



HAL
open science

Eczémas de contact aux produits chimiques : de la recherche de biomarqueurs au développement de nouvelles approches de diagnostic moléculaire

Marine-Alexia Lefevre

► To cite this version:

Marine-Alexia Lefevre. Eczémas de contact aux produits chimiques : de la recherche de biomarqueurs au développement de nouvelles approches de diagnostic moléculaire. Immunologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2022. Français. NNT : 2022LYO10238 . tel-04861156

HAL Id: tel-04861156

<https://theses.hal.science/tel-04861156v1>

Submitted on 2 Jan 2025

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

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



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

**Ecole Doctorale N° ED 340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)**

Discipline : Immunologie

Soutenue publiquement le 16/12/2022, par :
Marine-Alexia LEFEVRE

Eczémas de contact aux produits chimiques: de la recherche de biomarqueurs au développement de nouvelles approches de diagnostic moléculaire

Devant le jury composé de :

| | | |
|------------------------------------|---|-------------------------------|
| BERARD Frederic | Professeur, Université Lyon 1 | Président |
| GAUDENZIO Nicolas PALLARDY Marc | Directeur de recherche, INSERM Professeur, Université Paris-Saclay | Rapporteur Rapporteur |
| BODINIER Marie BONIFACE Katia | Directrice de recherche, INRAE Professeure, INSERM | Examinatrice Examinatrice |
| VOCANSON Marc NOSBAUM Audrey | Directeur de recherche, INSERM Professeure, Université Lyon 1 | Directeur de thèse Invitée |

N°d'ordre NNT : xxx



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° ED 340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : Biologie cellulaire
Discipline : Immunologie

Soutenue publiquement le 16/12/2022, par :
Marine-Alexia LEFEVRE

Eczémas de contact aux produits chimiques: de la recherche de biomarqueurs au développement de nouvelles approches de diagnostic moléculaire

Devant le jury composé de :

| | | |
|------------------------------------|---|-------------------------------------|
| BERARD Frederic | Professeur, Université Lyon 1 | Président |
| GAUDENZIO Nicolas PALLARDY Marc | Directeur de recherche, INSERM Professeur, Université Paris-Saclay | Rapporteur Rapporteur |
| BODINIER Marie BONIFACE Katia | Directrice de recherche, INRAE Professeure, INSERM | Examinatrice Examinatrice |
| VOCANSON Marc NOSBAUM Audrey | Directeur de recherche, INSERM Professeure, Université Lyon 1 | Directeur de thèse Membre Invité |

Université Claude Bernard - LYON 1

| | |
|---|-------------------------|
| Président de l'Université | M. Frédéric FLEURY |
| Président du Conseil Académique | M. Hamda BEN HADID |
| Vice-président du Conseil d'Administration | M. Didier REVEL |
| Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire | M. Philippe CHEVALIER |
| Vice-président de la Commission Recherche | M. Jean-François MORNEX |
| Directrice Générale des Services | Mme Dominique MARCHAND |

COMPOSANTES SANTE

| | |
|--|--|
| Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard | Doyen : M. Gilles RODE |
| Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux | Doyenne : Mme Carole BURILLON |
| UFR d'Odontologie | Doyenne : Mme. Dominique SEUX |
| Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques | Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA |
| Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation | Directeur : M. Xavier PERROT |
| Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine | Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT |

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

| | |
|---|---|
| UFR Biosciences | Directeur : Mme Kathrin GIESELER |
| Département Génie Electrique des Procédés (GEP) | Directrice: Mme Rosaria FERRIGNO |
| Département Informatique | Directeur : M. Behzad SHARIAT |
| Département Mécanique | Directeur : M. Marc BUFFAT |
| UFR Faculté des Sciences | Administrateur provisoir : M. Bruno ANDRIOLETTI |
| UFR (STAPS) | Directeur : M. Yannick VANPOULLE |
| Observatoire de Lyon | Directrice : Mme Isabelle DANIEL |
| Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1 | Directeur : M. Emmanuel PERRIN |
| Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique (CPE Lyon) | Directeur : M. Gérard PIGNAULT |
| Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1 | Directeur : M. Christophe VITON |
| Institut de Science Financière et d'Assurances | Directeur : M. Nicolas LEBOISNE |
| Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education (EPSE) | Administrateur provisoire : M. Pierre CHAREYRON |

A ma mère et Didier qui ont fait de moi la personne que je suis,
A la mémoire de mes grands-parents,
A Thomas.

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans l'équipe « Immunité de l'épiderme et allergie », au Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111, et est le fruit d'une collaboration avec les équipes cliniques de dermatologie et allergologie de Lyon Sud, St Etienne, Grenoble, Clermont-Ferrand, Bruxelles, Malmö.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Marc Vocanson, mon directeur d'équipe, mais également mon directeur de thèse, qui m'a donc fait l'honneur d'accepter de diriger mes travaux de recherche. Merci de m'avoir fait découvrir les secrets de l'immunologie à mon arrivée en master 2 et de m'avoir fait confiance et permis de continuer dans cette voie. J'espère que nous avons encore de belles années de collaboration devant nous.

J'adresse également ma profonde reconnaissance à la professeure Audrey Nosbaum, pour son soutien sans faille ces dernières années et son accompagnement aussi bien sur le plan personnel que professionnel ; ainsi qu'au Pr Nicolas pour son implication dans mes travaux et son aide précieuse, apportant toujours une vision très positive de la recherche.

Je remercie le Pr Marc Pallady et le Dr Nicolas Gaudenzio d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse.

Mes remerciements s'adressent également à la Pre Katia Boniface qui, en plus de m'avoir soutenue tout au long de ce travail au cours des comités de suivi de thèse avec le Dr Bertrand Dubois, a également accepté de siéger au sein de ce jury, et la Dre Marie Bodinier d'avoir bien voulu juger ce travail. J'adresse ma profonde gratitude au Pr Frederic Berard pour avoir accepté de présider ce jury de thèse et pour sa gentillesse et sa bienveillance qui m'ont aidée à évoluer dans mon parcours professionnel.

Un énorme merci à toute l'équipe MV/JFN, passée et actuelle, pour leur aide et leur soutien tout au long de ce travail de thèse. Merci à Vanina, Aurélie et Amandine pour leur disponibilité et leur gentillesse, et pour tous les bons moments passés ensemble. Merci à Axel pour nos discussions toujours plus enrichissantes les unes que les autres. Je n'oublie bien évidemment pas Roxane, Camille et Vijay pour leur bonne humeur. Une pensée pour Marie qui vient de rejoindre l'équipe et avec qui, je l'espère, nous allons pouvoir monter de beaux projets. Un grand merci également à mes anciens acolytes : Leo qui a décidé de poursuivre la recherche vers de nouveaux horizons, mais je ne perds toujours pas espoir de le retrouver bientôt dans

notre équipe ; et à Johanna qui n'a cessé de continuer à me soutenir et ce jusqu'à la fin (merci pour ta relecture et tes talents d'artiste !).

J'ai une pensée également pour toutes les personnes rencontrées au CIRI et tout particulièrement pour Margaux qui m'a donné quelques ficelles pour m'épanouir dans la bio-informatique (à mon humble niveau).

Mes remerciements vont aussi à toute l'équipe du service de Dermatologie et Allergologie du CHU de St Etienne, et plus particulièrement au Pr Perrot pour m'avoir accueillie dans son service ; et à ma super équipe d'infirmières sans qui je ne serais pas grand-chose...

Un grand merci également à toute l'équipe du service d'Allergologie et d'Immunologie clinique de Lyon Sud, et aux équipes cliniques de dermatologie et allergologie des CHU de Grenoble et Clermont-Ferrand, des cliniques universitaires de Louvain à Bruxelles, et à toute l'équipe de Malmö, sans qui ces travaux de thèse n'auraient jamais vu le jour.

A mes ami(e)s, Christine, Gary, Clément, Toscane, Nicolas, Laure, Tanguy, Alexandra, Sylvain, Remy, Robin, Jordi, Pauline, Hugo, Jennifer, Mathieu, Julien, Marine, Justine, Pierre, Alexandre, Océane, Cédric, Léa, Pilou et Manon... pour leur soutien et leurs encouragements. Enfin merci à Émilie pour son aide précieuse et sa relecture de dernière minute.

Et enfin, je souhaite adresser mes plus chaleureux remerciements à ma famille, à mes parents pour leur soutien indéfectible, à ma sœur, Franck, et le petit nouveau Milo, à mes grands-parents (absents ou présents) et à toute ma famille Pascal.

A Thomas, pour ta présence tout simplement....

*« Le succès n'est pas final,
L'échec n'est pas fatal,
C'est le courage de continuer qui compte. »*
Winston Churchill

Ce travail de thèse a été effectué au
Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)

INSERM U1111

Equipe « Immunité de l'épiderme et allergies »

Dirigée par le Dr. Marc Vocanson

21 Avenue Tony Garnier

69365 Lyon Cedex 07, France

Résumé du travail de thèse

Eczémas de contact aux produits chimiques : de la recherche de biomarqueurs au développement de nouvelles approches de diagnostic moléculaire

L'eczéma de contact (EC) est une dermatose inflammatoire fréquente, induite par l'exposition répétée de la peau à des produits chimiques présents dans notre environnement. La distinction entre les formes allergique (ECA) et irritante (ECI) des EC s'avère souvent difficile en pratique clinique.

Ce projet de thèse avait pour objectif premier de caractériser les signatures moléculaires des inflammations cutanées induites par l'exposition aux allergènes (haptènes) et aux irritants. Pour ce faire, nous avons conduit trois études cliniques translationnelles chez des patients suspectés d'ECA, en phase active de la maladie ou lors de la réalisation d'un bilan allergologique.

Nos travaux ont mis en évidence (i) l'existence de profils moléculaires et de voies de signalisation uniques caractérisant chaque inflammation. Nous avons aussi mis en évidence (ii) que le même profil de biomarqueurs d'allergie est exprimé à la fois dans les lésions actives d'ECA et celles induites après la pose de patch-tests lors du bilan allergologique.

Nous avons ensuite développé (iii) des méthodes de « machine learning » afin d'identifier et valider des algorithmes de diagnostic basé sur les niveaux d'expression d'un set minimum de biomarqueurs. Nous avons ainsi évalué les performances de ces combinaisons de biomarqueurs et montré que (iv) leur niveau d'expression corrèle avec l'intensité clinique des réactions ainsi que la dose d'allergène auquel l'individu est exposé. Finalement, nous avons validé leur efficacité pour (v) stratifier les patients dès la première consultation avant la réalisation du bilan allergologique, ou encore pour (vi) pour optimiser l'interprétation des résultats lors de ce bilan.

L'ensemble de ce travail démontre que l'analyse moléculaire de l'inflammation cutanée induite par les produits chimiques aide à renforcer le diagnostic clinique des EC. Ces résultats ouvrent également la voie au développement d'outils diagnostiques innovants, qui permettront de simplifier et d'améliorer à terme la prise en charge des patients.

Mots-clés : eczéma de contact – allergie – irritation – biomarqueurs – transcriptome – diagnostic – patch test – haptènes – irritants

Thesis abstract

Contact dermatitis: from biomarker discovery to the development of new molecular diagnostic approaches

Contact dermatitis (CD) is a common inflammatory skin disease induced by repeated exposure of the skin to environmental chemicals. The distinction between allergic (ACD) and irritant (ICD) forms of CD is often challenging in clinical practice.

The aim of this thesis was to characterize the molecular signatures of skin inflammation induced by exposure to contact allergens and irritants. To this end, we performed three translational clinical studies including patients suffering from CD, in the active phase of their disease or undergoing allergology workups.

Our results demonstrated (i) the existence of unique molecular profiles and signaling pathways characterizing each inflammation. We also showed that (ii) the same panel of allergy biomarkers is expressed in both active ACD lesions and relevant positive patch-test reactions.

(iii) Using machine learning approaches, we identified and validated diagnostic algorithms based on the expression level of a minimal set of biomarkers. We evaluated the performance of these biomarker combinations and showed that (iv) their expression level correlates with the intensity of the clinical reactions as well as with the dose of allergen applied to the skin; and finally, (v) their detection could allow patient stratification as early as the first consultation; and (vi) optimize the interpretation of patch-test results.

This work demonstrates that molecular analysis of chemical-induced skin inflammation could help to strengthen the clinical diagnosis of CD. These results also pave the way for the development of innovative diagnostic tools, which will simplify and refine the management of CD patients.

Keywords : contact dermatitis - allergy - irritation - biomarkers - transcriptome - diagnosis - patch test - haptens - irritants

Table des matières

| | |
|--|-----|
| REMERCIEMENTS | 7 |
| RESUME DU TRAVAIL DE THESE | 13 |
| THESIS ABSTRACT | 15 |
| TABLE DES MATIERES | 17 |
| LISTE DES TABLEAUX | 21 |
| LISTE DES FIGURES | 21 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 23 |
| INTRODUCTION | 25 |
| SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE | 29 |
| CHAPITRE 1 : LES ECZEMAS DE CONTACT INDUITS PAR LES PRODUITS CHIMIQUES | 31 |
| 1. ÉPIDEMIOLOGIE | 31 |
| 1.1 Prévalence des eczémats de contact | 31 |
| 1.2 L'eczéma de contact professionnel | 33 |
| 1.3 Les facteurs de risques et de prédisposition | 34 |
| 1.4 Évolution des tendances en matière d'allergènes | 36 |
| 2. ÉTIOLOGIE DES ECZEMAS DE CONTACT : PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES XENOBIOTIQUES | 38 |
| 2.1 Pénétration/absorption percutanée | 39 |
| 2.2 Le métabolisme cutané | 40 |
| 2.3 Les chimiques irritants | 42 |
| 2.4 Les chimiques allergisants : les haptènes | 43 |
| 2.4.1 Mécanismes physico-chimiques conduisant à la formation d'un complexe haptène-protéine | 44 |
| 2.4.1.1 Les haptènes classiques : liaisons covalentes | 44 |
| 2.4.1.2 Cas particulier des métaux : liaisons de coordination | 45 |
| 2.4.2 Les pro-haptènes | 47 |
| 2.4.3 Les pré-haptènes | 48 |
| 3. MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES | 50 |
| 3.1 L'eczéma de contact irritatif | 50 |
| 3.2 L'eczéma de contact allergique | 53 |
| 3.2.1 Activation de l'immunité innée | 53 |
| 3.2.1.1 Génération d'un milieu pro inflammatoire et rupture de tolérance | 53 |
| 3.2.1.2 L'activation de l'immunité innée par les haptènes « forts » | 55 |
| 3.2.1.3 La contribution des cellules dendritiques dans le déclenchement de la réponse adaptative | 57 |
| 3.2.2 La réponse adaptative et la résolution de l'inflammation : le rôle clé des cellules T (article de synthèse) .. | 59 |
| 4. DIAGNOSTIC | 88 |
| 4.1 Présentation clinique | 88 |
| 4.2 Interrogatoire et évaluation de l'exposition environnementale | 90 |
| 4.3 Les tests cutanés | 91 |
| 4.3.1 Tests épicutanés ou patch tests | 91 |
| 4.3.2 Sélection des substances à tester | 94 |
| 4.3.3 Les tests d'usages : le test ouvert d'application répétée (ROAT test) | 96 |
| 4.3.4 Pertinence des tests et diagnostic final | 97 |
| 4.4 Examens complémentaires | 98 |
| 5. PRISE EN CHARGE | 100 |
| 5.1 Éviction des facteurs de contact : pilier de la prise en charge des ECA | 100 |
| 5.2 Différentes thérapeutiques | 101 |
| 5.2.1 Les traitements topiques | 102 |
| 5.2.1.1 Les émoullients | 102 |
| 5.2.1.2 Les crèmes barrière | 102 |
| 5.2.1.3 Les dermocorticoïdes | 103 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 5.2.1.4 | Les immunomodulateurs topiques | 104 |
| 5.2.2 | Les traitements systémiques..... | 104 |
| 5.2.2.1 | Les corticostéroïdes | 105 |
| 5.2.2.2 | La photothérapie | 105 |
| 5.2.2.3 | Les traitements immunomodulateurs | 105 |
| 5.2.2.4 | Les biothérapies et les nouvelles petites molécules..... | 106 |
| 5.3 | Éducation des patients..... | 107 |
| 5.4 | Évolution de la pathologie..... | 108 |
| 5.5 | Prévention | 109 |
| 5.6 | Qualité de vie et impact professionnel..... | 110 |

CHAPITRE 2 : NOUVELLES APPROCHES DIAGNOSTIQUES DANS LES DERMATOSES INFLAMMATOIRES..... 113

| | | |
|---------|---|-----|
| 1. | RECHERCHE DE BIOMARQUEURS COMME PLATEFORME DE NOUVEAUX TESTS DIAGNOSTIQUES | 114 |
| 1.1 | Définition d'un biomarqueur | 114 |
| 1.2 | Différents types de biomarqueurs | 115 |
| 1.3 | Complexité et intérêt du développement d'un biomarqueur | 117 |
| 1.3.1 | Caractéristiques idéales d'un biomarqueur | 117 |
| 1.3.2 | Découverte, développement et validation des biomarqueurs..... | 118 |
| 1.3.3 | Le concept de médecine de précision | 120 |
| 1.4 | L'apport des nouvelles technologies d'approche globale : l'ère de l' « omique » et de la biologie systémique | 121 |
| 1.4.1 | Les différents types de données « omiques » | 122 |
| 1.4.1.1 | La génomique | 122 |
| 1.4.1.2 | L'épigénomique | 123 |
| 1.4.1.3 | La transcriptomique..... | 124 |
| 1.4.1.4 | La protéomique | 125 |
| 1.4.1.5 | La métabolomique | 126 |
| 1.4.1.6 | La microbiomique | 127 |
| 1.4.2 | Le concept de biologie systémique ou intégrative | 127 |
| 1.4.3 | L'analyse statistique des données transcriptomiques..... | 129 |
| 1.4.3.1 | Visualisation des données..... | 129 |
| 1.4.3.2 | Détection de gènes différentiellement exprimés | 130 |
| 1.4.3.3 | Clustering..... | 131 |
| 1.4.3.4 | Caractérisation biologique..... | 132 |
| 1.4.3.5 | L'apprentissage automatisé pour l'identification et la validation de biomarqueurs pertinents .. | 133 |
| 2. | PLACE DES BIOMARQUEURS DANS LES DERMATOSES INFLAMMATOIRES | 137 |
| 2.1 | Exemple de la dermatite atopique et du psoriasis | 137 |
| 2.1.1 | Méthodes d'identification de biomarqueurs | 138 |
| 2.1.2 | Biomarqueurs potentiels et champs d'application | 141 |
| 2.1.2.1 | Biomarqueurs pour prédire le risque de survenue et l'évolution de la maladie (biomarqueurs pronostiques)..... | 142 |
| 2.1.2.2 | Évaluation de la sévérité de la maladie | 143 |
| 2.1.2.3 | Caractérisation d'endotypes dans la DA | 144 |
| 2.1.2.4 | Développement de nouveaux traitements et évaluation/prédiction de la réponse thérapeutique .. | 146 |
| 2.1.2.5 | L'identification de biomarqueurs pour le diagnostic différentiel entre DA et psoriasis..... | 147 |
| 2.2 | Vers l'identification de biomarqueurs dans les eczémas de contact | 151 |
| 2.2.1 | Analyses sur coupes histologiques | 151 |
| 2.2.2 | Imagerie <i>in vivo</i> | 152 |
| 2.2.3 | Étude de la barrière épidermique par des approches peu invasives | 153 |
| 2.2.4 | Biomarqueurs sériques..... | 154 |
| 2.2.5 | Caractérisation des cellules T circulantes spécifiques d'allergènes | 155 |
| 2.2.6 | L'apport de la biologie moléculaire dans la recherche de biomarqueurs cutanés des EC | 158 |
| 2.2.6.1 | Caractérisation des profils moléculaires de l'inflammation cutanée allergique et irritante à partir de modèles murins | 158 |
| 2.2.6.2 | Études transcriptomiques chez l'homme à partir du modèle des patch tests | 159 |
| 2.2.6.3 | Signatures moléculaires des lésions cliniques d'EC | 161 |
| 2.2.6.4 | Impact du type de chimiques et des dermatoses associées sur l'identification des biomarqueurs des EC | 162 |
| 2.2.7 | Analyses protéomiques | 163 |

CONCLUSION DE LA SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE 165

| | |
|---|------------|
| TRAVAUX PERSONNELS DE RECHERCHE | 167 |
| ARTICLE 1 : UNIQUE MOLECULAR SIGNATURES TYPIFY SKIN INFLAMMATION INDUCED BY CHEMICAL ALLERGENS AND IRRITANTS | 169 |
| ARTICLE 2 : GENE PROFILING REVEALS A CONTACT ALLERGY SIGNATURE IN MOST POSITIVE AMERCHOL L-101 PATCH-TEST REACTIONS | 205 |
| ARTICLE 3 : DETECTION OF SKIN ALLERGY BIOMARKERS FOR POINT OF CARE DIAGNOSIS OF CONTACT DERMATITIS | 223 |
| DISCUSSION & PERSPECTIVES | 251 |
| 1. VERS LE DEVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE DE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DE L'ECA | 255 |
| 1.1 <i>Quels avantages et inconvénients dans le choix du modèle clinique pour l'identification de biomarqueurs des EC ?</i> | 255 |
| 1.2 <i>Quels sont les verrous technologiques à lever pour le développement d'un test diagnostique dans les EC ?</i> | 258 |
| 1.3 <i>Quelles perspectives pour la validation clinique des biomarqueurs ?</i> | 261 |
| 2. UTILITE DU DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DE L'ECA POUR UNE MEILLEURE PRISE EN CHARGE DES PATIENTS..... | 262 |
| 2.1 <i>Un diagnostic de précision rapide sur lésions cliniques</i> | 263 |
| 2.2 <i>Aide à l'interprétation des tests épicutanés</i> | 264 |
| 2.3 <i>De la précision diagnostique à la précision étiologique ?</i> | 265 |
| 2.4 <i>Y a-t-il un intérêt à développer des biomarqueurs « compagnons » dans les EC ?</i> | 266 |
| 3. VERS UNE MEILLEURE CONNAISSANCE DES MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LES EC | 267 |
| 3.1 <i>Que nous apporte l'analyse fonctionnelle des données sur la compréhension de la physiopathologie ?</i> | 268 |
| 3.2 <i>L'intérêt des études mécanistiques : le chaînon manquant vers une médecine personnalisée ?</i> 269 | |
| CONCLUSION | 271 |
| VALORISATION SCIENTIFIQUE | 277 |
| ANNEXES | 281 |
| ANNEXE 1 : REVUE "ROLE OF TISSUE-RESIDENT MEMORY T CELLS IN THE PATHOPHYSIOLOGY OF ALLERGIC CONTACT DERMATITIS" | 283 |
| ANNEXE 2 : REVUE « MEDECINE PERSONNALISEE DANS LA DERMATITE ATOPIQUE » | 291 |
| ANNEXE 3 : ARTICLE "GPR183 PROMOTES THE REACTIVATION OF HAPTEN SPECIFIC CD8+ T CELLS IN ALLERGIC CONTACT DERMATITIS" | 299 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 341 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| TABLEAU 1. TOP 10 DES ALLERGENES LES PLUS FREQUENTS DANS LES POPULATIONS PEDIATRIQUE, ADULTE ET LES ECZEMAS DE CONTACT PROFESSIONNEL..... | 33 |
| TABLEAU 2. CLASSIFICATION DE CHIMIQUES SENSIBILISANTS SELON LEUR POTENTIEL DE SENSIBILISATION CHEZ L'HOMME..... | 43 |
| TABLEAU 3. ALLERGENES DE LA BATTERIE STANDARD EUROPEENNE..... | 95 |
| TABLEAU 4. DEFINITION DES BIOMARQUEURS SELON LE NIH. | 115 |
| TABLEAU 5. PRINCIPAUX BIOMARQUEURS ASSOCIES A L'EVOLUTION DU PSORIASIS. | 142 |

Liste des figures

| | |
|--|-----|
| FIGURE 1. ÉVOLUTION DE LA PREVALENCE DE L'ALLERGIE DE CONTACT AU NICKEL DANS LA POPULATION DANOISE A LA SUITE DE LA MISE EN PLACE DE LA DIRECTIVE EUROPEENNE..... | 37 |
| FIGURE 2. CLASSIFICATION ET ETIQUETAGE SELON LE REGLEMENT CLP (« CLASSIFICATION, LABELLING, PACKAGING ») POUR LES EFFETS INDESIRABLES CUTANES DES XENOTBIOTIQUES | 39 |
| FIGURE 3. PROCESSUS DE DETOXIFICATION DES XENOBIOTIQUES AU NIVEAU CUTANE..... | 40 |
| FIGURE 4. PRINCIPAUX ACIDES AMINES NUCLEOPHILES | 44 |
| FIGURE 5. FORMATION DE LIAISONS COVALENTES PAR REACTION ELECTROPHILE-NUCLEOPHILE ET RADICALAIRE..... | 45 |
| FIGURE 6. EXEMPLES DE LIAISONS DE COORDINATION EFFECTUEES PAR LES METAUX. | 46 |
| FIGURE 7. L'ACTIVATION DES DIFFERENTS TYPES D'HAPTENES. | 47 |
| FIGURE 8. METABOLISME DE L'ALDEHYDE CINNAMIQUE ET DE L'ALCOOL CINNAMIQUE. | 48 |
| FIGURE 9. STRUCTURES CHIMIQUES DU LINALOL, DU LIMONENE ET DE LEURS HYDROPEROXYDES RESPECTIFS PROVOQUANT UNE ALLERGIE DE CONTACT..... | 49 |
| FIGURE 10. OXYDATION DE LA PARAPHENYLENEDIAMINE EN BENZOQUINONE DIIMINE, PUIS HYDROLYSE EN BENZOQUINONE. | 49 |
| FIGURE 11. SCHEMA RECAPITULATIF DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ECI | 52 |
| FIGURE 12. FACTEURS IMPLIQUES DANS LA RUPTURE DE TOLERANCE CONDUISANT A UN ECA | 54 |
| FIGURE 13. REPOSE IMMUNITAIRE INNEE INDUITE PAR LES HAPTENES..... | 55 |
| FIGURE 14. SCHEMA RECAPITULATIF DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ECA | 87 |
| FIGURE 15. LESIONS CLINIQUES D'ECZEMAS DE CONTACT | 89 |
| FIGURE 16. LES PATCH TESTS | 92 |
| FIGURE 17. ÉCHELLE D'ÉVALUATION DE L'ICDRG POUR LA LECTURE DES TESTS EPICUTANES | 93 |
| FIGURE 18. PROCEDURE DIAGNOSTIQUE ACTUELLE DES ECZEMAS DE CONTACT..... | 98 |
| FIGURE 19. COUPES HISTOLOGIQUES DE PEAU D'ECA ET D'ECI (COLORATION HEMATOXYLINE ET EOSINE)... | 99 |
| FIGURE 20. LES DIFFERENTES ETAPES DE DEVELOPPEMENT DES BIOMARQUEURS | 119 |
| FIGURE 21. LES DIFFERENTES TECHNOLOGIES « OMIQUES » | 122 |

| | |
|---|------------|
| FIGURE 22. ILLUSTRATION DES PUCES A ADN (MICROARRAYS)..... | 125 |
| FIGURE 23. L'INTEGRATION DES DONNEES « OMIQUES » : CONCEPT DE LA BIOLOGIE SYSTEMIQUE | 128 |
| FIGURE 24. ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES | 130 |
| FIGURE 25. VISUALISATION DES DONNEES SUR UNE HEATMAP | 131 |
| FIGURE 26. METHODES DE CLASSIFICATION NON SUPERVISEE..... | 132 |
| FIGURE 27. PRINCIPE DES « RANDOM FOREST » (OU FORETS ALEATOIRES) | 136 |
| FIGURE 28. METHODE DU TAPE-STRIPPING | 140 |
| FIGURE 29. BIOMARQUEURS POTENTIELS DANS LA DA, EN PEAU SAIN, EN PEAU LESEE ET DANS LE SANG.141 | |
| FIGURE 30. ENDOTYPES ASSOCIES A DIFFERENTS PHENOTYPES CLINIQUES DE DA. | 145 |
| FIGURE 31. UTILITE CLINIQUE DES BIOMARQUEURS DANS LA DERMATITE ATOPIQUE ET LE PSORIASIS | 150 |
| FIGURE 32. PRINCIPE DU TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOCYTAIRE..... | 156 |
| FIGURE 33. SENSIBILITE DE DETECTION DES BIOMARQUEURS EN FONCTION DES TAILLES DE BIOPSIES..... | 258 |
| FIGURE 34. DISPOSITIF DE MICROBIOPSIE CUTANEE | 259 |
| FIGURE 35. LES DIFFERENTES ETAPES AYANT CONDUIT A L'IDENTIFICATION ET LA VALIDATION DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS MOLECULAIRES POUR LE DIAGNOSTIC DES ECZEMAS DE CONTACT (SCHEMA DE SYNTHESE) | 275 |

Liste des abréviations

Principales abréviations utilisées dans le manuscrit en français. Pour les travaux en anglais, les abréviations sont rapportées dans chaque article.

ACP : analyse en composantes principales

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AMM : autorisation de mise sur le marché

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine-triphosphate

AUC : *area under the curve* (aire sous la courbe)

BSE : batterie standard européenne

CCL : *C-C Motif Chemokine Ligand*

CCR : *C-C Motif Chemokine Receptor*

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CXCL : *C-X-C Motif Chemokine Ligand*

CXCR : *C-X-C Motif Chemokine Receptor*

DA : dermatite atopique

DAMP : *damage associated molecular pattern*

DC : *cellule dendritique*

DNCB : 2,4-Dinitrochlorobenzene

DNFB : 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzène

EC : eczéma de contact

ECA : eczéma de contact allergique

ECI : eczéma de contact irritant

ECP : *eosinophil cationic protein* (protéine cationique des éosinophiles)

ELISA : *enzyme-linked immunoassay sorbent*

ESSCA : *European Surveillance System on Contact Allergies*

FLG : filaggrine

GM-CSF : *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GWAS : *genome-wide association study*

HEMA : méthacrylate d'hydroxyéthyle

ICDRG : *International Contact Dermatitis Research Group*

IDT : indice de texture dermique

IFN- γ : interféron gamma

IL- : interleukine

LC : cellule de langerhans

LC-OCT : *Line-field confocal optical coherence tomography* (tomographie par cohérence optique confocale à champ linéaire)

LT : lymphocyte T

LTreg : lymphocyte T régulateur

NACDRG : *North American Contact Dermatitis Group*

NF- κ B : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NGS : *next generation sequencing*

NMF : *natural moisturizing factor* (facteur d'hydratation naturel)

OCT : *optical coherence tomography* (tomographie par cohérence optique)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PPD : paraphénylènediamine

PRR : *pattern recognition receptor*

qRT-PCR : *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*

RCM : *reflectance confocal microscopy* (microscopie confocale à réflectance)

ROAT : *repeated open application test* (test ouvert d'application répétée)

ROC : *receiver operating characteristic*

ROS : *reactive oxygen species* (espèces réactives de l'oxygène)

SAMS : *stress associated molecular pattern*

SLS : sodium lauryl sulfate

TCR : *T cell receptor* (récepteur des lymphocytes T)

TLR : *toll like receptor*

TNFA : *tumor necrosis factor alpha*

TSLP : *thymic stromal lymphopoietin*

TTL : test de transformation lymphocytaire

UE : Union Européenne

UPR : *unfolded protein response*

Introduction

L'eczéma de contact (EC), encore appelé dermatite de contact, est l'une des dermatoses inflammatoires les plus fréquentes avec la dermatite atopique et le psoriasis (Diepgen et al., 2016; Svensson et al., 2018). L'EC occupe la première place parmi les maladies dermatologiques professionnelles dans de nombreux pays européens (Ring, 2017), et représente un enjeu majeur de santé publique.

Cliniquement, l'EC se caractérise par des rougeurs (érythème), un gonflement de la peau (œdème), des vésicules, des suintements, ainsi qu'un épaissement cutané (lichénification) et des croûtes dans les formes chroniques. Il est associé à des démangeaisons (prurit) intenses, ayant un fort impact sur la qualité de vie des patients.

