B, et al. Clinical presentation and time course in hypersensitivity reactions to β -lactams. *Allergy*. 2007;62(8):872-876. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01463.x

Brandenberger C, Rowley NL, Jackson-Humbles DN, et al. Engineered silica nanoparticles act as adjuvants to enhance allergic airway disease in mice. *Part Fibre Toxicol*. 2013 Jul 1;10:26. doi: 10.1186/1743-8977-10-26.

Brander C, Mauri-Hellweg D, Bettens F, Rolli H, Goldman M, Pichler WJ. Heterogeneous T cell responses to beta-lactam-modified self-structures are observed in penicillin-allergic individuals. *The Journal of Immunology* 1995

Brandt EB, Biagini Myers JM, Acciani TH, et al. Exposure to allergen and diesel exhaust particles potentiates secondary allergen-specific memory responses, promoting asthma susceptibility. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;136(2):295-303.e7. doi:10.1016/j.jaci.2014.11.043

Brennan JJ, Gilmore TD. Evolutionary Origins of Toll-like Receptor Signaling. Newfeld S, ed. *Molecular Biology and Evolution*. 2018;35(7):1576-1587. doi:10.1093/molbev/msy050

Breton G. De la diversité des cellules dendritiques humaines. *Med Sci (Paris)*. 2017;33(10):820-822. doi:10.1051/medsci/20173310003

Breton G. Origine et développement des cellules dendritiques humaines. *Med Sci (Paris)*. 2015;31(8-9):725-727. doi:10.1051/medsci/20153108008

Britschgi et al. T-cell involvement in drug-induced acute generalized exanthematous pustulosis. *J Clin Invest*. 2001 Jun 1; 107(11): 1433–1441. doi: 10.1172/JCI12118

Brown SGA. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004;114(2):371-376. doi:10.1016/j.jaci.2004.04.029

Bryskier A. Relation activité-structure des agents antibactériens. *Antibiotiques*. 2006;8(3):136-146. doi:10.1016/S1294-5501(06)70813-5

Burkemper NM. Contact Dermatitis, Patch Testing, and Allergen Avoidance. *Science of Medicine dermatology* 2015:296-300

Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(8):a025247. doi:10.1101/cshperspect.a025247

Buters J, Biedermann T. Chromium(VI) Contact Dermatitis: Getting Closer to Understanding the Underlying Mechanisms of Toxicity and Sensitization! *Journal of Investigative Dermatology*. 2017;137(2):274-277. doi:10.1016/j.jid.2016.11.015

Byamba D, Kim TG, Kim DH, Je JH, Lee M-G. The Roles of Reactive Oxygen Species Produced by Contact Allergens and Irritants in Monocyte-derived Dendritic Cells. *Ann Dermatol*. 2010;22(3):269. doi:10.5021/ad.2010.22.3.269

Byrd et al. Toxic effects of isoniazid in tuberculosis chemoprophylaxis. Role of biochemical monitoring in 1,000 patients. *JAMA*. 1979 Mar 23;241(12):1239-41.

Cabeza-Cabrerizo M, Cardoso A, Minutti CM, Pereira da Costa M, Reis e Sousa C. Dendritic Cells Revisited. *Annu Rev Immunol*. 2021;39(1):131-166. doi:10.1146/annurev-immunol-061020-053707

Caixas U, Antunes AMM, Marinho AT, et al. Evidence for nevirapine bioactivation in man: Searching for the first step in the mechanism of nevirapine toxicity. *Toxicology*. 2012;301(1-3):33-39. doi:10.1016/j.tox.2012.06.013

Callan HE, Jenkins RE, Maggs JL, et al. Multiple Adduction Reactions of Nitroso Sulfamethoxazole with Cysteinyll Residues of Peptides and Proteins: Implications for Hapten Formation. *Chem Res Toxicol*. 2009;22(5):937-948. doi:10.1021/tx900034r

Cao X, Cai SF, Fehniger TA, et al. Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity*. 2007;27(4):635-646. doi:10.1016/j.immuni.2007.08.014

Carey M, Vanpelt F. Immunochemical detection of flucloxacillin adduct formation in livers of treated rats. *Toxicology*. 2005;216(1):41-48. doi:10.1016/j.tox.2005.07.015

Casals E, Pfaller T, Duschl A, Oostingh GJ, Puentes V. Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona. *ACS NANO*. 2010;4(7):10.

Castells M, Khan DA, Phillips EJ. Penicillin Allergy. Longo DL, ed. *N Engl J Med*. 2019;381(24):2338-2351. doi:10.1056/NEJMra1807761

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med* 1994;180:1263-1272

Cavani A, Nasorri F, Ottaviani C, Sebastiani S, De Pità O, Girolomoni G. Human CD25 + Regulatory T Cells Maintain Immune Tolerance to Nickel in Healthy, Nonallergic Individuals. *J Immunol*. 2003;171(11):5760-5768. doi:10.4049/jimmunol.171.11.5760

Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol*. 2000 ; 30:1538-1543

Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nature Immunology* 2000; 1(4):305-310

Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*. 1997;9:10-16

Cerwenka A, Carter LL, Reome JB, Dutton RW. In Vivo Persistence of CD8 Polarized T Cell Subsets Producing Type 1 or Type 2 Cytokines. *J Immunol* 1998;161(1):97-105

Chaabane A, Aouam K, Boughattas NA, Chakroun M. Allergie aux bêta-lactamines : mythe et réalités. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2009;39(5):278-287. doi:10.1016/j.medmal.2008.09.011

Chao SK, Hamilton RF, Pfau JC, Holian A. Cell Surface Regulation of Silica-Induced Apoptosis by the SR-A Scavenger Receptor in a Murine Lung Macrophage Cell Line (MH-S). *Toxicology and Applied Pharmacology* 2001; 174, 10–16

Chen J-Q, Szodoray P, Zeher M. Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2015;50(1):1-17. doi:10.1007/s12016-015-8473-z

Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(4):227-242. doi:10.1038/nri3405

Chen P, Lin J-J, Lu C-S, et al. Carbamazepine-Induced Toxic Effects and HLA-B*1502 Screening in Taiwan. *N Engl J Med*. 2011;364(12):1126-1133. doi:10.1056/NEJMoa1009717

Chen W, Zhang Q, Kaplan BLF, Baker GL, Kaminski NE. Induced T cell cytokine production is enhanced by engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2014 ; 8 Suppl 1:11-23. doi: 10.3109/17435390.2013.848302

Chessman D, Kostenko L, Lethborg T, et al. Human Leukocyte Antigen Class I-Restricted Activation of CD8+ T Cells Provides the Immunogenetic Basis of a Systemic Drug Hypersensitivity. *Immunity*. 2008;28(6):822-832. doi:10.1016/j.immuni.2008.04.020

Collin M, Milne P. Langerhans cell origin and regulation: Current Opinion in Hematology. 2016;23(1):28-35. doi:10.1097/MOH.0000000000000202

Coombs R. Immunopathology. British Medical Journal. 1968;1:597-602. doi: 10.1136/bmj.1.5592.597

Coutant K. Modulation of the activity of human monocyte-derived dendritic cells by chemical haptens, a metal allergen, and a staphylococcal superantigen. Toxicological Sciences. 1999;52(2):189-198. doi:10.1093/toxsci/52.2.189

Crawford DHG, Roeser HP, Devereaux BM, Powell LW, Purcell P. Flucloxacillin associated cholestatic hepatitis: An Australian and Swedish epidemic? Eur J Clin Pharmacol. 1995;49(1-2). doi:10.1007/BF00192363

Cundiff J, Joe S. Amoxicillin-clavulanic acid-induced hepatitis. American Journal of Otolaryngology. 2007;28(1):28-30. doi:10.1016/j.amjoto.2006.06.007

D

DalleDonne I. The assembly of Ni²⁺-actin: some peculiarities. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 1999;1426(1):32-42. doi:10.1016/S0304-4165(98)00120-2

Dalli RL, Kumar R, Kennedy P, Maitz P, Lee S, Johnson R. TOXIC EPIDERMAL NECROLYSIS/STEVENS JOHNSON SYNDROME: CURRENT TRENDS IN MANAGEMENT. ANZ J Surg. 2007;77(8):671-676. doi:10.1111/j.1445-2197.2007.04184.x

Daly AK, et al. HLA-B*5701 genotype is a major determinant of drug-induced liver injury due to flucloxacillin. Nat Genet. 2009;41(7):816-819. doi:10.1038/ng.379

D'Amato et Cecchi. Effects of climate change on environmental factors in respiratory allergic. Clinical and Experimental Allergy. 2008 ; 38: 1264–1274

Damialis A, Halley JM, Gioulekas D, Vokou D. Long-term trends in atmospheric pollen levels in the city of Thessaloniki, Greece. Atmospheric Environment. 2007;41(33):7011-7021. doi:10.1016/j.atmosenv.2007.05.009

Davido A, Hallali P, Boutchnei T. A propos de sept accidents. La Revue de Médecine Interne 1989 ; 10(2) :113-117

Davies MH, Harrison RF, Elias E, Hübscher SG. Antibiotic-associated acute vanishing bile duct syndrome: A pattern associated with severe, prolonged, intrahepatic cholestasis. Journal of Hepatology. 1994;20(1):112-116. doi:10.1016/S0168-8278(05)80476-3

Deenick EK, Ma CS, Brink R, Tangye SG. Regulation of T follicular helper cell formation and function by antigen presenting. Curr Opin Immunol. 2011;23(1):111-118

de Greef PC, Oakes T, Gerritsen B, et al. The naive T-cell receptor repertoire has an extremely broad distribution of clone sizes. eLife. 2021;9:e49900. doi:10.7554/eLife.49900

de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. Springer Semin Immun. 2005;26(3):289-307. doi:10.1007/s00281-004-0167-1

Dekkers S, Krystek P, Peters RJB, Lankveld DPK, Bokkers BGH. Presence and risks of nanosilica in food products. Nanotoxicology 2011 ; 5(3):393-405

deLemos AS, Ghabril M, et al. Amoxicillin–Clavulanate-Induced Liver Injury. Dig Dis Sci. 2016;61(8):2406-2416. doi:10.1007/s10620-016-4121-6

Demoly P, Romano A. Update on beta-lactam allergy diagnosis. Curr Allergy Asthma Rep. 2005;5(1):9-14. doi:10.1007/s11882-005-0048-2

Demoly P, Viola M, Gomes ER, Romano A. Epidemiology and Causes of Drug Hypersensitivity. In: Pichler WJ. Drug Hypersensitivity; 2007:2-17. doi:10.1159/000104184

De Nardo D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. Cytokine. 2015;74(2):181-189. doi:10.1016/j.cyto.2015.02.025

Deng ZJ. Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. Nat Nanotechnol. 2011 Jan;6(1):39-44. doi: 10.1038/nnano.2010.250

Derby L, Jick H, Henry D.A and Dean A.D. Cholestatic hepatitis associated with flucloxacillin. The medical journal of Australia. 1993;158:596-600

Descamps V, Mahe E, Houhou N, et al. Drug-induced hypersensitivity syndrome associated with Epstein-Barr virus infection: DRUG-INDUCED HYPERSENSITIVITY SYNDROME AND EBV. British Journal of Dermatology. 2003;148(5):1032-1034. doi:10.1046/j.1365-2133.2003.05330.x

Deslée G tan, Charbonnier A-S, Hammad H, et al. Involvement of the mannose receptor in the uptake of der p 1, a major mite allergen, by human dendritic cells. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2002;110(5):763-770. doi:10.1067/mai.2002.129121

Dharmage S et al. Epidemiology of Asthma in Children and Adults. Frontiers in Pediatrics 2019; 7(246):1-15

Diaz-Mancebo et al. DRESS syndrome and acute tubulointerstitial nephritis after treatment with vancomycin and betalactams. Case report and literature review. Nefrologia 2012;32(5):685-7 doi:10.3265/Nefrologia.pre2012.Jun.11455

Diaz-sanchez D, Tsien A, Casillas A, Dotson A, Saxon A. Enhanced nasal cytokine production in human beings after in vivo challenge with diesel exhaust particles. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 1996;98(1):114-123. doi:10.1016/S0091-6749(96)70233-6

Diaz-Sanchez D, Tsien A, Fleming J, Saxon A. Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern. J Immunol 1997; 158:2406-2413:9.