Cette pathologie est induite à la suite d'un contact répété des individus avec des substances exogènes présentes dans l'environnement, et comprend différentes formes : (i) l'EC allergique (ECA), (ii) irritatif (ECI), ainsi que (iii) leur pendant photoallergique et photoirritatif (ou phototoxique), et (iv) la dermatite de contact aux protéines (Scheinman et al., 2021). Chaque type de dermatite de contact se caractérise par des mécanismes immunologiques différents et/ou des expositions distinctes, et différents sous-types d'EC peuvent co-exister. La prise en charge de l'EC repose sur l'éducation du patient, les stratégies d'éviction des substances responsables des lésions et l'utilisation de traitements topiques ou systémiques dans les cas sévères ou récalcitrants.

Les formes les plus courantes d'EC comprennent les ECA et ECI causés par l'exposition à des produits chimiques non protéiques (appelés aussi xénobiotiques) (Nosbaum et al., 2009). Les ECI représentent 80% des cas et sont induits par les propriétés pro-inflammatoires/toxiques des produits chimiques déclenchant l'activation de l'immunité innée. Ils peuvent être causés par une exposition aiguë à des substances corrosives comme les acides et les bases, entraînant une nécrose cellulaire intense et une perturbation majeure de la barrière cutanée, ou par une exposition chronique à des irritants faibles comme les détergents. Dans les deux cas, la réaction inflammatoire est initiée par les cellules cutanées (kératinocytes) lésées libérant des « signaux de danger » (cytokines, chimiokines, médiateurs de stress oxydant...), ceci entraînant l'activation du système immunitaire.

L'ECA quant à lui est caractérisé par une réponse d'hypersensibilité retardée de type IV induite par l'activation et le recrutement de lymphocytes T (effecteurs et mémoires) spécifiques d'allergène chez des individus préalablement sensibilisés (Vocanson et al., 2009). En effet, en plus d'être doués de propriétés irritantes, certains xénobiotiques de bas poids moléculaires possèdent (ou acquièrent après transformation) une nature chimique très réactive qui leur

permet de fixer des protéines du soi, créant alors de nouveaux déterminants antigéniques reconnus par le système immunitaire adaptatif. Ces molécules chimiques, nommés haptènes, peuvent être d'origine très diverse : métaux, parfums, colorants, caoutchouc, conservateurs, médicaments...

Bien que ces deux types d'EC diffèrent par les mécanismes immunologiques impliqués, leur présentation clinique et histologique est très similaire. Le diagnostic différentiel entre ECI et ECA est donc délicat à établir, mais il est crucial pour le patient. En effet, l'ECA, contrairement à l'ECI, implique des mécanismes de mémoire immunologique (Gamradt et al., 2019) et persiste donc à vie. De ce fait, une erreur diagnostique peut avoir des conséquences majeures en termes de restriction des activités quotidiennes ou même d'emploi pour le patient (Lysdal et al., 2011). Le processus diagnostique repose sur l'examen clinique, l'évaluation approfondie de l'exposition environnementale, et les tests épicutanés (patch tests) qui constituent le gold standard pour discriminer les différents sous-types d'EC (Johansen et al., 2015). Les patch-tests consistent à reproduire expérimentalement chez l'homme une réaction d'ECA à l'aide d'une batterie d'allergènes de référence appliquée sur la peau saine des patients. Ils permettent ainsi d'identifier la molécule responsable des lésions. Bien qu'utilisée depuis plus d'un siècle, cette méthode diagnostique présente un certain nombre d'écueils, tels qu'un (i) accès limité aux centres experts réalisant ces tests, (ii) des problèmes de spécificité/sensibilité des résultats, avec des résultats faux positifs du fait du pouvoir irritant de certains allergènes (Bennike et al., 2019a; Brasch et al., 1994a; Dittmar & Schuttelaar, 2019a), et (iii) un coût élevé pour les systèmes de santé.

Il existe donc aujourd'hui un véritable intérêt à développer de nouvelles approches, basées sur la compréhension des mécanismes immunitaires impliqués dans les EC, afin d'améliorer la procédure actuelle de diagnostic, et ainsi ouvrir la voie à une prise en charge personnalisée de ces pathologies. L'identification de biomarqueurs robustes pour discriminer les différents sous-types d'EC est donc un pré requis pour atteindre cet objectif.

Les progrès technologiques récents, en particulier le développement d'approches globales sans a priori telles que les technologies « omiques » (regroupant notamment la génomique, la transcriptomique ou la protéomique) ont permis l'identification de nouveaux biomarqueurs moléculaires. Ces nouveaux outils ont profondément modifié la prise en charge des patients notamment dans le domaine de l'oncologie mais également en dermatologie inflammatoire. Le psoriasis et la dermatite atopique sont deux exemples pour lesquels l'approche « omique » a conduit à une caractérisation moléculaire de plus en plus précise des mécanismes immunitaires sous-tendant ces pathologies, avec la mise en évidence d'endotypes distincts (Bieber et al., 2017a). Cette révolution dans la compréhension de la pathogénie et l'hétérogénéité de ces maladies se sont traduites par l'émergence de nouveaux

traitements ciblant des voies immunologiques spécifiques, à la base de la médecine de précision. Outre le ciblage thérapeutique, certains biomarqueurs ont également démontré leur intérêt dans la prédiction de l'apparition de ces maladies ou des comorbidités associées, l'évaluation de leur sévérité et de la réponse thérapeutique. Par ailleurs, l'utilisation d'outils de bio-informatique puissants, basés sur des algorithmes de classification, a permis l'identification de biomarqueurs diagnostiques spécifiques de ces différentes dermatoses inflammatoires apportant une aide précieuse en termes de diagnostic différentiel et de certitude (Quaranta, Knapp, et al., 2014).

A l'inverse du psoriasis et de la dermatite atopique, la recherche de biomarqueurs dans les EC n'en est qu'à ses balbutiements. Plusieurs auteurs ont exploré les profils moléculaires induits par des allergènes chimiques dans la peau humaine, identifiant ainsi des voies inflammatoires distinguant les ECA du psoriasis ou de la dermatite atopique par exemple. Néanmoins, très peu d'études se sont spécifiquement intéressées à la comparaison des réactions cutanées induites par différents produits chimiques irritants et allergènes, ainsi que des différentes intensités de réactions cliniques, afin d'identifier des biomarqueurs suffisamment robustes permettant de discriminer ECA d'ECI tout en tenant compte de la variabilité des contextes cliniques.

L'objectif de ce travail de thèse a donc été de caractériser les signatures moléculaires des inflammations cutanées induites par l'exposition aux haptènes et aux irritants afin d'identifier et valider des biomarqueurs diagnostiques des ECA.

Pour cela, nous avons tout d'abord conduit une analyse transcriptomique exploratoire à partir de lésions d'ECA et ECI induites expérimentalement en utilisant le modèle du patch test afin de comparer et étudier les réponses moléculaires induites par différents produits chimiques aux propriétés physico-chimiques distinctes dans le but d'identifier des biomarqueurs cutanés des ECA et ECI.

Dans un second temps, nous avons essayé de répondre à un certain nombre de questions émanant des résultats de notre précédente étude : 1) existe-t-il une corrélation entre les réponses moléculaires et certains paramètres cliniques spécifiques ? 2) les mêmes biomarqueurs sont-ils retrouvés dans les lésions actives d'EC ? 3) l'expression des biomarqueurs sélectionnés est-elle prédictive du diagnostic des patients ? 4) et pourrait-elle permettre de discriminer les résultats de patch test faussement positif de vrai positif ? L'objectif étant de valider cliniquement les biomarqueurs identifiés préalablement.

Au travers de ces travaux, nous avons montré que les réponses inflammatoires cutanées allergique et irritative étaient caractérisées par des signatures moléculaires distinctes, associées à des voies de signalisation spécifiques. En outre, nous avons observé que les

réponses moléculaires corrélient avec l'intensité clinique des réactions et la dose de produit chimique appliquée. Par une approche d'apprentissage automatisée, nous avons identifié différentes combinaisons minimales de biomarqueurs permettant de discriminer les inflammations induites par les allergènes et les irritants avec une excellente sensibilité et spécificité. Nous avons également montré que le même panel de biomarqueurs d'allergie est exprimé à la fois dans les lésions actives d'ECA et dans les réactions positives et pertinentes au patch test. De façon très intéressante, les biomarqueurs sélectionnés semblent prédictifs du diagnostic des patients et pourraient permettre d'identifier les réactions de patch test faussement positives.

Ces résultats ouvrent ainsi la voie au développement de nouvelles approches de diagnostic moléculaire afin de renforcer la prise en charge des EC.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les eczémas de contact induits par les produits chimiques

Dans cette synthèse bibliographique nous traiterons uniquement des deux formes les plus communes d'eczéma de contact : les ECA et ECI, et aborderons les aspects épidémiologiques, la nature des chimiques responsables des réactions cutanées, les mécanismes physiopathologiques, le processus diagnostique et la prise en charge de ces pathologies.

Par ailleurs, il est important de spécifier en introduction la distinction entre ECA et allergie de contact. Le terme "allergie de contact" désigne un état de réponse altérée du système immunitaire à un produit chimique spécifique, se traduisant par une réaction positive au test épicutané, mais qui n'est pas synonyme de maladie : une certaine proportion de personnes atteintes d'allergie de contact ne développera jamais de symptômes cliniques d'ECA.

1. Épidémiologie

1.1 Prévalence des eczémas de contact

L'eczéma de contact irritatif est la forme la plus courante des eczémas de contact. Il représente **80% des cas** (Sasseville, 2008) et est typiquement causé par l'effet cumulatif d'irritants faibles tels que l'eau ou le savon. Les autres irritants les plus fréquemment en cause sont les agents dégraissants, les détergents, les cosmétiques, la poussière, les aliments et les solvants (Bains et al., 2019).

Concernant l'eczéma de contact allergique, la plupart des études épidémiologiques ont été effectuées à partir de populations pré-sectionnées, adressées en centre spécialisé pour la réalisation de tests épicutanés. De plus, pour la majorité d'entre elles, les résultats statistiques se basent principalement sur la positivité des tests et ne prennent pas toujours en compte la pertinence clinique de ces derniers. Il est donc difficile d'estimer l'incidence et la prévalence exactes de l'ECA dans la population générale. Par ailleurs, les résultats divergent fortement en fonction des études.

Le North American Contact Dermatitis Group (NACDG) a rapporté une prévalence de 65,4% d'allergie de contact (au moins un test positif) parmi 4 947 patients ayant été adressés pour tests épicutanés en 2017 et 2018, et un diagnostic final d'ECA a été posé chez 50,4 % d'entre eux (DeKoven et al., 2021). Diepgen et ses collaborateurs ont quant à eux mené une étude incluant 3 119 sujets sélectionnés au hasard parmi 5 pays européens et ont retrouvé

une **prévalence de 27% d'allergie de contact** à au moins un allergène de la batterie standard européenne. Par ailleurs, **un diagnostic d'ECA n'a été retenu que chez 8,2% des sujets** en se basant sur la présence d'un test cutané positif, une histoire clinique compatible et une histoire d'exposition à l'allergène en question (Diepgen et al., 2016). Une méta-analyse récente portant sur 20 107 personnes issues de la population générale a retrouvé une prévalence similaire en termes d'allergie de contact avec 27% de sujets ayant présenté au moins un patch positif pour un allergène de la batterie standard européenne (BSE), avec une **prévalence plus élevée chez les femmes que chez les hommes** (27,9% vs 13,2% respectivement) (Alinaghi et al., 2019). Cette analyse regroupait 22 études réalisées en Europe, 2 en Amérique du Nord et 2 en Asie et la prévalence d'allergie de contact parmi ces 3 continents était comparable. Malheureusement, aucune étude menée en Afrique ou en Amérique du Sud n'a été référencée.

En ce qui concerne la population pédiatrique, la prévalence de l'ECA a longtemps été sous-estimée du fait de la sous-utilisation des tests épicutanés et du manque de collecte des données dans cette population. Cependant, l'ECA chez les enfants est de plus en plus reconnu et des études récentes ont révélé des **taux de réactions positives aux tests épicutanés variant de 36 à 62%** chez les patients testés, avec une proportion de réactions pertinentes plus élevée que dans les population adultes (Zug et al., 2014; Belloni Fortina et al., 2015; Goldenberg et al., 2016; Ortiz Salvador et al., 2017; Silverberg et al., 2022). Cette différence s'explique probablement par le fait que les enfants sont proportionnellement moins nombreux à être adressés pour des tests épicutanés et qu'ils ne le sont qu'en cas de très forte suspicion clinique. Par ailleurs, il n'a pas été montré de différence de prévalence en fonction du sexe chez les populations pédiatriques, de même que les enfants atteints de dermatite atopique ne semblent pas présenter une fréquence plus importante d'allergie de contact (Belloni Fortina et al., 2015).

Les dix allergènes les plus prévalents en Europe pour chacune des populations sont présentés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Top 10 des allergènes les plus fréquents dans les populations pédiatrique, adulte et les eczémats de contact professionnel. D'après (Belloni Fortina et al., 2015, Alinaghi et al., 2019, Pesonen et al., 2015)

| Population pédiatrique | | Adultes | | EC professionnel | |
|-------------------------|------------|----------------------|------------|-------------------------|------------|
| Allergènes | Prévalence | Allergènes | Prévalence | Allergènes | Prévalence |
| Sulfate de Nickel | 16.7 % | Sulfate de Nickel | 11.4 % | Chlorure de cobalt | 9.3 % |
| Chlorure de cobalt | 7.5 % | Fragrance mix I | 3.5 % | Fragrance mix I | 7.3 % |
| Dichromate de potassium | 5.2 % | Chlorure de cobalt | 2.7 % | Thiuram mix | 5.6 % |
| Sulfate de néomycine | 3.2 % | Baume du Perou | 1.8 % | Dichromate de potassium | 5.6 % |
| Baume du Perou | 2.6 % | Chrome | 1.8 % | Paraphénylènediamine | 5.4 % |
| Paraphénylènediamine | 2.5 % | Paraphénylènediamine | 1.5 % | Baume du Perou | 4.9 % |
| MCI/MI | 2.4 % | MCI/MI | 1.5 % | Euxyl™ K 400 | 4.6 % |
| Fragrance mix I | 2.3 % | Colophane | 1.3 % | Fragrance mix II | 4.4 % |
| Alcool de lanoline | 1.8 % | Formaldéhyde | 1.2 % | MCI/MI | 4.0 % |
| Colophane | 1.4 % | PTBP-FR | 1.2 % | Colophane | 4.0 % |

MCI, méthylchloroisothiazolinone; MI, méthylisothiazolinone; PTBP-FR, p-tert-butylphenol formaldehyde resin.

1.2 L'eczéma de contact professionnel

L'eczéma de contact est la première dermatose professionnelle, la forme irritative arrivant également en tête par rapport à la forme allergique (Belsito, 2005). Cette observation a notamment été confirmée par une étude australienne qui a montré que chez 2177 patients diagnostiqués avec une dermatose professionnelle, 44 % souffraient d'un ECI et 33% d'un ECA (Cahill et al., 2016). Cependant la prévalence exacte dans la population générale n'est pas connue et il est probable qu'elle soit beaucoup plus importante que celle rapportée. Les secteurs les plus fréquemment touchés sont les **métiers de la coiffure, du bâtiment, de la santé, de la métallurgie, de l'industrie alimentaire, ou encore les peintres** (Pesonen et al., 2015).

Concernant les formes d'eczéma de contact allergique, les allergènes professionnels les plus courants comprennent les thiurames et les carbamates (accélérateurs de caoutchouc), la résine époxy, le formaldéhyde (conservateur) et le nickel (Pesonen et al., 2015; Wiszniewska & Walusiak-Skorupa, 2015) (**Tableau 1**). Le NACDG a rapporté que 11.7% des patients testés entre 2017 et 2018 présentaient un eczéma de contact lié au travail (DeKoven et al., 2021). Le « European Surveillance System on Contact Allergies » (ESSCA) a quant à lui rapporté un taux de **24% d'eczéma de contact professionnel chez l'ensemble des travailleurs adressés pour test épicutanés** entre 2002 et 2010 avec de fortes variations parmi les différents pays européens recensés (Pesonen et al., 2015). A noter qu'une étude récente menée en Allemagne a rapporté que 17,3% des patients suspectés d'EC professionnel présentaient une forme allergique (Schubert et al., 2020). D'autres études, menées

notamment au Royaume Uni, ont suggéré que **l'incidence de l'EC professionnel variait entre 13 et 34 cas pour 100 000 travailleurs par an** (Meyer et al., 2000; Turner et al., 2007).

Les données pour les autres continents, comme l'Asie ou l'Amérique du Sud et l'Afrique, sont quasiment inexistantes, probablement en raison de l'absence d'un système établi de déclaration de maladie professionnelle comme le nôtre. Cependant, une étude a révélé que les dermatoses professionnelles chez les travailleurs du secteur de l'industrie en Asie étaient plus fréquentes que dans les pays occidentaux, ce qui pourrait s'expliquer par l'importance moindre accordée aux mesures préventives (Bhatia & Sharma, 2017). Par ailleurs, plusieurs études ont montré une proportion d'ECA au chrome (constituant majeur du ciment) plus élevée dans ces populations, probablement du fait d'un nombre important de travailleurs dans le secteur du bâtiment (Keragala et al., 2019; Özkaya & Elinç Aslan, 2021). Enfin, une étude brésilienne s'est intéressée au profil socio-économique des patients souffrant d'eczéma de contact professionnel adressés pour des tests épicutanés entre 2000 et 2014 et a révélé une prévalence plus importante chez les hommes que chez les femmes. Néanmoins, l'incidence et la prévalence dans la population générale n'a pas été évaluée (Melo et al., 2019).

1.3 Les facteurs de risques et de prédisposition

Les facteurs de risque de développer un eczéma de contact peuvent être acquis ou innés. **Les facteurs de risque acquis** comprennent les **dermatoses inflammatoires sous-jacentes** telles que la dermite de stase ou la dermatite atopique (DA) qui faciliterait le développement d'EC du fait de l'altération de la barrière cutanée (Boonstra et al., 2018; Erfurt-Berge & Mahler, 2017; Simonsen et al., 2017; Teo et al., 2019), ainsi que **les expositions environnementales individuelles**. Ces dernières constituent le principal facteur de risque de développer des EC et vont notamment dépendre des expositions professionnelles ou des habitudes culturelles, mais également des aspects législatifs influençant les expositions (comme les lois limitant l'exposition au nickel dans certains pays européens).

Les facteurs de risque innés comprennent quant à eux **le sexe, l'âge, l'origine ethnique ou encore la susceptibilité génétique** comme la mutation de certains gènes associés à la fonction barrière de la peau, ou encore le métabolisme cutané et la réponse immunitaire. Concernant ces derniers, plusieurs études ont mis en évidence un **risque plus élevé de développer un EC, notamment les formes allergiques, chez les femmes que les hommes**, avec une prévalence jusqu'à deux fois supérieure. Cela résulterait d'expositions professionnelles et domestiques spécifiques plutôt que de différences intrinsèques en termes de susceptibilité entre les sexes (Nassau & Fonacier, 2020), même si des études récentes soulèvent la question du rôle des hormones sexuelles dans le développement des dermatoses inflammatoires (Kanda et al., 2019). De plus, il a été rapporté que l'ECA débiterait à un **âge**

moyen plus précoce chez les femmes (20-29 ans) que chez les hommes (50-59 ans) (Cashman et al., 2012). Les études portant sur la relation entre EC et l'origine ethnique ne sont pas concluantes en ce qui concernant l'origine ethnique en tant que facteur de risque inhérent (Goh, 1986). Certains anciens rapports ont suggéré que les personnes au phototype foncé auraient un risque plus faible de développer un EC que celles au phototype clair, en lien avec une meilleure fonction barrière de la peau (par exemple, il aurait été observé une augmentation plus limitée de la perte insensible en eau après exposition à des irritants topiques) (Reed et al., 1995; Wedig & Maibach, 1981).

Plusieurs études se sont par ailleurs intéressées à la génétique comme facteur de risque de développer un eczéma de contact. La recherche de gènes de susceptibilité s'est principalement concentrée sur les protéines impliquées dans la barrière cutanée et la réponse immunitaire (notamment les cytokines), qui jouent un rôle clé dans les ECA et ECI. De plus, dans le cas de l'ECA, les variations génétiques des enzymes impliquées dans le métabolisme des allergènes de contact ont également été étudiées. Parmi les gènes de la barrière cutanée, **les mutations de perte de fonction dans le gène de la filaggrine (FLG) ont été identifiées comme un facteur de risque d'ECI** (de Jongh et al., 2008; Timmerman et al., 2016), tandis que les données concernant l'ECA sont moins concluantes (Brown & Cordell, 2008; Lagrelus et al., 2020) et semblent dépendre des allergènes incriminés. Pour exemple, des auteurs ont rapporté une association entre mutation de la FLG et un risque accru de sensibilisation et d'ECA au nickel dans des sous-groupes de patients particuliers (Novak et al., 2008; Thyssen et al., 2008). Ceci s'expliquerait par le fait que la filaggrine est la principale source d'histidine au niveau cutanée, qui est un puissant agent chélateur du nickel. Des niveaux réduits de FLG entraîneraient donc une meilleure pénétration du nickel au niveau épidermique. Il est intéressant de noter que les patients atteints de dermatite atopique et présentant une mutation concomitante de la FLG ont le risque le plus élevé de développer un ECI (Visser et al., 2013, 2014).

Parmi les gènes associés à la réponse immunitaire, il semble y avoir **un effet des polymorphismes du gène du TNFA (« tumor necrosis factor alpha »)** sur la susceptibilité de développer des EC, à la fois irritatif et allergique, suggérant qu'ils partagent certaines voies communes (Blömeke, Brans, Dickel, et al., 2009; Landeck et al., 2012; B.-J. R. Wang et al., 2007). Néanmoins, concernant l'ECA, ceci semble une nouvelle fois dépendre de l'allergène incriminé, puisque s'il a été démontré que l'allèle TNFA-308A augmenterait le risque de sensibilisation à la paraphénylènediamine (PPD) (Blömeke, Brans, Dickel, et al., 2009), et au chrome (B.-J. R. Wang et al., 2007), alors qu'aucune différence n'a pu être retrouvée concernant les sensibilisation au nickel (Colagiovanni et al., 2016). Enfin, plusieurs études ont rapporté une **association entre les polymorphismes génétiques des enzymes impliquées**

dans le métabolisme des xénobiotiques telle que la N-acétyltransférase ou la glutathion S-transférase et l'ECA, mais les résultats restent contradictoires et largement controversés (Blömeke, Brans, Coenraads, et al., 2009; Bolt & Thier, 2006; Ross-Hansen et al., 2013; Schnuch et al., 2011; Westphal et al., 2000) .

Ainsi, actuellement, la valeur prédictive des marqueurs génétiques pour le développement des EC est insuffisante et de futures études sont nécessaires pour étendre nos connaissances concernant l'impact des variations génétiques sur la susceptibilité aux EC.

1.4 Évolution des tendances en matière d'allergènes

Bien que la prévalence de l'allergie de contact soit généralement comparable entre l'Europe, l'Amérique du Nord et l'Asie, **les tendances en matière d'allergènes varient entre les régions et au fil du temps** (Alinaghi et al., 2019; Goldminz & Scheinman, 2018).

Le nickel reste le principal allergène de contact dans les pays industrialisés (Ahlström et al., 2017). La prévalence de l'allergie de contact au nickel dans la population européenne est d'environ 8 à 19 % chez les adultes. Depuis l'introduction de la directive de l'Union européenne (UE) sur le nickel en 1994, entrée en vigueur en 2000, plusieurs pays européens ont rapporté une diminution significative de la sensibilisation au nickel, notamment chez les femmes âgées de 18 à 35 ans (11,4 % en 2006 contre 19,8 % en 1998 chez les adultes danois participants) (Thyssen et al., 2009) (**Figure 1**). De la même manière, l'introduction d'une législation réglementant le chrome hexavalent dans le ciment et les articles en cuir dans l'UE a entraîné une diminution de la prévalence de l'allergie au chrome (Bregnbak et al., 2015). Cependant, la prévalence globale de la sensibilisation au nickel reste encore très élevée (Ahlström et al., 2017, 2019), et constitue un véritable problème aux Etats-Unis, où le relargage du nickel dans les produits de consommation n'est pas réglementé. Dans une étude menée par le NACDG entre 1994 et 2014, l'allergie de contact au nickel a même significativement augmenté au fil du temps, passant de 14,3 % en 1994-1996 à 20,1 % en 2013-2014 (Warshaw et al., 2019). D'autres pays ont rapporté des taux croissants de sensibilisation au nickel, comme Taïwan (de 14,3 % en 1978-1990 à 23,0 % en 1991-2003) (T.-Y. Cheng et al., 2008), Singapour (de 13,9 % en 1984-1985 à 19,9 % en 2001-2003) (Goon & Goh, 2005) et la Chine (de 15,4 % en 1990 à 31,6 % en 2006-2009) (Dou et al., 2011).

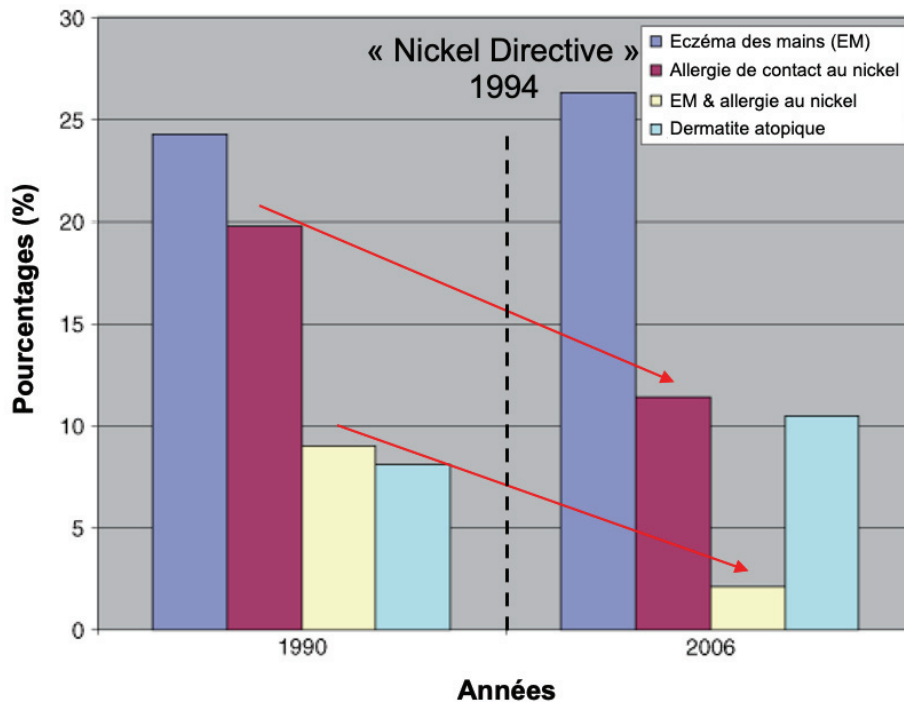


Figure 1. Évolution de la prévalence de l’allergie de contact au nickel dans la population danoise à la suite de la mise en place de la directive européenne. D’après (Thyssen et al., 2009)

La prévalence de l’allergie de contact au nickel a fortement chuté après la mise en place de la directive européenne visant à limiter les quantités de nickel libéré dans les produits de consommation. Par ailleurs, il n’y a eu aucun changement en termes de prévalence de l’eczéma des mains (hormis en cas d’étiologie allergique au nickel) ou de la dermatite atopique. Cette analyse a inclus des femmes danoises âgées de 18 à 35 ans.

Concernant les allergènes professionnels, on peut citer la paraphénylènediamine (PPD), un composant présent dans les colorants capillaires oxydants, entraînant de nombreuses sensibilisations chez les coiffeurs. Cependant, une analyse récente dans 12 pays européens a montré une baisse globale de la positivité des tests épicutanés à la PPD (Uter et al., 2017), probablement due à la diminution de son utilisation dans les teintures capillaires oxydatives, remplacée par des dérivés (Kirchlechner et al., 2016).

Parmi les autres tendances importantes, il convient de noter la récente épidémie d’ECA à la méthylisothiazolinone (un conservateur), qui a atteint un pic dans la première moitié des années 2010 avant qu’une législation soit introduite en Europe pour interdire son utilisation dans les produits de soins personnels non rincés et réduire sa concentration à 15 ppm dans les produits rincés (Uter et al., 2020). Une épidémie similaire d’ECA aux méthacrylates (notamment le méthacrylate d’hydroxyéthyle (HEMA)) a vu le jour ces dernières années, du fait de la forte augmentation de pose d’ongles artificiels, entraînant l’ajout de l’HEMA aux batteries de référence des tests épicutanés dans le monde entier (Rolls et al., 2019; Toholka et al., 2015).

Ainsi, **les modifications des compositions chimiques des produits, les tendances d'expositions des consommateurs et les pratiques industrielles contribuent à l'apparition de nouveaux allergènes et de nouveaux profils de sensibilisation au fil du temps.** Entre 2008 et 2015, environ 17 nouveaux allergènes ont été rapportés chaque année, dont un tiers intervenant dans la composition des cosmétiques (de Groot, 2015). Cette réalité, nécessite des mises à jour régulières de nos connaissances et une flexibilité des batteries de tests épicutanés de référence.

2. Étiologie des eczémas de contact : propriétés physicochimiques des xénobiotiques

Au quotidien, nous sommes constamment exposés à une multitude de produits chimiques dans notre environnement. **Les xénobiotiques sont des chimiques non protéiques étrangers à notre organisme** pouvant être de deux types : **irritants et/ou allergènes** (encore appelés **haptènes**). L'exposition cutanée à ces xénobiotiques est généralement sans conséquence. Cependant, dans certaines conditions, certains chimiques de faible poids moléculaire peuvent pénétrer la barrière cutanée et entraîner une perturbation des processus biologiques. Certains xénobiotiques sont chimiquement réactifs, tandis que d'autres nécessitent une métabolisation pour le devenir. Leurs effets sont variés. **Les irritants possèdent des propriétés physicochimiques toxiques capables d'activer le système immunitaire inné cutané conduisant à un ECI.** Selon la nature du chimique, la dose et la fréquence d'exposition, l'irritation cutanée peut être plus ou moins sévère cliniquement. **Les haptènes sont, en plus d'être pourvus d'un pouvoir irritant, capables d'induire une réponse immunitaire adaptative par l'activation de lymphocytes T spécifiques d'allergène, responsables de la réaction clinique d'ECA.** Les haptènes ne sont pas reconnus directement par le système immunitaire, mais possèdent la capacité de se lier à des protéines du soi entraînant la formation de peptides hapténisés pouvant ainsi être présentés au système immunitaire.

Divers modèles *in vivo*, *in vitro* et *in silico* ont été développés afin de déterminer le pouvoir irritant ou sensibilisant d'un produit chimique, permettant donc de les classer par la législation internationale. Le **système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques** est un système international d'étiquetage des matières dangereuses, basé sur une nomenclature associée à des numéros, des pictogrammes et mentions de danger, permettant d'informer les utilisateurs quant aux principaux dangers des produits

chimiques. Concernant les effets indésirables cutanés, les xénobiotiques ont ainsi été classés en 3 catégories : corrosif (H314), irritant (H315) ou sensibilisant (H317) (**Figure 2**).




| Pictogramme du CLP | Classe de danger | Mention de danger Phrase H |
|--|----------------------|--|
| Irritants | | |
|  | Corrosion cutanée | H314 Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves |
|  | Irritation cutanée | H315 Provoque une irritation cutanée |
| Sensibilisants | | |
|  | Sensibilisant cutané | H317 Peut provoquer une allergie cutanée |

Figure 2. Classification et étiquetage selon le règlement CLP (« Classification, Labelling, Packaging ») pour les effets indésirables cutanés des xénobiotiques

2.1 Pénétration/absorption percutanée

Un prérequis au déclenchement de la réaction clinique d'EC, qu'elle soit allergique ou irritative, est la pénétration du xénobiotique à travers la barrière cutanée protégée par la couche cornée. Le terme de « **pénétration** » ou de « **perméation cutanée** » décrit donc le cheminement d'une molécule appliquée sur la peau, depuis sa fixation au sein du stratum corneum, vers les couches cutanées plus profondes (épiderme, derme, hypoderme), jusqu'à son éventuel passage systémique.