Di Cristo LD, Movia D, Bianchi MG, et al. Pro-inflammatory effects of pyrogenic and precipitated amorphous silica nanoparticles in innate immunity cells. Toxicol Sci. 2016;150(1):40-53. doi: 10.1093/toxsci/kfv258

Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S. Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA. Science. 2004; 303 : 1529-1531

Dispenza MC. Classification of hypersensitivity reactions. Allergy asthma proc. 2019;40(6):470-473. doi:10.2500/aap.2019.40.4274

Divkovic M, Pease CK, Gerberick GF, Basketter DA. Hapten-protein binding: from theory to practical application in the in vitro prediction of skin sensitization. *Contact Dermatitis*. 2005;53(4):189-200. doi:10.1111/j.0105-1873.2005.00683.x

Drawz SM, Bonomo RA. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *CMR*. 2010;23(1):160-201. doi:10.1128/CMR.00037-09

Dustin ML. The Immunological Synapse. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(11):1023-1033. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0161

Dutta D, Sundaram SK, Teeguarden JG, et al. Adsorbed Proteins Influence the Biological Activity and Molecular Targeting of Nanomaterials. *Toxicol Sci*. 2007 Nov;100(1):303-15. doi: 10.1093/toxsci/kfm217

E

Eder et al. The Asthma Epidemic. *The New England Journal of Medicine*. 2006; 355:2226-2235.

Edwards IR, Aronson JK. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *The Lancet*. 2000;356(9237):1255-1259. doi:10.1016/S0140-6736(00)02799-9

Eggleton P. Hypersensitivity: Immune Complex Mediated (Type III). In: John Wiley & Sons, Ltd, ed. *ELS*. John Wiley & Sons, Ltd; 2005 doi:10.1038/npg.els.0004101

Eisenbarth SC. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(2):89-103. doi:10.1038/s41577-018-0088-1

Esser PR, Freudenberg MA, Jakob T, Martin SF. Contact Sensitizers Induce Skin Inflammation via ROS Production and Hyaluronic Acid Degradation. *PLoS ONE*. 2012;7(7):16.

Esser PR, Kimber I, Martin SF. Correlation of Contact Sensitizer Potency with T Cell Frequency and TCR Repertoire Diversity. In: Martin SF, ed. *T Lymphocytes as Tools in Diagnostics and Immunotoxicology* ; 2014:14:101-114. doi:10.1007/978-3-0348-0726-5_8

Esser PR, Martin SF. Pathomechanisms of Contact Sensitization. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2017;17(12):83. doi:10.1007/s11882-017-0752-8

F

Fadeel B. Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune system. *Swiss Med Wkly*, 2012 ; 142:1-9. doi:10.4414/smw.2012.13609

Fan W-L, Shiao M-S, Hui RC-Y, et al. HLA Association with Drug-Induced Adverse Reactions. *Journal of Immunology Research*. 2017 ; 1-10. doi:10.1155/2017/3186328

Farnam K, Chang C, Teuber S, Gershwin ME. Nonallergic Drug Hypersensitivity Reactions. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;159(4):327-345. doi:10.1159/000339690

Farrera C, Fadeel B. It takes two to tango: Understanding the interactions between engineered nanomaterials and the immune system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;95:3-12. doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.007

Fasano M, Curry S, Terreno E, et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*. 2005;57(12):787-796. doi:10.1080/15216540500404093

Faulkner L, Meng X, Park BK, Naisbitt DJ. The importance of hapten–protein complex formation in the development of drug allergy. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology*. 2014;14(4):293-300. doi:10.1097/ACI.0000000000000078

Feray A, Szely N, Guillet E, Hullo M, Legrand FX, Brun E, Pallardy M and Biola-Vidamment A. How to address the adjuvant effects of nanoparticles on the immune system. *Nanomaterials*. 2020;10(425). doi:10.3390/nano10030425

Fernandez TD, Mayorga C, Salas M, et al. Evolution of diagnostic approaches in betalactam hypersensitivity. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2017;10(6):671-683. doi:10.1080/17512433.2017.1313110

Ferrell PB, McLeod HL. Carbamazepine, HLA-B*1502 and risk of Stevens–Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: US FDA recommendations. *Pharmacogenomics*. 2008;9(10):1543-1546. doi:10.2217/14622416.9.10.1543

Finetti F, Baldari CT. The immunological synapse as a pharmacological target. *Pharmacological Research*. 2018;134:118-133. doi:10.1016/j.phrs.2018.06.009

Fleming DM, Crombie DL. Prevalence of asthma and hay fever in England and Wales. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987 Jan 31;294(6567):279-83. doi: 10.1136/bmj.294.6567.279

Förster R, Schubel A, Breitfeld D, et al. CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs. *Cell*. 1999;99(1):23-33. doi:10.1016/S0092-8674(00)80059-8

Franken A, Eloff FC, Du Plessis J, Du Plessis JL. In Vitro Permeation of Metals through Human Skin: A Review and Recommendations. *Chem Res Toxicol*. 2015;28(12):2237-2249. doi:10.1021/acs.chemrestox.5b00421

Fulde M, Sommer F, Chassaing B, et al. Neonatal selection by Toll-like receptor 5 influences long-term gut microbiota composition. *Nature*. 2018;560(7719):489-493. doi:10.1038/s41586-018-0395-5

Fung M, Thornton A, Mybeck K, Wu JH-H, Hornbuckle K, Muniz E. Evaluation of the Characteristics of Safety Withdrawal of Prescription Drugs from Worldwide Pharmaceutical Markets-1960 to 1999. *Drug Information J*. 2001;35(1):293-317. doi:10.1177/009286150103500134

G

Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opinion in Immunology*. 2001;13(1):114-119. doi:10.1016/S0952-7915(00)00191-6

Gatoo MA, Naseem S, Arfat MY, Mahmood Dar A, Qasim K, Zubair S. Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations. *BioMed Research International*. 2014;2014:1-8. doi:10.1155/2014/498420

Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, et al. A human memory T cell subset with stem cell–like properties. *Nat Med*. 2011;17(10):1290-1297. doi:10.1038/nm.2446

Gehrke H et al. In vitro toxicity of amorphous silica nanoparticles in human colon carcinoma cells. *Nanotoxicology*. 2013 May;7(3):274-93. doi: 10.3109/17435390.2011.652207

Ginhoux F, Merad M. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunol Cell Biol*. 2010;88(4):387-392. doi:10.1038/icb.2010.38

Gleichmann. Studies on the mechanism of drug sensitization: T-cell-dependent popliteal lymph node reaction to diphenylhydantoin. *Clin Immunol Immunopathol*. 1981 Feb;18(2):203-11. doi: 10.1016/0090-1229(81)90026-x

Gomes ER, Demoly P. Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2005;5:309-316

Gómez D et al. Silica nanoparticles induce NLRP3 inflammasome activation in human primary immune cells. *Innate Immun*. 2017 Nov;23(8):697-708. doi: 10.1177/1753425917738331

Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjugate Chem*. 2004 ; 15:897-900

Gräfe C. Intentional formation of a protein corona on nanoparticles - Serum concentration affects protein corona mass, surface charge, and nanoparticle-cell interaction. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016 Jun;75:196-202. doi: 10.1016/j.biocel.2015.11.005

Gratton SEA, Ropp PA, Pohlhaus PD, et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *PNAS* 2008 ; 105(33) :11613-11618

Greenberger PA, Ditto AM. Chapter 24: Anaphylaxis. *allergy asthma proc*. 2012;33(3):80-83. doi:10.2500/aap.2012.33.3557

Green JM, Noel PJ, Sperling AI, et al. Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity*. 1994;1(6):501-508. doi:10.1016/1074-7613(94)90092-2

Gruchalla RS. Drug metabolism, danger signals, and drug-induced hypersensitivity. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*. 2001;108(4):14.

Gualtieri et al. Importance of agglomeration state and exposure conditions for uptake and pro-inflammatory responses to amorphous silica nanoparticles in bronchial epithelial cells. *Nanotoxicology*. 2012 Nov;6(7):700-12. doi: 10.3109/17435390.2011.604441

Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002;20(1):621-667. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828

Guilliams M, Henri S, Tamoutounour S, et al. From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets. *Eur J Immunol*. 2010;40(8):2089-2094. doi:10.1002/eji.201040498

Gust AA. Bacteria-derived Peptidoglycans Constitute Pathogen-associated Molecular Patterns Triggering Innate Immunity in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(44):11.

H

Hamamura-Yasuno E, Iguchi T, Kumagai K, Tsuchiya Y, Mori K. Identification of the dog orthologue of human MAS-related G protein coupled receptor X2 (MRGPRX2) essential for drug-induced pseudo-allergic reactions. *Sci Rep*. 2020;10(1):16146. doi:10.1038/s41598-020-72819-5

Hamilton RF, Thakur SA, Mayfair JK, Holian A. MARCO Mediates Silica Uptake and Toxicity in Alveolar Macrophages from C57BL/6 Mice. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2006;281(45):9.

Han H. Toxic and adjuvant effects of silica nanoparticles on ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice. *Respir Res*. 2016 May 18;17(1):60. doi: 10.1186/s12931-016-0376-x.

Harr T, French LE. Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2010 Dec 16;5:39. doi: 10.1186/1750-1172-5-39.

Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8+ T Cell Effector Mechanisms in Resistance to Infection. *Annu Rev Immunol*. 2000;18(1):275-308. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.275

Heijmans CMC, Groot NG, Bontrop RE. Comparative genetics of the major histocompatibility complex in humans and nonhuman primates. *Int J Immunogenet*. 2020;47(3):243-260. doi:10.1111/iji.12490

Heinrich J, Wichmann H-E. Traffic related pollutants in Europe and their effect on allergic disease. Exposure assessment. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004 Oct;4(5):341-8.

Heiss K, Junkes C, Guerreiro N, et al. Subproteomic analysis of metal-interacting proteins in human B cells. *Proteomics*. 2005;5(14):3614-3622. doi:10.1002/pmic.200401215

Hemmi et Akira. TLR signalling and the function of dendritic cells. *Chem Immunol Allergy*. 2005;86:120-135. doi: 10.1159/000086657

Heo JH, Heo Y, Lee HJ, Kim M, Shin HY. Topical anti-inflammatory and anti-oxidative effects of porcine placenta extracts on 2,4-dinitrochlorobenzene-induced contact dermatitis. *BMC Complement Altern Med*. 2018;18(1):331. doi:10.1186/s12906-018-2396-1

Heo Y, Saxon A, Hankinson O. Effect of diesel exhaust particles and their components on the allergen-specific IgE and IgG1 response in mice. *Toxicology*. 2001 Feb 28;159(3):143-58. doi: 10.1016/s0300-483x(00)00418-2.

Hetherington S, Hughes AR, Mosteller M, et al. Genetic variations in HLA-B region and hypersensitivity reactions to abacavir. *The Lancet*. 2002;359(9312):1121-1122. doi:10.1016/S0140-6736(02)08158-8

Hetland et al. Silica-induced cytokine release from A549 cells: importance of surface area versus size. *Human & Experimental Toxicology*. 2001 ; 20(1):46-55. DOI:10.1191/096032701676225130

Higuchi S, Yano A, Takai S, et al. Metabolic Activation and Inflammation Reactions Involved in Carbamazepine-Induced Liver Injury. *Toxicological Sciences*. 2012;130(1):4-16. doi:10.1093/toxsci/kfs222

Himly M, Mills-Goodlet R, Geppert M, Duschl A. Nanomaterials in the Context of Type 2 Immune Responses—Fears and Potentials. *Front Immunol*. 2017;8:471. doi:10.3389/fimmu.2017.00471

Hirai T et al. Amorphous silica nanoparticles size-dependently aggravate atopic dermatitis-like skin lesions following an intradermal injection. *Part Fibre Toxicol.* 2012a Feb 2;9:3. doi: 10.1186/1743-8977-9-3

Hirai T. Amorphous silica nanoparticles enhance cross-presentation in murine dendritic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* Biochemical and Biophysical Research Communications 2012b ; 427 :553–556

Hoelen DWM, Tjan DHT, van Vugt R, Geert van der Meer Y, van Zanten ARH. Severe local vancomycin induced skin necrosis. *Br J Clin Pharmacol.* 2007;64(4):553-554. doi:10.1111/j.1365-2125.2007.02897.x

Holland CJ, Cole DK, Godkin A. Re-Directing CD4+ T Cell Responses with the Flanking Residues of MHC Class II-Bound Peptides: The Core is Not Enough. *Front Immunol.* 2013;4. doi:10.3389/fimmu.2013.00172

Holt et Ju. Mechanisms of drug-induced liver injury. *AAPS J.* 2006 Mar; 8(1): E48–E54. doi: 10.1208/aapsj080106

Holt PG, Thomas WR. Sensitization to airborne environmental allergens: unresolved issues. *NATURE IMMUNOLOGY.* 2005;6(10):4.