Pour certains chimiques aux propriétés irritantes fortes (ou corrosifs), comme les acides ou les alcalins forts, le seul contact avec la surface de la peau est suffisant. En effet, ils sont capables de dissoudre la couche cornée et d'entraîner la coagulation des protéines qui la composent. Certaines autres molécules ne pénètrent que modérément cette barrière de façon naturelle et doivent donc réussir à traverser la couche cornée pour exercer leur propriété toxique. L'absorption cutanée va alors dépendre de différents facteurs. Tout d'abord on peut citer des **facteurs intrinsèques de la peau tels que l'hydratation, l'âge, la perte insensible en eau, le pH, la cohésion du stratum corneum, la quantité de sébum, l'existence de pathologies cutanées sous-jacentes** (Boer et al., 2016). De plus, plusieurs propriétés du

chimique vont faciliter la pénétration cutanée. La masse moléculaire est un élément déterminant puisque seules les molécules ayant une **masse moléculaire inférieure à 500-1000 Dalton (Da)** sont susceptibles de franchir la barrière cutanée (D. A. Basketter, 1998; Berard et al., 2003; Bos & Meinardi, 2000). Il a été montré que la diffusion percutanée décroît de manière exponentielle avec l'augmentation de la masse moléculaire (Potts & Guy, 1992). Le **caractère lipophile du xénobiotique** est un autre élément très important et peut être établi d'après le coefficient de partage octanol/eau. Les caractéristiques du véhicule sont également déterminantes en contrôlant la libération du xénobiotique et en agissant sur la perméation (Roberts & Walters, 2008). Il faut souligner que le site d'application, la dose de xénobiotique ainsi que la surface et la fréquence d'application peuvent également jouer un rôle.

Des méthodes de mesure d'absorption cutanée permettent de déterminer le potentiel toxique d'un xénobiotique, mais elles ne peuvent malheureusement pas tenir compte de l'ensemble des facteurs favorisant cités précédemment.

2.2 Le métabolisme cutané

Une fois que le chimique aura pénétré la barrière cutanée, il va s'accumuler dans le derme et l'épiderme. Néanmoins, dans la plupart des cas, cela n'aura pas de conséquence clinique. En effet, des systèmes enzymatiques de **détoxication** ont pour but d'éliminer les xénobiotiques présents dans l'organisme. C'est ce que l'on nomme plus communément le **métabolisme cutané**. Ces réactions ont pour but de transformer une molécule au départ lipophile en une molécule hydrosoluble afin de faciliter son excrétion hors de l'organisme. Ce système enzymatique agit via une ou plusieurs étapes de métabolisation classées en deux catégories : le métabolisme de phase I et celui de phase II (**Figure 3**).

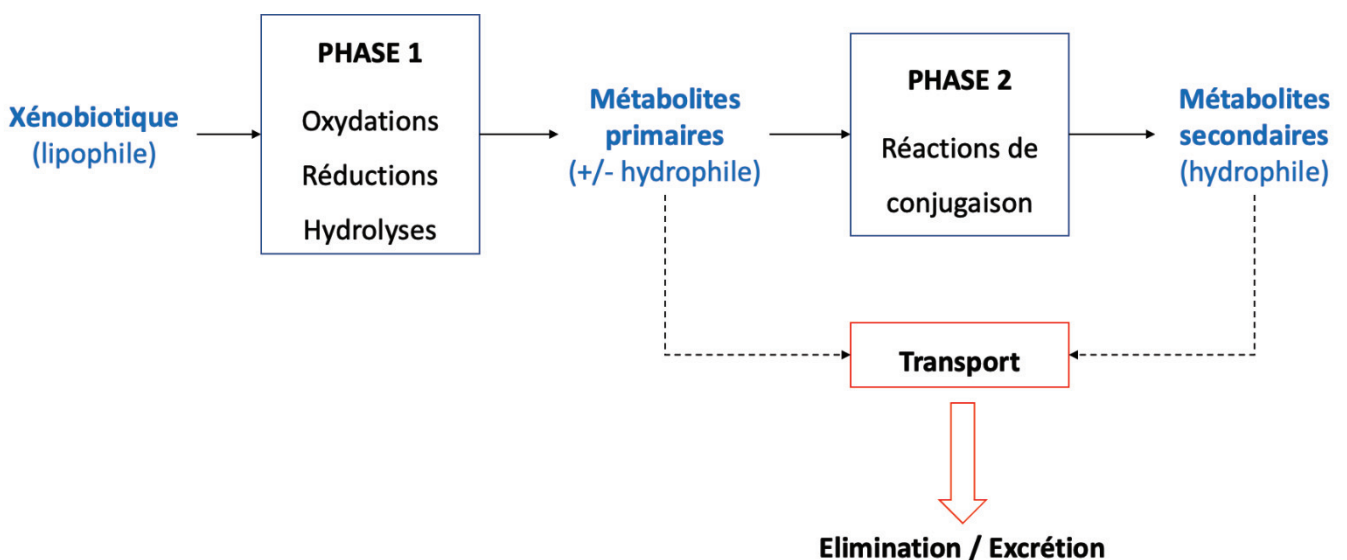


Figure 3. Processus de détoxication des xénobiotiques au niveau cutané

Le métabolisme de phase I comprend des réactions d'activation et de fonctionnalisation, consistant à modifier ou introduire des groupes fonctionnels hydrophiles à la surface des molécules **par des réactions d'oxydation, de réduction, ou d'hydrolyse**. Si le métabolite est rendu suffisamment hydrophile, il sera alors éliminé. Ces réactions sont généralement assurées par des enzymes membranaires de la famille des oxydoréductases. Parmi elles, on peut citer les mono-oxygénases à cytochrome P450 (B. K. Park et al., 1995), les flavines mono-oxygénases (Krueger & Williams, 2005), les alcools et aldéhydes déshydrogénases (Cheung et al., 1999), les monoamines oxydases (Weyler et al., 1990), les peroxydases (Hollenberg, 1992), les estérases (Prusakiewicz et al., 2006), les azo-réductases (Levine & Zbaida, 1991) ou encore les enzymes hydrolytiques (Oesch et al., 2018).

Le métabolisme de phase II intervient lorsque le xénobiotique n'est pas suffisamment hydrophile pour être éliminé dans les suites de la première transformation et correspond cette fois-ci à des réactions de conjugaison. Les enzymes de phase II au niveau cutané appartiennent essentiellement à la famille des transférases telles que les UDP-glucuronyl transférases (Tukey & Strassburg, 2000), les N-acétyltransférases (Kawakubo et al., 2000), les glutathion-S-transférases (Giralt et al., 1996) et les sulfotransférases (Coughtrie et al., 1998).

Après transformation, des transporteurs tels que la P-glycoprotéine ou la « multi-drug resistance proteins » (Kruh et al., 2001; Picchianti-Diamanti et al., 2014), vont permettre l'élimination des dérivés des xénobiotiques par les cellules par transport actif à travers la membrane plasmique.

Bien que le but principal du métabolisme cutané soit d'éliminer le xénobiotique et donc de protéger la cellule des effets toxiques de ce dernier (c'est ce qu'on appelle la détoxification), il peut **dans certains cas au contraire être responsable de sa toxicité, par un phénomène de bio-activation** (Ahmad & Mukhtar, 2004). En effet, lors des réactions de phase I, des intermédiaires fonctionnalisés souvent très réactifs sont formés. En cas de mauvaise détoxification, ils peuvent s'accumuler dans la peau et, dans certaines situations, réagir avec des protéines. Ils se comportent alors comme des haptènes classiques. C'est le cas des pro-haptènes dont nous discuterons dans les paragraphes suivants. Il existe donc un véritable équilibre entre les mécanismes d'activation de la phase 1 et les mécanismes de détoxification de la phase 2 dans la peau, qui peuvent être à l'origine de la toxicité.

Il faut souligner que l'expression et la fonction des enzymes du métabolisme cutané peuvent varier en fonction de facteurs endogènes (sexe, âge, pathologies, hormones, facteurs génétiques) ou exogènes (polluants, médicaments, alimentation, addiction) (Coecke et al., 2006), contribuant à une forte variabilité inter-espèce (Oesch et al., 2007) mais aussi inter-

individuelle (Janmohamed et al., 2001; Sieben et al., 1999). Par ailleurs, des études ont mis en évidence l'importance du microbiote cutané vis-à-vis de sa capacité à métaboliser les xénobiotiques pour les inactiver ou, au contraire, les activer (Oesch et al., 2018; Sowada et al., 2014).

2.3 Les chimiques irritants

Un irritant est un chimique capable d'altérer et/ou de pénétrer dans la peau du fait de ses propriétés physico-chimiques et ainsi être toxique au contact des cellules cutanées. Le xénobiotique est donc directement responsable de l'inflammation cutanée de par ses propriétés physico-chimiques **toxiques et pro-inflammatoires**.

Les irritants sont omniprésents dans notre environnement quotidien, aussi bien personnel que professionnel. Des exemples bien connus d'irritants sont les savons ou les détergents, les acides et les solvants. La corrosivité et la capacité de pénétration cutanée sont deux paramètres importants du pouvoir irritant des xénobiotiques. Ces propriétés sont par ailleurs notamment utilisées dans la détermination de la toxicité de nouveaux chimiques (Barratt, 1995).

Le pouvoir irritant d'une substance est ainsi lié (i) à **sa capacité à rompre et/ou pénétrer la barrière cutanée** et (ii) à **sa toxicité se traduisant par sa capacité à perturber les membranes cellulaires, entraînant des dommages cellulaires directs**. L'hétérogénéité des propriétés physicochimiques des molécules irritantes explique les effets variables sur les cellules. Pour exemple, les solvants et les détergents perturbent les membranes cellulaires et leur fluidité par leur action sur les lipides membranaires. C'est notamment le cas du sodium lauryl sulfate (SLS), utilisé dans de nombreuses études, mais également comme témoin d'irritation dans les batteries de tests épicutanés. Les acides et les alcalins, de leur côté, modifient le pH membranaire, entraînant une perturbation du métabolisme cellulaire. De nombreux chimiques perturbent ainsi les échanges cellulaires. L'ensemble de ces modifications va donc induire l'activation et/ou la mort des cellules cutanées par des mécanismes d'apoptose ou de nécrose en fonction de la nature et de la dose de l'irritant. Ces cellules vont alors libérer des médiateurs pro-inflammatoires (histamines, prostaglandines, cytokines...), amplifiant alors la réponse immunitaire innée (Ale & Maibach, 2014).

Le pouvoir irritant dépend de la nature, dose, de la durée et de la fréquence d'exposition, mais aussi de facteurs environnementaux (pollution, stress, infection...) et génétiques, il est donc difficile de prévoir les effets d'un produit donné chez un individu donné. Alors que les irritants forts conduisent directement aux signes cliniques, les irritants faibles nécessitent généralement une exposition répétée (Esser & Martin, 2017). Il faut

rappeler que tout chimique est un irritant cutané potentiel. Même l'eau doit être considérée comme un irritant faible. Un contact prolongé ou fréquent de la peau avec l'eau peut ainsi provoquer des eczémas de contact irritatif.

2.4 Les chimiques allergisants : les haptènes

L'origine et la nature des substances capables d'induire une réaction d'ECA sont très diverses. A ce jour, environ **4000 molécules chimiques** ont été recensées comme potentiellement sensibilisantes dont les plus fréquents sont : **les métaux, les parfums, les colorants, les conservateurs**... Ces nombreux allergènes ne présentent néanmoins pas tous le même pouvoir sensibilisant. Ainsi, on peut distinguer les allergènes « extrêmes », « forts », « modérés » et « faibles » (Esser & Martin, 2017) (**Tableau 2**).

Tableau 2. Classification de chimiques sensibilisants selon leur potentiel de sensibilisation chez l'homme. D'après (D. A. Basketter et al., 2005)

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

Les haptènes sont par essence non immunogènes, mais ils possèdent ou acquièrent après transformation, **une nature chimique très réactive qui leur permet de lier les résidus aminés des protéines cutanées**, générant de nouveaux déterminants antigéniques qui seront alors reconnus par le système immunitaire chargé de les éliminer (Kaplan et al., 2012). La réactivité de l'haptène envers les protéines est donc un facteur majeur de la sensibilisation.

2.4.1 Mécanismes physico-chimiques conduisant à la formation d'un complexe haptène-protéine

La formation du complexe haptène-protéine implique la création de liaisons plus ou moins fortes et il est ainsi possible de distinguer les haptènes selon le type de liaison engagée : soit via des liaisons covalentes pour les haptènes classiques (molécules organiques), soit via des liaisons de coordination pour les haptènes non classiques (ions métalliques) (Divkovic et al., 2005).

2.4.1.1 Les haptènes classiques : liaisons covalentes

Les liaisons de covalence sont des interactions très stables entre les résidus électrophiles des haptènes et les groupements nucléophiles des protéines épidermiques. Les principaux acides aminés nucléophiles sont représentés dans la **Figure 4**.

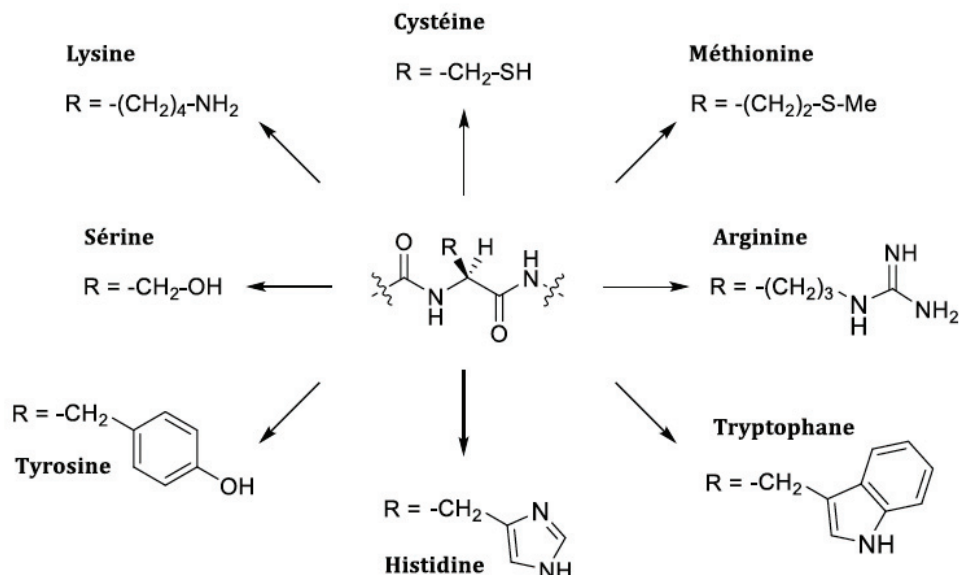


Figure 4. Principaux acides aminés nucléophiles

Chimiquement, la peau peut être décrite comme un environnement nucléophile, riche en eau et en protéines dont les groupements nucléophiles sont riches en électrons. Les acides aminés les plus fréquemment impliqués dans la formation de complexes antigéniques possèdent sur leurs chaînes latérales des groupes nucléophiles riches en électrons, telles que la **cystéine, la lysine, la tyrosine, la méthionine ou encore l'histidine** (Karlberg et al., 2008). Les principales réactions impliquées dans la formation de liaisons covalentes entre les haptènes et les résidus protéiques peuvent être classées en 3 groupes :

- les réactions de substitution nucléophile sur un centre saturé (dérivés halogénés, époxydes) ou insaturé (dérivés halogénés aromatiques, esters) (Divkovic et al., 2005),
- les réactions d'addition sur une fonction carbonyle ou réaction de condensation (dérivés carbonylés) (Tracey & Shuker, 1997),
- les réactions d'addition nucléophile de type Michael 1, 4 (systèmes α - β insaturés).

Il a également été montré que des liaisons covalentes peuvent être formées par des réactions mettant en jeu des espèces radicalaires (Karlberg et al., 2008) (**Figure 5**).

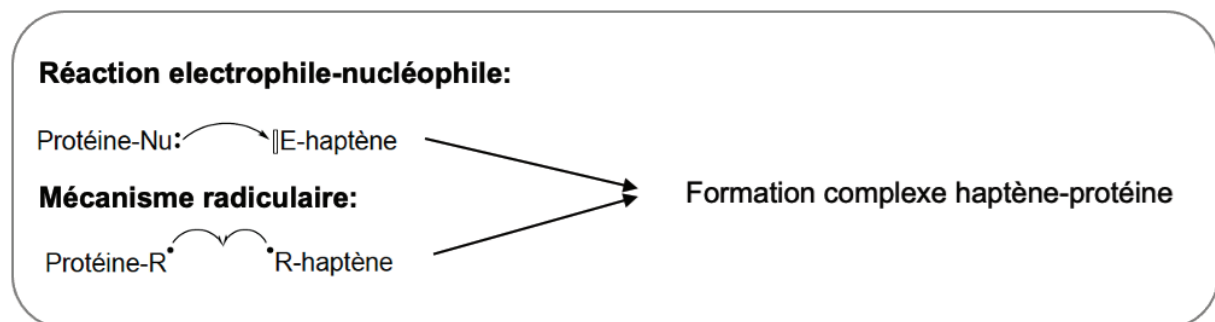


Figure 5. Formation de liaisons covalentes par réaction électrophile-nucléophile et radicalaire.

Les liaisons covalentes étant difficilement réversibles, elles confèrent au complexe haptène-protéine formé une meilleure stabilité ce qui favorisera une réponse du système immunitaire conduisant à une sensibilisation.

2.4.1.2 Cas particulier des métaux : liaisons de coordination

Les métaux tels que le nickel (Ni), le chrome ou le cobalt diffèrent des haptènes classiques puisqu'ils sont incapables d'effectuer des liaisons de covalence avec les protéines (Thierse et al., 2005). En revanche, ils réagissent avec les protéines via des liaisons de faible affinité et réversibles avec 4 ou 6 électrons donateurs tels que l'oxygène ou l'azote des acides aminés de la chaîne latérale des protéines (**Figure 6**). Ces liaisons de coordination sont cependant suffisamment stables pour former un complexe reconnaissable et pris en charge par le système immunitaire (M. Schmidt & Goebeler, 2015). Par ailleurs, il a été montré

que le Ni pouvait se lier directement aux peptides du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II des cellules dendritiques (Romagnoli et al., 1991), mais également entrainer une liaison entre les molécules de CMH et la tyrosine 29 de la chaîne du récepteur des lymphocytes T (TCR), formant une sorte de « pont » entre les deux cellules (Gamerding et al., 2003)

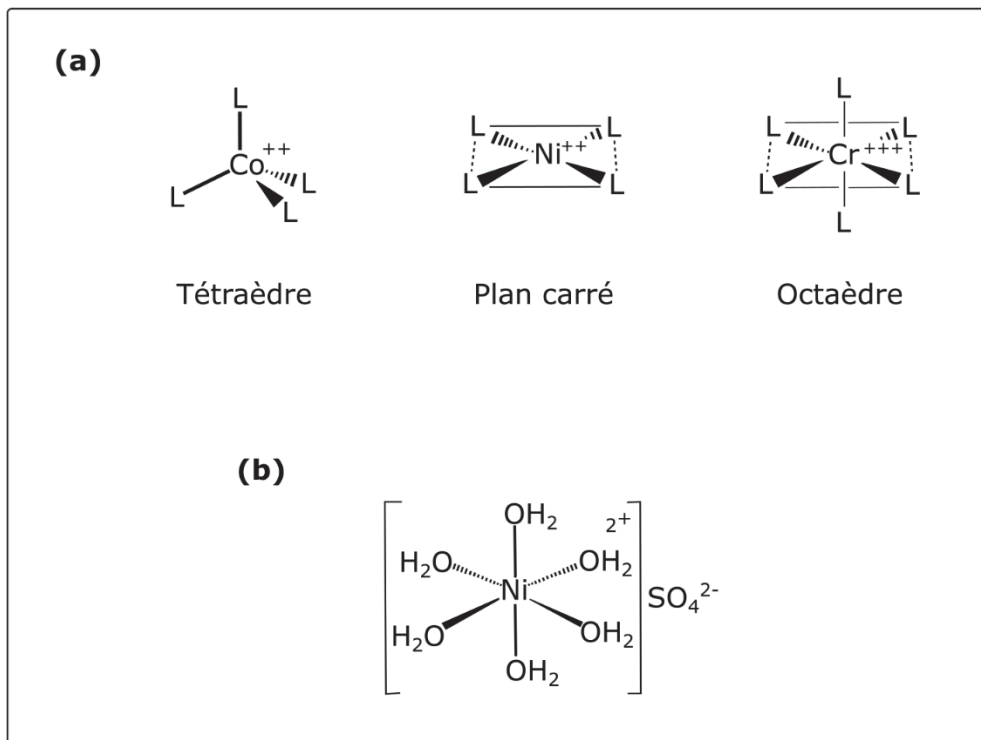


Figure 6. Exemples de liaisons de coordination effectuées par les métaux. D'après (D. Basketter et al., 1995)

Le Cobalt (Co^{++}) forme un tétraèdre, le nickel (Ni^{++}) un complexe en plan carré alors que le chrome Cr^{+++} forme un octaèdre. [L= ligand]. b. Le sulfate de nickel NiSO_4 .

Une fois le complexe haptène-protéine formé, les systèmes immunitaires inné et adaptatif vont reconnaître le néo-antigène ainsi généré pour induire une réponse immune spécifique de l'haptène. Néanmoins, certaines molécules ne sont **pas intrinsèquement réactives** avec les protéines mais acquièrent une réactivité protéique suite à une **transformation/activation préalable** par un **mécanisme non enzymatique intervenant avant le contact cutané** (ex : oxydation) ou bien **enzymatique survenant après le contact** (ex : métabolisme cutané). Ces substances sont respectivement appelées **pré- (ex : les parfums) ou pro-haptènes (ex : colorants)** (Karlberg et al., 2013), et sont donc distingués des **haptènes classiques** (Figure 7).

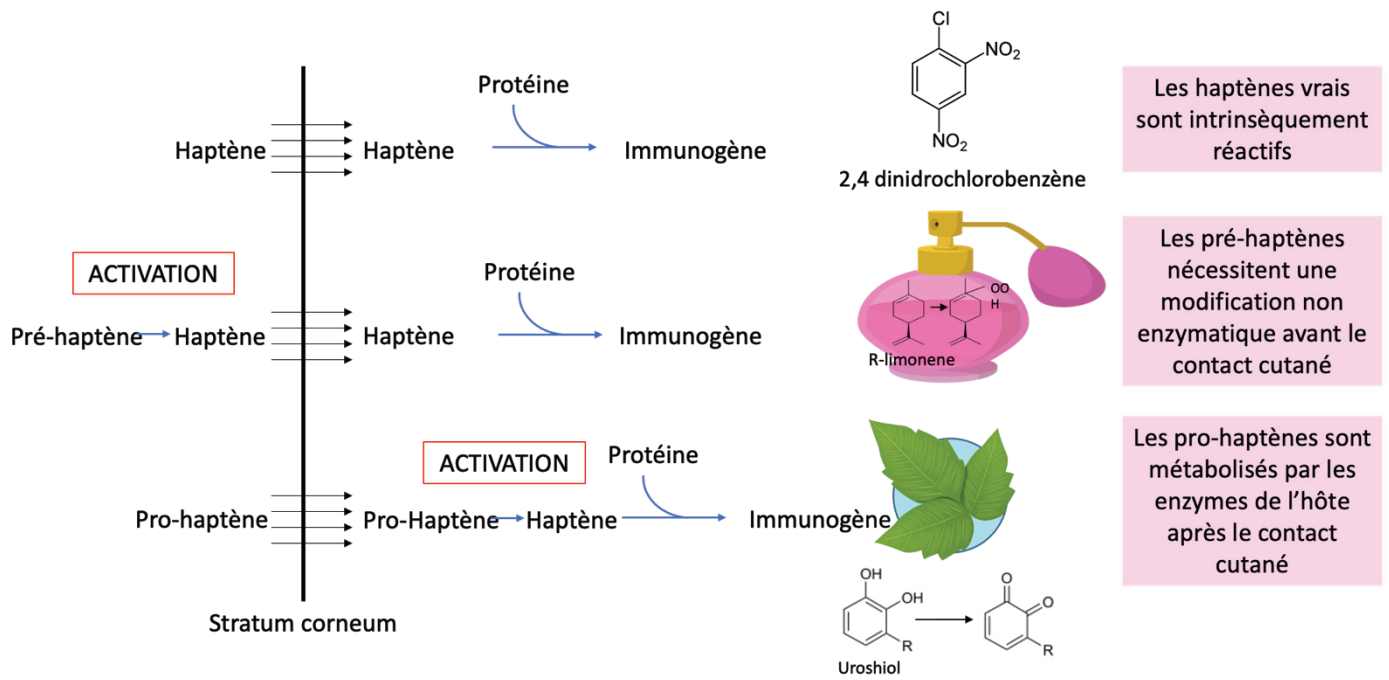


Figure 7. L'activation des différents types d'haptènes. D'après (Kaplan et al., 2012; Karlberg et al., 2013)

2.4.2 Les pro-haptènes

Les **pro-haptènes** sont des allergènes nécessitant au préalable, une **activation métabolique** pour se lier ensuite aux protéines de la peau. Comme nous l'avons vu précédemment, la peau humaine exprime des systèmes enzymatiques capables de métaboliser les xénobiotiques, en modifiant leur structure chimique afin d'augmenter leur hydrophilie pour en faciliter l'élimination du corps. Néanmoins, ils peuvent dans certains cas les convertir en intermédiaires électrophiles réactifs vis-à-vis des protéines. Une multitude d'enzymes peuvent donc participer à l'activation des pro-haptènes et comprennent à la fois des enzymes de phase I et II. **Plus d'un tiers des allergènes connus seraient des pro-haptènes.** Parmi eux, on peut citer l'exemple de l'alcool cinnamique, composant principal de la cannelle retrouvé dans les parfums et huiles essentielles. *In vivo*, l'alcool cinnamique est oxydé par une enzyme de type alcool déshydrogénase en aldéhyde cinnamique (Moss et al., 2016). A la suite de cette métabolisation, il peut se conjuguer à une entité hydrosoluble afin d'être éliminé de l'organisme, ou bien réagir avec les protéines de l'épiderme et du derme et former un complexe antigénique (**Figure 8**) (Smith et al., 2000).

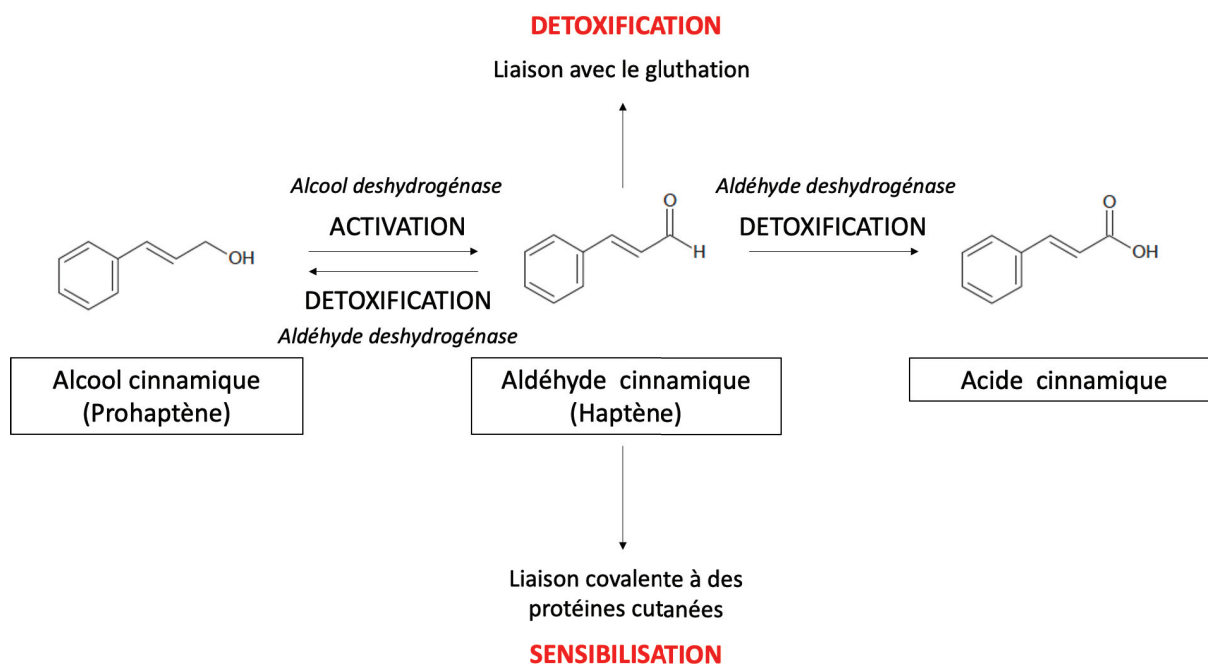


Figure 8. Métabolisme de l'aldéhyde cinnamique et de l'alcool cinnamique. D'après (Smith et al., 2000)

Néanmoins, une étude réalisée sur épiderme reconstruit a montré que les métabolites réactifs formés sont des époxy-alcools et des sulfates allyliques. La métabolisation de l'alcool cinnamique induirait donc la formation d'haptènes autres que l'aldéhyde cinnamique (Moss et al., 2016).

Ce changement potentiel de réactivité d'une substance peu ou pas sensibilisante en un sensibilisant puissant est un facteur de risque important qui doit être considéré dans les tests épicutanés et les tests *in vitro* pour l'identification des allergènes de contact.

2.4.3 Les pré-haptènes

Le terme de **pré-haptène**, définit des molécules non intrinsèquement réactives **transformées cette fois ci par des mécanismes chimiques et non enzymatiques tels que l'oxydation à l'air ou photoactivation**, en dérivés radicalaires très réactifs pouvant ainsi fixer les protéines (Lepoittevin, 2006). L'oxydation à l'air (ou auto-oxydation) est une réaction en chaine de radicaux libres dans laquelle la substitution d'atomes d'hydrogène combinée à l'addition d'atomes d'oxygène peut former des radicaux peroxydes stables et très réactifs (Karlberg et al., 2013), tels que les hydroperoxydes. Ceux-ci peuvent continuer à s'oxyder et ainsi former des composés d'oxydation secondaire. Une fois les hydroperoxydes générés, ils peuvent ainsi former des complexes antigéniques spécifiques et agir comme allergisants cutanés (Bråred Christensson et al., 2006). Les produits d'oxydation secondaires tels que les

aldéhydes et les époxydes peuvent aussi être allergisants, augmentant ainsi le potentiel allergisant des mélanges d'auto-oxydation (Karlberg et al., 2008). **De nombreuses fragrances couramment utilisées ont ainsi été montrées comme étant des pré- ou des pro-haptènes, parfois même pouvant être à la fois pré- et pro-haptène (Figure 9).** En effet, bien que les mécanismes soient assez différents, l'auto-oxydation et la bio-activation de certaines fragrances peuvent générer les mêmes produits (Karlberg et al., 2013).

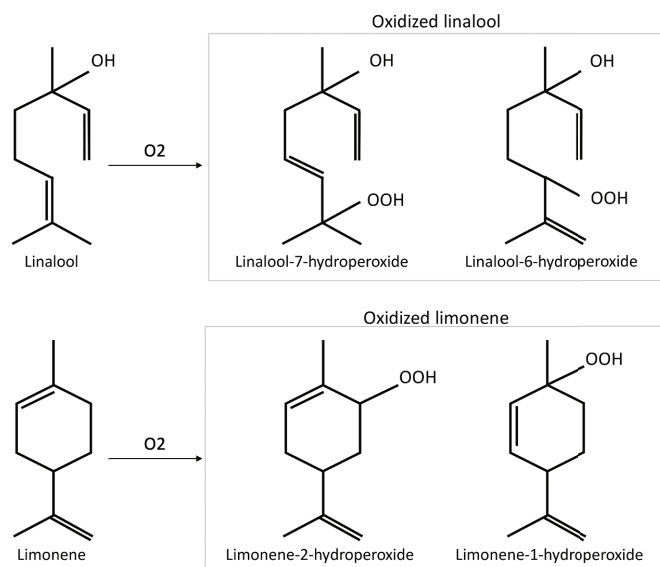


Figure 9. Structures chimiques du linalol, du limonène et de leurs hydroperoxydes respectifs provoquant une allergie de contact. D'après (Sukakul et al., 2021)

Un autre exemple est le cas de la paraphénylènediamine (PPD), utilisée dans la composition de colorants comme les teintures capillaires, qui est rapidement oxydée à l'air favorisant la formation d'un ensemble de molécules réactives (Eilstein et al., 2006, 2007) (Figure 10).