Howarth PH. Is allergy increasing? – early life influences. *Clinical and Experimental Allergy. Clin Exp Allergy.* 1998 Dec;28 Suppl 6:2-7. doi: 10.1046/j.1365-2222.1998.0280s6002.x

I

Ichimizu S, Watanabe H, Maeda H, et al. Cell-penetrating mechanism of intracellular targeting albumin: Contribution of macropinocytosis induction and endosomal escape. *Journal of Controlled Release.* 2019;304:156-163. doi:10.1016/j.jconrel.2019.05.015

Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y, Flavell R, Iwasaki A. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med.* 2009 Jan 16;206(1):79-87. doi: 10.1084/jem.20081667

Illing PT, Vivian JP, Dudek NL, et al. Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire. *Nature*. 2012;486(7404):554-558. doi:10.1038/nature11147

J

James DV, Farnham F, Cripps J. Homelessness and psychiatric admission rates through the criminal justice system. *The Lancet*. 1999;353(9159):1158. doi:10.1016/S0140-6736(98)05650-5

Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT. Nanoparticle Uptake by the Rat Gastrointestinal Mucosa: Quantitation and Particle Size Dependency. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1990;42(12):821-826. doi:10.1111/j.2042-7158.1990.tb07033.x

Jenkinson C, Jenkins RE, Aleksic M, Pirmohamed M, Naisbitt DJ, Park BK. Characterization of p-Phenylenediamine–Albumin Binding Sites and T-Cell Responses to Hapten-Modified Protein. *Journal of Investigative Dermatology*. 2010;130(3):732-742. doi:10.1038/jid.2009.271

Jenkins RE, Meng X, Elliott VL, Kitteringham NR, Pirmohamed M, Park BK. Characterisation of flucloxacillin and 5-hydroxymethyl flucloxacillin haptenated HSA in vitro and in vivo. *Prot Clin Appl*. 2009;3(6):720-729. doi:10.1002/prca.200800222

Jenkins RE, Yaseen FS, Monshi MM, et al. β -Lactam Antibiotics Form Distinct Haptenic Structures on Albumin and Activate Drug-Specific T-Lymphocyte Responses in Multiallergic Patients with Cystic Fibrosis. *Chem Res Toxicol*. 2013;26(6):963-975. doi:10.1021/tx400124m

Jin G-B, Nakayama H, Shmyhlo M, et al. High positive frequency of antibodies to metallothionein and heat shock protein 70 in sera of patients with metal allergy: Antibodies to metallothionein and hsp 70 in human serum. *Clinical & Experimental Immunology*. 2003;131(2):275-279. doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02074.x

Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(8):557-569. doi:10.1038/nri3254

Joint Task Force on Practice Parameters. Drug Allergy: An Updated Practice Parameter. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2010;105(4):259-273.e78. doi:10.1016/j.anai.2010.08.002

Jönsson F, de Chaisemartin L, Granger V, et al. An IgG-induced neutrophil activation pathway contributes to human drug-induced anaphylaxis. *Sci Transl Med*. 2019;11(500):eaat1479. doi:10.1126/scitranslmed.aat1479

Judokusumo E, Tabdanov E, Kumari S, Dustin ML, Kam LC. Mechanosensing in T Lymphocyte Activation. *Biophysical Journal*. 2012;102(2):L5-L7. doi:10.1016/j.bpj.2011.12.011

Jung J-W, Song W-J, Kim Y-S, et al. HLA-B58 can help the clinical decision on starting allopurinol in patients with chronic renal insufficiency. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2011;26(11):3567-3572. doi:10.1093/ndt/gfr060

Jurewicz MM, Stern LJ. Class II MHC antigen processing in immune tolerance and inflammation. *Immunogenetics*. 2018;71(3):171-187. doi:10.1007/s00251-018-1095-x

K

Kabashima K, Shiraishi N, Sugita K, et al. CXCL12-CXCR4 Engagement Is Required for Migration of Cutaneous Dendritic Cells. *The American Journal of Pathology*. 2007;171(4):1249-1257. doi:10.2353/ajpath.2007.070225

Kamekura R, Yamashita K, Jitsukawa S, et al. Role of Crosstalk between Epithelial and Immune Cells, the Epimmunome, in Allergic Rhinitis Pathogenesis. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016;77:75-82. doi:10.1159/000441878

Kang H-R, Jee YK, Kim Y-S, et al. Positive and negative associations of HLA class I alleles with allopurinol-induced SCARs in Koreans: Pharmacogenetics and Genomics. 2011;21(5):303-307. doi:10.1097/FPC.0b013e32834282b8

Kang P, Liao M, Wester MR, Leeder JS, Pearce RE, Correia MA. CYP3A4-Mediated Carbamazepine (CBZ) Metabolism: Formation of a Covalent CBZ-CYP3A4 Adduct and Alteration of the Enzyme Kinetic Profile. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(3):490-499. doi:10.1124/dmd.107.016501

Kaniwa N, Saito Y, Aihara M, et al. HLA-B locus in Japanese patients with anti-epileptics and allopurinol-related Stevens–Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Pharmacogenomics*. 2008;9(11):1617-1622. doi:10.2217/14622416.9.11.1617

Kaplan DH, Igyártó BZ, Gaspari AA. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(2):114-124. doi:10.1038/nri3150

Kaplan DH. Ontogeny and function of murine epidermal Langerhans cells. *Nat Immunol*. 2017;18(10):1068-1075. doi:10.1038/ni.3815

Kaplowitz N. Drug-Induced Liver Injury. *Clinical Infectious Diseases* 2004;38(2):44-48

Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(6):489-499. doi:10.1038/nrd1750

Kapralov et al. Adsorption of Surfactant Lipids by Single- Walled Carbon Nanotubes in Mouse Lung upon Pharyngeal Aspiration. *ACS Nano*. 2012 May 22;6(5):4147-56. doi: 10.1021/nn300626q

Karlberg A-T, Bergström MA, Börje A, Luthman K, Nilsson JLG. Allergic Contact Dermatitis—Formation, Structural Requirements, and Reactivity of Skin Sensitizers. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(1):53-69. doi:10.1021/tx7002239

Kasper et al. Inflammatory and cytotoxic responses of an alveolar-capillary coculture model to silica nanoparticles: comparison with conventional monocultures. *Part Fibre Toxicol*. 2011 Jan 27;8(1):6. doi: 10.1186/1743-8977-8-6

Keller M, Lerch M, Britschgi M, et al. Processing-dependent and -independent pathways for recognition of iodinated contrast media by specific human T cells. *Clinical & Experimental Allergy*. 2010;40(2):257-268. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03425.x

Kelly A, Trowsdale J. Genetics of antigen processing and presentation. *Immunogenetics*. 2018;71(3):161-170. doi:10.1007/s00251-018-1082-2

Kimber I, Dearman RJ, Basketter DA, Boverhof DR. Chemical respiratory allergy: Reverse engineering an adverse outcome pathway. *Toxicology*. 2014;318:32-39. doi:10.1016/j.tox.2014.02.001

Kimber I, Poole A, Basketter DA. Skin and respiratory chemical allergy: confluence and divergence in a hybrid adverse outcome pathway. *Toxicology Research*. 2018;7(4):586-605. doi:10.1039/c7tx00272f

Kim HW, Ahn E-K, Jee BK, Yoon H-K, Lee KH, Lim Y. Nanoparticulate-induced toxicity and related mechanism in vitro and in vivo. *J Nanopart Res.* 2009 ; 11:55–65

Kim S-H, Naisbitt DJ. Update on Advances in Research on Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2016;8(1):3. doi:10.4168/aa.2016.8.1.3

King Heiden T et al. Developmental toxicity of low generation PAMAM dendrimers in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007 Nov 15;225(1):70-9.

Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol.* 2014;14(6):377-391. doi:10.1038/nri3667

Kloetzel P-M, Ossendorp F. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Current Opinion in Immunology.* 2004;16(1):76-81. doi:10.1016/j.coi.2003.11.004

Kohanim S, Palioura S, Saeed HN, et al. Stevens-Johnson Syndrome/Toxic Epidermal Necrolysis – A Comprehensive Review and Guide to Therapy. I. Systemic Disease. *The Ocular Surface.* 2016;14(1):2-19. doi:10.1016/j.jtos.2015.10.002

Koike et al. Carbon black nanoparticles promote the maturation and function of mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Chemosphere.* 2008 Sep;73(3):371-6. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.05.054

Komanduri K et al. Direct Measurement of CD41 and CD81 T-Cell Responses to CMV in HIV-1-Infected Subjects. *Virology* 2001 ; 279, 459-470

Kondo K, Ohigashi I, Takahama Y. Thymus machinery for T-cell selection. *International Immunology.* 2018;31(3):119-125. doi:10.1093/intimm/dxy081

Kool B, Chandra D, Fitzharris P. Adult food-induced anaphylaxis hospital presentations in New Zealand. *Postgrad Med J.* 2016;92(1093):640-644. doi:10.1136/postgradmedj-2015-133530

Ko T-M, Chung W-H, Wei C-Y, et al. Shared and restricted T-cell receptor use is crucial for carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;128(6):1266-1276.e11. doi:10.1016/j.jaci.2011.08.013

Kotsias F, Cebrian I, Alloatti A. Antigen processing and presentation. *International Review of Cell and Molecular Biology*; 2019:348:69-121. doi:10.1016/bs.ircmb.2019.07.005

Kowalski ML, Asero R, Bavbek S, et al. Classification and practical approach to the diagnosis and management of hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Allergy*. 2013;68(10):1219-1232. doi:10.1111/all.12260

Kreuter J, Shamenkov D, Petrov V, et al. Apolipoprotein-mediated Transport of Nanoparticle-bound Drugs Across the Blood-Brain Barrier. *J Drug Target*. 2002 Jun;10(4):317-25. doi: 10.1080/10611860290031877

L

Laaidi M, Chinet T, Aegerter P. Allergies au pollen, pollution et climat: revue de la littérature. *Revue Française d'Allergologie*. 2011;51(7):622-628. doi:10.1016/j.reval.2011.05.004

Lakehal F, Dansette PM, Becquemont L, et al. Indirect Cytotoxicity of Flucloxacillin toward Human Biliary Epithelium via Metabolite Formation in Hepatocytes. *Chem Res Toxicol*. 2001;14(6):694-701. doi:10.1021/tx0002435

Lammintausta K, Kortekangas-Savolainen O. The usefulness of skin tests to prove drug hypersensitivity. *Br J Dermatol*. 2005;152(5):968-974. doi:10.1111/j.1365-2133.2005.06429.x

Larrey D, Vial T, Micaleff A, et al. Hepatitis associated with amoxycillin-clavulanic acid combination report of 15 cases. *Gut*. 1992;33(3):368-371. doi:10.1136/gut.33.3.368

Larsson M, Majeed M, Ernst JD, Magnusson K -E., Stendahl O, Forsum U. Role of annexins in endocytosis of antigens in immature human dendritic cells. *Immunology*. 1997;92(4):501-511. doi:10.1046/j.1365-2567.1997.00377.x

Larsson M, Majeed M, Stendahl O, Magnusson K-E, Ernst JD, Forsum U. Mobilization of annexin V during the uptake of DNP-albumin by human dendritic cells. *APMIS*. 1995;103(7-8):855-861. doi:10.1111/j.1699-0463.1995.tb01444.x

Lavergne SN, Wang H, Callan HE, Park BK, Naisbitt DJ. "Danger" Conditions Increase Sulfamethoxazole-Protein Adduct Formation in Human Antigen-Presenting Cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;331(2):372-381. doi:10.1124/jpet.109.155374

Leitner JM, Graninger W, Thalhammer F. Hepatotoxicity of Antibacterials: Pathomechanisms and Clinical Data. *Infection*. 2010;38(1):3-11. doi:10.1007/s15010-009-9179-z

León B, López-Bravo M, Ardavín C. Monocyte-derived dendritic cells. *Seminars in Immunology*. 2005;17(4):313-318. doi:10.1016/j.smim.2005.05.013

Lepoittevin J-P. Metabolism versus chemical transformation or pro- versus prehapten? Contact Dermatitis. 2006;54(2):73-74. doi:10.1111/j.0105-1873.2006.00795.x

Levetin E. Changing Pollen Types/Concentrations/ Distribution in the United States: Fact or Fiction? *Curr Allergy Asthma Rep*. 2008 Sep;8(5):418-24. doi: 10.1007/s11882-008-0081-z.

Levine BB. Immunochemical Mechanisms of Drug Allergy. *Annu Rev Med*. 1966;17:23-38. doi: 10.1146/annurev.me.17.020166.000323

Li L, Jick H, Jick SS. Updated study on risk of cholestatic liver disease and flucloxacillin. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2009;68(2):269-270. doi:10.1111/j.1365-2125.2009.03454.x

Lim JP, Gleeson PA. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(8):836-843. doi:10.1038/icb.2011.20

Lim K-H, Staudt LM. Toll-Like Receptor Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013;5(1):a011247-a011247. doi:10.1101/cshperspect.a011247

Ling EM, Smith T, Nguyen XD, et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *THE LANCET*. 2004;363:8.

Linneberg A, Nielsen NH, Madsen F, Dirksen A, Jørgensen T. Increasing prevalence of specific IgE to aeroallergens in an adult population: Two cross-sectional surveys 8 years apart. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*. 2000;106(2):6.

Lipinski et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. 1997 Mar 1;46(1-3):3-26. doi: 10.1016/s0169-409x(00)00129-0.