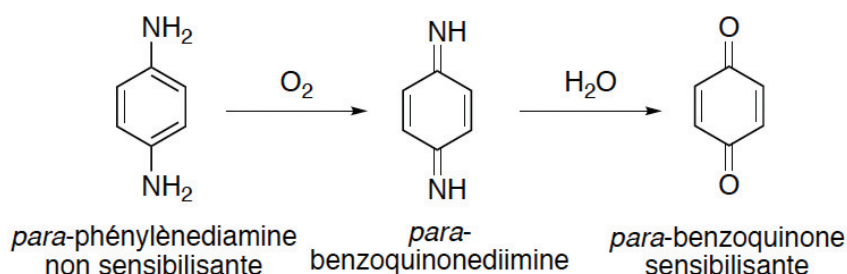


Figure 10. Oxydation de la paraphénylènediamine en benzoquinone diimine, puis hydrolyse en benzoquinone. D'après (Eilstein et al., 2006, 2007)

Enfin, il faut rappeler que **l'ensemble de ces chimiques allergisants (haptènes vrais, pré- et pro-haptènes) possèdent en outre de leurs propriétés sensibilisantes, des propriétés irritantes**, ce qui leur confère la capacité d'activer à la fois l'immunité innée et adaptative, à la différence des molécules irritantes qui activent seulement l'immunité innée. L'activation de l'immunité innée par les haptènes est liée à leurs caractères pro inflammatoire et toxique, et joue un rôle clé dans la sensibilisation des individus aux haptènes, puisqu'elle permet la maturation des cellules dendritiques (DCs) cutanées, ce qui stimule l'activation de lymphocytes T producteurs de cytokines effectrices (Vocanson et al., 2014). **Les deux types d'eczéma peuvent donc être discriminés par des mécanismes physiopathologiques différents.**

3. Mécanismes physiopathologiques

Le développement des EC repose sur un ensemble de processus complexes, interconnectés et finement contrôlés. **L'ECI et l'ECA font intervenir différentes branches du système immunitaire** et ont donc des mécanismes sous-jacents variés. **L'ECI est une dermatose inflammatoire non spécifique principalement due à la toxicité des xénobiotiques qui induisent une inflammation par activation de l'immunité innée** (H. Y. Lee et al., 2013; Nosbaum et al., 2009). **L'ECA, au contraire, correspond à une réaction d'hypersensibilité de type IV** (Honda et al., 2013; Kaplan et al., 2012; Martin et al., 2018; Vocanson et al., 2009) induite par les propriétés immunogènes des haptènes et **nécessite l'activation de l'immunité innée et adaptative**. L'inflammation induite est secondaire au recrutement et à l'activation des Lymphocytes T spécifiques de l'haptène (Vocanson et al., 2006) chez des individus préalablement sensibilisés.

Par ailleurs, il convient de souligner que la dichotomie ECI/ECA et immunité innée/adaptative reste conceptuelle puisqu'en pratique les deux types d'immunité sont intimement liées. L'induction de l'immunité adaptative nécessite au préalable l'activation de l'immunité innée. L'irritation cutanée fait donc le lit de l'allergie (Nosbaum et al., 2009). Il a aussi été montré que l'exposition aux irritants augmente le risque de sensibilisation et donc de développer un ECA (Engebretsen & Thyssen, 2016).

3.1 L'eczéma de contact irritatif

Plusieurs mécanismes potentiels peuvent être considérés dans la physiopathologie des ECI : (i) **la rupture de la couche cornée** induisant la perte d'eau et/ou la pénétration de la substance irritante, (ii) **la rupture ou la perturbation des membranes** des kératinocytes

libérant des médiateurs pro-inflammatoires, (iii) **la synthèse de médiateurs inflammatoires** par les cellules cutanées, (iv) **la cytotoxicité** due à la libération des médiateurs ou des enzymes de destruction tissulaire et (v) **des effets directes sur les vaisseaux sanguins** du derme et les molécules d'adhésion générant un infiltrat inflammatoire.

Finalement, les mécanismes par lesquels les produits chimiques entraînent une réaction d'irritation sont encore mal compris et résultent d'une désorganisation des couches lipidiques des membranes cellulaires ou de l'altération des protéines de la barrière épidermiques telles que les kératines, claudines, l'involucrine ou la filaggrine (Angelova-Fischer, 2016; Fartasch, 1997). Certains chimiques, tels que les acides, les bases ou les détergents, peuvent entraîner une nécrose cellulaire intense, provoquant une perturbation majeure de la barrière cutanée ; ce sont les corrosifs. Les substances corrosives endommagent la peau de manière irréversible, tandis que les substances irritantes entraînent une réaction inflammatoire locale réversible provoquée par les acteurs du système immunitaire inné au niveau des tissus affectés. Ces dernières peuvent avoir des effets minimes sur les cellules de l'épiderme et nécessitent parfois des expositions prolongées ou répétées avant qu'une réaction d'ECI ne se produise (Eskes et al., 2012).

Les irritants induisent une perturbation de la barrière cutanée et des dommages cellulaires directs. Les kératinocytes jouent donc un rôle central dans la réponse inflammatoire. Celle-ci est initiée par l'activation et la reconnaissance de **signaux de danger** induits suite au stress (SAMS pour « Stress associated molecular patterns ») ou aux dommages (DAMPs pour « damage associated molecular pattern ») cellulaires et est médiée par la libération de tout un ensemble de médiateurs solubles tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS), l' adénosine-triphosphate (ATP), des protéines de choc thermique (HSP), des protéines HMGB1 (« high mobility group box 1 »), ou encore l'interleukine (IL-)1 α par les cellules endommagées (Gibbs, 2009; S. Patel, 2018) . L'ensemble de ces ligands seront alors reconnus par les récepteurs du système immunitaire inné présents sur les cellules saines environnantes entraînant alors la **libération de chimiokines** (CCL1 [« C-C Motif Chemokine Ligand 1 »], CCL11, CCL20, CXCL8 [« C-X-C Motif Chemokine Ligand 8 »]...) **et de cytokines** (tels que l'IL-1 α , l'IL-1 β le TFN- α qui sont toutes 3 des cytokines clés, ainsi que l'IL-6, le GM-CSF [« Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor »] ou la TSLP [« Thymic stromal lymphopoietin »...]) (Kumari et al., 2015; H. Y. Lee et al., 2013), ainsi que des **dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique** (Kendall et al., 2016) et des **protéases** (Clemmensen et al., 2010) dans les minutes ou les heures qui suivent le contact. Les irritants peuvent également **activer les nocicepteurs** exprimés à la surface des kératinocytes, des mastocytes et des fibres nerveuses sensorielles, produisant ainsi une douleur aiguë et une inflammation neurogène par la libération de peptides vasoactifs tels que la substance P

(Fulzele et al., 2007). Cette libération induit une **vasodilatation et l'infiltration de divers leucocytes** (neutrophiles, éosinophiles, basophiles et/ou monocytes inflammatoires) du sang vers la peau (Calhoun et al., 2019; Willis et al., 1993), amplifiant le processus inflammatoire. On peut noter que même si les lymphocytes T (LT) conventionnels infiltrent les lésions d'irritation, aucun rôle inflammatoire ne leur a été reconnu dans l'ECI.

La physiopathologie de l'ECI est résumée dans la **Figure 11**.

L'irritation cutanée induite par un xénobiotique entraîne ainsi des lésions cutanées importantes, qui se résorbent avec l'élimination de l'agent incriminé et l'élimination et le remplacement des cellules endommagées ou mortes par la mise en place d'un processus de cicatrisation.

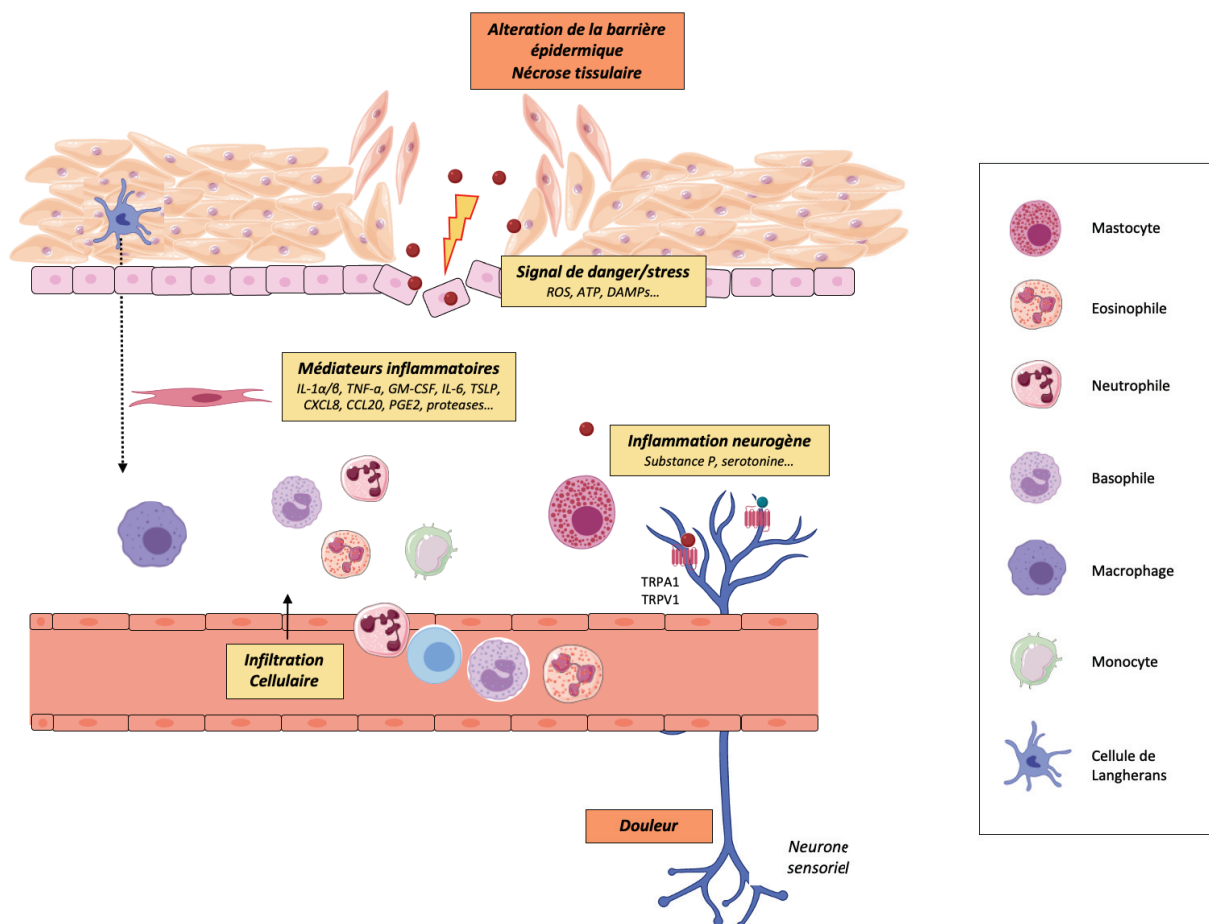


Figure 11. Schéma récapitulatif de la physiopathologie de l'ECI

L'ECI est dû aux propriétés toxiques des produits chimiques sur les cellules cutanées, entraînant une réaction aiguë par la libération de signaux de dommages et de stress et l'infiltration ultérieure de cellules immunitaires innées. Les irritants excitent également les nocicepteurs, produisant ainsi une douleur aiguë et une inflammation neurogène.

3.2 L'eczéma de contact allergique

Contrairement à l'ECI, la réaction clinique d'ECA survient après un contact avec un haptène chez des individus préalablement sensibilisés (Karlberg et al., 2008; Lepoittevin & Leblond, 2000). Nous avons vu précédemment que bien que les haptènes ne soient pas intrinsèquement immunogènes, ils ont la capacité de lier des protéines cutanées et ainsi de générer des néo-antigènes pouvant être spécifiquement reconnus par le système immunitaire (Kaplan et al., 2012). L'ECA est le prototype même d'une **réaction d'hypersensibilité retardée de type IV** et se développe en deux phases temporellement dissociées : **la sensibilisation et l'élicitation**. Après la perméation de l'allergène dans la peau et la formation de complexes haptène-autoprotéine (Eilstein et al., 2006; Landsteiner & Jacobs, 1936), l'induction de la réponse allergique nécessite la génération d'un milieu pro-inflammatoire local, prérequis indispensable à la présentation des antigènes aux lymphocytes T par les cellules dendritiques au niveau des ganglions lymphatiques (Esser & Martin, 2017). À ce stade, l'individu est sensibilisé et présente une allergie de contact, bien qu'il reste asymptomatique cliniquement. L'exposition ultérieure au même allergène entraînera l'activation et le recrutement au niveau du site de contact des cellules T effectrices et mémoires spécifiques de l'haptène, dont le but est d'éliminer les kératinocytes hapténisés. Cette phase d'élicitation aboutit au développement de la réaction clinique d'ECA (Vocanson et al., 2009). Enfin, des mécanismes de régulation faisant intervenir les lymphocytes T régulateurs interviennent dans la phase de résolution de l'inflammation. Il est important de noter que la persistance d'une mémoire locale et systémique (lymphocytes T mémoire) favorise la récurrence de la maladie, communément appelée « poussée », et l'aggravation progressive de l'inflammation cutanée lors de la réexposition à l'haptène.

3.2.1 Activation de l'immunité innée

La formation des complexes haptène-protéine qui initie l'activation de l'immunité innée a été développée dans le Chapitre 1 : 2.4.1.

3.2.1.1 *Génération d'un milieu pro inflammatoire et rupture de tolérance*

Il est important de noter que l'exposition aux haptènes ne conduit pas nécessairement à une sensibilisation « efficace ». Seul un nombre limité d'individus développe un ECA et les mécanismes à l'origine de cette rupture de tolérance ne sont pas encore complètement élucidés. En effet, une **tolérance immunologique** se développe chez les individus exposés et est médiée par l'activation de LT régulateurs (LTregs) combinée à l'anergie des LT spécifiques d'antigène (Cavani et al., 2003; Gomez de Agüero et al., 2012; Luckey et al.,

2012). Ce concept a été parfaitement illustré dans des modèles expérimentaux murins. En effet, l'exposition à des haptènes faibles ou modérés n'entraînent des réactions cliniques que chez les souris dépourvues de LTreg (Rozieres et al., 2010; Vocanson et al., 2006).

Néanmoins, en induisant un microenvironnement pro-inflammatoire cutané, certains haptènes dotés d'un fort potentiel sensibilisant génèrent les conditions nécessaires pour contourner les mécanismes de tolérance (Riemann et al., 2005; Watanabe et al., 2008). Cela entraîne l'activation et la migration des DCs cutanées ayant capturé l'antigène et l'activation ultérieure des LT spécifiques d'allergènes. A l'inverse, les mécanismes conduisant à la sensibilisation vis-à-vis des sensibilisants modérés ou faibles restent obscurs et supposent des prédispositions génétiques spécifiques entraînant l'altération de la fonction barrière de la peau (cf chapitre 1: 1.3), ou encore une exposition simultanée à plusieurs allergènes ou à un allergène et un irritant qui fournirait alors un signal adjuvant, une infection concomitante, un stress sous-jacent (Bonefeld et al., 2017; Saint-Mezard et al., 2003; Watanabe et al., 2008)... La contribution du microbiote cutané est également discutée (Martin et al., 2008). De tels signaux pourraient ainsi augmenter le potentiel immunogène des DCs cutanées afin de favoriser l'activation des cellules T effectrices. L'ensemble des facteurs pouvant conduire à la réaction d'ECA sont résumés dans la **Figure 12**.

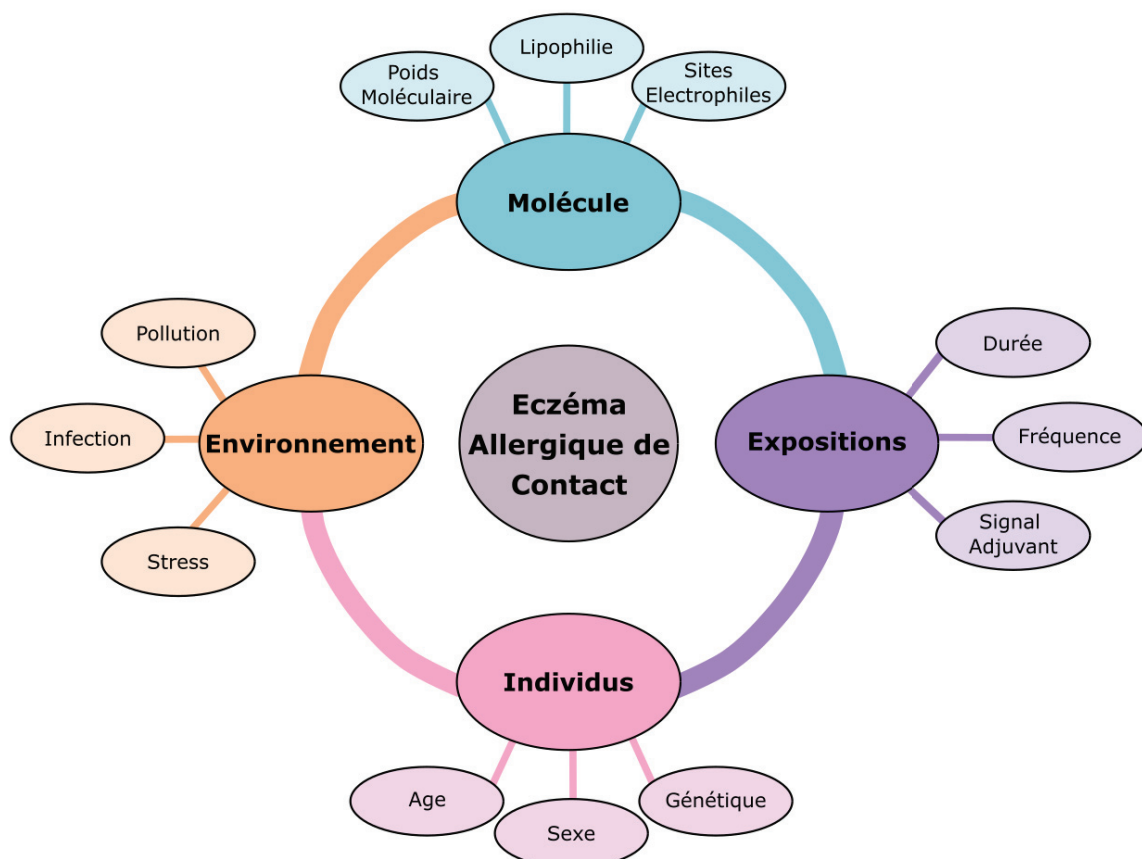


Figure 12. Facteurs impliqués dans la rupture de tolérance conduisant à un ECA

3.2.1.2 L'activation de l'immunité innée par les haptènes « forts »

De nombreux travaux de recherche se sont intéressés à la compréhension des mécanismes conduisant à l'activation de l'immunité innée par les sensibilisants forts. L'ensemble de ces mécanismes sont résumés dans la **Figure 13**.

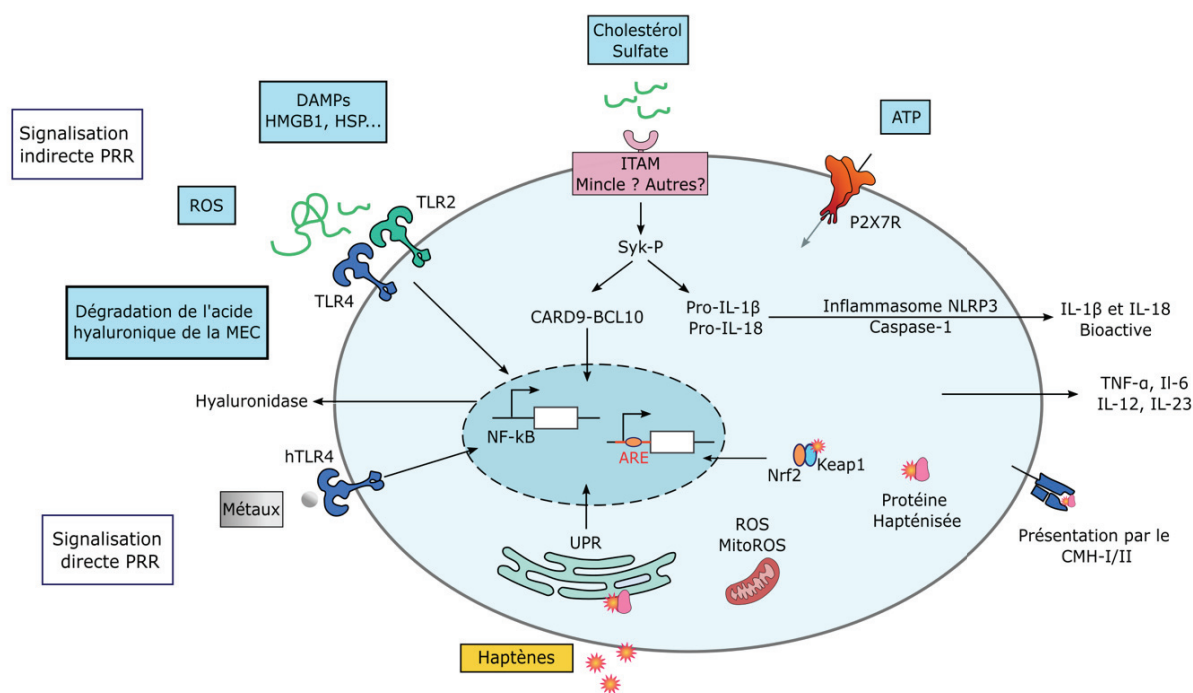


Figure 13. Réponse immunitaire innée induite par les haptènes

Les allergènes métalliques interagissent avec le TLR4 humain pour induire une signalisation pro-inflammatoire, tandis que les autres haptènes activent indirectement les TLR2 et TLR4 via la dégradation de l'acide hyaluronique. Ces deux types d'allergènes de contact induisent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui contribue à l'inflammation cutanée. Les allergènes de contact peuvent activer la voie Nrf2 soit via l'activation du stress oxydatif, soit par la modification chimique de cystéines présente sur Keap1. Les allergènes peuvent également induire la libération d'ATP par les cellules cutanées. L'ATP stimule le récepteur purinergique P2X7, activant la protéine NLRP3 de l'inflammasome. L'ensemble aboutit à la production de cytokines et de chimiokines inflammatoires.

Comme pour les irritants, les **réponses innées sont principalement déclenchées par les propriétés pro-inflammatoires ou toxiques intrinsèques de l'allergène incriminé et impliquent l'activation indirecte ou directe des récepteurs de type PRR** (« Pattern recognition receptor »). En effet, en s'accumulant à l'intérieur de la cellule, les haptènes forts, comme l'urushiol ou les molécules expérimentales telles que le 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzène

(DNFB) ou l'oxazolone, stimulent la libération de ROS et augmentent l'activité de la hyaluronidase (Esser et al., 2012; Migdal et al., 2010). Ces processus conduisent à la dégradation de l'acide hyaluronique présente dans la matrice extracellulaire (Muto et al., 2014). Les fragments d'acide hyaluronique qui en résultent agissent comme des DAMPs et, en combinaison avec d'autres molécules telles que les HMGB1 ou les bêta-défensines humaines 2 ou 3 (hBD2-3), activent les récepteurs « Toll-like » (TLRs) à la surface des cellules immunitaires (Galbiati et al., 2014). L'activation des TLR2 et TLR4 déclenche la signalisation NF- κ B (« Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ») stimulant ainsi la production de plusieurs cytokines inflammatoires clés dans l'ECA, notamment le TNF α , l'IL-6, l'IL-12, l'IL-23, la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 (Klekotka et al., 2010; Yasukawa et al., 2014). La contribution relative de chacune de ces cytokines à l'initiation de la réaction varie en fonction des haptènes et des modèles étudiés. La production d'IL-1 β et IL-18 dans leur forme active nécessite par ailleurs l'activation de l'inflammasome NLRP3 et de la caspase-1 (Sutterwala et al., 2006; Yasukawa et al., 2014). Comme pour les irritants, l'activation de l'inflammasome est induite indirectement par les lésions cellulaires et la libération d'ATP dans l'espace extracellulaire (Weber et al., 2010). De plus, une étude a montré que l'activation d'une cascade de signalisation ITAM-Syk-CARD9/BCL10 jouait un rôle crucial dans la sensibilisation aux haptènes (Yasukawa et al., 2014). Les signaux générés régulent à la fois l'activation de NLRP3 et de la voie NF- κ B, contrôlant ainsi la synthèse d'IL-1. Enfin, les haptènes forts engendrent une accumulation de protéines mal repliées à l'intérieur de la cellule, entraînant donc également l'activation de la réponse UPR (« unfolded protein response ») pour générer un milieu pro-inflammatoire (Gendrisch et al., 2022; Luís et al., 2014).

Contrairement aux haptènes organiques, les allergènes métalliques utilisent des mécanismes légèrement différents pour initier la réponse innée. Certains possèdent notamment la capacité de lier directement le TLR4 humain (comme le nickel, le cobalt et le palladium) (M. Schmidt et al., 2010). D'autres génèrent la production de ROS mitochondriaux induisant l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Adam et al., 2017; X. Li & Zhong, 2014).

Ainsi, **le stress oxydatif étant au cœur du déclenchement de la réponse initiale, celui-ci doit être étroitement contrôlé par l'activation de systèmes anti-oxydants.** Dans ce contexte, le facteur de transcription Nrf2 (« Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 »), étroitement lié à son répresseur cytosolique : la protéine Keap 1 (« Kelch-like ECH-associated protein 1 »), joue un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie et la tolérance cutanée en régulant négativement le stress oxydant mais également les voies de l'inflammation (Helou et al., 2019). Cela a été démontré dans des modèles murins chez qui l'invalidation de Nrf2 entraîne une exacerbation de la réaction cutanée induite par le 2,4-Dinitrochlorobenzène (DNCB) (El Ali et al., 2013).

3.2.1.3 *La contribution des cellules dendritiques dans le déclenchement de la réponse adaptative*

Les cellules dendritiques sont caractérisées par une forte capacité de capture antigénique du fait de leur prolongement cytoplasmique facilitant leur rencontre avec le complexe haptène-protéine. Elles intègrent une multitude de signaux inflammatoires fournis non seulement par la stimulation directe de leurs PRRs mais aussi par l'environnement cutané et sont capables de convertir ces signaux de danger en stimuli nécessaires à leur maturation, activation, et migration vers les ganglions lymphatiques drainants (Ainscough et al., 2013; Saint-Mezard, Berard, et al., 2004; Vocanson et al., 2009). Plusieurs études ont notamment décrit les interactions entre les kératinocytes et les cellules de langherans (LCs) afin de favoriser la mobilisation de ces dernières à partir de l'épiderme vers les organes lymphoïdes (Antonopoulos et al., 2008; Eaton et al., 2015). D'autres travaux ont exploré la coopération entre les cellules immunitaires résidentes et nouvellement recrutées au niveau cutané pour orchestrer les étapes de maturation et de migration des DCs. Par exemple, dans les modèles murins, la production de TNF- α et d'histamine par les mastocytes cutanés permet l'activation des DCs (A. Dudeck et al., 2011; J. Dudeck et al., 2015). Ce processus est probablement médié par l'activation du récepteur MrgprB2 (ou son homologue humain MRGPRX2) à la surface des mastocytes (Meixiong et al., 2019; Peng et al., 2019). Parallèlement, les mastocytes, aidés par les macrophages cutanés, induisent également le recrutement de neutrophiles depuis le sang périphérique (Biedermann et al., 2000), participant ainsi à l'amplification de l'activation des DCs et leur migration vers les ganglions lymphatiques drainants. Ainsi, la déplétion des mastocytes ou des neutrophiles en amont de la sensibilisation inhibe ou diminue considérablement la migration des DCs et par conséquent l'activation des lymphocytes T spécifiques (Weber et al., 2015).

Le processus de migration des DCs est finement régulé par une expression séquentielle et différentielle de chimiokines et de leurs récepteurs. L'expression des récepteurs CCR1 (« C-C Motif Chemokine Receptor 1»), CCR2, CCR5 et CCR6 promouvant la rétention des DCs dans l'épiderme, en association avec les chimiokines CCL3, CCL4, CCL5 et CCL20 produites par la peau, est fortement diminuée (Dieu et al., 1998). Au contraire, les récepteurs CXCR4 (« C-X-C Motif Chemokine Receptor 4 ») et CCR7 impliqués dans la résidence au niveau des ganglions drainants sont surexprimés et, en associant avec leurs ligands, participent à la migration des DCs vers les ganglions via la formation d'un gradient de chimiokines favorisant le chimiotactisme. La migration des DCs vers les vaisseaux lymphatiques dépend également de la dégradation contrôlée de la matrice extracellulaire par des enzymes protéolytiques telles que les hyalurodinases (Muto et al., 2014) et les métalloprotéinases (Ratzinger et al., 2002).

Il faut rappeler que plusieurs sous-ensembles de DCs résident dans la peau à l'homéostasie. Les LCs colonisent l'épiderme, tandis que les DCs conventionnelles de type 1 et de type 2 (cDC1 et cDC2) sont présentes dans le derme. Les DCs plasmacytoïdes circulantes ou les DCs dérivées de monocytes peuvent également être recrutées dans la peau lors de l'exposition à un haptène et augmenter ainsi le pool de DCs préexistant (Tamoutounour et al., 2013). De nombreux auteurs se sont ainsi intéressés au rôle exact de chacune de ces populations dans la physiopathologie des ECA. Néanmoins, dans les modèles précliniques, la contribution des sous-ensembles de DCs à la sensibilisation dépend non seulement de la souche de souris utilisée mais également de la dose d'haptène appliqué (Clausen & Stoitzner, 2015; Kaplan et al., 2012). Les LCs, exprimant la langerine, induisent une tolérance immunitaire au contact des haptènes faibles (Gomez de Agüero et al., 2012). A contrario, elles sont nécessaires aux réponses induites par des haptènes forts, en particulier à de faibles doses d'allergènes (Bacci et al., 1997; Clausen & Stoitzner, 2015). À des concentrations plus élevées, les haptènes pénètrent davantage dans la peau et sont ainsi facilement pris en charge par les DCs du derme, qui renforcent (ou compensent dans les modèles de déplétion de LCs) la réponse médiée par les LCs (Cho et al., 2017; Edelson et al., 2010; Honda et al., 2010; Noordegraaf et al., 2010). Ainsi, les différents sous ensemble de DCs cutanées peuvent avoir des fonctions redondantes dans les ECA. Néanmoins, ces résultats ont été remis en question dans des modèles spécifiques de souris déplétées en LCs, où les auteurs ont montré que ces cellules pourraient également inhiber les réponses aux haptènes forts de manière dépendante de l'IL-10 (Kaplan et al., 2012). Le rôle exact de cette population dans la phase de sensibilisation reste donc aujourd'hui controversé. Par ailleurs, il n'a pas été démontré que les DCs plasmacytoïdes jouent un rôle clé dans la sensibilisation aux haptènes et les fonctions des DCs dérivées des monocytes reste inconnues (Le Borgne et al., 2006; Tamoutounour et al., 2013).

La maturation phénotypique et fonctionnelle des DCs ainsi que leur migration vers les ganglions lymphatiques est un prérequis indispensable à la génération de lymphocytes T spécifiques d'haptènes.

3.2.2 La réponse adaptative et la résolution de l'inflammation : le rôle clé des cellules T (article de synthèse)

Cette partie a fait l'objet d'une revue de la littérature intitulée : « **Pathophysiology of allergic contact dermatitis with a focus on T cells** » qui sera soumise pour publication dans *Contact Dermatitis*.

Par ailleurs, au cours de mes années de thèse, j'ai effectué un travail bibliographique sur le rôle plus spécifique des lymphocytes T résidents mémoires dans l'ECA, intitulé « Role of tissue-resident memory T cells in the pathophysiology of allergic contact dermatitis », et publié dans *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. Une reproduction de cette revue est disponible en **Annexe 1**.

Pathophysiology of allergic contact dermatitis with a focus on T cells

Marine-Alexia LEFEVRE MD¹, Jean-François NICOLAS MD/PhD¹⁻², Marc VOCANSON PhD¹

Affiliations :

¹ CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, (Team Immunology of Skin Allergy and Vaccination); INSERM, U1111; Univ Lyon; Université de Lyon 1; Ecole Normale Supérieure de Lyon; CNRS, UMR 5308, Lyon, France.

² Department of Allergy and Clinical Immunology, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Benite, France.

Corresponding author:

Marine-Alexia Lefevre – CIRI-INSERM U1111 – 21 Avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France

Tel: +33 4 37 28 23 43 16; e-mail address: marine-alexia.lefevre@inserm.fr

Disclosure statement: The authors declare no competing financial interests.