Liu H, Sun M, Liu Z, et al. KRAS-enhanced macropinocytosis and reduced FcRn-mediated recycling sensitize pancreatic cancer to albumin-conjugated drugs. *Journal of Controlled Release*. 2019;296:40-53. doi:10.1016/j.jconrel.2019.01.014

Liu X. Amorphous silica nanoparticles induce inflammation via activation of NLRP3 inflammasome and HMGB1/TLR4/MYD88/NF-kb signaling pathway in HUVEC cells. *Journal of Hazardous Materials*. 2021 ; 15;404(Pt B):124050. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124050.

Li Y, Duan J, Chai X, et al. Microarray-assisted size-effect study of amorphous silica nanoparticles on human bronchial epithelial cells. *Nanoscale*. 2019;11(47):22907-22923. doi:10.1039/C9NR07350G

Li Y. Size-dependent cytotoxicity of amorphous silica nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*. 2011 ; 25 : 1343-1352

L. Millard A, Mertes PM, Ittelet D, Villard F, Jeannesson P, Bernard J. Butyrate affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages: Butyrate impairs monocyte-derived APC function. *Clinical & Experimental Immunology*. 2002;130(2):245-255. doi:10.1046/j.0009-9104.2002.01977.x

Lucarelli M, Gatti AM, Savarino G, et al. Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles. *Eur. Cytokine Netw.*, 2004 ; 15(4): 339-46

Lucena MI, Molokhia M, Shen Y, et al. Susceptibility to Amoxicillin-Clavulanate-Induced Liver Injury Is Influenced by Multiple HLA Class I and II Alleles. *Gastroenterology*. 2011;141(1):338-347. doi:10.1053/j.gastro.2011.04.001

Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor. PNAS 2004; 101(5):5598-5603

Lundqvist M, Stigler J, Cedervall T, et al. The Evolution of the Protein Corona around Nanoparticles: A Test Study. ACS NANO. 2011;5(9):7.

Lu W, Uetrecht JP. Peroxidase-Mediated Bioactivation of Hydroxylated Metabolites of Carbamazepine and Phenytoin. Drug Metab Dispos. 2008;36(8):1624-1636. doi:10.1124/dmd.107.019554

M

Macy E. Penicillin and Beta-Lactam Allergy: Epidemiology and Diagnosis. Curr Allergy Asthma Rep. 2014;14(11):476. doi:10.1007/s11882-014-0476-y

Macy E, Poon K-Y T. Self-reported Antibiotic Allergy Incidence and Prevalence: Age and Sex Effects. The American Journal of Medicine. 2009;122(8):778.e1-778.e7. doi:10.1016/j.amjmed.2009.01.034

Magi B, Marzocchi B, Bini L, Cellesi C, Rossolini A, Pallini V. Two-dimensional electrophoresis of human serum proteins modified by ampicillin during therapeutic treatment. Electrophoresis. 1995;16(1):1190-1192. doi:10.1002/elps.11501601198

Malissen B, Bongrand P. Early T Cell Activation: Integrating Biochemical, Structural, and Biophysical Cues. Annu Rev Immunol. 2015;33(1):539-561. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112158

Mallal S et al. HLA-B*5701 Screening for Hypersensitivity to Abacavir. New Engl J Med. 2008;12.

Mallon DF, Buck A, Reece JC, Crowe SM, Cameron PU. Monocyte-derived dendritic cells as a model for the study of HIV-1 infection: Productive infection and phenotypic changes during culture in human serum. Immunol Cell Biol. 1999;77(5):442-450. doi:10.1046/j.1440-1711.1999.00853.x

Manchanda T, Hess D, Dale L, Ferguson SG, Rieder MJ. Haptenation of Sulfonamide Reactive Metabolites to Cellular Proteins. Mol Pharmacol. 2002;62(5):1011-1026. doi:10.1124/mol.62.5.1011

Manome H, Aiba S, Tagami H. Simple chemicals can induce maturation and apoptosis of dendritic cells: Chemical-induced maturation and apoptosis of DCs. *Immunology*. 1999;98(4):481-490. doi:10.1046/j.1365-2567.1999.00916.x

Mardivirin L, Descamps V, Lacroix A, Delebassée S, Ranger-Rogez S. Early effects of drugs responsible for DRESS on HHV-6 replication in vitro. *Journal of Clinical Virology*. 2009;46(3):300-302. doi:10.1016/j.jcv.2009.08.006

Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular Mechanisms of Fatal Early-Onset Autoimmunity in Mice with the T Cell-Specific Targeting of Transforming Growth Factor- β Receptor. *Immunity*. 2006;25(3):441-454. doi:10.1016/j.immuni.2006.07.012

Martin S, Delattre V, Leicht C, Weltzien H-U, Simon JC. A high frequency of allergen-specific CD8⁺ Tc1 cells is associated with the murine immune response to the contact sensitizer trinitrophenyl. *Exp Dermatol*. 2003;12(1):78-85. doi:10.1034/j.1600-0625.2003.120110.x

Martín-Serrano Á, Gonzalez-Morena JM, Barbero N, et al. Biotin-Labelled Clavulanic Acid to Identify Proteins Target for Haptentation in Serum: Implications in Allergy Studies. *Front Pharmacol*. 2020;11:594755. doi:10.3389/fphar.2020.594755

Martin SF, Esser PR, Weber FC, et al. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy* 2011 ; 66 :1152-1163

Martin SF. et al. T-cell recognition of chemicals, protein allergens and drugs: towards the development of in vitro assays. *Cell. Mol. Life Sci.* (2010) 67:4171–4184 DOI 10.1007/s00018-010-0495-3

Martin S, Merfort I, Thierse H-J. Interactions of Chemicals and Metal Ions with Proteins and Role for Immune Responses. *MRMC*. 2006;6(3):247-255. doi:10.2174/138955706776073493

Martin S, Ortmann B, Pflugfelder U, Birsner U and Weltzien H. Role of hapten-anchoring peptides in defining hapten-epitopes for MHC-restricted cytotoxic T cells. Cross-reactive TNP-determinants on different peptides. *J Immunol*. 1992; 149 (8) 2569-2575;

Matzinger P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science*. 2002;296(5566):301-305. doi:10.1126/science.1071059

Matzinger P. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annu Rev Immunol*.1994;55.

Mauri-Hellweg D, Bettens F, Mauri D, Brander C, Hunziker T, Pichler WJ. Activation of drug-specific CD4+ and CD8+ T cells in individuals allergic to sulfonamides, phenytoin and carbamazepine. *The Journal of Immunology*. 1995;155:462-472

Mayorga C, Celik G, Rouzaire P, et al. In vitro tests for drug hypersensitivity reactions: an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper. *Allergy*. 2016;71(8):1103-1134. doi:10.1111/all.12886

Mayorga C, Obispo T, Jimeno L, Blanca M, Moscoso de Prado J, Carreira K, Garcia JJ, Juarez C. Epitope mapping of β -lactam antibiotics with the use of monoclonal antibodies. 1994;97:225-234

McCormack M, Farrell JJ, Sills GJ. HLA-A*3101 and Carbamazepine-Induced Hypersensitivity Reactions in Europeans. *New Engl J Med*. 2011;10.

McGuirk P, McCann C, Mills KHG. Pathogen-specific T Regulatory 1 Cells Induced in the Respiratory Tract by a Bacterial Molecule that Stimulates Interleukin 10 Production by Dendritic Cells: A Novel Strategy for Evasion of Protective T Helper Type 1 Responses by *Bordetella pertussis*. *J. Exp. Med*. 2002;195(2):221-231

Meier Y, Cavallaro M, Roos M, et al. Incidence of drug-induced liver injury in medical inpatients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2005;61(2):135-143. doi:10.1007/s00228-004-0888-z

Meldrum K. Mechanistic insight into the impact of nanomaterials on asthma and allergic airway disease. *Part Fibre Toxicol*. 2017 Nov 21;14(1):45. doi: 10.1186/s12989-017-0228-y

Meng X, Al-Attar Z, Yaseen FS, et al. Definition of the Nature and Hapten Threshold of the β -Lactam Antigen Required for T Cell Activation In Vitro and in Patients. *Jl*. 2017;198(11):4217-4227. doi:10.4049/jimmunol.1700209

Meng X, Earnshaw CJ, Taylor A, et al. Amoxicillin and Clavulanate Form Chemically and Immunologically Distinct Multiple Haptenic Structures in Patients. *Chem Res Toxicol*. 2016;29(10):1762-1772. doi:10.1021/acs.chemrestox.6b00253

Meng X, Howarth A, Earnshaw CJ, et al. Detection of Drug Bioactivation in Vivo: Mechanism of Nevirapine–Albumin Conjugate Formation in Patients. *Chem Res Toxicol*. 2013;26(4):575-583. doi:10.1021/tx4000107

Meng X, Jenkins RE, Berry NG, et al. Direct Evidence for the Formation of Diastereoisomeric Benzylpenicilloyl Haptens from Benzylpenicillin and Benzylpenicillenic Acid in Patients. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;338(3):841-849. doi:10.1124/jpet.111.183871

Meng X, Lawrenson AS, Berry NG, et al. Abacavir Forms Novel Cross-Linking Abacavir Protein Adducts in Patients. *Chem Res Toxicol*. 2014;27(4):524-535. doi:10.1021/tx400406p

Meng X, Yerly D, Naisbitt DJ. Mechanisms leading to T-cell activation in drug hypersensitivity. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology*. 2018;18(4):317-324. doi:10.1097/ACI.0000000000000458

Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu Rev Immunol*. 2013;31(1):563-604. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950

Mertes PM, Laxenaire MC. Allergy and anaphylaxis in anaesthesia. *MINERVA ANESTESIOLOGICA*. 2004;70(5):7.

Michaelis M, Köhler N, Reinisch A, et al. Increased human cytomegalovirus replication in fibroblasts after treatment with therapeutical plasma concentrations of valproic acid. *Biochemical Pharmacology*. 2004;68(3):531-538. doi:10.1016/j.bcp.2004.04.013

Miller J et al. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nature immunology*. 2012. doi:10.1038/ni.2370

Mims JW. Epidemiology of allergic rhinitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2014 Sep;4 Suppl 2:S18-20. doi:10.1002/alr.21385

Mirakian R, Leech SC, Krishna MT, et al. Management of allergy to penicillins and other beta-lactams. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(2):300-327. doi:10.1111/cea.12468

Mittrücker H-W, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. *Arch Immunol Ther Exp*. 2014;62(6):449-458. doi:10.1007/s00005-014-0293-y

Miyabara Y, Ichinose T, Takano H, Lim H-B, Sagai M. Effects of diesel exhaust on allergic airway inflammation in mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1998;102(5):805-812. doi:10.1016/S0091-6749(98)70021-1

Mizukawa Y, Shiohara T. Nonpigmenting fixed drug eruption as a possible abortive variant of toxic epidermal necrolysis: immunohistochemical and serum cytokine analyses: Nonpigmenting FDE as a possible abortive variant of TEN. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2009;35(5):493-497. doi:10.1111/j.1365-2230.2009.03622.x

Mizukawa Y, Yamazaki Y, Teraki Y, et al. Direct Evidence for Interferon- γ Production by Effector-Memory-Type Intraepidermal T Cells Residing at an Effector Site of Immunopathology in Fixed Drug Eruption. *Am J Pathol*. 2002 Oct;161(4):1337-47. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64410-0

Moalic V. Comment est réalisé un typage HLA ? *Réanimation*. 2008;17(4):407-411. doi:10.1016/j.reaurg.2008.03.006

Monshi MM, Faulkner L, Gibson A, et al. Human leukocyte antigen (HLA)-B*57:01-restricted activation of drug-specific T cells provides the immunological basis for flucloxacillin-induced liver injury. *Hepatology*. 2013;57(2):727-739. doi:10.1002/hep.26077

Montnemery P, Nihlén U, Göran Löfdahl C, Nyberg P, Svensson Å. Prevalence of self-reported eczema in relation to living environment, socio-economic status and respiratory symptoms assessed in a questionnaire study. *BMC Dermatol*. 2003;3(1):4. doi:10.1186/1471-5945-3-4

Morgan H et al. Evaluation of in vitro Assays to Assess the Modulation of Dendritic Cells Functions by Therapeutic Antibodies and Aggregates. *Front Immunol*. 2019 Mar 28;10:601. doi: 10.3389/fimmu.2019.00601

Motosue MS, Bellolio MF, Van Houten HK, Shah ND, Campbell RL. National trends in emergency department visits and hospitalizations for food-induced anaphylaxis in US children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2018;29(5):538-544. doi:10.1111/pai.12908

Mullins RJ, Dear KBG, Tang MLK. Time trends in Australian hospital anaphylaxis admissions in 1998-1999 to 2011-2012. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;136(2):367-375. doi:10.1016/j.jaci.2015.05.009

Muranaka M et al. Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 1986 Apr;77(4):616-23. doi: 10.1016/0091-6749(86)90355-6

Murata J, Abe R, Shimizu H. Increased soluble Fas ligand levels in patients with Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis preceding skin detachment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008;122(5):992-1000. doi:10.1016/j.jaci.2008.06.013

Murphy et Stockinger. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol*. 2010;11(8):674-80. doi: 10.1038/ni.1899.