Word count= 5580 words

Figure count= 1 figure

Abstract

Allergic contact dermatitis (ACD) is a common inflammatory skin disease. It is the prototype of a delayed-type hypersensitivity reaction mediated by the recruitment and activation into the skin of hapten-specific T cells in previously sensitized patients. While cytotoxic CD8⁺ T cells are considered the main effector cells, subsets of CD4⁺ T cells endowed with suppressive activity have been shown to participate in the regulation/resolution of the eczema lesion. Although widely described as type 1 inflammation (associated with IFN γ production), the inflammatory response during ACD is actually a mixed inflammation combining varying degrees of type 2 and 17 responses. These differences in T cell polarization seem to depend on the type of chemicals involved. Recent works also highlighted the key role of skin resident memory T cells, which can persist in the skin for months, in the ACD chronicity and severity. Finally, although ACD has long been regarded as being solely driven by conventional CD4⁺ and CD8⁺ T cells, numerous studies demonstrate an important role of unconventional T cells such as natural killer (NK) T cells and gamma delta ($\gamma\delta$) T cells. Nevertheless, it remains to be determined whether these cells play an effector or regulatory role or both.

Keywords: Allergic contact dermatitis, T lymphocytes, cytotoxic CD8⁺ T cells, regulatory T cells, memory T cells, natural killer T cells, gamma delta T cells, pathophysiology

Abbreviations

ACD: allergic contact dermatitis
ATP: Adenosine-5'-triphosphate
CCL: chemokine ligand
CCR: C-C chemokine receptor type
CHS: contact hypersensitivity
CLA: cutaneous lymphocyte antigen
CTL: cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte-Antigen 4
CXCL: C-X-C motif chemokine ligand
CXCR: C-X-C chemokine receptor
DC: dendritic cell
DETC: dendritic epidermal T cell
DNCB: 2,4-Dinitrochlorobenzene
DNFB: 2,4-dinitro-1-fluorobenzene
FITC: fluorescein isothiocyanate
 $\gamma\delta$ T : gamma delta T cell
GrB: granzyme B
ICOS: inducible t-cell costimulation
IFN- γ : interferon gamma
IL-: interleukin
iNKT: invariant natural killer cell
KO: knock-out
LN: lymph nodes
LZT: low-zone tolerance
mAb: monoclonal antibody
MHC: Major histocompatibility complex
PDL1: programmed cell death 1 ligand 1
Teff: effector T cell
TCM: central memory T cell
TCR: T-cell receptor
TEM: effector memory T cell
TGF: tumor growth factor
Tmem: memory T cell
TNCB: trinitrochlorobenzene
TNF: tumor necrosis factor

TNP: trinitrophenyl

Treg: regulatory T cell

TRM: tissue-resident memory T cell

TSLP: thymic stromal lymphopoietin

Introduction

Allergic Contact Dermatitis (ACD) is one of the most common inflammatory skin disease affecting approximately 15% to 20% of the general population in industrialized countries (1,2). It ranks among the most frequent occupational diseases in Europe (3) and has a significant socioeconomic impact (4). ACD clinically manifests as pruritic eczematous lesions, erythema, local papules and oedema induced by repeated skin contacts with external agents.

ACD pathophysiology relies on a chain of complex, interlinked and finely controlled processes. It is the prototype of a type IV delayed-type hypersensitivity reaction, which develops in individuals who have been previously sensitized to chemical allergens (also called haptens) (5–7). The most common clinically relevant allergens include protein-reactive compounds, such as metals, fragrances, preservatives or rubbers (8). While haptens are non-immunogenic by themselves, by binding to self-proteins they generate neo-antigens that are ultimately recognized by the immune system as “altered self” (9). Unlike irritant contact dermatitis (ICD), which evolves as a consequence of direct toxic effects of physical or chemical agents resulting in keratinocyte damage and local inflammation, ACD critically depends on adaptive immunity and develops in two temporally dissociated phases: sensitization and elicitation (10). After permeation of the allergen into the skin and formation of hapten–self-protein complexes (11), ACD requires the generation of a local inflammatory milieu in the skin for efficient T cells priming in lymphoid organs by migratory skin dendritic cells (DCs) (12). Subsequent exposure to the chemical results in skin inflammation that is mediated by the recruitment and (re)activation of allergen-specific effector/memory T cells (Teff/mem) (5). Regulatory mechanisms, including the regulatory T cells, control the severity of the reaction (13). The persistence of a local and systemic T-cell memory promotes the recurrence of the disease, also known as ACD flares, and progressive worsening of skin inflammation upon hapten re-exposure (14). Originally ACD was regarded as being solely driven by conventional T cells but recently other cell types such as natural killer (NK) T cells (15,16) and gamma delta ($\gamma\delta$) T cells (17,18) have shown to mediate important functions during the response as well.

In this review, after a brief reminder of the general scheme of ACD pathophysiology, we will focus on the major role of T cells that mediate disease initiation, progression, maintenance, and down-regulation suppression.

1. Pathophysiology of allergic contact dermatitis – general scheme

Most of our knowledge on the pathophysiology of ACD comes from animal models referred to as contact hypersensitivity (CHS). Thus, ACD and CHS will be used interchangeably in this review and define a hapten-specific T-cell-mediated skin inflammation.

As the outermost barrier of the human body, the skin is frequently exposed to chemical and physical factors from the environment. The origin and nature of the compounds capable of inducing an ACD reaction are very diverse, and comprise a limited number of strong contact sensitizers (e.g. 2,4-dinitro-1-fluorobenzene (DNFB), dinitrochlorobenzene (DNCB), trinitrochlorobenzene (TNCB), oxazolone) used in animal models of CHS and thousands of weak haptens (e.g. fragrance, dyes, preservatives, rubber, metal ions) responsible for human ACD (19,20). Contact allergens, also called haptens, are low molecular weight chemicals bearing lipophilic residues, allowing them to cross through the corneal barrier. Due to their small size (< 1000 daltons), they are not immunogenic by themselves and need to bind to epidermal proteins to generate new antigenic determinants. The mechanisms by which haptens react towards self-proteins include mainly interactions between electrophilic residues of the chemical and nucleophilic residues of protein amino acids, especially cysteine, lysine or tyrosine, as well as free radical reactions (6,21–23).

However, a majority of haptens are not per se electrophilic but acquire protein reactivity after prior transformation via chemical or physical activators (i.e. oxidation, photo-activation) in the environment, or via biotic activation by detoxifying enzymes in the skin. Such molecules are referred to as prehapten and prohapten, respectively (24–26). Of note, metal ions such as nickel, chromium and cobalt react differently with self-proteins by generating non-covalent coordination chelation complexes with amino acids such as histidine (27).

Several factors impact the formation of hapten–self-protein complexes, such as the size and nature of the contact allergen (28,29), as well as the dose (30), the frequency (31) or the duration (32) of exposure. In addition, genetic factors such as genetic susceptibility of the skin barrier or deficiency of detoxification enzymes should also be taken into account (33–36)

Along with their capacity to form a hapten–protein carrier complex, haptens can deliver toxic/danger signals to skin cells resulting in their activation and production of inflammatory mediators. Indeed, the potency of an allergen is determined by two features: (i) its ability to trigger an innate immune response; and (ii) its ability to induce T cell activation. Therefore, hapten-induced skin inflammation (ICD) conditions the development and severity of ACD responses (37).

ACD pathophysiology is classically divided into two temporally dissociated phases, namely the sensitization and the elicitation phase. However, a regulation/resolution phase of the inflammatory response is also described (Figure 1).

a. Sensitization phase

The sensitization phase (also referred to as afferent phase) results in the priming and expansion of hapten specific T cells upon antigen presentation by DC in the lymph nodes (LNs) (38). It occurs at the first skin contact with a hapten in experimental models using strong haptens (e.g. DNFB).

It is important to note that hapten exposure does not necessarily lead to an efficient T cell sensitization due to immunological tolerance mechanisms (39–41). Indeed, most individuals are daily exposed to various chemicals and still do not develop contact allergy. Nevertheless, under certain circumstances, the penetration and accumulation of the contact allergen in the skin result in the activation of innate immunity and the release of pro-inflammatory mediators, including TNF, interleukin (IL)-6, IL-12, IL-23, IL-1 β and IL-18 (42,43). Generation of this pro-inflammatory milieu is a prerequisite for activation and maturation of DCs that have engulfed hapten–self-protein complexes. Hapten-bearing DCs migrate from the skin to the LNs where specific CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes are primed in the para-cortical area (44). Antigen specific T cells are then activated, proliferate and differentiate into effector and memory subsets able to re-circulate between the lymphoid organs, the blood and the skin (45,46). The sensitization step lasts 10–15 days in human, and 5–7 days in mice, and is generally clinically silent.

b. Elicitation phase and resolution

Elicitation (also known as efferent or challenge phase) occurs in sensitized individuals 24 to 48 hours after a renewed contact with the same hapten. After cutaneous barrier penetration, haptens are captured by epidermal cells (antigen-presenting keratinocytes and DCs) that interact with hapten-specific T cells generated during the sensitization phase. These latter trigger a rapid and efficient inflammatory response and contribute to the recruitment of other circulating T cells (38). Studies highlighted the major role of cytotoxic CD8⁺ T cells (47). Their activation results in keratinocyte apoptosis (via the production of proteases as granzyme B (GrB) and perforin, and the activation of the Fas-FasL pathway) and is accompanied by the release of pro-inflammatory cytokines that amplify skin inflammation (48,49). In addition, unconventional T lymphocytes, including gamma delta ($\gamma\delta$) T cells and natural killer T cells (NKT), as well as innate immune cells (e.g. monocytes / macrophages, neutrophils, eosinophils, mast cells or innate lymphoid cells), accumulate in ACD lesions, further worsening the inflammatory process (50–53).

This leads to the establishment of the ACD lesion.

c. Resolution phase

The inflammatory reaction persists for only a few days and rapidly decreases following down-regulatory mechanisms.

This resolution phase involves different regulatory processes including activation of Foxp3⁺ IL-10⁺ regulatory T cells (Tregs) (13,54,55), increased expression of co-inhibitory molecules by resident immune cells (56), and the release of anti-inflammatory cytokines.

In addition, during this phase T_{eff} are progressively replaced by a large population of T_{mem}, including central memory T cells (TCM), effector memory T cells (TEM) and tissue-resident memory T cells (TRM), which enable a faster and more effective immune response upon future hapten reexposure (57).

2. Hapten specific T cell activation

ACD is dependent on the priming of T cells during the sensitization phase. Thus, T-cell activation is a crucial step in the establishment of anti-hapten immunity and requires the engagement of T-cell receptor (TCR). Then, differentiation of primed CD4⁺ and CD8⁺ T-cell precursors is mainly dependent on the type of cytokines secreted during DC–T cell interactions, resulting to variable polarization.

a. Classical and non-classical MHC/TCR recognition

T lymphocytes usually recognize hapten-modified peptides presented in the binding grooves of self-major histocompatibility complex (MHC)-molecules (58). Our molecular understanding of the interaction of the TCR with chemicals presented in the context of MHC molecules has significantly increased (59–61). Classical haptens are recognized by T cells as covalently hapten-modified MHC-bound peptides (62–64). In contrast, metal ions such as nickel form noncovalent complexes with amino acids such as histidine in both MHC molecules and the TCR (65,66). Furthermore, some organic chemicals such as drugs may be recognized by T cells without covalent binding to carrier peptides on MHC as formulated in the p-i concept proposed by Pichler et al. (67,68).

More recently, it has been showed that some T cells activated in response to hapten exposure are not restricted to conventional MHC class I or class II molecules. Indeed, Kim et al. showed that the activation of lipid-antigen presenting molecule CD1-restricted T cells by contact sensitizers such as uroshiol could be a novel mechanism in allergic contact dermatitis (69). Other recent studies based on in vitro T cell clone technology have demonstrated that many small and extremely hydrophobic haptens, such as DNCB, cinnamaldehyde, benzoate or benzyl cinnamate, stimulate the production of inflammatory cytokines by T cells restricted for cell-surface glycoproteins CD1a, CD1b, CD1c or the antigen-presenting glycoprotein CD1d (70,71). The molecular mechanisms of this non-classical presentation remain unclear, but it has been suggested that after their sequestration within CD1, haptens could (i) serve as classical epitopes, (ii) unmask the CD1a surface or (iii) displace endogenous self-lipids to stimulate TCR responses (71).

Nevertheless, while the pathways through which contact sensitizers act on MHC-restricted T cells are well described, very little is known of the potential roles of non-MHC-restricted T cells within ACD and more investigation are required.

b. T cells polarization

Hapten sensitization results in activation and proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells within 5-7 days in mice or 10-15 days in humans. A wide range of T cell polarization has been described both in animals and patients and seems to depend on models and type of chemicals. Effector T lymphocytes mainly

produce type 1 (IFN γ , TNF), type 17 (IL-17) and type 22 (IL-22) cytokines, but type 2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) cytokines release has also been reported, notably in chronic forms (38,72–74). This variability in T cell polarization appears to be related to the ability of haptens to activate specific pathways of innate immunity. It has been shown that by binding TL4 nickel promotes IL-17-producing T cells by stimulating IL-23 secretion by DCs (75). Tang et al. reported that the fluorescein isothiocyanate (FITC)-induced CHS response is type 2 dominant, whereas the DNFB response is type 1 dominant (76). Indeed, FITC exposure leads to thymic stromal lymphopoietin (TSLP) release by keratinocytes, thus mediating a type 2 differentiation (77). Because DCs play a central role for T-cell activation/polarization, it can be assumed that the state and modulation of their maturation may have a significant impact on this process. Mice depleted for STAT5 in DCs are unable to respond to TSLP, indicating that STAT5 may be a critical component in promoting type-2 immunity (78). Alternatively, protein kinase CK2 was reported to promote type 1 polarization in response to nickel or DNCB, by regulating the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-23) (79).

Recently, Dhingra et al. performed gene array studies using skin samples from positive patch-tests lesions induced by various chemicals (80). In addition to identifying 149 differentially expressed genes common to all contact allergen-treated samples, they identified a significant number of genes regulated in a contact allergen-specific manner, with prominent type 1 and type 17 polarization induced by molecules such as nickel and mixed type 1–type 17–type 2 polarization in response to fragrances and rubber (80). This study clearly shows that the clinical appearance of ACD can be very similar for different contact allergens while the underlying immune responses can be very different. Nevertheless, to date, the reason why certain haptens can stimulate different pathways of innate immunity remains largely unknown.

3. Development of ACD lesion: key role of CTL

Hapten skin-painting in sensitized individuals induces the ACD skin inflammatory reaction, resulting from the early recruitment of activated hapten-specific T cells, especially CD8⁺ T cells, and the production of cytotoxic mediators and inflammatory cytokines/chemokines. These mechanisms progressively induce the morphological and clinical changes characteristic of ACD.

a. T cells recruitment

Recruitment of hapten-specific-T cells into the skin is finely orchestrated by chemokine release from resident or newly immigrated skin cells. Upon hapten-induced inflammation and TNF- α /IL-1 β release, T_H17 cells are recruited from the blood via up-regulation of E-/P-selectins and VCAM-1/ICAM-1 constitutively expressed on endothelial cells. They are then directed to the dermis and epidermis notably through the up-regulation of chemokine ligand (CCL) 2, CCL5, CCL20, CCL22 or CCL27, which are detected as early as 6–12 h after hapten challenge. Subsequently, TCR-engagement of newly recruited

effector cells induces the release of type 1 cytokines such as IFN- γ and TNF- α , as well as IL-4 and IL-17, which in turn stimulate the secretion of C-X-C chemokine receptor (CXCR) 3 ligands C-X-C motif chemokine ligand (CXCL) 10, CXCL11 and CXCL9, by keratinocytes, mast cells or other skin cells (81,82). This complex production of cytokines and chemokines then shapes and amplifies the inflammatory response initiated by hapten exposure. This same mechanism participates in the recruitment and the accumulation of other inflammatory cells such as neutrophils, eosinophils, mast cells, monocytes/macrophages or unconventional lymphocytes, such as $\gamma\delta$ T cells, NKT cells and innate lymphoid cells in ACD lesion, thus enhancing the inflammatory process (18,50–52,83).

By producing IFN γ , TNF- α and IL-17 (84,85), they activate the endothelium to produce CXCL1, CXCL2 and CXCL8, which results to early neutrophils extravasation into the skin (86). Neutrophils, in turn, release granules that contain multiple attractants or cytotoxic mediators leading to tissue damage (87).

b. CD8⁺ T cells are the main effector cells in ACD

Numerous experiments have suggested that CD8⁺ T cells are the main effector cells in CHS, whereas CD4⁺ T cells behave as down-regulatory cells (44,88–90). This was first demonstrated by monoclonal antibody (mAb)-dependent depletion of CD4⁺ or CD8⁺ T cells in vivo, resulting in reduced or enhanced CHS responses, respectively (49,91). Additionally, studies using gene targeted mice have confirmed these findings, as MHC class I knock-out (KO) mice (90) or CD8 KO mice (92) are unable to develop CHS to haptens. On the other hand, MHC II knock-out mice lacking CD4⁺ T cells showed a fulminant allergic response (90), thus challenging the concept of a CD8⁺ T cell immunity dependent on CD4⁺ T cell help (93). It can be speculated that strong haptens have the ability to deliver effective innate inflammatory signals and could circumvent the helper-dependence of CD8⁺ T cells priming.

A variety of effector mechanisms are used by CD8⁺ T cells to induce inflammation in ACD, such as cytokine production and cytotoxicity. The major contribution of type 1 and type 17 cytokines has been demonstrated in mice deficient in IFN- γ / IFN- γ receptors or IL-17, respectively, which exhibit an impaired CHS reaction (94,95). Both cytokines act synergistically on keratinocytes activation, resulting in maintenance of the inflammatory response.

Regardless of the role of cytokines in the ACD pathogenesis, CD8⁺ T-cell cytotoxicity appears to be mandatory for the development of CHS responses as mice deficient in the two main cytotoxic pathways, i.e. Fas/Fas-L and perforin, were unable to develop an ACD reaction despite the presence of IFN- γ -producing CD8⁺ T cells at the hapten challenge site (96). Furthermore, the two CD8⁺ CTL pathways are redundant as abrogation of ACD occurred only in Fas-L- and perforin double-deficient mice. This demonstrates that cytotoxicity is necessary for the development of the pathologic process and that one cytotoxic pathway may compensate for the absence of the other (96). Keratinocytes have been shown to be the primary targets of the cytotoxic effect of hapten-specific CD8⁺ T cells (97). The resulting

epidermal damage facilitates the penetration of haptens, which may increase the inflammation (98). Whether type-1 and type-17 T cells feature diverse cytotoxic properties remains to be established.

c. CD4+ T cells may eventually mediate ACD

Although most studies have emphasized the major effector role of CD8+ T cells in ACD, it cannot be excluded that CD4+ T cells in some circumstances may contribute as effector cells as well. Findings suggest a context-dependent role of both cell types in CHS, depending on the mouse model and the nature of the allergen used.

Hapten-specific CD4+ T cells may participate in inflammation in support of effector CD8+ T cells. Cavani et al. observed that like CD8+ T cells, which kill resting nickel-modified keratinocytes in vitro, CD4+ Th1 clones were also able to kill keratinocytes, but exclusively after MHC class II induction by IFN- γ . Thus, they may cooperate with CD8+ T cells at a later time point to cause tissue damage (97).

Nevertheless, in the absence of CD8+ T cells, CD4+ T cells are able to induce ACD. This was demonstrated in a CHS model to trinitrophenyl (TNP). Indeed, MHC I-deficient mice were able to develop a normal CHS that was abrogated by CD4+ T cells depletion (99).

Furthermore, single chemicals, such as FITC and formaldehyde, have been hypothesized to induce preferential type 2 cytokine production by CD4+ T cells in LNs, mediating the CHS reaction (100).

Despite the different findings, CD8+ T cells are thought to be the major effector cells and CD4 cells are split between a minor fraction of effector CD4+ Th1 cells and a major fraction of suppressor/regulatory CD4+ T cells. When CD8+ T cells are absent, CD4+ Th1 cells are able to mediate a diminished but significant response. The reason why CHS effector cells are only confined to the CD8+ T cell pool in normal mice could be explained by studies of Martin et al. who showed that CD8+ T cells induce Fas-mediated apoptosis of CD4+ T cells, thus preventing the priming/expansion of hapten-specific CD4+ T cells during the sensitization phase of CHS (99).

4. Regulation of skin inflammation

Resolution of the ACD reaction requires the removal of the offending allergen and the activation of numerous regulatory mechanisms, including the recruitment and activation of Treg, in particular the CD4+CD25+FoxP3+ subpopulation, which has been shown to be crucial in controlling inflammation.

a. Regulatory pathways

Down-regulation of ACD was initially attributed to the clearance of the hapten from the skin. However, recent studies have shown that hapten can persist for more than a month (101). Today, it seems clear that numerous regulatory mechanisms suppress the inflammation to prevent tissue damage.

A variety of immune cells with regulatory potential have been shown to be activated in parallel of effector T cells, such as regulatory T and B cells (102–104), and invariant NKT (iNKT) cells, which limit DCs activation and the expansion, differentiation and egress of effector T cells from the LN (13,16,105). Of note, three main subsets of regulatory CD4⁺ T cell have been identified: i) antigen-specific Tr1 cell clones which produce large amounts of the immunosuppressive cytokine IL-10 (106); ii) antigen-specific Th2-type CD4⁺ T cells that antagonize the type 1 T cell effectors characteristic of CHS; and iii) ICOS⁺ forkhead box protein P3 (FoxP3)⁺ Treg cells (107,108).

Although partially understood, the regulatory mechanisms are multiple and involve direct cell–cell contact via gap junctions or Fas–FasL signaling (109,110), the secretion of inhibitory cytokines such as IL-10 and TGFβ (104), the engagement of regulatory ligands such as programmed cell death 1 ligand 1 (PDL1) (111–113) or cytotoxic T-lymphocyte-Antigen 4 (CTLA-4) (114–116), the regulation of Adenosine-5'-triphosphate (ATP) turnover in skin and LNs, leading to downregulation of CD62L expression in CD8⁺ T cells (117), and possibly the deprivation of the IL-2 pool (118).

Interestingly, repeated application of a nonsensitizing amount of a strong sensitizer (e.g. DNFB or oxazolone) induces a tolerance window, during which any further skin application of the hapten at an optimal sensitizing dose does not result in priming of effector cells, thus preventing the development of ACD. This phenomenon referred to as low-zone (low-dose) tolerance (LZT), is mediated by IL-4/IL-10-secreting CD8⁺ Tregs that are generated in presence of Tr1 CD4⁺ T cells (119).

b. CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells

The relative contribution of different regulatory cell subsets in the control and the resolution of ACD remains unclear. Nevertheless, several studies reported the crucial role of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T cells to prevent hapten-specific responses (13,120). Indeed, Treg depletion by anti-CD25 mAb prior sensitization led to an increased CD8⁺ T-cell priming and an enhanced ACD reaction (118,120,121). Moreover, treatment with an IL-2-IgG2b fusion protein, showed a decreased CHS reaction associated with an increase in the Treg subset (108), and adoptive transfer of CD4⁺ CD25⁺ T cells reduced the CHS response significantly (122).

Tregs may exert their regulatory function both in the LN, during expansion and differentiation of effector T cells, and in the skin, during inflammatory process. The immunosuppressive mechanisms by which CD4⁺ CD25⁺ T cells function are not yet fully understood, but several pathways have been described such as cell-cell contact-dependent mechanisms and the release of anti-inflammatory mediators (13,123–125). Treg cells interact with DCs in the dLNs by establishing gap junctions (109), leading to downregulation of the DCs/T cell–activation abilities, or by their constitutive expression of CTLA-4, resulting in inhibition of IL-2 secretion (76). These phenomena lead to abrogation of T-cell priming and subsequent sensitization. It has also been shown that the development and expansion of hapten-specific CD8⁺ T cells is restricted by CD4⁺ CD25⁺ T cells through a FasL-dependent

mechanism (110). In the skin, Tregs exert their regulatory function through the secretion of suppressor cytokines, including IL-10 (126). In addition, they control the recruitment of effector T cell via the production of adenosine which results in down-regulation of E-selectin and P-selectin expression by endothelial cells (127,128).

Therefore, cutaneous Tregs play an important role in terminating the ACD reaction and in the control of systemic immune responses.

5. Development of local and systemic memory

ACD manifests as eczema flares after each new exposure to a hapten. The exacerbations tend to occur with increasing rapidity, worsen over time, and generally occur at the same sites (10). This clinical observation led to an interest in the contribution of memory T cells in ACD. Although the various Tmem share certain characteristics, they are not a homogenous population. Indeed, a number of subsets, distinguishable by their circulatory and functional properties, have been identified.

a. Circulating memory T cells

Emigration of newly activated T cells from LNs into the circulation is associated with modifications in chemokine and adrenergic receptors expression. Two subsets of memory T cells are then generated:

- (i) The central memory T cells (TCM) circulate in the lymphoid organs through C-C chemokine receptor type (CCR) 7 expression. They have no direct effector activity, but rather the ability to proliferate and differentiate rapidly into effector cells in response to a secondary antigen challenge (129–131).
- (ii) The effector memory T cells (TEM) circulate in blood and peripheral tissues through the expression of skin-homing markers such as CCR4 and cutaneous lymphocyte antigen (CLA). Upon antigen recognition, they rapidly acquire effector capacities, with limited proliferation (129–131).

Upon new allergen challenge, hapten-specific TEM may act immediately with a quick and strong release of IFN- γ . In addition, they accelerate the recruitment of newly generated effector T cells through CCL5 expression. This phenomenon confers an increased effective T-cell response (132). On the other hand, TCM participate to the preservation of the hapten-specific T cells pool.

More recently, a third population has been identified, i.e., tissue-resident memory T cells (TRM). These cells survive for several months within the peripheral tissues (including epithelial barriers) of the organism without recirculating after resolution of inflammation and have been shown to play a crucial role in the recurrence of eczema by providing an extremely rapid and effective response after new antigen exposures. (14,133,134).

b. Resident memory T cells

Because of their tissue residency and distinct functions, TRM have specific transcriptional programs and characteristics (135). Two phenotype markers, CD69 and CD103, favouring their retention and survival within the tissues, are conventionally used to differentiate TRM from other circulating T cells (136). Furthermore, micro-environmental signal responses - TGF β , TNF α , IL-33, IL-7 and IL-15 promote TRM differentiation (137–139).

Several studies have shown that TRM are involved in the pathophysiology of ACD. Most emphasize a major role for CD8⁺ TRM (14,101,140,141) and a recent study highlighted an important role for CD4⁺ TRM in CHS (142)

During the sensitization phase, hapten-specific TRM and TCM are generated in equal number from a common precursor cell (140). TRM domiciliate in the skin tissue under the influence of keratinocyte-derived IL-15 and IL-7 (143), autocrine production of TGF β (139), and the persistence of the allergen in the epidermis, which can still be detected one month after contact (101). They furnish a rapid (<24 hours) and intense immune response (by releasing IFN γ , IL-17 and GrB), in contrast to their circulating counterparts (>48–72 hours). TRM have been showed to gather preferentially at the site of contact, and allergen reexposure causes a more severe ACD flare-up at antigen-non-naive compared to antigen-naive sites (101). The tendency of TRM to accumulate in tissues repeatedly exposed to allergens may explain why ACD worsens over time, with more severe lesions appearing more rapidly with each exposure (14,101,140–142). Indeed, Schmidt et al. showed that the clinical response correlated with epidermal TRM levels, and IFN γ and IL-17 expression (14). Similarly, Gadsboll et al. demonstrated a clinical correlation between reaction intensity and epidermal CD8⁺ TRM, and a correlation of the latter with the applied allergen dose and the number of exposures (141).

Importantly, TRM are also able to tame excessive responses to avoid tissue damage, especially for low-dose allergen exposure (101). These regulatory mechanisms involve co-inhibitory molecules (e.g., PD-1, LAG-3, TIM-3 and 2B4) (137) and anti-inflammatory cytokines (e.g., IL-10 and TGF β) that stimulate Treg (144).

Therefore, TRM appear to be key players in ACD recurrence, and the development of therapeutic strategies to target hapten-specific TRM may be a new perspective in ACD treatment.

6. Role of unconventional T cells

In addition to conventional CD4⁺ and CD8⁺ T cells, unconventional T lymphocytes including $\gamma\delta$ T cells and natural killer T cells have been reported to be involved in the ACD response. (52,145–148).

a. NKT cells

NKT cells are a subpopulation of T cells that express a TCR with a majority invariant TCR V α chain (V α 14J α 18 in mice and V α 24J α 18 in humans) paired with a restricted subset of TCR V β chains (149), and recognize highly conserved endogenous and microbial glycolipids, presented on CD1d molecules (150,151).

The presence of CD1d-restricted invariant Natural Killer T (iNKT) cells in skin lesions of patients with ACD has been reported at elicitation sites compared to normal skin (52). Mouse studies also provided evidence that iNKT cells may participate in the inflammatory response to haptens, usually by influencing the response of other immune cell types. iNKT cells have been shown to potentiate the inflammatory response to TNCB (15,150,151), facilitating the activation of B1-cells (152), or promoting dendritic cell survival and maturation in draining lymph nodes (153).

Data indicate that the sensitization phase depends on hepatic iNKT cells that are rapidly activated after hapten exposure to produce IL-4, which in turn activates B-1 cells in the presence of hapten to produce IgM antibodies (150,152,154,155).. The latter form immune complexes with the allergen to induce complement C5a generation. This in turn stimulates mast cells to release vasoactive mediators, stimulating local endothelium to allow extravasation of effector T cells (156–158).

A regulatory role of CD1d-restricted T cells in response to DNFB has also been suggested (159). Goubier et al showed that iNKT can reduce the severity of CHS reaction through their expression of IL-4 and IL-13. Their suppressive function is independent of Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) (16).

Thus, it is most likely that NKT cells exert a dual function during CHS, since they can be both effector and immunoregulatory cells. The relative importance of these two opposing functions in CHS may depend on the mouse strain, the nature and doses of hapten, and sensitization protocols.

b. $\gamma\delta$ T cells

$\gamma\delta$ T cells are T cells that express heterodimers of the γ and δ chains of TCR (9). These cells are present in the skin, both in dermis and epidermis (referred to as dendritic epidermal T cell [DETC] in mice); express limited or invariable TCRs; and show a phenotype similar to that of T cells, which allows them to react rapidly to antigen challenge (160).

The presence of $\gamma\delta$ T cells in human skin, and especially in ACD skin, has been known for some time, whereas the biological role and repertoire have not been completely elucidated (161–163). In addition, it is debated whether $\gamma\delta$ T cells act in a pro- or anti-inflammatory manner (17,18,146,164–170).

In CHS model it has been reported that DETCs rapidly produced IL-17 in response to contact allergens. Nielsen et al. suggested a contact allergen-induced interaction between epidermal $\gamma\delta$ T cells and keratinocytes, which results in an IL-1 β -driven and NKG2D/NKG2DL-dependent T-cell activation and production of IFN- γ and IL-17 (146,147). In addition, Jiang et al. reported a role for dermal $\gamma\delta$ T cells in promoting CHS through IL-17-dependent neutrophil recruitment (166).

On the other hand, it has also been suggested that DETCs may provide local and non-redundant regulation of hapten-related skin inflammation (18,167,168,171). Guan et al. found that a lack of $\gamma\delta$ T cells correlated with increased CHS after oxazolone challenge (169).

One explanation for the conflicting results on the role of $\gamma\delta$ T cells in the response to contact allergens might be the use of different mouse models to induce CHS. Thus, further investigations using combination of various $\gamma\delta$ T cells ablation strategies, together with CHS model might bring new insights to the role of DETC during the inflammatory response.

The role of $\gamma\delta$ T cells in ACD in humans is poorly characterized. They have been showed to infiltrate the epidermis and dermis at later time point after challenge with DNCB, suggesting a role in the amplification or resolution of ACD reaction but not in its initiation (172). In addition, skin challenge with nickel in nickel-allergic patients, resulted in increase in $\gamma\delta$ T cells that produced IFN- γ , IL-17A, and IL-22 in the dermis (72), suggesting a pro-inflammatory role in the response to nickel.

Although $\alpha\beta$ T cells are certainly central mediators of ACD, more studies on human unconventional T cells should be conducted to fully characterize their role in ACD.

7. Conclusion

Much progress has been made in our understanding of the pathomechanism of ACD. It is a highly complex process mediated by hapten-specific T cells, resulting from a loss of immune tolerance to environmental chemicals. Surprisingly, since chemical allergens are able to simultaneously generate immunogenic determinants for both hapten-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells, cytotoxic CD8⁺ T cell are considered to be the main/dominant effector cells, whereas CD4⁺ T cell are involved in the regulation/resolution of the inflammation. This dichotomy could be explained by cell recruitment kinetics. Indeed, CD8⁺ T cells are recruited very early in the tissue, about 6h after allergen exposure, whereas CD4⁺ T cell infiltration occurred at least 24h later (49). Differential expression of homing receptors and sequential expression of chemokines in the skin may account for the selective attraction of CD8⁺ effector cells, preceding that of CD4⁺ T cells. Another possible explanation may be cell location. Since CD8⁺ T cells are found in both the epidermis and dermis, whereas CD4⁺ T cells are primarily located in the dermis, they may be more prone to respond first to an allergen encounter. Finally, Martin et al. also suggested that CD8⁺ T cells could prevent priming of CD4⁺ T cells through a Fas-mediated, perforin-independent, induction of apoptosis. This concept has been demonstrated in vitro (99).

In addition to conventional T cells, unconventional T cells such as NKT and $\gamma\delta$ T cells have also emerged as important players in ACD pathophysiology. By contrast to conventional T cells recognizing protein allergen-derived peptide antigen presented by MCH-I or MHC-II, the latter recognize lipid antigen presented via non-classical MCH-I-like molecules. Nevertheless, little is known about the exact nature of the antigens recognized by these cells. It has been speculated that the glycolipids mediating the

activation of iNKT may be derived from commensals or generated endogenously in response to tissue stress resulting from barrier disruption during the ACD reaction (173). In addition, contact allergens could activate $\gamma\delta$ T cells via indirect pathways inducing stress molecules expressed or secreted by keratinocytes (146). Another further important question for future investigation remains about their exact contribution to the ACD reaction as both an effector and regulatory role as been suggested. Furthermore, it also remains to be established whether there is collaboration between $\alpha\beta$, $\gamma\delta$ and NK T cells during ACD response.

Finally, better understanding of the mechanisms underlying cellular activation and mediators released after hapten exposure as well as the molecular events leading to allergen sensitization or tolerance could lead to the discovery of new potential targets to strengthen the therapeutic armamentarium in ACD, which is still poorly developed to date.

References

1. Svensson A, Ofenloch RF, Bruze M, Naldi L, Cazzaniga S, Elsner P, et al. Prevalence of skin disease in a population-based sample of adults from five European countries. *Br J Dermatol*. 2018;178(5):1111–8.
2. Diepgen TL, Ofenloch RF, Bruze M, Bertuccio P, Cazzaniga S, Coenraads PJ, et al. Prevalence of contact allergy in the general population in different European regions. *Br J Dermatol*. 2016 Feb;174(2):319–29.
3. Ring J. Occupational skin disease - a major health problem in Europe. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017 Jun;31(6):919–20.
4. Sartorelli P, Kezic S, Larese Filon F, John SM. Prevention of occupational dermatitis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011 Mar;24(1 Suppl):89S-93S.
5. Vocanson M, Hennino A, Rozières A, Poyet G, Nicolas JF. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*. 2009 Dec;64(12):1699–714.
6. Karlberg AT, Bergström MA, Börje A, Luthman K, Nilsson JLG. Allergic contact dermatitis--formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers. *Chem Res Toxicol*. 2008 Jan;21(1):53–69.
7. Martin SF, Rustemeyer T, Thyssen JP. Recent advances in understanding and managing contact dermatitis. *F1000Res*. 2018;7.
8. Uter W, Werfel T, White IR, Johansen JD. Contact Allergy: A Review of Current Problems from a Clinical Perspective. *Int J Environ Res Public Health*. 2018 29;15(6).
9. Kaplan DH, Igyártó BZ, Gaspari AA. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol*. 2012 Jan 13;12(2):114–24.
10. Nosbaum A, Vocanson M, Rozieres A, Hennino A, Nicolas JF. Allergic and irritant contact dermatitis. *Eur J Dermatol*. 2009 Aug;19(4):325–32.
11. Landsteiner K, Jacobs J. STUDIES ON THE SENSITIZATION OF ANIMALS WITH SIMPLE CHEMICAL COMPOUNDS. II. *J Exp Med*. 1936 Sep 30;64(4):625–39.
12. Esser PR, Martin SF. Pathomechanisms of Contact Sensitization. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017 Nov 11;17(12):83.
13. Vocanson M, Rozieres A, Hennino A, Poyet G, Gaillard V, Renaudineau S, et al. Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Aug;126(2):280–9, 289.e1-7.
14. Schmidt JD, Ahlström MG, Johansen JD, Dyring-Andersen B, Agerbeck C, Nielsen MM, et al. Rapid allergen-induced interleukin-17 and interferon- γ secretion by skin-resident memory CD8(+) T cells. *Contact Derm*. 2017 Apr;76(4):218–27.
15. Askenase PW, Majewska-Szczepanik M, Kerfoot S, Szczepanik M. Participation of iNKT cells in the early and late components of Tc1-mediated DNFB contact sensitivity: cooperative role of $\gamma\delta$ -T cells. *Scand J Immunol*. 2011 May;73(5):465–77.
16. Goubier A, Vocanson M, Macari C, Poyet G, Herbelin A, Nicolas JF, et al. Invariant NKT cells suppress CD8(+) T-cell-mediated allergic contact dermatitis independently of regulatory CD4(+) T cells. *J Invest Dermatol*. 2013 Apr;133(4):980–7.
17. Askenase PW, Ptak W, Szczepanik M. gamma delta T cells in normal murine spleen assist immunized alpha beta T cells in the adoptive cell transfer of contact sensitivity: effect of Bordetella pertussis, Cyclophosphamide, and antipressor T cell monoclonal antibodies. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995 Jun;107(1–3):363.
18. Girardi M, Lewis J, Glusac E, Filler RB, Geng L, Hayday AC, et al. Resident skin-specific gammadelta T cells provide local, nonredundant regulation of cutaneous inflammation. *J Exp Med*. 2002 Apr 1;195(7):855–67.
19. Belsito DV. The diagnostic evaluation, treatment, and prevention of allergic contact dermatitis in the new millennium. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Mar;105(3):409–20.
20. Blauvelt A, Hwang ST, Udey MC. 11. Allergic and immunologic diseases of the skin. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Feb;111(2 Suppl):S560-570.

21. Lepoittevin JP, Leblond I. Hapten-peptide-T cell receptor interactions: molecular basis for the recognition of haptens by T lymphocytes. *European Journal of Dermatology*. 2000 Jul 6;7(3):151–4.
22. Divkovic M, Pease CK, Gerberick GF, Basketter DA. Hapten-protein binding: from theory to practical application in the in vitro prediction of skin sensitization. *Contact Dermatitis*. 2005 Oct;53(4):189–200.
23. Aptula AO, Roberts DW. Mechanistic applicability domains for nonanimal-based prediction of toxicological end points: general principles and application to reactive toxicity. *Chem Res Toxicol*. 2006 Aug;19(8):1097–105.
24. Lepoittevin JP. Metabolism versus chemical transformation or pro- versus prehaptens? *Contact Dermatitis*. 2006 Feb;54(2):73–4.
25. Aptula AO, Roberts DW, Pease CK. Haptens, prohaptens and prehaptens, or electrophiles and proelectrophiles. *Contact Derm*. 2007 Jan;56(1):54–6.
26. Karlberg AT, Börje A, Duus Johansen J, Lidén C, Rastogi S, Roberts D, et al. Activation of non-sensitizing or low-sensitizing fragrance substances into potent sensitizers - prehaptens and prohaptens. *Contact Dermatitis*. 2013 Dec;69(6):323–34.
27. Schmidt M, Goebeler M. Immunology of metal allergies. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2015 Jul;13(7):653–60.
28. Fitzpatrick JM, Roberts DW, Patlewicz G. What determines skin sensitization potency: Myths, maybes and realities. The 500 molecular weight cut-off: An updated analysis. *J Appl Toxicol*. 2017;37(1):105–16.
29. Sekiguchi K, Kurohane K, Tsutsumi M, Mochizuki N, Orii A, Nose M, et al. Enhancement of mouse contact hypersensitivity appears with a short chain triacylglycerol but not with a long chain one. *Toxicology*. 2019 15;412:48–54.
30. Popov A, Mirkov I, Vasilijic S, Zolotarevski L, Kataranovski D, Kataranovski M. Impact of the magnitude of sensitization dose on the incidence and intensity of CHS to dinitrochlorobenzene (DNCB): insight from ear swelling and challenged-skin draining lymph node response in rats. *J Immunotoxicol*. 2013 Dec;10(4):355–60.
31. Paramasivan P, Lai C, Pickard C, Ardern-Jones M, Healy E, Friedmann PS. Repeated low-dose skin exposure is an effective sensitizing stimulus, a factor to be taken into account in predicting sensitization risk. *Br J Dermatol*. 2010 Mar;162(3):594–7.
32. van Och FMM, Vandebriel RJ, De Jong WH, van Loveren H. Effect of prolonged exposure to low antigen concentration for sensitization. *Toxicology*. 2003 Feb 14;184(1):23–30.
33. Friedmann PS, Sanchez-Elsner T, Schnuch A. Genetic factors in susceptibility to contact sensitivity. *Contact Dermatitis*. 2015 May;72(5):263–74.
34. Schnuch A, Westphal G, Mössner R, Uter W, Reich K. Genetic factors in contact allergy--review and future goals. *Contact Derm*. 2011 Jan;64(1):2–23.
35. Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Shimizu A, Mizuno H, et al. Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jun;129(6):1538-1546.e6.
36. Petersen TH, Jee MH, Gadsbøll ASØ, Schmidt JD, Sloth JJ, Sonnenberg GF, et al. Mice with epidermal filaggrin deficiency show increased immune reactivity to nickel. *Contact Derm*. 2019 Mar;80(3):139–48.
37. Bonneville M, Chavagnac C, Vocanson M, Rozières A, Benetiere J, Pernet I, et al. Skin contact irritation conditions the development and severity of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2007 Jun;127(6):1430–5.
38. Vocanson M, Hennino A, Rozières A, Poyet G, Nicolas JF. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*. 2009 Dec;64(12):1699–714.
39. Gomez de Agüero M, Vocanson M, Hacini-Rachinel F, Taillardet M, Sparwasser T, Kissenpfennig A, et al. Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8(+) T cells and activating Foxp3(+) regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2012 May;122(5):1700–11.
40. Cavani A, Nasorri F, Ottaviani C, Sebastiani S, De Pità O, Girolomoni G. Human CD25+ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals. *J Immunol*. 2003 Dec 1;171(11):5760–8.

41. Luckey U, Schmidt T, Pfender N, Romer M, Lorenz N, Martin SF, et al. Crosstalk of regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells prevents contact allergy in subjects with low zone tolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Sep;130(3):781-797.e11.
42. Klekotka PA, Yang L, Yokoyama WM. Contrasting roles of the IL-1 and IL-18 receptors in MyD88-dependent contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. 2010 Jan;130(1):184–91.
43. Yasukawa S, Miyazaki Y, Yoshii C, Nakaya M, Ozaki N, Toda S, et al. An ITAM-Syk-CARD9 signalling axis triggers contact hypersensitivity by stimulating IL-1 production in dendritic cells. *Nat Commun*. 2014 May 7;5:3755.
44. Xu H, DiIulio NA, Fairchild RL. T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (Il) 4/Il-10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells. *J Exp Med*. 1996 Mar 1;183(3):1001–12.
45. Vocanson M, Hennino A, Chavagnac C, Saint-Mezard P, Dubois B, Kaiserlian D, et al. Contribution of CD4(+) and CD8(+) T-cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2005 May;1(1):75–86.
46. Mora JR, von Andrian UH. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol*. 2006 May;27(5):235–43.
47. Vocanson M, Hennino A, Cluzel-Tailhardat M, Saint-Mezard P, Benetiere J, Chavagnac C, et al. CD8+ T cells are effector cells of contact dermatitis to common skin allergens in mice. *J Invest Dermatol*. 2006 Apr;126(4):815–20.
48. Trautmann A, Akdis M, Kleemann D, Altnauer F, Simon HU, Graeve T, et al. T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J Clin Invest*. 2000 Jul;106(1):25–35.
49. Akiba H, Kehren J, Ducluzeau MT, Krasteva M, Horand F, Kaiserlian D, et al. Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8+ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *J Immunol*. 2002 Mar 15;168(6):3079–87.
50. Meixiong J, Anderson M, Limjunyawong N, Sabbagh MF, Hu E, Mack MR, et al. Activation of Mast-Cell-Expressed Mas-Related G-Protein-Coupled Receptors Drives Non-histaminergic Itch. *Immunity*. 2019 21;50(5):1163-1171.e5.
51. Tamoutounour S, Williams M, Montanana Sanchis F, Liu H, Terhorst D, Malosse C, et al. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity*. 2013 Nov 14;39(5):925–38.
52. Gober MD, Fischelevich R, Zhao Y, Unutmaz D, Gaspari AA. Human natural killer T cells infiltrate into the skin at elicitation sites of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2008 Jun;128(6):1460–9.
53. Rafei-Shamsabadi DA, van de Poel S, Dorn B, Kunz S, Martin SF, Klose CSN, et al. Lack of Type 2 Innate Lymphoid Cells Promotes a Type I-Driven Enhanced Immune Response in Contact Hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. 2018;138(9):1962–72.
54. Honda T, Otsuka A, Tanizaki H, Minegaki Y, Nagao K, Waldmann H, et al. Enhanced murine contact hypersensitivity by depletion of endogenous regulatory T cells in the sensitization phase. *J Dermatol Sci*. 2011 Feb;61(2):144–7.
55. Ikebuchi R, Teraguchi S, Vandenbon A, Honda T, Shand FHW, Nakanishi Y, et al. A rare subset of skin-tropic regulatory T cells expressing Il10/Gzmb inhibits the cutaneous immune response. *Sci Rep*. 2016 19;6:35002.
56. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2010 Jul;236:219–42.
57. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2012 Nov;12(11):749–61.
58. Weltzien HU, Moulon C, Martin S, Padovan E, Hartmann U, Kohler J. T cell immune responses to haptens. Structural models for allergic and autoimmune reactions. *Toxicology*. 1996 Feb 22;107(2):141–51.
59. Weltzien HU, Dötze A, Gamerdinger K, Hellwig S, Thierse HJ. Molecular Recognition of Haptens by T Cells: More Than One Way to Tickle the Receptor [Internet]. *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Landes Bioscience; 2013 [cited 2020 Nov 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6573/>

60. Martin SF. T lymphocyte-mediated immune responses to chemical haptens and metal ions: implications for allergic and autoimmune disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004 Jul;134(3):186–98.
61. Posadas SJ, Pichler WJ. Delayed drug hypersensitivity reactions - new concepts. *Clin Exp Allergy.* 2007 Jul;37(7):989–99.
62. Ortmann B, Martin S, Bonin A von, Schiltz E, Hoschützky H, Weltzien HU. Synthetic peptides anchor T cell-specific TNP epitopes to MHC antigens. *The Journal of Immunology.* 1992 Mar 1;148(5):1445–50.
63. Martin S, Ortmann B, Pflugfelder U, Birsner U, Weltzien HU. 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 Oct 15;149(8):2569–75.
64. Martin S, von Bonin A, Fessler C, Pflugfelder U, Weltzien HU. Structural complexity of antigenic determinants for class I MHC-restricted, hapten-specific T cells. Two qualitatively differing types of H-2Kb-restricted TNP epitopes. *J Immunol.* 1993 Jul 15;151(2):678–87.
65. Gernerding K, Moulon C, Karp DR, Van Bergen J, Koning F, Wild D, et al. A new type of metal recognition by human T cells: contact residues for peptide-independent bridging of T cell receptor and major histocompatibility complex by nickel. *J Exp Med.* 2003 May 19;197(10):1345–53.
66. Wang Y, Dai S. Structural basis of metal hypersensitivity. *Immunol Res.* 2013 Mar;55(1–3):83–90.
67. Pichler WJ, Beeler A, Keller M, Lerch M, Posadas S, Schmid D, et al. Pharmacological interaction of drugs with immune receptors: the p-i concept. *Allergol Int.* 2006 Mar;55(1):17–25.
68. Martin SF, Esser PR, Schmucker S, Dietz L, Naisbitt DJ, Park BK, et al. T-cell recognition of chemicals, protein allergens and drugs: towards the development of in vitro assays. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Dec;67(24):4171–84.
69. Kim JH, Hu Y, Yongqing T, Kim J, Hughes VA, Le Nours J, et al. CD1a on Langerhans cells controls inflammatory skin disease. *Nat Immunol.* 2016;17(10):1159–66.
70. Betts RJ, Perkovic A, Mahapatra S, Del Bufalo A, Camara K, Howell AR, et al. Contact sensitizers trigger human CD1-autoreactive T-cell responses. *Eur J Immunol.* 2017;47(7):1171–80.
71. Nicolai S, Wegrecki M, Cheng TY, Bourgeois EA, Cotton RN, Mayfield JA, et al. Human T cell response to CD1a and contact dermatitis allergens in botanical extracts and commercial skin care products. *Sci Immunol.* 2020 Jan 3;5(43).
72. Dyring-Andersen B, Skov L, Løvendorf MB, Bzorek M, Søndergaard K, Lauritsen JPH, et al. CD4(+) T cells producing interleukin (IL)-17, IL-22 and interferon- γ are major effector T cells in nickel allergy. *Contact Derm.* 2013 Jun;68(6):339–47.
73. Micossé C, von Meyenn L, Steck O, Kipfer E, Adam C, Simillion C, et al. Human ‘TH9’ cells are a subpopulation of PPAR- γ + TH2 cells. *Sci Immunol.* 2019 Jan 18;4(31).
74. Gibson A, Kim SH, Faulkner L, Evely J, Pirmohamed M, Park KB, et al. In Vitro Priming of Naïve T-cells with p-Phenylenediamine and Bandrowski’s Base. *Chem Res Toxicol.* 2015 Oct 19;28(10):2069–77.
75. Bechara R, Antonios D, Azouri H, Pallardy M. Nickel Sulfate Promotes IL-17A Producing CD4+ T Cells by an IL-23-Dependent Mechanism Regulated by TLR4 and Jak-STAT Pathways. *J Invest Dermatol.* 2017;137(10):2140–8.
76. Tang A, Judge TA, Nickoloff BJ, Turka LA. Suppression of murine allergic contact dermatitis by CTLA4Ig. Tolerance induction of Th2 responses requires additional blockade of CD40-ligand. *J Immunol.* 1996 Jul 1;157(1):117–25.
77. Cho Y, Kwon D, Kang SJ. The Cooperative Role of CD326+ and CD11b+ Dendritic Cell Subsets for a Hapten-Induced Th2 Differentiation. *J Immunol.* 2017 01;199(9):3137–46.
78. Bell BD, Kitajima M, Larson RP, Stoklasek TA, Dang K, Sakamoto K, et al. The transcription factor STAT5 is critical in dendritic cells for the development of TH2 but not TH1 responses. *Nat Immunol.* 2013 Apr;14(4):364–71.
79. de Bourayne M, Gallais Y, El Ali Z, Rousseau P, Damiens MH, Cochet C, et al. Protein kinase CK2 controls T-cell polarization through dendritic cell activation in response to contact sensitizers. *J Leukoc Biol.* 2017;101(3):703–15.

80. Dhingra N, Shemer A, Correa da Rosa J, Rozenblit M, Fuentes-Duculan J, Gittler JK, et al. Molecular profiling of contact dermatitis skin identifies allergen-dependent differences in immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Aug;134(2):362–72.
81. Albanesi C, Scarponi C, Sebastiani S, Cavani A, Federici M, Sozzani S, et al. A cytokine-to-chemokine axis between T lymphocytes and keratinocytes can favor Th1 cell accumulation in chronic inflammatory skin diseases. *J Leukoc Biol.* 2001 Oct;70(4):617–23.
82. Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DYM. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2006 Jul 1;118(1):178–89.
83. Simon D, Aeberhard C, Erdemoglu Y, Simon HU. Th17 cells and tissue remodeling in atopic and contact dermatitis. *Allergy.* 2014 Jan;69(1):125–31.
84. He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmetts CA, Xu H. IL-17 and IFN-gamma mediate the elicitation of contact hypersensitivity responses by different mechanisms and both are required for optimal responses. *J Immunol.* 2009 Jul 15;183(2):1463–70.
85. Chong SZ, Tan KW, Wong FHS, Chua YL, Tang Y, Ng LG, et al. CD8 T cells regulate allergic contact dermatitis by modulating CCR2-dependent TNF/iNOS-expressing Ly6C⁺ CD11b⁺ monocytic cells. *J Invest Dermatol.* 2014 Mar;134(3):666–76.
86. Kish DD, Volokh N, Baldwin WM, Fairchild RL. Hapten application to the skin induces an inflammatory program directing hapten-primed effector CD8 T cell interaction with hapten-presenting endothelial cells. *J Immunol.* 2011 Feb 15;186(4):2117–26.
87. Kish DD, Gorbachev AV, Parameswaran N, Gupta N, Fairchild RL. Neutrophil expression of Fas ligand and perforin directs effector CD8 T cell infiltration into antigen-challenged skin. *J Immunol.* 2012 Sep 1;189(5):2191–202.
88. Cavani A, Albanesi C, Traidl C, Sebastiani S, Girolomoni G. Effector and regulatory T cells in allergic contact dermatitis. *Trends Immunol.* 2001 Mar;22(3):118–20.
89. Gorbachev AV, Fairchild RL. Regulatory role of CD4⁺ T cells during the development of contact hypersensitivity responses. *Immunol Res.* 2001;24(1):69–77.
90. Bour H, Peyron E, Gaucherand M, Garrigue JL, Desvignes C, Kaiserlian D, et al. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8⁺ T cells and class II-restricted CD4⁺ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol.* 1995 Nov;25(11):3006–10.
91. Gocinski BL, Tigelaar RE. Roles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J Immunol.* 1990 Jun 1;144(11):4121–8.
92. Wang B, Fujisawa H, Zhuang L, Freed I, Howell BG, Shahid S, et al. CD4⁺ Th1 and CD8⁺ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. *J Immunol.* 2000 Dec 15;165(12):6783–90.
93. Bedoui S, Heath WR, Mueller SN. CD4(+) T-cell help amplifies innate signals for primary CD8(+) T-cell immunity. *Immunol Rev.* 2016 Jul;272(1):52–64.
94. Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity.* 2002 Sep;17(3):375–87.
95. Wakabayashi T, Hu DL, Tagawa YI, Sekikawa K, Iwakura Y, Hanada K, et al. IFN-gamma and TNF-alpha are involved in urushiol-induced contact hypersensitivity in mice. *Immunol Cell Biol.* 2005 Feb;83(1):18–24.
96. Kehren J, Desvignes C, Krasteva M, Ducluzeau MT, Assossou O, Horand F, et al. Cytotoxicity Is Mandatory for CD8⁺ T Cell-mediated Contact Hypersensitivity. *J Exp Med.* 1999 Mar 1;189(5):779–86.
97. Traidl C, Sebastiani S, Albanesi C, Merk HF, Puddu P, Girolomoni G, et al. Disparate cytotoxic activity of nickel-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell subsets against keratinocytes. *J Immunol.* 2000 Sep 15;165(6):3058–64.
98. Trautmann A, Akdis M, Schmid-Grendelmeier P, Disch R, Bröcker EB, Blaser K, et al. Targeting keratinocyte apoptosis in the treatment of atopic dermatitis and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Nov;108(5):839–46.

99. Martin SF, Dudda JC, Delattre V, Bachtanian E, Leicht C, Burger B, et al. Fas-mediated inhibition of CD4+ T cell priming results in dominance of type 1 CD8+ T cells in the immune response to the contact sensitizer trinitrophenyl. *J Immunol.* 2004 Sep 1;173(5):3178–85.
100. Takeshita K, Yamasaki T, Akira S, Gantner F, Bacon KB. Essential role of MHC II-independent CD4+ T cells, IL-4 and STAT6 in contact hypersensitivity induced by fluorescein isothiocyanate in the mouse. *Int Immunol.* 2004 May;16(5):685–95.
101. Gamradt P, Laoubi L, Nosbaum A, Mutez V, Lenief V, Grande S, et al. Inhibitory checkpoint receptors control CD8+ resident memory T cells to prevent skin allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2019 Jun;143(6):2147-2157.e9.
102. Tomura M, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, et al. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest.* 2010 Mar;120(3):883–93.
103. Nakashima H, Hamaguchi Y, Watanabe R, Ishiura N, Kuwano Y, Okochi H, et al. CD22 expression mediates the regulatory functions of peritoneal B-1a cells during the remission phase of contact hypersensitivity reactions. *J Immunol.* 2010 May 1;184(9):4637–45.
104. Fjelbye J, Antvorskov JC, Buschard K, Issazadeh-Navikas S, Engkilde K. CD1d knockout mice exhibit aggravated contact hypersensitivity responses due to reduced interleukin-10 production predominantly by regulatory B cells. *Exp Dermatol.* 2015 Nov;24(11):853–6.
105. Wang K, Tao L, Su J, Zhang Y, Zou B, Wang Y, et al. TLR4 supports the expansion of FasL+CD5+CD1dhi regulatory B cells, which decreases in contact hypersensitivity. *Mol Immunol.* 2017;87:188–99.
106. Girolomoni G, Sebastiani S, Albanesi C, Cavani A. T-cell subpopulations in the development of atopic and contact allergy. *Curr Opin Immunol.* 2001 Dec;13(6):733–7.
107. Dubois B, Chapat L, Goubier A, Kaiserlian D. CD4+CD25+ T cells as key regulators of immune responses. *Eur J Dermatol.* 2003 Apr;13(2):111–6.
108. Rückert R, Brandt K, Hofmann U, Bulfone-Paus S, Paus R. IL-2-IgG2b fusion protein suppresses murine contact hypersensitivity in vivo. *J Invest Dermatol.* 2002 Aug;119(2):370–6.
109. Ring S, Karakhanova S, Johnson T, Enk AH, Mahnke K. Gap junctions between regulatory T cells and dendritic cells prevent sensitization of CD8(+) T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Jan;125(1):237-246.e1-7.
110. Gorbachev AV, Fairchild RL. CD4+CD25+ regulatory T cells utilize FasL as a mechanism to restrict DC priming functions in cutaneous immune responses. *Eur J Immunol.* 2010 Jul;40(7):2006–15.
111. Hitzler M, Majdic O, Heine G, Worm M, Ebert G, Luch A, et al. Human Langerhans cells control Th cells via programmed death-ligand 1 in response to bacterial stimuli and nickel-induced contact allergy. *PLoS One.* 2012;7(10):e46776.
112. Ritprajak P, Hashiguchi M, Tsushima F, Chalermarp N, Azuma M. Keratinocyte-associated B7-H1 directly regulates cutaneous effector CD8+ T cell responses. *J Immunol.* 2010 May 1;184(9):4918–25.
113. Hirano T, Honda T, Kanameishi S, Honda Y, Egawa G, Kitoh A, et al. PD-L1 on mast cells suppresses effector CD8+ T-cell activation in the skin in murine contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 2021 Aug;148(2):563-573.e7.
114. Cavani A, Nasorri F, Prezzi C, Sebastiani S, Albanesi C, Girolomoni G. Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J Invest Dermatol.* 2000 Feb;114(2):295–302.
115. O’Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med.* 2004 Aug;10(8):801–5.
116. Taylor A, Verhagen J, Akdis CA, Akdis M. T regulatory cells in allergy and health: a question of allergen specificity and balance. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004 Sep;135(1):73–82.
117. Mahnke K, Useliene J, Ring S, Kage P, Jendrossek V, Robson SC, et al. Down-Regulation of CD62L Shedding in T Cells by CD39+ Regulatory T Cells Leads to Defective Sensitization in Contact Hypersensitivity Reactions. *J Invest Dermatol.* 2017;137(1):106–14.

118. Kish DD, Gorbachev AV, Fairchild RL. CD8⁺ T cells produce IL-2, which is required for CD(4⁺)CD25⁺ T cell regulation of effector CD8⁺ T cell development for contact hypersensitivity responses. *J Leukoc Biol.* 2005 Sep;78(3):725–35.
119. Maurer M, Seidel-Guyenet W, Metz M, Knop J, Steinbrink K. Critical role of IL-10 in the induction of low zone tolerance to contact allergens. *J Clin Invest.* 2003 Aug;112(3):432–9.
120. Christensen AD, Skov S, Kvist PH, Haase C. Depletion of regulatory T cells in a hapten-induced inflammation model results in prolonged and increased inflammation driven by T cells. *Clin Exp Immunol.* 2015 Mar;179(3):485–99.
121. Dubois B, Chapat L, Goubier A, Papiernik M, Nicolas JF, Kaiserlian D. Innate CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8⁺ T cells mediating skin inflammation. *Blood.* 2003 Nov 1;102(9):3295–301.
122. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol.* 2005 Dec;6(12):1219–27.
123. Shevach EM. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 2009 May;30(5):636–45.
124. Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla JC, Belkaid Y, Kamanaka M, et al. IL-10 from CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127⁺ adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog.* 2008 Feb 29;4(2):e1000004.
125. Maeda A, Schwarz A, Bullinger A, Morita A, Peritt D, Schwarz T. Experimental extracorporeal photopheresis inhibits the sensitization and effector phases of contact hypersensitivity via two mechanisms: generation of IL-10 and induction of regulatory T cells. *J Immunol.* 2008 Nov 1;181(9):5956–62.
126. Ring S, Schäfer SC, Mahnke K, Lehr HA, Enk AH. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *Eur J Immunol.* 2006 Nov;36(11):2981–92.
127. Melrose J, Tsurushita N, Liu G, Berg EL. IFN-gamma inhibits activation-induced expression of E- and P-selectin on endothelial cells. *J Immunol.* 1998 Sep 1;161(5):2457–64.
128. Ring S, Oliver SJ, Cronstein BN, Enk AH, Mahnke K. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions through a CD39, adenosine-dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Jun;123(6):1287-1296.e2.
129. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999 Oct 14;401(6754):708–12.
130. Tussey L, Speller S, Gallimore A, Vessey R. Functionally distinct CD8⁺ memory T cell subsets in persistent EBV infection are differentiated by migratory receptor expression. *Eur J Immunol.* 2000 Jul;30(7):1823–9.
131. von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med.* 2000 Oct 5;343(14):1020–34.
132. Walzer T, Marçais A, Saltel F, Bella C, Jurdic P, Marvel J. Cutting edge: immediate RANTES secretion by resting memory CD8 T cells following antigenic stimulation. *J Immunol.* 2003 Feb 15;170(4):1615–9.
133. Schenkel JM, Masopust D. Tissue-resident memory T cells. *Immunity.* 2014 Dec 18;41(6):886–97.
134. Mueller SN, Mackay LK. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nat Rev Immunol.* 2016 Feb;16(2):79–89.
135. Mackay LK, Wynne-Jones E, Freestone D, Pellicci DG, Mielke LA, Newman DM, et al. T-box Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF- β and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate. *Immunity.* 2015 Dec 15;43(6):1101–11.
136. Watanabe R, Gehad A, Yang C, Scott LL, Teague JE, Schlapbach C, et al. Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells. *Sci Transl Med.* 2015 Mar 18;7(279):279ra39.
137. Mackay LK, Rahimpour A, Ma JZ, Collins N, Stock AT, Hafon ML, et al. The developmental pathway for CD103⁺CD8⁺ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol.* 2013 Dec;14(12):1294–301.