Murugadoss S et al. Toxicology of silica nanoparticles: an update. *Arch Toxicol*. 2017 Sep;91(9):2967-3010. doi: 10.1007/s00204-017-1993-y

Mysore V, Ghuloom A. A case of recurrent acute generalized exanthematous pustulosis due to beta-lactam antibiotics: a case report. *Journal of Dermatological Treatment*. 2003;14(1):54-56. doi:10.1080/09546630305544

N

Nabeshi H et al. Effect of amorphous silica nanoparticles on in vitro RANKL-induced osteoclast differentiation in murine macrophages. *Nanoscale Research Letters* 2011, 6:464

Nabhan M. et al. Growth hormone aggregates activation of human dendritic cells is controlled by Rac1 and PI3 kinase signaling pathways. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2019

Nabhan M, Legrand F-X, Le-Minh V, et al. The FcγRIIa–Syk Axis Controls Human Dendritic Cell Activation and T Cell Response Induced by Infliximab Aggregates. *J Immunol* 2020a

Nabhan M et al. Immunogenicity of Bioproducts: Cellular Models to Evaluate the Impact of Therapeutic Antibody Aggregates. *Front Immunol*. 2020b May 5;11:725. doi: 10.3389/fimmu.2020.00725

Nagata S. Apoptosis by Death Factor. *Cell*. 1997;88(3):355-365. doi:10.1016/S0092-8674(00)81874-7

Naisbitt DJ, Farrell J, Gordon SF, et al. Covalent Binding of the Nitroso Metabolite of Sulfamethoxazole Leads to Toxicity and Major Histocompatibility Complex-Restricted Antigen Presentation. *Mol Pharmacol*. 2002;62(3):628-637. doi:10.1124/mol.62.3.628

Naisbitt DJ, Hough SJ, Gill HJ, Pirmohamed M, Kitteringham NR, Park BK. Cellular disposition of sulphamethoxazole and its metabolites: implications for hypersensitivity: Sulphamethoxazole binding to cells. *British Journal of Pharmacology*. 1999;126(6):1393-1407. doi:10.1038/sj.bjp.0702453

Napierska D. The nanosilica hazard: another variable entity. *Particle and Fiber Toxicology* 2010 ; 7(39)

Napierska D, Thomassen LCJ, Rabolli V, et al. Size-Dependent Cytotoxicity of Monodisperse Silica Nanoparticles in Human Endothelial Cells. *Small*. 2009 Apr;5(7):846-53. doi: 10.1002/smll.200800461

Nattrass R, Faulkner L, Jenkins R, et al. Characterization of Flucloxacillin-specific CD8+ T-cells in a mouse model. *Clinical and Translational Allergy*. 2014;4(S3). doi:10.1186/2045-7022-4-S3-P41

Nattrass R, Faulkner L, Vocanson M, et al. Activation of Flucloxacillin-Specific CD8+ T-Cells With the Potential to Promote Hepatocyte Cytotoxicity in a Mouse Model. *Toxicol Sci*. 2015;146(1):146-156. doi:10.1093/toxsci/kfv077

Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(12):823-836. doi:10.1038/nri3084

Nel A, Diazsanchez D, Ng D, Hiura T, Saxon A. Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1998;102(4):539-554. doi:10.1016/S0091-6749(98)70269-6

Nepal MR, Kang MJ, Kim GH, Cha DH, Nam DH, Jeong TC. Identification of pre- and pro-haptens with a β -galactosidase-expressing *E. coli* culture system for skin sensitization. *Toxicology Letters*. 2019;305:81-93. doi:10.1016/j.toxlet.2019.01.015

Nettis E, Marcandrea M, Di Maggio G, Ferrannini A, Tursi A. RETROSPECTIVE ANALYSIS OF DRUG-INDUCED URTICARIA AND ANGIOEDEMA: A SURVEY OF 2287 PATIENTS. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2001;23(4):585-595. doi:10.1081/IPH-100108604

Neu HC. p-Lactam Antibiotics: Structural Relationships Affecting in Vitro Activity and Pharmacologic Properties. *Reviews of infectious diseases* 1986;8(3):237-259

Nhim C, Delluc S, Halgand F, et al. Identification and frequency of circulating CD4 + T lymphocytes specific to Benzylpenicillin in healthy donors. *Allergy*. 2013;68(7):899-905. doi:10.1111/all.12173

Nikolich-Žugich J, Slifka MK, Messaoudi I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(2):123-132. doi:10.1038/nri1292

Noirey N, Rougier N, André C, Schmitt D, Vincent C. Langerhans-like dendritic cells generated from cord blood progenitors internalize pollen allergens by macropinocytosis, and part of the molecules are processed and can activate autologous naive T lymphocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000;105(6):1194-1201. doi:10.1067/mai.2000.106545

Norcross MA, Luo S, Lu L, et al. Abacavir induces loading of novel self-peptides into HLA-B*57: 01 an autoimmune model for HLA-associated drug hypersensitivity. *AIDS*. 2012;26(11):F21-F29. doi:10.1097/QAD.0b013e328355fe8f

Nordenhäll C et al. Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum. *Eur Respir J*. 2000 Jun;15(6):1046-51. doi: 10.1034/j.1399-3003.2000.01512.x.

Nordenhäll C et al. Diesel exhaust enhances airway responsiveness in asthmatic subjects. *Eur Respir J*. 2001 May;17(5):909-15. doi: 10.1183/09031936.01.17509090.



Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives*. 2005;113(7):823-839. doi:10.1289/ehp.7339

OECD. Synthetic Amorphous Silica and Silicates. SIDS 2004

Ogese MO et al. Characterization of Drug-Specific Signaling Between Primary Human Hepatocytes and Immune Cells. *Toxicol Sci.* 2017 Jul 1;158(1):76-89. doi: 10.1093/toxsci/kfx069.

Ogese MO, Jenkins RE, Maggs JL, et al. Characterization of Peroxidases Expressed in Human Antigen Presenting Cells and Analysis of the Covalent Binding of Nitroso Sulfamethoxazole to Myeloperoxidase. *Chem Res Toxicol.* 2015;28(1):144-154. doi:10.1021/tx500458k

Olive D, le Thi S, Xerri L, Hirsch I, A. Nunès J. Rôle de CTLA-4 dans la cosignalisation négative du système immunitaire. *Med Sci (Paris).* 2011;27(10):842-849. doi:10.1051/medsci/20112710012

Olsson R et al. Liver damage from flucloxacillin, cloxacillin and dicloxacillin. *Journal of Hepatology* 1992; 15:154-161

Onakpoya IJ, Heneghan CJ, Aronson JK. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature. *BMC Med.* 2016;14(1):10. doi:10.1186/s12916-016-0553-2

Orr GA, Chrisler WB, Cassens KJ, et al. Cellular recognition and trafficking of amorphous silica nanoparticles by macrophage scavenger receptor. *Nanotoxicology*, 2011; 5(3): 296–311

Osawa J, Naito S, Aihara M, Kitamura K, Ikezawa Z, Nakajima H. Evaluation of Skin Test Reactions in Patients with Non-immediate Type Drug Eruptions. *The Journal of Dermatology.* 1990;17(4):235-239. doi:10.1111/j.1346-8138.1990.tb01631.x

Ostrov DA, Grant BJ, Pompeu YA, et al. Drug hypersensitivity caused by alteration of the MHC-presented self-peptide repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012;109(25):9959-9964. doi:10.1073/pnas.1207934109

P

Pacitto SR, Uetrecht JP, Boutros PC, Popovic M. Changes In Gene Expression Induced by Tienilic Acid and Sulfamethoxazole: Testing the Danger Hypothesis. *Journal of Immunotoxicology.* 2007;4(4):253-266. doi:10.1080/15476910701680020

Pallardy M, Bechara R. Chemical or Drug Hypersensitivity: Is the Immune System Clearing the Danger? *Toxicological Sciences*. 2017;158(1):14-22. doi:10.1093/toxsci/kfx084

Pallardy MJ, Turbica I, Biola-Vidamment A. Why the Immune System Should Be Concerned by Nanomaterials? *Front Immunol*. 2017;8:544. doi:10.3389/fimmu.2017.00544

Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1353-1362. doi:10.1038/ni1536

Pandya R et al. Diesel Exhaust and Asthma: Hypotheses and Molecular Mechanisms of Action. *Environ Health Perspect*. 2002 Feb;110 Suppl 1:103-12

Park E-J, Park K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicology Letters*. 2009 ; 184 : 18-25

Park KH, Chhowalla M, Iqbal Z, Sesti F. Single-walled Carbon Nanotubes Are a New Class of Ion Channel Blockers. *The Journal of Biological Chemistry* 2003 ; 278(50):50212-50216

Park MA, Koch CA, Klemawesch P, Joshi A, Li JT. Increased Adverse Drug Reactions to Cephalosporins in Penicillin Allergy Patients with Positive Penicillin Skin Test. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;153(3):268-273. doi:10.1159/000314367

Pateron et al. Anomalies hépatiques aux urgences. *URGENCES* 2009 ; 40 :435-445

Pearce RE, Lu W, Wang Y, Uetrecht JP, Correia MA, Leeder JS. Pathways of Carbamazepine Bioactivation in Vitro. III. The Role of Human Cytochrome P450 Enzymes in the Formation of 2,3-Dihydroxycarbamazepine. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(8):1637-1649. doi:10.1124/dmd.107.019562

Pearce RE. Pathways of Carbamazepine Bioactivation In Vitro II. The Role of Human Cytochrome P450 Enzymes in the Formation of 2-Hydroxyiminostilbene. *Drug Metab Dispos*. 2005 Dec;33(12):1819-26. doi: 10.1124/dmd.105.004861

Pénard-Morand C, Annesi-Maesano I. Maladies allergiques respiratoires et pollution atmosphérique extérieure. *Revue des Maladies Respiratoires*. 2008;25(8):1013-1026. doi:10.1016/S0761-8425(08)74417-6

Peng W, Novak N. Pathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(3):566-574. doi:10.1111/cea.12495

Perez-Inestrosa E, Suau R, Montañez MI, et al. Cephalosporin chemical reactivity and its immunological implications. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology*. 2005;5(4):323-330. doi:10.1097/01.all.0000173788.73401.69

Peters R, Kramer E, Oomen AG, et al. Presence of Nano-Sized Silica during In Vitro Digestion of Foods Containing Silica as a Food Additive. *ACS Nano*. 2012 Mar 27;6(3):2441-51. doi: 10.1021/nn204728k

Pichler WJ, Adam J, Daubner B, Gentinetta T, Keller M, Yerly D. Drug Hypersensitivity Reactions: Pathomechanism and Clinical Symptoms. *Medical Clinics of North America*. 2010;94(4):645-664. doi:10.1016/j.mcna.2010.04.003

Pichler WJ. Delayed Drug Hypersensitivity Reactions. *Ann Intern Med*. 2003;139(8):683-693

Pichler WJ, Hausmann O. Classification of Drug Hypersensitivity into Allergic, p-i, and Pseudo-Allergic Forms. *Int Arch Allergy Immunol*. 2016;171(3-4):166-179. doi:10.1159/000453265

Pichler WJ, Naisbitt DJ, Park BK. Immune pathomechanism of drug hypersensitivity reactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;127(3):S74-S81. doi:10.1016/j.jaci.2010.11.048

Pichler WJ. The p-i Concept: Pharmacological Interaction of Drugs With Immune Receptors. *World Allergy Organization Journal*. 2008;1(6):96-102. doi:10.1097/WOX.0b013e3181778282

Pinho A, Coutinho I, Gameiro A, Gouveia M, Gonçalo M. Patch testing - a valuable tool for investigating non-immediate cutaneous adverse drug reactions to antibiotics. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016;31(2):280-287. doi:10.1111/jdv.13796

Pinto Gouveia M, Gameiro A, Coutinho I, Pereira N, Cardoso JC, Gonçalo M. Overlap between maculopapular exanthema and drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms among

cutaneous adverse drug reactions in a dermatology ward. *Br J Dermatol*. 2016;175(6):1274-1283. doi:10.1111/bjd.14704

Pirmohamed M, Naisbitt DJ, Gordon F, Park BK. The danger hypothesis —potential role in idiosyncratic drug reactions. *Toxicology* 2002; 55-63

Platts-Mills TAE. The allergy epidemics: 1870-2010. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*. 2015;136(1):11.

Pontier et al. HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: role of the mucus layer. *J Pharm Sci*. 2001 Oct;90(10):1608-19. doi: 10.1002/jps.1111.