138. Zhang N, Bevan MJ. Transforming growth factor- β signaling controls the formation and maintenance of gut-resident memory T cells by regulating migration and retention. *Immunity*. 2013 Oct 17;39(4):687–96.
139. Hirai T, Yang Y, Zenke Y, Li H, Chaudhri VK, De La Cruz Diaz JS, et al. Competition for Active TGF β Cytokine Allows for Selective Retention of Antigen-Specific Tissue-Resident Memory T Cells in the Epidermal Niche. *Immunity*. 2021 Jan 12;54(1):84–98.e5.
140. Gaide O, Emerson RO, Jiang X, Gulati N, Nizza S, Desmarais C, et al. Common clonal origin of central and resident memory T cells following skin immunization. *Nat Med*. 2015 Jun;21(6):647–53.
141. Gadsbøll ASØ, Jee MH, Funch AB, Alhede M, Mraz V, Weber JF, et al. Pathogenic CD8⁺ Epidermis-Resident Memory T Cells Displace Dendritic Epidermal T Cells in Allergic Dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2020 Apr;140(4):806–815.e5.
142. Murata A, Hayashi SI. CD4⁺ Resident Memory T Cells Mediate Long-Term Local Skin Immune Memory of Contact Hypersensitivity in BALB/c Mice. *Front Immunol*. 2020;11:775.
143. Adachi T, Kobayashi T, Sugihara E, Yamada T, Ikuta K, Pittaluga S, et al. Hair follicle-derived IL-7 and IL-15 mediate skin-resident memory T cell homeostasis and lymphoma. *Nat Med*. 2015 Nov;21(11):1272–9.
144. Zhong H, Liu Y, Xu Z, Liang P, Yang H, Zhang X, et al. TGF- β -Induced CD8⁺CD103⁺ Regulatory T Cells Show Potent Therapeutic Effect on Chronic Graft-versus-Host Disease Lupus by Suppressing B Cells. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2018 [cited 2020 Sep 21];9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5797539/>
145. Askenase PW, Itakura A, Leite-de-Moraes MC, Lisbonne M, Roongapinun S, Goldstein DR, et al. TLR-dependent IL-4 production by invariant Valpha14⁺Jalpha18⁺ NKT cells to initiate contact sensitivity in vivo. *J Immunol*. 2005 Nov 15;175(10):6390–401.
146. Nielsen MM, Lovato P, MacLeod AS, Witherden DA, Skov L, Dyring-Andersen B, et al. IL-1 β -dependent activation of dendritic epidermal T cells in contact hypersensitivity. *J Immunol*. 2014 Apr 1;192(7):2975–83.
147. Nielsen MM, Dyring-Andersen B, Schmidt JD, Witherden D, Lovato P, Woetmann A, et al. NKG2D-dependent activation of dendritic epidermal T cells in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. 2015 May;135(5):1311–9.
148. Kumagai K, Horikawa T, Shigematsu H, Matsubara R, Kitaura K, Eguchi T, et al. Possible Immune Regulation of Natural Killer T Cells in a Murine Model of Metal Ion-Induced Allergic Contact Dermatitis. *Int J Mol Sci*. 2016 Jan 12;17(1):E87.
149. Taniguchi M, Harada M, Kojo S, Nakayama T, Wakao H. The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:483–513.
150. Campos RA, Szczepanik M, Itakura A, Akahira-Azuma M, Sidobre S, Kronenberg M, et al. Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant Valpha14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1785–96.
151. Nieuwenhuis EES, Gillessen S, Scheper RJ, Exley MA, Taniguchi M, Balk SP, et al. CD1d and CD1d-restricted iNKT-cells play a pivotal role in contact hypersensitivity. *Exp Dermatol*. 2005 Apr;14(4):250–8.
152. Campos RA, Szczepanik M, Lisbonne M, Itakura A, Leite-de-Moraes M, Askenase PW. Invariant NKT cells rapidly activated via immunization with diverse contact antigens collaborate in vitro with B-1 cells to initiate contact sensitivity. *J Immunol*. 2006 Sep 15;177(6):3686–94.
153. Shimizuhira C, Otsuka A, Honda T, Kitoh A, Egawa G, Nakajima S, et al. Natural killer T cells are essential for the development of contact hypersensitivity in BALB/c mice. *J Invest Dermatol*. 2014 Nov;134(11):2709–18.
154. Campos RA, Szczepanik M, Itakura A, Lisbonne M, Dey N, Leite-de-Moraes MC, et al. Interleukin-4-dependent innate collaboration between iNKT cells and B-1 B cells controls adaptative contact sensitivity. *Immunology*. 2006 Apr;117(4):536–47.
155. Itakura A, Szczepanik M, Campos RA, Paliwal V, Majewska M, Matsuda H, et al. An hour after immunization peritoneal B-1 cells are activated to migrate to lymphoid organs where within 1 day they produce IgM antibodies that initiate elicitation of contact sensitivity. *J Immunol*. 2005 Dec 1;175(11):7170–8.

156. Tsuji RF, Kikuchi M, Askenase PW. Possible involvement of C5/C5a in the efferent and elicitation phases of contact sensitivity. *J Immunol.* 1996 Jun 15;156(12):4444–50.
157. Tsuji RF, Geba GP, Wang Y, Kawamoto K, Matis LA, Askenase PW. Required early complement activation in contact sensitivity with generation of local C5-dependent chemotactic activity, and late T cell interferon gamma: a possible initiating role of B cells. *J Exp Med.* 1997 Oct 6;186(7):1015–26.
158. Tsuji RF, Kawikova I, Ramabhadran R, Akahira-Azuma M, Taub D, Hugli TE, et al. Early local generation of C5a initiates the elicitation of contact sensitivity by leading to early T cell recruitment. *J Immunol.* 2000 Aug 1;165(3):1588–98.
159. Fjelbye J, Antvorskov JC, Buschard K, Issazadeh-Navikas S, Engkilde K. CD1d knockout mice exhibit aggravated contact hypersensitivity responses due to reduced interleukin-10 production predominantly by regulatory B cells. *Exp Dermatol.* 2015 Nov;24(11):853–6.
160. Lebre MC, van der Aar AMG, van Baarsen L, van Capel TMM, Schuitemaker JHN, Kapsenberg ML, et al. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol.* 2007 Feb;127(2):331–41.
161. Nordlind K, Lidén S. Gamma/delta T cells and human skin reactivity to heavy metals. *Arch Dermatol Res.* 1995;287(2):137–41.
162. Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Anderson T, et al. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med.* 1989 Apr 1;169(4):1277–94.
163. Holtmeier W, Pfänder M, Hennemann A, Zollner TM, Kaufmann R, Caspary WF. The TCR-delta repertoire in normal human skin is restricted and distinct from the TCR-delta repertoire in the peripheral blood. *J Invest Dermatol.* 2001 Feb;116(2):275–80.
164. Dieli F, Asherson GL, Sireci G, Dominici R, Gervasi F, Vendetti S, et al. gamma delta cells involved in contact sensitivity preferentially rearrange the Vgamma3 region and require interleukin-7. *Eur J Immunol.* 1997 Jan;27(1):206–14.
165. Dieli F, Ptak W, Sireci G, Romano GC, Potestio M, Salerno A, et al. Cross-talk between V beta 8+ and gamma delta+ T lymphocytes in contact sensitivity. *Immunology.* 1998 Apr;93(4):469–77.
166. Jiang X, Park CO, Geddes Sweeney J, Yoo MJ, Gaide O, Kupper TS. Dermal $\gamma\delta$ T Cells Do Not Freely Re-Circulate Out of Skin and Produce IL-17 to Promote Neutrophil Infiltration during Primary Contact Hypersensitivity. *PLoS ONE.* 2017;12(1):e0169397.
167. Sullivan S, Bergstresser PR, Tigelaar RE, Streilein JW. Induction and regulation of contact hypersensitivity by resident, bone marrow-derived, dendritic epidermal cells: Langerhans cells and Thy-1+ epidermal cells. *J Immunol.* 1986 Oct 15;137(8):2460–7.
168. Welsh EA, Kripke ML. Murine Thy-1+ dendritic epidermal cells induce immunologic tolerance in vivo. *J Immunol.* 1990 Feb 1;144(3):883–91.
169. Guan H, Zu G, Slater M, Elmets C, Xu H. GammadeltaT cells regulate the development of hapten-specific CD8+ effector T cells in contact hypersensitivity responses. *J Invest Dermatol.* 2002 Jul;119(1):137–42.
170. Huber H, Descosy P, van Brandwijk R, Knop J. Activation of murine epidermal TCR-gamma delta+ T cells by keratinocytes treated with contact sensitizers. *J Immunol.* 1995 Sep 15;155(6):2888–94.
171. Caccamo N, Battistini L, Bonneville M, Poccia F, Fournié JJ, Meraviglia S, et al. CXCR5 identifies a subset of Vgamma9Vdelta2 T cells which secrete IL-4 and IL-10 and help B cells for antibody production. *J Immunol.* 2006 Oct 15;177(8):5290–5.
172. Fujita M, Miyachi Y, Nakata K, Imamura S. gamma delta T-cell receptor-positive cells of human skin. II. Appearance in delayed-type hypersensitivity reaction. *Arch Dermatol Res.* 1993;285(7):436–40.
173. Mattner J, Debord KL, Ismail N, Goff RD, Cantu C, Zhou D, et al. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature.* 2005 Mar 24;434(7032):525–9.

Figure legends

Figure 1: Schematic representation of the pathophysiology of allergic contact dermatitis (ACD)

After permeation of the allergen into the skin and the formation of hapten-self protein complexes, the generation of a local inflammatory milieu into the skin induces activation and maturation of skin dendritic cells (DCs). Hapten-bearing DCs then migrate to the draining lymph node where they prime T-cells. The nature of T cell polarization and its MHC-restriction varies depending on the type of haptens involved.

In parallel, during this sensitization phase, IL-4 producing natural killer (NK) T cells are activated in the liver following skin hapten exposure and allow the recruitment and activation in the spleen of B-1 cells producing hapten-specific IgM.

Subsequent contact with the chemical may lead to the mobilization and reactivation of hapten-specific effector/memory cells into the skin, through a complex and highly intricate inflammatory process (elicitation phase). CD8⁺ T cells activate the endothelium to produce chemokines, resulting in early extravasation of neutrophils, which in turn facilitate CD8⁺ T cells infiltration. Neutrophils recruitment also depends on IL-17 producing $\gamma\delta$ T cells. In addition, hapten-specific IgM antibodies bind complement components to generate C5a that activates mast cells to release vasoactive mediators allowing extravasation of effector T cells.

Cytotoxic CD8⁺ T cells then kill haptensitized keratinocytes (via Fas/Fas-L pathway and perforin/granzyme release) and potentiates the (re)activation of other inflammatory cells (monocytes/macrophages, neutrophils, eosinophils, mast cells, T cells) which leads to the formation of local erythema, epidermal spongiosis and vesicles in severe cases.

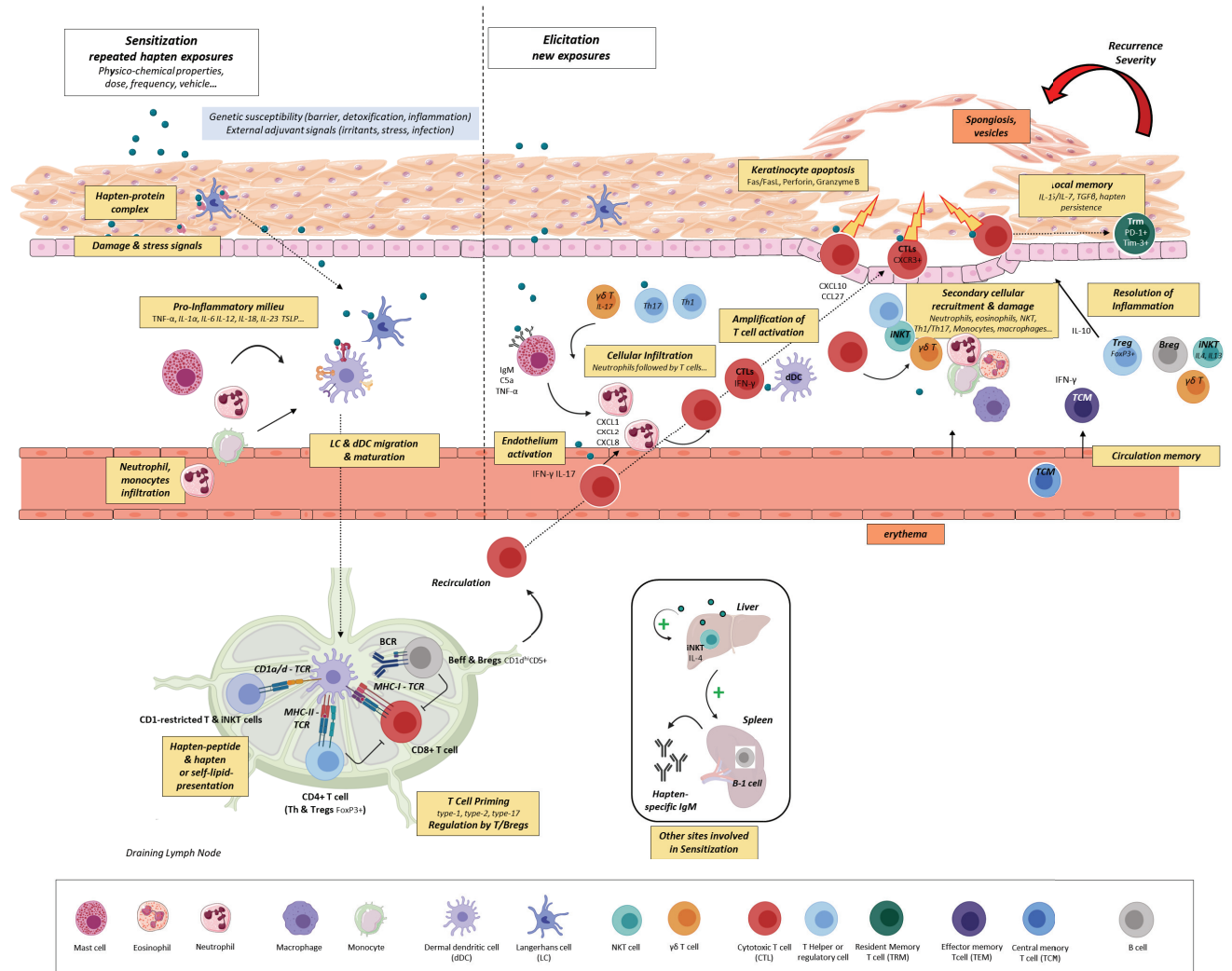
Finally, resolution of the inflammation requires the recruitment and activation of FoxP3⁺ CD4⁺ Tregs and Bregs.

Potential involvement of unconventional T cells, such as $\gamma\delta$ T cells, NKT cells has also been suggested in the effector or down-regulation process or both.

During the resolution phase, effector T cells are progressively replaced by a large population of memory T cells, which enable a faster and more effective immune response upon allergen reexposure. Importantly, these resident memory T cells (Trm) persist long-term in the healed skin of ACD patients and are endowed with potent cytotoxic properties. Therefore, they are key player in ACD flare-up.

Figure

Figure 1



Schematic representation of the pathophysiology of ACD

Figure 14. Schéma récapitulatif de la physiopathologie de l'ECA

4. Diagnostic

Le « gold standard » pour le diagnostic de l'eczéma de contact allergique sont les **tests épicutanés**. Ils doivent obligatoirement être **combinés à la clinique et à l'évaluation des expositions environnementales** pour aider à leur interprétation et poser un diagnostic le plus fiable possible. Par ailleurs, l'évaluation des expositions individuelles est utile pour déterminer les allergènes à tester. **L'eczéma de contact irritatif est quant à lui un diagnostic d'élimination après exclusion d'un diagnostic d'ECA**. Les biopsies cutanées sont d'un apport limité pour discriminer entre les deux formes.

4.1 Présentation clinique

Les manifestations cliniques de l'EC peuvent varier en fonction de facteurs tels que la nature du produit chimique en cause, sa concentration, le temps, la fréquence et la voie d'exposition, le degré de sensibilité, le type de peau, la chronicité des lésions...

Les lésions cutanées débutent généralement au niveau du site de contact (direct ou indirect) avec l'agent exogène incriminé. Elles sont caractérisées par un **œdème**, un **érythème**, des **papules**, des **vésicules**, un **suintement** évoluant vers des croûtes dans les formes aiguës, et peuvent prendre un aspect de **xérose** associée à des squames, une **lichénification** de la peau et des **fissures** dans les formes chroniques (**Figure 15**). Le **prurit** est quasiment constant (Nosbaum et al., 2009), et ce pour les deux formes d'EC. Même si les formes aiguës et chroniques peuvent être différenciées cliniquement, il est fréquent que ces deux entités se chevauchent.

Dans le cas des eczémas de contact des mains certaines atteintes particulières pourraient aider à différencier les sous-types d'eczémas de contact. Pour exemple, l'eczéma de contact irritatif a tendance à se localiser au niveau des espaces interdigitaux et sur la face dorsale des mains et des doigts. Néanmoins, l'atteinte de ces zones n'est pas spécifique du diagnostic d'ECl, et il n'est pas rare que les formes allergique et irritative co-existent au niveau des mains. Seuls l'évaluation des expositions environnementales associée aux résultats des tests épicutanés peuvent aider à faire le diagnostic. Il est donc quasiment impossible de distinguer de façon fiable et certaine allergie et irritation sur la seule base de la clinique.

Traditionnellement, **l'ECA a tendance à s'étendre à distance du site de contact**, voire se généraliser sur le reste de la peau, en cas d'exposition persistante ou en grande quantité à l'allergène en cause (Calnan & Wells, 1956). Cependant, l'ECl peut également se propager dans certains cas, par exemple des mains aux avant-bras (Williams et al., 2007). On peut noter que de rares cas d'ECA systémique ont été décrits où les lésions eczématiformes se

manifestent classiquement dans les zones de flexion (entre autres) après une exposition systémique (par exemple, orale ou parentérale) à un allergène (Veien, 2011).

Les ECA aéroportés résultent du contact avec des allergènes véhiculés par l'air avant de se déposer sur la peau. Les lésions affectent donc généralement les sites exposés tels que le visage, les mains, les avant-bras. Un exemple typique d'eczéma aéroporté est celui dû aux méthylisothiazolinones, conservateurs ajoutés dans les peintures (Wright & Cahill, 2016).

Des eczemas de contact par procuration (connubial – consort) sont également décrits. Ils sont le résultat peu fréquent d'une exposition à un allergène véhiculé par quelqu'un d'autre (dans la majorité des cas le partenaire). Il s'agit dans la plupart des cas d'un produit cosmétique ou un médicament topique (Corazza et al., 2019).

Il est important de noter que d'autres dermatoses, comme le lymphome T cutané, la pemphigoïde bulleuse pré-bulleuse, le psoriasis, la dermatite atopique et certaines atteintes cutanées paranéoplasiques, peuvent imiter ou co-exister avec l'eczéma de contact. Lorsque les patients ne répondent pas aux traitements, il est donc important de réaliser des examens complémentaires ainsi qu'une biopsie cutanée afin de ne pas méconnaître une autre pathologie sous-jacente. Cependant, il n'existe pas de résultats histopathologiques pathognomoniques d'un diagnostic d'EC.

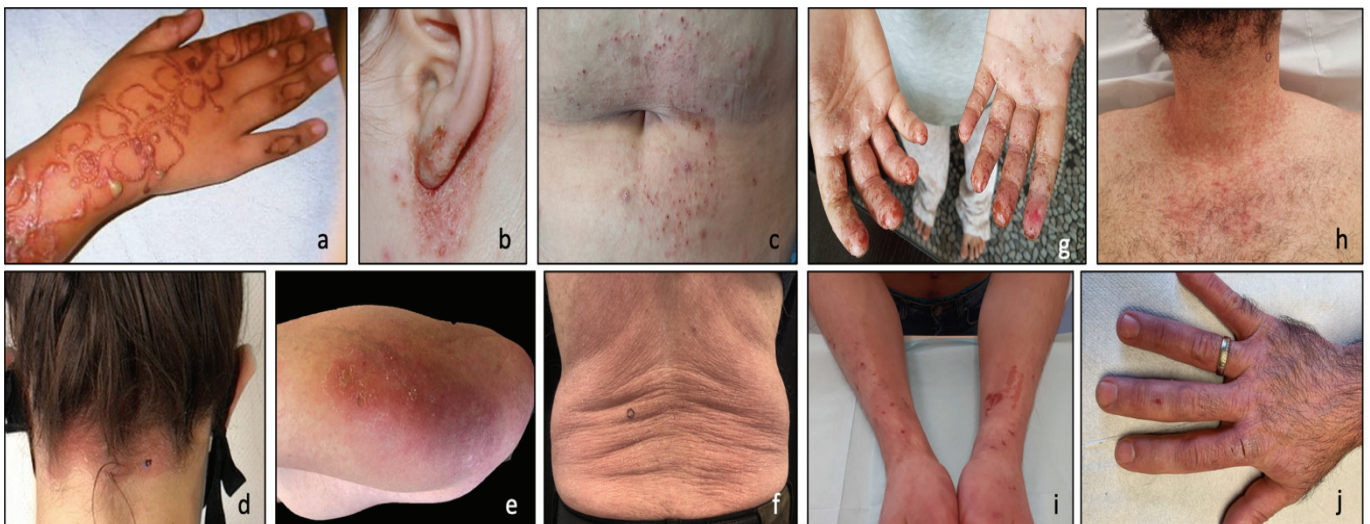


Figure 15. Lésions cliniques d'eczémas de contact

allergique à la PPD (a, d), au nickel (b, c), à la méthylisothiazolinone (e), à l'alcool cinnamique (f) et irritatif (g, h, i, j)

4.2 Interrogatoire et évaluation de l'exposition environnementale

L'interrogatoire minutieux (ou anamnèse) du patient est une étape primordiale pour le diagnostic des eczémas de contact. Il permet de recueillir les antécédents, l'histoire clinique et **d'évaluer les expositions individuelles personnelles ou professionnelles**. Il faut prendre en compte la chronologie de l'apparition des lésions, leur localisation et leur caractère évolutif. Il ne faut négliger aucune piste potentielle. Les sources de contacts professionnels (analyse des gestes professionnels, des produits utilisés sur le lieu de travail, des moyens de prévention ou de nettoyage...), vestimentaires (nature des tissus, chaussures, accessoires vestimentaires...), cosmétiques et médicamenteux (topiques locaux utilisés récemment ou anciennement) doivent être systématiquement explorés. L'étiquetage des produits utilisés par le patient est ensuite une source d'informations majeure pour recenser les différents allergènes auxquels celui-ci est exposé dans son quotidien. Ceci est particulièrement vrai pour les cosmétiques. Cependant, même l'étiquetage des produits peut fournir des informations incomplètes. En effet, des études ont identifiés des conservateurs non répertoriés contenant ou libérant du formaldéhyde dans des produits de soins d'usage (Ham et al., 2019; Nikle et al., 2019). Pour d'autres produits de consommation comme les peintures, les colles, les textiles et les chaussures ou encore des accessoires médicaux (comme les capteurs glycémiques (Herman et al., 2017), il est parfois beaucoup plus difficile d'obtenir des informations fiables sur leur composition. Lors d'exposition en contexte professionnel, les fiches de données de sécurité restent la source d'information principale bien que celles-ci ne recensent pas l'ensemble des allergènes présents dans la composition des produits (Friis et al., 2015).

De plus, des tests rapides : « spot test », peuvent également apporter une aide précieuse pour aider à déterminer les expositions des patients en évaluant la libération d'allergènes tels que le nickel, le chrome, le cobalt, le formaldéhyde ou encore les isothiazolinones dans les produits personnels (Tautvydaitė et al., 2020; Wennervaldt et al., 2021). Ces tests reposent sur une méthode colorimétrique qui permet d'identifier la présence ou non de l'allergène recherché mais également la quantité relarguée dans le produit en question.

Dans certains centres spécialisés, disposant de plateaux techniques adaptés, la chromatographie sur couche mince peut également être utilisée. Cette méthode permet de séparer physiquement les composés présents dans un mélange ou un produit et peut être utilisée dans un contexte de suspicion d'allergie de contact aux textiles, plastiques ou parfums par exemple. Les plaques de chromatographie avec chaque composé séparé peuvent ensuite être directement utilisées pour les tests épicutanés (Bruze et al., 2003). En cas de positivité pour un des composants, une analyse plus poussée (par exemple la chromatographie gazeuse couplées à la spectrométrie de masse) permettra d'identifier la substance exacte incriminée (Lammintausta et al., 2010). Ces méthodes ont ainsi permis l'identification

d'exposition à des allergènes jusqu'alors sous-estimés. De façon plus anecdotique, des mesures directes de l'exposition cutanée aux allergènes ont été réalisées pour les métaux notamment. Cette méthode simple, ne nécessite qu'un écouvillonnage cutané et permet ainsi d'identifier la présence et la quantité d'allergène sur la peau des patients (Erfani et al., 2017).

4.3 Les tests cutanés

Il est clair qu'une anamnèse fouillée ne peut suffire et doit impérativement être complétée par des **tests cutanés** qui constituent la deuxième pierre angulaire du diagnostic clinique d'un eczéma de contact. Ceux-ci visent à identifier l'allergène responsable des lésions cutanées en cas d'allergie, en reproduisant expérimentalement la réaction d'eczéma de contact allergique. Cependant, la présence d'une allergie de contact (sensibilisation à une substance) chez un individu n'est pas suffisante pour établir le diagnostic de certitude d'un ECA et une évaluation de la **pertinence actuelle de l'allergène en question et de sa relation avec la présentation clinique est également nécessaire.**

4.3.1 Tests épicutanés ou patch tests

Depuis son introduction en 1895 par Jozef Jadassohn, **le test épicutané (ou patch-test)** reste le **gold standard dans le diagnostic des eczémas de contact allergique, pour identifier la molécule chimique incriminée.**

Ce test consiste à reproduire expérimentalement la lésion d'eczéma sur la peau saine des patients en appliquant des allergènes sous occlusion. C'est donc un test de provocation clinique où les allergènes de contact suspectés sont appliqués sur de petites surfaces cutanées (~0,5 cm²), le plus souvent dans le haut du dos (à défaut, en cas de lésions cutanées, d'autres sites seront privilégiés), à l'aide de chambres de test fixées à la peau du patient (Johansen et al., 2015). Plusieurs modèles de chambres existent, et aucun consensus ne codifie leur emploi respectif : la Finn Chamber®, chambre d'aluminium de 8 mm de diamètre et les diverses chambres plastiques carrées, dont le diamètre intérieur peut varier de 8×8 mm à 10×10 mm. Parmi ces dernières, on peut citer : la IQ Square Chamber ou la IQ Ultra Square Chamber de chez Chemotechnique, la van der Bend Square Chamber, la Haye's Test Square Chamber, l'allergEAZE Patch Test Chamber (Lachapelle, J. M. & Maibach, 2020) (**Figure 16**).

La quantité optimale d'allergènes (dilués pour la plupart dans la vaseline ou dans l'eau) recommandée est de 20 mg pour les Finn Chambers et de 35 mg pour les Plastic Square Chambers (Bruze et al., 2007). La concentration optimale des chimiques testés varie selon

l'allergène ; certains étant disponibles sous forme commerciale standardisée (**Figure 16**). Celle-ci est définie comme la concentration maximale non irritante pour un produit donné.



Figure 16. Les patch tests

- (a) Exemple de chambres pour réaliser les tests (IQ Ultra Square Chamber, Chemotechnique)
- (b) Seringues d'allergènes standardisés de la batterie standard européenne (Chemotechnique)
- (c) Pose de patch tests

La période d'occlusion est de 48 heures. **Une première lecture s'effectue donc à la 48^e heure, mais une seconde lecture est impérative à 72 ou 96 heures** (Johansen et al., 2015). Dans certains cas, une lecture à J7 est recommandée, comme pour les corticostéroïdes en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires qui risquent de retarder la survenue de la réaction clinique (Davis et al., 2008).

L'échelle d'évaluation des tests a été définie au niveau international par l'International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) (Figure 17) (Johansen et al., 2015). Cette échelle est utilisée pour tous les phototypes, mais l'évaluation peut être plus difficile sur les peaux foncées, par exemple, en raison d'un érythème moins visible.



| Score | Description clinique | Interprétation |
|-------|--|-------------------------------|
| - | Absence de réaction | Négatif |
| ?+ | Érythème simple, non infiltré | Douteux |
| + | Érythème infiltré et œdème | Réaction positive faible |
| ++ | Érythème, œdème et vésicules bien visibles | Réaction fortement positive |
| +++ | Érythème, œdème et vésicules coalescentes ou bulles | Réaction extrêmement positive |
| IR | Œdème absent, aspect fripé, pustules, pétéchies, nécrose | Réaction d'irritation |

Figure 17. Échelle d'évaluation de l'ICDRG pour la lecture des tests épicutanés

La lecture des tests doit être réalisée par un praticien expérimenté. Les réactions ++ et +++ ne posent en principe aucun problème ; il n'en est pas de même avec les réactions + ou douteuses qui peuvent parfois refléter une simple réaction d'irritation. Il convient de noter que ces réactions sont fréquentes et des études ont également rapporté un manque de reproductibilité de celles-ci (Bourke et al., 1999; Brasch et al., 1994b; Dittmar & Schuttelaar, 2019b). **En effet, la plupart des allergènes ont un pouvoir irritant, majoré une fois appliqué sous occlusions, et les tests doivent donc être interprétés avec beaucoup de circonspection.**

Les tests irritatifs ont largement été décrits, c'est ce qu'on appelle l'effet « savon », « shampoing », « détergeant », « toxique »... mais les reconnaître est un exercice difficile. Par ailleurs certains patients ont une peau « irritable », comme les patients présentant une dermatite atopique, pour lesquels la lecture des tests n'est pas toujours évidente. Le syndrome du dos en colère ou « angry back » peut également donner lieu à des erreurs d'interprétation. Celui-ci consiste en l'apparition de multiples réactions positives, de morphologie parfois atypique, sur un fond d'inflammation cutanée diffuse. Les réactions ne sont pas toujours reproductibles lorsque les allergènes sont retestés séparément (Cockayne & Gawkrödger, 2000). En cas de doute, il convient de réaliser de nouvelles batteries de tests, ainsi que des séries de dilutions afin d'aider notre interprétation (Johansen et al., 2015).

Il faut noter par ailleurs que plusieurs facteurs peuvent entraîner des résultats faussement négatifs tels des substances testées à des concentrations trop faibles, des lectures trop précoces des tests, un allergène testé non adéquat (impureté dans le produit fini). L'application de dermocorticoïdes, la prise de traitements immunosuppresseurs et l'exposition récente aux UV peuvent également entraîner des résultats faussement négatifs.

Des méthodes d'investigation complémentaires comme **les tests semi ouverts ou ouverts** peuvent venir compléter le bilan, et s'avèrent notamment utiles pour tester les produits rapportés par le patient dont on soupçonne les propriétés irritantes tels que les shampoings, les détergents, les peintures, les vernis, les huiles industrielles, les produits pharmaceutiques et certains cosmétiques (Goossens, 2009). Dans les tests semi-ouverts, une petite quantité (~15 µl) du produit est appliquée sur une zone (~ 1 à 5 cm²) de la peau, on la laisse sécher pendant le temps adéquat, puis on la recouvre d'un sparadrap non occlusif (par exemple Micropore). Les lectures s'effectuent aux mêmes temps que les tests épicutanés. Le test ouvert quant à lui ne nécessite aucune occlusion. Son utilisation est recommandée comme première étape pour tester des substances ou des produits mal définis. Ces tests moins standardisés nécessitent un expérimentateur entraîné qui comprenne parfaitement les dangers des substances/produits appliqués. Pour exemple, avant d'employer un test semi-ouvert (ceci est valable pour tout test épicutané également) avec un produit apporté, il importe de toujours vérifier le pH du produit en question (ne jamais tester lorsque le pH est inférieur à 4 ou supérieur à 9).

4.3.2 Sélection des substances à tester

Environ 5 000 substances ont été identifiées comme des allergènes de contact potentiels (de Groot, 2018) ; par conséquent, la sélection des substances à tester pour chaque patient est une étape cruciale du processus diagnostique.

Certains allergènes sont, de par leur caractère ubiquitaire, particulièrement présents dans notre environnement. Il a donc été proposé de **tester systématique des batteries de tests de base**, qui contiennent généralement 30 à 100 allergènes à tester et correspondent aux expositions les plus fréquentes dans une zone géographique donnée. Ces batteries sont **régulièrement mises à jour par les groupes nationaux experts en eczéma de contact allergique en fonction de l'émergence ou diminution de certains allergènes**. En Europe, il est donc recommandé de tester au minimum la **batterie standard européenne (BSE) (Tableau 3)**.