Ponvert C, Scheinmann P. Les réactions allergiques et pseudoallergiques aux antalgiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Archives de pédiatrie*. 2007 ; 14 : 507-512

Poole K. Resistance to β -lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(17). doi:10.1007/s00018-004-4060-9

Porter M, Karp M, Killedar S, et al. Diesel-Enriched Particulate Matter Functionally Activates Human Dendritic Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37(6):706-719. doi:10.1165/rcmb.2007-0199OC

Posadas SJ, Pichler WJ. Delayed drug hypersensitivity reactions? new concepts. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(7):989-999. doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02742.x

Pot LM, Scheitza SM, Coenraads P-J, Blömeke B. Penetration and haptening of p -phenylenediamine. *Contact Dermatitis*. 2013;68(4):193-207. doi:10.1111/cod.12032

Powers KW, Palazuelos M, Moudgil BM, Roberts SM. Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. *Nanotoxicology*, March 2007; 1(1): 42-51

Prechtel and Steinkasserer. CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Arch Dermatol Res*. 2007 May;299(2):59-69. doi: 10.1007/s00403-007-0743-z

Provoost S, Maes T, Willart MAM, Joos GF, Lambrecht BN, Tournoy KG. Diesel Exhaust Particles Stimulate Adaptive Immunity by Acting on Pulmonary Dendritic Cells. *J. Immunol.* 2010;184(1):426-432. doi:10.4049/jimmunol.0902564

Puig M, Ananthula S, Venna R, et al. Alterations in the HLA-B*57:01 Immunoepitope by Flucloxacillin and Immunogenicity of Drug-Haptenated Peptides. *Front Immunol.* 2021;11:629399. doi:10.3389/fimmu.2020.629399

Pullen H et al. Hypersensitivity reactions to antibacterial drugs in infectious mononucleosis. *Lancet.* 1967 Dec 2;2(7527):1176-8. doi: 10.1016/s0140-6736(67)91893-4.

Q

Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, et al. Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4. *Science.* 2011;332(6029):600-603. doi:10.1126/science.1202947

R

Rachmawati D, Bontkes HJ, Verstege MI, et al. Transition metal sensing by Toll-like receptor-4: next to nickel, cobalt and palladium are potent human dendritic cell stimulators. *Contact Dermatitis.* 2013;68(6):331-338. doi:10.1111/cod.12042

Rajiv S et al. Comparative cytotoxicity and genotoxicity of cobalt (II, III) oxide, iron (III) oxide, silicon dioxide, and aluminum oxide nanoparticles on human lymphocytes in vitro. *Hum Exp Toxicol.* 2016 Feb;35(2):170-83. doi: 10.1177/0960327115579208

Rancan F, Gao Q, Graf C, et al. Skin Penetration and Cellular Uptake of Amorphous Silica Nanoparticles with Variable Size, Surface Functionalization, and Colloidal Stability. *ACS NANO.* 2012;6(8):14.

Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, Bartemes KR, Squillace DL, Kita H. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2009;123(5):1047-1054. doi:10.1016/j.jaci.2009.02.026

Reilly TP et al. A role for bioactivation and covalent binding within epidermal keratinocytes in sulfonamide-induced cutaneous drug reactions. *J Invest Dermatol.* 2000 Jun;114(6):1164-73. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00985.x.

Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, et al. Extracellular ATP Is a Danger Signal Activating P2X7 Receptor in Lung Inflammation and Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:10.

Robin M-A, Roy ML, Descatoire V, Pessayre D. Plasma membrane cytochromes P450 as neoantigens and autoimmune targets in drug-induced hepatitis. *Journal of Hepatology*. 1997;26:23-30. doi:10.1016/S0168-8278(97)82329-X

Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(4):203-216. doi:10.1038/nri3818

Romano A, Gaeta F, Poves MFA, Valluzzi RL. Cross-Reactivity among Beta-Lactams. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2016;16(3):24. doi:10.1007/s11882-016-0594-9

Romano A, Gaeta F, Valluzzi RL, Caruso C, Rumi G, Bousquet PJ. The very limited usefulness of skin testing with penicilloyl-polylysine and the minor determinant mixture in evaluating nonimmediate reactions to penicillins. *Allergy*. 2009. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02318.x

Romano A, Valluzzi RL, Caruso C, Maggioletti M, Gaeta F. Non-immediate Cutaneous Reactions to Beta-Lactams: Approach to Diagnosis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017;17(4):23. doi:10.1007/s11882-017-0691-4

Roujeau J-C. Clinical heterogeneity of drug hypersensitivity. *Toxicology*. 2005;209(2):123-129. doi:10.1016/j.tox.2004.12.022

Roy R. ZnO nanoparticles induced adjuvant effect via toll-like receptors and Src signaling in Balb/c mice. *Toxicol Lett*. 2014 Nov 4;230(3):421-33. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.08.008

Ryan CA, Kimber I, Basketter DA, Pallardy M, Gildea LA, Gerberick GF. Dendritic cells and skin sensitization: Biological roles and uses in hazard identification. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007;221(3):384-394. doi:10.1016/j.taap.2007.03.006

Sagai M, Furuyama A. BIOLOGICAL EFFECTS OF DIESEL EXHAUST PARTICLES (DEP). III. PATHOGENESIS OF ASTHMA LIKE SYMPTOMS IN MICE. *Free Radical Biology & Medicine* 1996; 21(2):199-209

Salkind AR, Cuddy PG, Foxworth JW. Is This Patient Allergic to Penicillin? *JAMA* 2001 ; 285(19):2498-2505

Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartement :Downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 1995;182:389-400

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets : Function, Generation, and Maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004;22(1):745-763.
doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702

Salvi S, Blomberg A, Rudell B, et al. Acute Inflammatory Responses in the Airways and Peripheral Blood After Short-Term Exposure to Diesel Exhaust in Healthy Human Volunteers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Mar;159(3):702-9. doi: 10.1164/ajrccm.159.3.9709083

Samuelsen M, Nygaard UC, Løvik M. Allergy adjuvant effect of particles from wood smoke and road traffic. *Toxicology.* 2008;246(2-3):124-131. doi:10.1016/j.tox.2008.01.001

Sánchez-Gómez FJ, González-Morena JM, Vida Y, et al. Amoxicillin haptens intracellular proteins that can be transported in exosomes to target cells. *Allergy.* 2017;72(3):385-396. doi:10.1111/all.12958

Sandler RH. Anaphylactic reactions to zomepirac. *Annals of Emergency Medicine.* 1985;14(2):171-174. doi:10.1016/S0196-0644(85)81084-2

Satoh T, Akira S. Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins. *Gordon S. Microbiol Spectr.* 2016;4(6). doi:10.1128/microbiolspec.MCHD-0040-2016

Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol.* 2012;13(12):1145-1154. doi:10.1038/ni.2467

Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32(2):234-258. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x

Savage J, Johns CB. *Epidemiology and Natural History. Immunol Allergy Clin N Am.* 2015 ; 35: 45–592

Savio L et al. The P2X7 Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon? *Front Pharmacol.* 2018 Feb 6;9:52. doi: 10.3389/fphar.2018.00052

Sayes CM, Fortner JD, Guo W, et al. The Differential Cytotoxicity of Water-Soluble Fullerenes. *Nano Lett.* 2004;4(10):7.

Schaefer L. Complexity of Danger: The Diverse Nature of Damage-associated Molecular Patterns. *Journal of Biological Chemistry.* 2014;289(51):35237-35245. doi:10.1074/jbc.R114.619304

Schanen et al. Immunomodulation and T Helper TH1/TH2 Response Polarization by CeO₂ and TiO₂ Nanoparticles. *PLoS One.* 2013; 8(5): e62816. 2013 May 8. doi: 10.1371/journal.pone.0062816

Schildkopf P. Radiation combined with hyperthermia induces HSP70-dependent maturation of dendritic cells and release of pro-inflammatory cytokines by dendritic cells and macrophages. *Radiotherapy and Oncology.* 2011 ; 101 :109-115

Schluns KS, Lefrançois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(4):269-279. doi:10.1038/nri1052

Schmid et al. Acute generalized exanthematous pustulosis: role of cytotoxic T cells in pustule formation. *Am J Pathol.* 2002 Dec;161(6):2079-86. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64486-0.

Schmidt M, Raghavan B, Müller V, et al. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol.* 2010;11(9):814-819. doi:10.1038/ni.1919

Schnyder B, Burkhart C, Schnyder-Frutig K, et al. Recognition of Sulfamethoxazole and Its Reactive Metabolites by Drug-Specific CD4 + T Cells from Allergic Individuals. *J Immunol.* 2000;164(12):6647-6654. doi:10.4049/jimmunol.164.12.6647

Schnyder B, Mauri-Hellweg D, Zanni M, Bettens F, Pichler WJ. Direct, MHC-dependent Presentation of the Drug Sulfamethoxazole to Human $\alpha\beta$ T Cell Clones. *The Journal of Clinical Investigation*. 1997;100(1):136-141

Schopf E. Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome. An epidemiologic study from West Germany. *Archives of Dermatology*. 1991;127(6):839-842. doi:10.1001/archderm.127.6.839

Schutte RJ, Sun Y, Li D, Zhang F, Ostrov DA. Human Leukocyte Antigen Associations in Drug Hypersensitivity Reactions. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2018;38(4):669-677. doi:10.1016/j.cll.2018.08.002

Scornet N, Delarue-Cochin S, Azoury ME, et al. Bioinspired Design and Oriented Synthesis of Immunogenic Site-Specifically Penicilloylated Peptides. *Bioconjugate Chem*. 2016;27(11):2629-2645. doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00393

Séguin B et Uetrecht J. The danger hypothesis applied to idiosyncratic drug reactions. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2003;3:235-242

Selvaraj S, Oh J-H, Borlak J. An adverse outcome pathway for immune-mediated and allergic hepatitis: a case study with the NSAID diclofenac. *Arch Toxicol*. 2020;94(8):2733-2748. doi:10.1007/s00204-020-02767-6

Serafin W.E et Austen K.F. Mediators of immediate hypersensitivity reactions. *The new England Journal of Medicine*. 1987;317(1):30-34

Sester M, Sester U, Gärtner B, et al. Sustained High Frequencies of Specific CD4 T Cells Restricted to a Single Persistent Virus. *J VIROL*. 2002;76:8.

Shannahan JH, Brown JM. Engineered Nanomaterial Exposure and the Risk of Allergic Disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2014 Apr;14(2):95-9.

Sharma AM, Klarskov K, Uetrecht J. Nevirapine Bioactivation and Covalent Binding in the Skin. *Chem Res Toxicol*. 2013a;26(3):410-421. doi:10.1021/tx3004938

Sharma AM, Novalen M, Tanino T, Uetrecht JP. 12-OH-Nevirapine Sulfate, Formed in the Skin, Is Responsible for Nevirapine-Induced Skin Rash. *Chem Res Toxicol*. 2013b;26(5):817-827. doi:10.1021/tx400098z

Shiohara T, Kano Y. A Complex Interaction Between Drug Allergy and Viral Infection. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2007 Oct;33(1-2):124-33. doi: 10.1007/s12016-007-8010-9

Shull MM, Ormsby I, Kier AB, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 1992;359(6397):693-699. doi:10.1038/359693a0

Sicherer SH. Epidemiology of food allergy. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*. 2011;127(3):9.

Síndrome de DRESS y nefritis tubulointersticial aguda tras tratamiento con vancomicina y betalactámicos. Descripción de un caso y revisión de la literatura. *Nefrología*. 2012;(32). doi:10.3265/Nefrologia.pre2012.Jun.11455

Skoner DP. Allergic rhinitis: Definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*. 2001;108(1):7.

Smith PC, McDonagh AF, Benet LZ. Irreversible binding of zomepirac to plasma protein in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 1986;77(3):934-939. doi:10.1172/JCI112392

Solensky R, Earl HS, Gruchalla RS. Clinical approach to penicillin-allergic patients: a survey. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2000;84(3):329-333. doi:10.1016/S1081-1206(10)62782-2

Somkruea R, Eickman EE, Saokaew S, Lohitnavy M, Chaiyakunapruk N. Association of HLA-B*5801 allele and allopurinol-induced stevens johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med Genet*. 2011;12(1):118. doi:10.1186/1471-2350-12-118

Spoerl D, Nigolian H, Czarnetzki C, Harr T. Reclassifying Anaphylaxis to Neuromuscular Blocking Agents Based on the Presumed Patho-Mechanism: IgE-Mediated, Pharmacological Adverse Reaction or "Innate Hypersensitivity"? *IJMS*. 2017;18(6):1223. doi:10.3390/ijms18061223

Sprent J, Surh CD. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat Immunol.* 2011;12(6):478-484. doi:10.1038/ni.2018

Stamp LK, Chapman PT. Allopurinol hypersensitivity: Pathogenesis and prevention. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology.* 2020;34(4):101501. doi:10.1016/j.berh.2020.101501

Stamp LK, Day RO, Yun J. Allopurinol hypersensitivity: investigating the cause and minimizing the risk. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(4):235-242. doi:10.1038/nrrheum.2015.132

Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic Cell Development and Maturation. *Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology.* 1997 ; 417:1-6. doi:10.1007/978-1-4757-9966-8_1

Stockinger B. T Lymphocyte Tolerance: From Thymic Deletion to Peripheral Control Mechanisms. *Advances in Immunology.* Vol 71. Elsevier; 1998:229-265. doi:10.1016/S0065-2776(08)60404-6

Stone SF, Phillips EJ, Wiese MD, Heddle RJ, Brown SGA. Immediate-type hypersensitivity drug reactions: Immediate-type hypersensitivity drug reactions. *Br J Clin Pharmacol.* 2014;78(1):1-13. doi:10.1111/bcp.12297

Streit M. Contact dermatitis: clinics and pathology. *Acta Odontologica Scandinavica.* 2001;59(5):309-314. doi:10.1080/000163501750541183

Subbarao et al. Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ.* 2009; 181(9):181-190 DOI:10.1503/cmaj.080612

Subramanian H, Gupta K, Ali H. Roles of Mas-related G protein-coupled receptor X2 on mast cell-mediated host defense, pseudoallergic drug reactions, and chronic inflammatory diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2016;138(3):700-710. doi:10.1016/j.jaci.2016.04.051

Sullivan J R, Shear N H. The drug hypersensitivity syndrome: what is the pathogenesis? *Arch Dermatol.* 2001 Mar;137(3):357-64.

Sun B et al. Repetitive Dosing of Fumed Silica Leads to Profibrogenic Effects through Unique Structure-Activity Relationships and Biopersistence in the Lung. *ACS Nano.* 2016 Aug 23;10(8):8054-66. doi: 10.1021/acsnano.6b04143

Suzuki Y, Inagi R, Aono T, Yamanishi K, Shiohara T. Human Herpesvirus 6 Infection as a Risk Factor for the Development of Severe Drug-Induced Hypersensitivity Syndrome. *ARCH DERMATOL*. 1998;134:5.

Swain SL. Who does the polarizing ? *Current Biology*. 1995;5(8):849-851

Swamy M, Jamora C, Havran W, Hayday A. Epithelial decision makers: in search of the 'epimmunome'. *Nat. Immunol* 2010 ; 11(8):656-665 DOI: 10.1038/ni.1905

Sykes M. Immune tolerance: mechanisms and application in clinical transplantation. *J Intern Med*. 2007;262(3):288-310. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01855.x

Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus- specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *The Journal of Experimental Medicine*.2005; 5:673-685

Szebeni J. Hypersensitivity Reactions to Radiocontrast Media: The Role of Complement Activation. *Current Allergy and Asthma Reports* 2004, 4:25–30

T

Tailor A, Waddington JC, Meng X, Park BK. Mass Spectrometric and Functional Aspects of Drug–Protein Conjugation. *Chem Res Toxicol*. 2016;29(12):1912-1935. doi:10.1021/acs.chemrestox.6b00147

Tailor et al. HLA DRB1*15:01-DQB1*06:02-Restricted Human CD4+ T Cells Are Selectively Activated With Amoxicillin-Peptide Adducts. *Toxicol Sci*. 2020 Nov 1;178(1):115-126. doi: 10.1093/toxsci/kfaa128.

Takaba H, Takayanagi H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends in Immunology*. 2017;38(11):805-816. doi:10.1016/j.it.2017.07.010

Takano H, Yoshikawa T, Ichinose T, Miyabara Y, Imaoka K, Sagai M. Diesel Exhaust Particles Enhance Antigen-induced Airway Inflammation and Local Cytokine Expression in Mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Jul;156(1):36-42. doi: 10.1164/ajrccm.156.1.9610054

Tang MLK, Mullins RJ. Food allergy: is prevalence increasing? Royal Australasian College of Physicians 2016. doi:10.1111/imj.13362

Tassinari R. Hazard identification of pyrogenic synthetic amorphous silica (NM-203) after sub-chronic oral exposure in rat_ A multitarget approach. Food and Chemical Toxicology. 2020 ; 137

Thienvibul C, Vachiramon V, Chanprapaph K. Five-Year Retrospective Review of Acute Generalized Exanthematous Pustulosis. Dermatology Research and Practice. 2015;2015:1-8. doi:10.1155/2015/260928

Thierse H-J, Gamerdinger K, Junkes C, Guerreiro N, Weltzien HU. T cell receptor (TCR) interaction with haptens: metal ions as non-classical haptens. Toxicology. 2005;209(2):101-107. doi:10.1016/j.tox.2004.12.015

Thong BY-H, Tan T-C. Epidemiology and risk factors for drug allergy: Epidemiology and risk factors for drug allergy. British Journal of Clinical Pharmacology. 2010;71(5):684-700. doi:10.1111/j.1365-2125.2010.03774.x

Tian T, Yu S, Ma D. Th22 and related cytokines in inflammatory and autoimmune diseases. Expert Opinion on Therapeutic Targets. 2012;17(2):113-125. doi:10.1517/14728222.2013.736497

Tipper D.J et Strominger J.L. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1965;54:1133-1141

Tittarelli A, Navarrete M, Gleisner MA, Gebicke-Haerter P, Salazar-Onfray F. Connexin-Mediated Signaling at the Immunological Synapse. IJMS. 2020;21(10):3736. doi:10.3390/ijms21103736

Toda T, Yoshino S. Amorphous nanosilica particles block induction of oral tolerance in mice. J Immunotoxicol. 2016 Sep;13(5):723-8. doi: 10.3109/1547691X.2016.1171266

Tohyama M, Yahata Y, Yasukawa M, et al. Severe Hypersensitivity Syndrome Due to Sulfasalazine Associated With Reactivation of Human Herpesvirus 6. ARCH DERMATOL. 1998;134:5.

Torres J, Romano A, Mayorga C, et al. Diagnostic evaluation of a large group of patients with immediate allergy to penicillins: the role of skin testing. *Allergy*. 2001;56(9):850-856. doi:10.1034/j.1398-9995.2001.00089.x

Torres MJ, Adkinson NF, Caubet J-C, et al. Controversies in Drug Allergy: Beta-Lactam Hypersensitivity Testing. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2019;7(1):40-45. doi:10.1016/j.jaip.2018.07.051

Torres M, Mayorga C, Blanca M. Nonimmediate Allergic Reactions Induced by Drugs: Pathogenesis and Diagnostic Tests. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19:11.

Tournier J-N, Hellmann AQ, Drouet E, Mathieu J. Fever-like thermal conditions regulate the activation of maturing dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology* 2003; 73:493-501

Trasande L, Thurston GD. The role of air pollution in asthma and other pediatric morbidities. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005;115(4):689-699. doi:10.1016/j.jaci.2005.01.056

Trowsdale J, Knight JC. Major Histocompatibility Complex Genomics and Human Disease. *Annu Rev Genom Hum Genet*. 2013;14(1):301-323. doi:10.1146/annurev-genom-091212-153455

Turabekova M, Rasulev B, Theodore M, Jackman J, Leszczynska D, Leszczynski J. Immunotoxicity of nanoparticles: a computational study suggests that CNTs and C60 fullerenes might be recognized as pathogens by Toll-like receptors. *Nanoscale*. 2014 Apr 7;6(7):3488-95. doi: 10.1039/c3nr05772k.

Tuschl H, Kovac R, Weber E. The expression of surface markers on dendritic cells as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Toxicology in Vitro*. 2000;14(6):541-549. doi:10.1016/S0887-2333(00)00051-5

U

Uetrecht JP. New Concepts in Immunology Relevant to Idiosyncratic Drug Reactions: The "Danger Hypothesis" and Innate Immune System. *Chem Res Toxicol*. 1999;12(5):387-395. doi:10.1021/tx980249i

Uetrecht J. Role of drug metabolism for breaking tolerance and the localization of drug hypersensitivity. *Toxicology*. 2005;209(2):113-118. doi:10.1016/j.tox.2004.12.019

Uetrecht J. Screening for the potential of a drug candidate to cause idiosyncratic drug reactions. *Drug Discovery Today*. 2003;8(18):832-837. doi:10.1016/S1359-6446(03)02816-2

United States Environmental Protection Agency. Review of the Impacts of Climate Variability and Change on Aeroallergens and Their Associated Effects. 2008

V

Valeyrie-Allanore L, Lebrun-Vignes B, Bensaid B, Sassolas B, Barbaud A. Érythème pigmenté fixe : épidémiologie, physiopathologie, clinique, diagnostic différentiel et modalités de prise en charge. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*. 2015;142(11):701-706. doi:10.1016/j.annder.2015.07.010

Vallhov H, Gabrielsson S, Strømme M, Scheynius A, Garcia-Bennett AE. Mesoporous Silica Particles Induce Size Dependent Effects on Human Dendritic Cells. *Nano Lett*. 2007;7(12):7.

Vallhov H, Kupferschmidt N, Gabrielsson S, et al. Adjuvant Properties of Mesoporous Silica Particles Tune the Development of Effector T Cells. *Small*. 2012 Jul 9;8(13):2116-24. doi: 10.1002/sml.201102620.

van Bilsen JHM, Sienkiewicz-Szłapka E, Lozano-Ojalvo D, et al. Application of the adverse outcome pathway (AOP) concept to structure the available in vivo and in vitro mechanistic data for allergic sensitization to food proteins. *Clin Transl Allergy*. 2017;7(1):13. doi:10.1186/s13601-017-0152-0

van der Merwe PA, Dushek O. Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(1):47-55. doi:10.1038/nri2887

Van Kesteren P et al. Novel insights into the risk assessment of the nanomaterial synthetic amorphous silica, additive E551, in food. *Nanotoxicology*. 2015 May;9(4):442-52. doi: 10.3109/17435390.2014.940408

van Vliet et al. State-of-the-art and new options to assess T cell activation by skin sensitizers: Cosmetics Europe Workshop. *ALTEX*. 2018;35(2):179-192. doi: 10.14573/altex.1709011

Vardakas KZ, Kalimeris GD, Triarides NA, Falagas ME. An update on adverse drug reactions related to β -lactam antibiotics. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2018;17(5):499-508. doi:10.1080/14740338.2018.1462334

Varricchi G, Pecoraro A, Loffredo S, et al. Heterogeneity of Human Mast Cells With Respect to MRGPRX2 Receptor Expression and Function. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:299. doi:10.3389/fncel.2019.00299

Veerappan Ganesan AP, Eisenlohr LC. The elucidation of non-classical MHC class II antigen processing through the study of viral antigens. *Current Opinion in Virology*. 2017;22:71-76. doi:10.1016/j.coviro.2016.11.009

Venturi et al. 2008 The molecular basis for public T-cell responses? *Nat Rev Immunol*. 2008 Mar;8(3):231-8. doi: 10.1038/nri2260.

Verma A, Stellacci F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions. *Small*. 2010;(1):10.

Vermaelen K, Carro-Muino I, Lambrecht BN, Pauwels RA. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J. Exp. Med*. 2001;193(1):51-60

Viard I, Wehrli P, Bullani R, Schneider P, Holler N, Salomon D, Hunziker T, Saurat J-H, Tschopp J, French L.E. Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. *Science*. 1998 Oct 16;282(5388):490-3. doi: 10.1126/science.282.5388.490

Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. Redefining Chronic Viral Infection. *Cell*. 2009; 138:30-50

Vocanson et al. Depletion of human peripheral blood lymphocytes in CD25+ cells allows for the sensitive in vitro screening of contact allergens. *J Invest Dermatol*. 2008 Aug;128(8):2119-22. doi: 10.1038/jid.2008.15

Vocanson M, Hennino A, Chavagnac C, et al. Contribution of CD4 + and CD8 + T-cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2005;1(1):75-86. doi:10.1586/1744666X.1.1.75

Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(6):388-400. doi:10.1038/nri3839

W

Waddington JC, Meng X, Illing PT, et al. Identification of Flucloxacillin-Haptenated HLA-B*57:01 Ligands: Evidence of Antigen Processing and Presentation. *Toxicological Sciences*. 2020;177(2):454-465. doi:10.1093/toxsci/kfaa124

Walczyk D, Bombelli FB, Monopoli MP, Lynch I, Dawson KA. What the Cell “Sees” in Bionanoscience. *J Am Chem Soc*. 2010 Apr 28;132(16):5761-8. doi: 10.1021/ja910675v.

Walsh KP, Mills KHG. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends in Immunology*. 2013;34(11):521-530. doi:10.1016/j.it.2013.07.006

Wang et al. Intravenously delivered graphene nanosheets and multiwalled carbon nanotubes induce site-specific Th2 inflammatory responses via the IL-33/ST2 axis. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:1733-48. doi: 10.2147/IJN.S44211

Watanabe H, Unger M, Tuvel B, Wang B, Sauder DN. Review: Contact Hypersensitivity: The Mechanism of Immune Responses and T Cell Balance. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2002;22(4):407-412. doi:10.1089/10799900252952181

Weaver CT, Unanue ER. The costimulatory function of antigen-presenting cells. *Immunology Today*. 1990;11(2):49-54

Weaver JL, Chapdelaine JM, Descotes J, et al. Evaluation of a Lymph Node Proliferation Assay for its Ability to Detect Pharmaceuticals with Potential to Cause Immune-Mediated Drug Reactions. *Journal of Immunotoxicology*. 2005;2(1):11-20. doi:10.1080/15476910590930100

Weaver RJ, Blomme EA, Chadwick AE, et al. Managing the challenge of drug-induced liver injury: a roadmap for the development and deployment of preclinical predictive models. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(2):131-148. doi:10.1038/s41573-019-0048-x

Wei C-Y, Chung W-H, Huang H-W, Chen Y-T, Hung S-I. Direct interaction between HLA-B and carbamazepine activates T cells in patients with Stevens-Johnson syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012;129(6):1562-1569.e5. doi:10.1016/j.jaci.2011.12.990

Weiner HL. Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms. *J Clin Invest*. 2000;106(8):935-937. doi:10.1172/JCI11348

Whitaker P, Meng X, Lavergne SN, et al. Mass Spectrometric Characterization of Circulating and Functional Antigens Derived from Piperacillin in Patients with Cystic Fibrosis. *J. Allergy Clin Immunol*. 2011;127(1):200-211. doi:10.1016/j.jallergy.2010.11.006

Whitebread S, Hamon J, Bojanic D, Urban L. Keynote review: In vitro safety pharmacology profiling: an essential tool for successful drug development. *Drug Discovery Today*. 2005;10(21):1421-1433. doi:10.1016/S1359-6446(05)03632-9

White KD, Chung W-H, Hung S-I, Mallal S, Phillips EJ. Evolving models of the immunopathogenesis of T cell-mediated drug allergy: The role of host, pathogens, and drug response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;136(2):219-234. doi:10.1016/j.jaci.2015.05.050

Whritenour J, Cole S, Zhu X, Li D, Kawabata TT. Development and partial validation of a mouse model for predicting drug hypersensitivity reactions. *Journal of Immunotoxicology*. 2014;11(2):141-147. doi:10.3109/1547691X.2013.812164

Wick P, Manser P, Limbach LK, et al. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicology Letters*. 2007 ; 128 :121-131

Wing K, Bhaskaran K, Peeling L, et al. Quantification of the risk of liver injury associated with flucloxacillin: a UK population-based cohort study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;72(9):2636-2646. doi:10.1093/jac/dkx183

Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al. CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function. *Science*. 2008;322(5899):271-275. doi:10.1126/science.1160062

Winkler HC. MyD88-dependent pro-interleukin-1 β induction in dendritic cells exposed to food-grade synthetic amorphous silica. *Particle and Fiber Toxicology*. 2017 ; 14(21)

Winter M, Beer H-D, Hornung V, Krämer U, Schins RPF, Förster I. Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO₂ nanoparticles in murine dendritic cells. *Nanotoxicology*. 2011 ;5(3):326-40. doi: 10.3109/17435390.2010.506957

Wong KC, Kennedy PJ, Lee S. Clinical manifestations and outcomes in 17 cases of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Australas J Dermatol*. 1999;40(3):131-134. doi:10.1046/j.1440-0960.1999.00342.x

Woodland DL, Kohlmeier JE. Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(3):153-161. doi:10.1038/nri2496

Wright et al. CONTROLLED PROSPECTIVE STUDY OF THE EFFECT ON LIVER FUNCTION OF MULTIPLE EXPOSURES TO HALOTHANE. *The Lancet* 1975 ; 305(7911):817-820

Wuillemin N, Adam J, Fontana S, Krähenbühl S, Pichler WJ, Yerly D. HLA Haplotype Determines Hapten or p-i T Cell Reactivity to Flucloxacillin. *J. Immunol*. 2013;190(10):4956-4964. doi:10.4049/jimmunol.1202949

Wüthrich B. Epidemiology of the allergic diseases : are they really on the increase ? *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989; 90:3-10

Y

Yang M et al. Macrophages participate in local and systemic inflammation induced by amorphous silica nanoparticles through intratracheal instillation. *Int J Nanomedicine*. 2016 Nov 22;11:6217-6228. doi: 10.2147/IJN.S116492

Yan X, Xiu F, An H, Wang X, Wang J, Cao X. Fever range temperature promotes TLR4 expression and signaling in dendritic cells. *Life Sciences* 2007 ; 80 :307-313

Yao W, Ding M, Bao L, et al. Human monocyte-derived dendritic cells as an in vitro alternative model cell to evaluate the immunotoxicity of 2, 4-Dinitrochlorobenzene. *Toxicology Letters*. 2020;330:118-127. doi:10.1016/j.toxlet.2020.05.008

Yawalkar N. Drug-induced exanthems. *Toxicology*. 2005;209(2):131-134. doi:10.1016/j.tox.2004.12.023

Yawalkar N, Egli F, Hari Y, Nievergelt H, Braathen LR, Pichler WJ. Infiltration of cytotoxic T cells in drug-induced cutaneous eruptions. *Clin Exp Allergy*. 2000 Jun;30(6):847-55. doi: 10.1046/j.1365-2222.2000.00847.x

Yawalkar N, Pichler WJ. Immunohistology of drug-induced exanthema: clues to pathogenesis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2001 Aug;1(4):299-303. doi: 10.1097/01.all.0000011030.52248.1b.

Yip VLM, Meng X, Maggs JL, et al. Mass Spectrometric Characterization of Circulating Covalent Protein Adducts Derived from Epoxide Metabolites of Carbamazepine in Patients. *Chem Res Toxicol*. 2017;30(7):1419-1435. doi:10.1021/acs.chemrestox.7b00063

Yoshimoto T. The Hunt for the Source of Primary Interleukin-4: How We Discovered That Natural Killer T Cells and Basophils Determine T Helper Type 2 Cell Differentiation In Vivo. *Front Immunol*. 2018;9:716. doi:10.3389/fimmu.2018.00716

Yuan et Kaplowitz. Mechanisms of drug-induced liver injury. *Clin Liver Dis*. 2013 Nov;17(4):507-18, vii. doi: 10.1016/j.cld.2013.07.002.

Yu L, Wang L, Chen S. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010;14(11):2592-2603. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01127.x

Yun J, Cai F, Lee FJ, Pichler WJ. T-cell-mediated drug hypersensitivity: immune mechanisms and their clinical relevance. *Asia Pac Allergy*. 2016 Apr;6(2):77-89. doi: 10.5415/apallergy.2016.6.2.77

Yun J, Marcaida MJ, Eriksson KK, et al. Oxypurinol Directly and Immediately Activates the Drug-Specific T Cells via the Preferential Use of HLA-B*58:01. *J. Immunol*. 2014;192(7):2984-2993. doi:10.4049/jimmunol.1302306

Yun J, Mattsson J, Schnyder K, et al. Allopurinol hypersensitivity is primarily mediated by dose-dependent oxypurinol-specific T cell response. *Clin Exp Allergy*. 2013;43(11):1246-1255. doi:10.1111/cea.12184

Yvon M, Anglade P, Wal J-M. Binding of benzyl penicilloyl to human serum albumin Evidence for a highly reactive region at the junction of domains 1 and 2 of the albumin molecule. FEBS Letters. 1989;247(2):273-278. doi:10.1016/0014-5793(89)81351-1

Yvon M, Anglade P, Wal J-M. Identification of the binding sites of benzyl penicilloyl, the allergenic metabolite of penicillin, on the serum albumin molecule. FEBS Letters. 1990;263(2):237-240. doi:10.1016/0014-5793(90)81382-X

Yvon M, Wal J-M. Identification of lysine residue 199 of human serum albumin as a binding site for benzylpenicilloyl groups. FEBS LETTERS. 1988;239(2):4.

Z

Zambonino MA, Corzo JL, Muñoz C, et al. Diagnostic evaluation of hypersensitivity reactions to beta-lactam antibiotics in a large population of children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014;25(1):80-87. doi:10.1111/pai.12155

Zanni MP, von Greyerz S, Schnyder B, et al. HLA-restricted, processing- and metabolism-independent pathway of drug recognition by human alpha beta T lymphocytes. *J Clin Invest*. 1998b;102(8):1591-1598. doi:10.1172/JCI3544

Zanni MP, von Greyerz S, Schnyder B, Wendland T, Pichler WJ. Allele-unrestricted presentation of lidocaine by HLA-DR molecules to specific $\alpha\beta$ T cell clones. *International Immunology*. 1998a;10(4):507-515

Zarnitsyna VI, Evavold BD, Schoettle LN, Blattman JN, Antia R. Estimating the Diversity, Completeness, and Cross-Reactivity of the T Cell Repertoire. *Front Immunol*. 2013;4. doi:10.3389/fimmu.2013.00485

Zhang X, Sharma AM, Uetrecht J. Identification of 'Danger' Signals in Nevirapine-Induced Skin Rash. *Chemical Research in Toxicology*. 2013. DOI: 10.1021/tx400232s

Zhao W, An H, Zhou J, Xu H, Yu Y, Cao X. Hyperthermia differentially regulates TLR4 and TLR2-mediated innate immune response. *Immunology Letters*. 2007 ;108 :137-142

Zhu J. T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2017;10(10):a030338. doi:10.1101/cshperspect.a030338

Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. Annu Rev Immunol. 2010;28(1):445-489. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101212

Zhu R. The induction of maturation on dendritic cells by TiO₂ and Fe₃O₄-TiO₂ nanoparticles via NF-κB signaling pathway. Materials Science and Engineering 2014 :39 :305-314

Zhu X-D. Caveolae-dependent Endocytosis Is Required for Class A Macrophage Scavenger Receptor-mediated Apoptosis in Macrophages. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 2011;286(10):9.

Ziska L et al. Cities as harbingers of climate change: Common ragweed, urbanization, and public health. J ALLERGY CLIN IMMUNOL 2003 ; 111(2):290-295

Titre : Impact de l'environnement sur la réponse lymphocytaire T reconnaissant les β -lactamines : rôles dans les mécanismes allergiques

Mots clés : Bêta-lactamines, Allergie, Pénicilline, Lymphocytes, Environnement, Nanoparticules

Résumé : L'allergie aux bêta-lactamines (BL) est l'allergie médicamenteuse la plus fréquente constituant ainsi un véritable problème de santé publique. L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer l'impact de l'environnement sur le déclenchement des hypersensibilités aux BL. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à deux aspects de cet environnement : l'exposition environnementale et l'environnement à l'échelle cellulaire. Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de l'exposition environnementale aux nanoparticules de silice amorphe (aSNP), un additif alimentaire largement utilisé. Nos résultats ont permis de montrer que ces nanoparticules agissaient comme un signal de danger avec une augmentation de l'activation des cellules dendritiques (DCs) humaines caractérisée par une modulation de l'expression des molécules d'activation (CD83, CD86 et CXCR4) et la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (CXCL-8 et CXCL-12). Ces modifications phénotypiques observées sur la DC ont un impact

significatif sur la réponse lymphocytaire caractérisée par une augmentation de la prolifération des lymphocytes T (LT) ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'IL-5 par les lignées de LT reconnaissant la benzylpénicilline (BP) suggérant une orientation vers une réponse pro-allergique Th2. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'environnement cellulaire et à son impact sur l'orientation de la réponse lymphocytaire dirigée contre le médicament. Nos travaux ont permis de démontrer que la BP pouvait entrer sous sa forme libre dans les DCs et se conjuguer avec l'albumine humaine à l'intérieur des cellules. Cette hapténisation intracellulaire déclenchait l'activation d'un répertoire de LT CD8+ naïfs reconnaissant la BP.

In fine, ce travail permet une meilleure compréhension de l'impact de l'environnement sur les réponses allergiques tant au niveau environnemental qu'au niveau cellulaire.

Title : Impact of the environment on β -lactam specific T-cell responses: consequences for allergy

Keywords : Beta-lactam, Allergy, Penicillin, Lymphocytes, Environment, Nanoparticles

Abstract: Beta-lactam (BL) allergy is the most common drug allergy constituting a real public health problem. The objective of this work was to assess the impact of the environment on the onset of BL hypersensitivity. We were particularly interested in two aspects of this environment: environmental exposure and the environment at the cellular level. First, we studied the impact of environmental exposure to amorphous silica nanoparticles (aSNP), a widely used food additive. We showed that aSNP act as a danger signal with an increase in the activation of human dendritic cells (DCs) characterized by an augmentation in the expression of the activation molecules (CD83, CD86 and CXCR4) and an increased secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines (CXCL-8

and CXCL-12). Our results also showed that these phenotypic modifications had a significant impact on the T-cell response characterized by an increase in lymphocyte proliferation as well as an increase in IL-5 secretion by BP specific T-cell lines, suggesting an orientation towards a pro-allergic Th2 response. Secondly, we studied the cellular environment and its impact on drug-specific T-cells responses. Our work showed that BP could enter in its free form in DCs and bind with human albumin in DCs. This intracellular haptentation triggered CD8+ T-cell activation. In resume, this work allows a better understanding of the impact of the environment on allergic responses both at the environmental and cellular level.