Tableau 3. Allergènes de la batterie standard Européenne

| Allergènes | | Concentration (%) |
|------------|---|-------------------|
| 1 | Potassium dichromate | 0,5 |
| 2 | Neomycin sulfate | 20 |
| 3 | Thiuram mix | 1 |
| 4 | p-Phenylenediamine (PPD) | 1 |
| 5 | Cobalt (II) chloride herahydrate | 1 |
| 6 | Methyldibromo glutaronitrile | 0,5 |
| 7 | Formaldehyde | 2 |
| 8 | Colophonium | 20 |
| 9 | Benzocaïne | 5 |
| 10 | Myroxylon pereirae resin (baume du Perou) | 25 |
| 11 | N-Isopropyl-N-phenyl-4-phenylenediamine (IPPD) | 0,1 |
| 12 | Lanolin alcohol | 30 |
| 13 | Mercapto mix | 2 |
| 14 | Epoxy resin, Bisphenol A | 1 |
| 15 | Parabens | 16 |
| 16 | 4-tert-Butylphenolformaldehyde resin (PTBP) | 1 |
| 17 | Fragrance mix I | 8 |
| 18 | Clioquinol | 5 |
| 19 | Quaternium 15 | 1 |
| 20 | Nickel (II) sulfate hexahydrate | 5 |
| 21 | Methylisothiazolinone + Methylchloroisothiazolinone | 0,02 |
| 22 | 2-Mercaptobenzothiazole (MBT) | 2 |
| 23 | 2-Methoxy-6-n-pentyl-4-benzoquinone (primin) | 0,01 |
| 24 | Budésonide | 0,01 |
| 25 | Tixocortol-21-pivalate | 0,1 |
| 26 | Cocamidopropyl Bétaine | 1 |
| 27 | 3-(Dimethylamino)-1- propylamine | 1 |
| 28 | Hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde | 5 |
| 29 | Cocamide DEA | 0,5 |
| 30 | Amerchol L 101 | 50 |
| 31 | Fragrance Mix II | 14 |
| 32 | Sesquiterpene lactone mix | 0,1 |
| 33 | Hydroperoxides of linalool | 1 |
| 34 | Benzyl Alcohol | 10 |
| 35 | Hydroperoxides of Limonene | 0,3 |
| 36 | Textile dye mix | 6,6 |
| 37 | Lauryl polyglucose | 3 |
| 38 | Methylisothiazolinone | 0,2 |
| 39 | 2-n-Octyl-4-isothiazolin-3-one | 0,1 |
| 40 | Benzalkonium chloride | 0,1 |

Des batteries additionnelles, développées par des firmes spécialisées, viennent ensuite compléter la batterie standard en fonction des expositions du patient, comme la profession, les loisirs et les produits de soins utilisés et de la clinique (comme la localisation des lésions). Le choix des allergènes à tester est donc basé sur une analyse d'exposition méticuleuse et systématique s'appuyant sur tous les types d'informations disponibles (Friis et al., 2013).

Les produits utilisés par le patient, solides ou liquides, peuvent également être inclus dans la procédure de tests, car les batteries ne comportent pas tous les allergènes et le mélange d'ingrédients peut provoquer des réactions non observées en ingrédient isolé. Seuls les produits dont on connaît la composition et les caractéristiques chimiques et toxicologiques seront testés, pour ne pas entraîner de réaction d'irritation voire caustique. Les étiquettes et les fiches de données de sécurité sont alors d'une grande aide pour savoir comment tester ces produits. Dans la plupart des cas un produit apporté devra être dilué à une dilution non irritante, en général très faible (1 %, 0,01 %, 0,001 %), et ce également afin d'éviter de provoquer une sensibilisation active. Une difficulté pratique réside à ce niveau, car il existe peu de références sur lesquelles s'appuyer pour effectuer les dilutions. La dilution peut se faire dans l'eau, l'acétone, l'huile d'olive ou la vaseline, en fonction de la solubilité du produit. Le contrôle du pH après dilution est indispensable, mais ne concerne que les substances solubles dans l'eau.

4.3.3 Les tests d'usages : le test ouvert d'application répétée (ROAT test)

Les tests d'usages sont également d'une importance capitale en dermato allergologie de contact, et sont souvent un complément indispensable aux tests épicutanés. Il s'avère d'une aide précieuse dans certains cas : pour clarifier la pertinence clinique d'un test épicutané positif par rapport à l'utilisation d'un produit donné ou dans le cas d'un test épicutané négatif lorsqu'une forte suspicion d'eczéma allergique de contact à une substance particulière subsiste. Le test le plus utilisé est **le test ouvert d'application répétée ou ROAT test** (Nakada et al., 2000). Il consiste à **simuler l'utilisation d'un produit en vie réelle**, en appliquant sur la peau, deux fois par jour, sur une surface de 5 × 5 cm, sans occlusion, le produit suspecté pendant 14 à 21 jours (Amsler et al., 2022). Une échelle de lecture a également été développée (Johansen et al., 1998). Le ROAT semble plus sensible que le test épicutané, car des réactions positives pourraient apparaître pour des doses 30 fois plus faibles par application (Fischer et al., 2009). Par ailleurs, l'application sur un site cutané préalablement atteint pourra engendrer une réaction beaucoup plus rapide et à des doses d'allergène plus faibles que sur des sites naïfs du fait de la présence de lymphocytes T résidents mémoires (J. D. Schmidt et al., 2017). Il ne faut tout de même pas exclure la possibilité de résultats faussement négatifs (Goldminz et al., 2018).

Parfois le ROAT test peut même être réalisé en amont des tests épicutanés, notamment pour des produits finis à la composition complexe. Si le ROAT est positif, l'étape suivante consiste normalement à identifier l'allergène responsable par la réalisation de patch tests. Les ROAT ont également été utilisés à des fins scientifiques pour établir les seuils de réaction aux allergènes dans des conditions réelles (Fischer et al., 2007).

4.3.4 Pertinence des tests et diagnostic final

Une fois la lecture des tests effectuée, la recherche de la **pertinence des résultats**, actuelle ou ancienne, est l'ultime étape de l'investigation. Il s'agit en fait **d'établir un lien entre le résultat du test et les manifestations cliniques présentées par le patient**. Cette recherche est donc une étape cruciale et essentielle mais s'avère des plus complexes. Une codification basée sur la probabilité de pertinence actuelle ou ancienne d'une réaction positive a été proposée (Lachapelle, 1997). La réalisation d'un interrogatoire exhaustif et l'utilisation des tests d'usage restent néanmoins la démarche la plus adaptée dans ce contexte. **Lorsqu'une exposition actuelle pertinente pour les lésions d'EC du patient est retrouvée, un diagnostic d'eczéma de contact allergique pourra alors être posé** (Johansen et al., 2015). Cependant, la négativité des tests ne permet pas toujours d'éliminer de façon formelle la possibilité d'un ECA. La reprise d'une anamnèse minutieuse rétrospective pourra alors aider le clinicien à progresser dans la découverte de l'allergène responsable. La connaissance des réactions croisées potentielles est également indispensable car elle permet de pouvoir prédire l'apparition de réactions allergiques face à des substances a priori différentes (Madan & Beck, 2005). Il convient également de noter qu'un test cutané positif peut parfois témoigner d'une sensibilisation ancienne, sans rapport avec les lésions récentes d'eczéma de contact.

Le diagnostic de l'eczéma de contact irritant, est quant à lui un diagnostic d'exclusion. Il ne peut être posé qu'après une analyse exhaustive de l'exposition et la détection d'une exposition pertinente aux irritants au niveau des sites cliniquement atteints. Une relation temporelle entre l'exposition et l'apparition ou l'aggravation de la maladie doit également être recherchée. Dans de nombreux cas, la réalisation des tests épicutanés est nécessaire pour exclure le diagnostic d'ECA. Par ailleurs, l'ECI coexiste très souvent avec l'ECA (Friis et al., 2013), c'est pourquoi l'analyse des expositions est importante pour déterminer si les deux diagnostics sont alors pertinents. La prévalence de coexistence de ces deux types d'eczéma est difficile à établir avec certitude et dépend de la population étudiée et de la rigueur avec laquelle les critères diagnostiques sont appliqués, et des taux variant de 5% à 50% ont été rapportés (Agner et al., 2015; Diepgen et al., 2009).

La procédure de diagnostic actuelle est synthétisée dans la **Figure 18**.

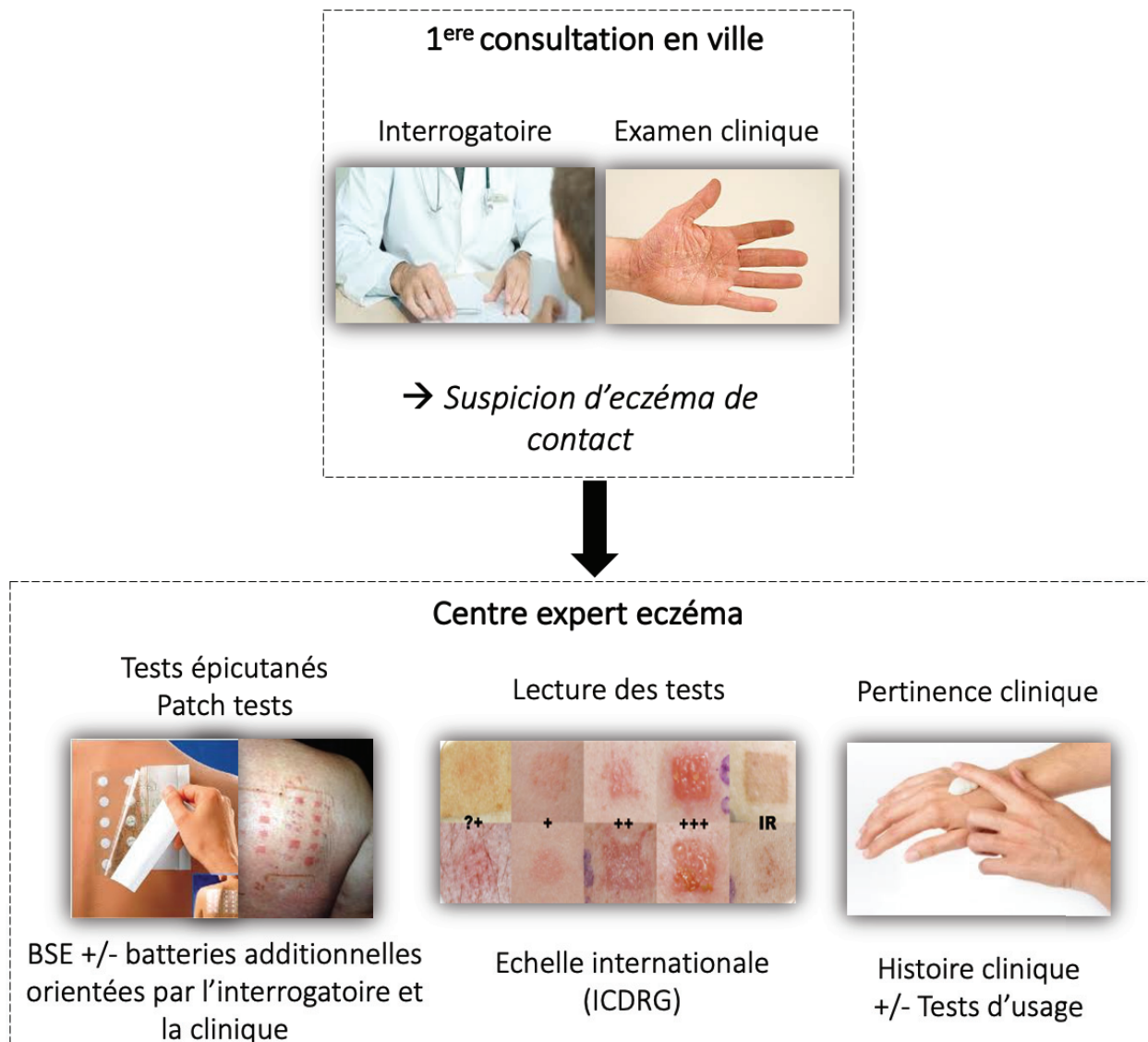


Figure 18. Procédure diagnostique actuelle des eczémats de contact

Le diagnostic d'EC est suspecté sur la base d'un interrogatoire et d'un examen clinique en faveur. Le patient est ensuite adressé à un centre expert pour la réalisation de patch tests. En cas de réaction positive, il convient alors de rechercher la pertinence clinique de celle-ci. Dans certains cas, le recours aux tests d'usage est alors nécessaire. Un diagnostic d'ECA ne sera posé qu'en cas de test épicutané positif associé à une pertinence clinique actuelle et certaine. Le diagnostic d'ECI est un diagnostic d'exclusion.

4.4 Examens complémentaires

Dans la majorité des cas, aucun examen complémentaire n'est recommandé et ne permet de faire le diagnostic d'EC à ce jour.

Dans certaines situations il peut s'avérer utile de recourir à l'examen anatomopathologique en cas de doute avec un diagnostic différentiel (lymphome T cutané,

pemphigoïde bulleuse, psoriasis...), mais en aucun cas il ne sera contributif pour discriminer les différentes formes d'EC. L'image histopathologique est celle d'une dermatite spongiiforme comme dans les autres variétés d'eczéma et ne permet donc pas de préjuger de l'étiologie de l'eczéma de contact (allergie ou irritation) (**Figure 19**).

Au stade aigu, la lésion histologique la plus caractéristique est la spongiose épidermique. Celle-ci correspond à un œdème intercellulaire d'intensité variable, dissociant les kératinocytes. Elle peut parfois aboutir à la formation de vésicules (vésicules spongiotiques). S'y associe également une exocytose, correspondant à la migration de cellules inflammatoires, essentiellement des lymphocytes et plus accessoirement des polynucléaires neutrophiles et des éosinophiles, qui s'accumulent dans les vésicules spongiotiques. Le derme superficiel est le siège d'un œdème important, associé à un infiltrat lympho-monocytaire à prédominance périvasculaire.

Au stade chronique, il n'existe souvent qu'une spongiose résiduelle. L'épiderme est fortement épaissi (acanthose), et l'on observe souvent un allongement des crêtes épidermiques, avec une hyperkératose.

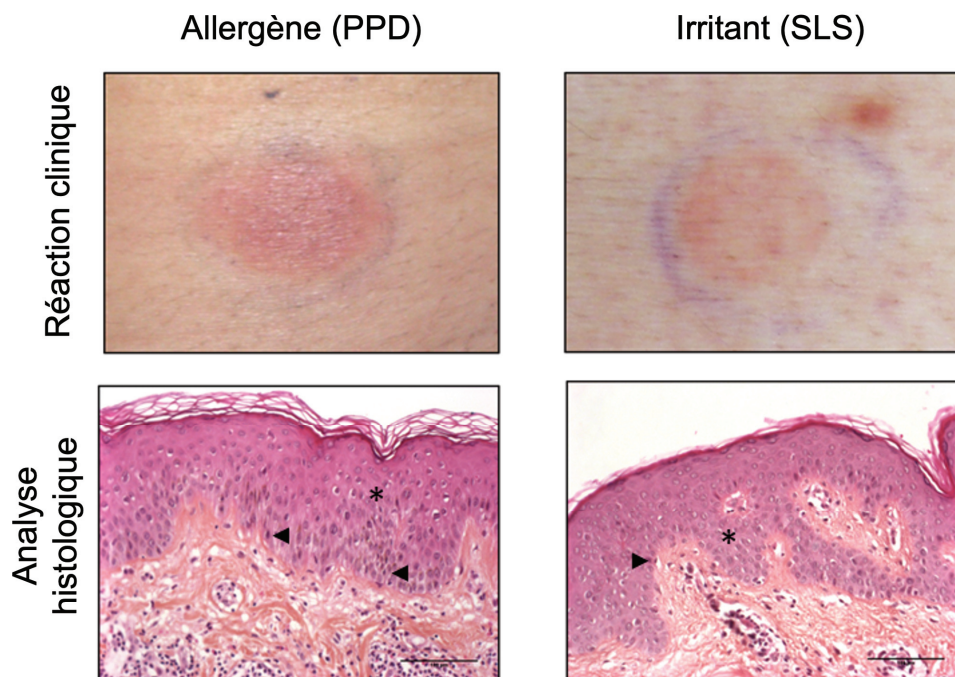


Figure 19. Coupes histologiques de peau d'ECA et d'ECI (coloration hématoxyline et éosine)

Des biopsies cutanées de patch tests positifs pour un allergène (PPD) et un irritant (SLS) ont été prélevées à 72h. Une analyse histologique a ensuite été effectuée. Les étoiles indiquent la spongiose et les flèches l'exocytose.

Par ailleurs, la biologie disponible en routine n'est pas contributive dans le diagnostic des EC. Néanmoins, des tests immunobiologiques *in vitro*, développés pour mettre en évidence des LT spécifiques d'allergènes dans le sang des patients, pourraient offrir de nouvelles perspectives dans le diagnostic des ECA. Ces tests restent pour le moment l'apanage de la recherche mais ont déjà montré des résultats prometteurs.

5. Prise en charge

La connaissance du facteur de contact est un prérequis essentiel à une prise en charge adaptée des patients. En effet, si l'ECI peut être relativement bien contrôlé par des mesures de prévention et de soins locaux afin de restaurer l'état de la barrière cutanée, l'ECA ne pourra l'être qu'à condition d'une éviction stricte et totale de l'allergène responsable des lésions.

Ceci implique donc une prise en charge personnalisée, afin de comprendre et reconnaître les principales sources d'expositions et de développer les stratégies d'éviction adaptées à chaque cas. L'éducation du patient est donc une étape majeure. Par ailleurs, l'utilisation d'émollients est fortement recommandée. Le recours aux dermocorticoïdes peut également être utile en cas de poussées ou d'EC léger et des traitements systémiques pourront être ajoutés en cas de formes modérées à sévères insuffisamment contrôlées par les mesures d'éviction.

Des études ont démontré qu'un diagnostic et un traitement précoces permettent d'améliorer le pronostic des patients (Hald et al., 2009). Par ailleurs, les interventions réglementaires visant à réduire les expositions à des allergènes spécifiques ont non seulement un effet sur le nombre de nouveaux cas d'ECA mais réduisent aussi généralement la gravité de la maladie chez les personnes déjà sensibilisées.

5.1 Éviction des facteurs de contact : pilier de la prise en charge des ECA

Comme expliqué précédemment, il s'agit de la phase primordiale et incontournable de la prise en charge des EC (et tout particulièrement des ECA), et **pour de nombreux patients une éviction stricte entrainera une rémission complète** (Jacob & Castanedo-Tardan, 2007).

L'éviction du facteur de contact n'est évidemment possible qu'en cas d'identification de ce dernier. **Tout traitement à visée symptomatique est voué à un échec plus ou moins complet si les mesures d'éviction ne sont pas prises.** Selon le facteur de contact, ces mesures seront plus ou moins réalisables. En effet, dans certains cas, l'allergène responsable

peut être ubiquitaire (comme le nickel), et une éviction stricte sera donc difficile voire impossible ; les facteurs de contact professionnels en sont un autre exemple.

En cas d'éviction hypothétique ou partielle, les mesures de protection individuelles (gants, vêtements appropriés, chaussures adéquates...) et collectives prennent alors toute leur importance et, dans un contexte professionnel, une collaboration étroite avec la médecine du travail est souvent indispensable. Il est également important de fournir au patient des informations écrites concernant le(s) facteur(s) de contact identifié(s) lors du bilan diagnostique en précisant les différentes appellations possibles, leur fonction, leur utilisation et en identifiant toutes les sources d'exposition potentielles. La connaissance des réactions croisées a ici aussi toute son importance afin d'éviter des expositions accidentelles et donc une éviction incomplète.

Dans les cas particuliers des patients sensibilisés à un composant d'un dispositif implanté, comme les prothèses orthopédiques, les implants dentaires ou les dispositifs endovasculaires par exemple, le retrait du dispositif pourra être envisagé avec ou sans remplacement par un substitut ne contenant pas la substance incriminée (Schallock et al., 2012). Cette décision sera bien sûr prise après avoir évalué le rapport bénéfice-risque pour le patient. Un autre cas particulier concerne les allergènes aéroportés dont l'éviction peut parfois s'avérer difficile. Certaines stratégies consistant à augmenter la ventilation ou porter des équipements de protection (masque, lunettes vêtements, gants) peuvent donc être mises en place (Kimyon & Warsaw, 2019). Dans un contexte professionnel, une étude toxicologique de l'air peut également être bénéfique pour développer des stratégies de modification du lieu de travail.

En cas d'insuffisance ou d'échec des mesures d'éviction, l'initiation d'un traitement topique ou systémique sera alors nécessaire.

5.2 Différentes thérapeutiques

À l'heure actuelle, il n'existe **aucune possibilité de désensibilisation** dans le cadre de l'ECA. Lorsque le facteur de contact ne peut être « évité », comme le cas des allergènes ubiquitaires, ou dans le contexte professionnel où l'exposition aux allergènes et irritants perdure, ou alors que celui-ci n'a malheureusement pas pu être identifié, ou encore lors d'exposition accidentelle au facteur de contact, le recours à des thérapeutiques topiques ou systémiques est indispensable.

L'initiation des traitements se fera alors selon un algorithme en fonction de la sévérité des symptômes. Il convient de noter que le rôle de ces thérapeutiques est de contrôler mais pas de guérir de la pathologie puisque seule une éviction stricte des facteurs de contact pour entraîner une rémission complète des lésions.

5.2.1 Les traitements topiques

Avant toute chose, il est important de rappeler l'importance des mesures de prévention et soins cutanés de base, avec par exemple d'utilisation d'huile lavantes hydratantes et la réduction des facteurs irritatifs en limitant la fréquence et le temps des douches et en diminuant la température de l'eau.

5.2.1.1 *Les émollients*

Pour maintenir une hydratation normale de la couche cornée, et ainsi réduire la xérose cutanée et la desquamation et par extension le prurit induits par l'eczéma de contact, **des émollients sont fréquemment utilisés**. Un émollient sert à ramollir, assouplir, adoucir la peau et fonctionne grâce à deux propriétés de base que sont l'occlusion et l'humectation. L'occlusion est le fait de fournir une couche d'étanchéité à la surface de la peau pour réduire la perte en eau ce qui va avoir pour conséquence l'augmentation de la teneur en eau de la couche cornée (la vaseline étant un bon exemple de substance utilisée comme émollient en raison de ses effets d'étanchéité). L'humectation, quant à elle, est la propriété par laquelle la capacité de rétention d'eau est augmentée (dans ce cas de la couche cornée), augmentant ainsi l'hydratation. Les humectants de faible poids moléculaire comprennent : l'urée, la glycérine, l'acide pyrrolidone carboxylique ou les acides α -hydroxy (acide lactique et acide glycolique).

Certains lipides tels que les céramides peuvent également être ajoutés aux émollients pour renforcer la bicouche lipidique structurelle de la couche cornée, améliorant ainsi la barrière cutanée.

Concernant la galénique, les crèmes et les baumes sont préférés aux laits et émulsions car ils sont plus consistants, épais et plus riches que ces derniers.

5.2.1.2 *Les crèmes barrière*

Lorsque l'éviction d'un facteur de contact n'est pas possible ou partielle, **des mesures prophylactiques peuvent être indiquées pour prévenir ou réduire le risque d'eczéma de contact**. Dans ce contexte, l'application de **crèmes barrière** avant et/ou pendant l'exposition peut jouer un rôle protecteur dans la prévention de l'eczéma de contact. Celles-ci sont conçues pour empêcher ou limiter la pénétration et l'absorption de divers produits chimiques afin de prévenir l'exposition épidermique. La « Food and Drug Administration » (FDA) définit un « produit pharmaceutique protecteur de la peau » comme « un produit pharmaceutique qui protège temporairement les surfaces de la peau ou des muqueuses blessées ou exposées contre des stimuli nocifs ou gênants et qui peut contribuer à soulager ces surfaces » et recense

à ce jour 21 substances actives reconnues pour leur propriété « protectrice pour la peau » (Title 21, Code of Federal Regulations [CFR], partie 347, sous-partie B, section 347.10). Parmi elles, on trouve l'avoine colloïdale, la glycérine, la lanoline ou l'oxyde de zinc.

Néanmoins, dans la littérature il existe peu d'informations sur les mécanismes d'action des crèmes barrière. On pense qu'elles interfèreraient avec les mécanismes d'absorption et de pénétration en formant un film qui bloquerait physiquement la pénétration du produit chimique potentiellement irritant ou allergisant. D'autre part, il est possible qu'une crème barrière contienne des ingrédients actifs qui pourraient piéger un irritant ou empêcher la transformation d'un prohapène en hapène. Certaines crèmes barrière seraient même spécifiquement développées pour la prévention de l'ECA induit par un allergène donné. En effet, une étude récente a montré qu'une crème contenant du glutathion et du sulfate de fer permet de bloquer l'élicitation de l'allergie au chrome hexavalent chez des patients préalablement sensibilisés au dichromate de potassium (Lejding et al., 2020).

Néanmoins, bien que ces produits soient largement utilisés, notamment en Europe, il faut les utiliser avec prudence car ils peuvent contenir des produits chimiques sensibilisants (comme la lanoline). De plus, ils ne constituent pas une barrière complète ou durable, par rapport à une couche cornée intacte, et ne peuvent pas prétendre à être aussi efficace qu'un équipement de protection adapté comme une paire de gants. Par ailleurs, dans les essais cliniques, leur bénéfice réel est souvent controversé (Korinth et al., 2003; Lachapelle, 1996; Wigger-Alberti & Elsner, 1998; Zhai & Maibach, 1996).

5.2.1.3 Les dermocorticoïdes

Les **corticostéroïdes à usage topique (ou dermocorticoïdes) restent incontestablement le traitement de référence de l'EC**, que ce soit pour traiter les poussées ou les formes chroniques de la pathologie.

L'introduction de ceux-ci, depuis plus d'un demi-siècle, a révolutionné la prise en charge des dermatoses inflammatoires en générale et plus particulièrement des eczémas (Cohen & Heidary, 2004). Les dermocorticoïdes sont connus pour inhiber les gènes pro-inflammatoires codant pour les cytokines, les molécules d'adhésion cellulaire ainsi que divers autres médiateurs de la réponse inflammatoire. Cependant, dans le traitement des eczémas de contact, leur rôle majeur réside dans leur capacité à inhiber l'activation des lymphocytes T et la migration des leucocytes (Tuckermann et al., 2005). Par ailleurs, une étude récente menée au sein de notre laboratoire suggère que les corticostéroïdes topiques pourraient limiter la réactivation des Trm réduisant ainsi les risques de récurrence (Ono E, données non publiées).

Il est classique de recommander l'utilisation d'un dermocorticoïde de classe II. Dans certains cas, un corticostéroïde de classe I (pour les mains ou pieds en particulier) ou de classe III ou IV (pour les atteintes du visage et des organes génitaux) peut être préféré. La galénique adéquate (crème, pommade, lotion, gel...) est adaptée à la localisation et au type des lésions (sèches ou suintantes notamment). La fréquence d'application est pour la plupart du temps d'une par jour et le temps de traitement sera maintenu jusqu'à la disparition complète des lésions. Dans certains cas, un traitement d'entretien peut être proposé, dans le contexte de rechutes rapides et fréquentes, souvent lorsque l'éviction stricte n'est pas réalisable. C'est donc l'évolution clinique qui va guider la prescription thérapeutique. Il convient de spécifier que les effets indésirables des corticostéroïdes par voie topique sont rares, du fait d'un passage systémique très faible, et ainsi chercher à lutter contre la corticophobie. Il faut cependant toujours garder à l'esprit que les dermocorticoïdes peuvent également être générateurs d'ECA (tant par une sensibilisation à la molécule active elle-même que les excipients) (Baeck et al., 2010).

5.2.1.4 *Les immunomodulateurs topiques*

Le recours aux **immunomodulateurs topiques** tels que les **analogues de la calcineurine** (tacrolimus et pimecrolimus) ou les **inhibiteurs de la phosphodiesterase** (crisaborole) sont une alternative intéressante dans le traitement topique des EC, notamment dans les formes chroniques, bien qu'ils soient utilisés hors AMM (autorisation de mise sur le marché). Ces différents agents inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires en bloquant les voies de transduction du signal au niveau des cellules T. Ils sont notamment utilisés dans une stratégie d'épargne cortisonique dans la dermatite atopique (Wollenberg et al., 2018) et possèdent une activité équivalente à celle des corticostéroïdes topiques (Bhardwaj et al., 2007; Cury Martins et al., 2015). Des études ont notamment montré l'intérêt du tacrolimus topique dans le traitement de l'ECA au nickel (Saripalli et al., 2003) et le pré-traitement par tacrolimus a significativement diminué l'inflammation induite chez des patients sensibilisés à la diphénylcyclopropénone (Mose et al., 2018). Toutefois leur tolérance n'est pas systématiquement parfaite et impossible à prévoir. Leurs effets secondaires potentiels doivent être connus des patients et concernent principalement des sensations de brûlure et de tiraillement au site d'application surtout en début de traitement.

5.2.2 Les traitements systémiques

Il existe divers traitements systémiques auxquels les cliniciens peuvent recourir en cas d'eczéma de contact chronique, réfractaire aux traitements topiques. La plupart d'entre eux n'ont pas l'AMM dans les EC mais sont largement utilisés dans la dermatite atopique.

5.2.2.1 Les corticostéroïdes

Les **corticostéroïdes systémiques** sont les immunosuppresseurs les plus étudiés et les plus utilisés pour le traitement de l'eczéma réfractaire et des dermatoses inflammatoires en général. Ils agissent en inhibant de manière non spécifique les cascades cytokiniques impliquées dans la plupart des voies inflammatoire et apportent souvent un soulagement rapide au patient (Sung et al., 2019). Cependant, il est important de promouvoir des approches d'épargne stéroïdienne ou du moins une approche minimale (à la fois en termes de durée et de concentration) pour contrôler la maladie afin de prévenir les effets indésirables importants survenant après une utilisation prolongée de ces derniers (maladie de Cushing, diabète, hypertension, l'ulcère gastroduodéal, ostéonécrose, prise de poids, infections opportunistes...) (Sheary, 2018). Parmi les traitements systémiques présentés, les corticostéroïdes systémiques sont les seuls à avoir fait l'objet de recherches significatives. La triamcinolone 40 mg en intramusculaire peut être administrée en cas d'eczéma aigu ; cependant, la prednisone orale (à raison de 1 mg/kg par jour en traitement d'attaque) est plus couramment utilisée car elle permet une diminution de dose progressive.

Il convient de noter que le recours aux corticoïdes systémiques dans le traitement des eczémas de contact est extrêmement rare en France.

5.2.2.2 La photothérapie

La **photothérapie** (principalement **UVB à bandes ou PUVA-thérapie** combinant un traitement oral par **psoralène et UVA**) peut être une option efficace pour les EC ne répondant pas aux traitements topiques. La lumière ultraviolette (UV) possède des propriétés immunosuppressives intrinsèques impliquant de multiples mécanismes, comme par exemple la libération de cytokines immunosuppressives, l'apoptose des cellules T activées, la diminution de la présentation antigénique ou la génération de lymphocytes T régulateurs (Kemény et al., 2019). Cependant, la principale cible moléculaire de l'immunosuppression induite par les UV est l'ADN, et son utilisation doit donc être précautionneuse. La photothérapie implique de se déplacer en centre spécialisé plusieurs fois par semaines et ce pendant plusieurs mois. Par ailleurs, les risques de récurrence sont non négligeables et ce traitement ne peut être renouvelé indéfiniment en raison de ses effets toxiques à long terme.

5.2.2.3 Les traitements immunomodulateurs

Dans certains cas, l'initiation d'un traitement immunomodulateur par voie générale peut être indiquée. Le choix de celui-ci sera orienté par la clinique mais également les antécédents des patients et ses éventuelles contre-indications.

La **ciclosporine** représente actuellement la molécule de choix (Granlund et al., 1998) mais ne peut toutefois constituer qu'une solution à court terme en raison de son risque de néphrotoxicité et de l'éventuelle apparition d'une hypertension. La ciclosporine est un inhibiteur de la calcineurine, et comme le tacrolimus et le pimecrolimus, elle inhibe principalement la production d'IL-2 et d'IFN- γ nécessaire à l'activité des LT CD8+ (Russell et al., 1992). Elle est approuvée dans le traitement de la dermatite atopique (Ring et al., 2012) et son utilisation a été rapportée dans des cas sévères d'eczéma de contact (Granlund et al., 1996).

L'alitrétinoïne (rétinoïde de synthèse) pourrait également être envisagée à la dose de 10 à 30 mg/j pour traiter certains cas exceptionnels d'eczéma de contact chronique sévère des mains résistant aux corticostéroïdes topiques puissants (Bissonnette et al., 2010; Ruzicka et al., 2008). La grossesse constitue une contre-indication absolue et une surveillance biologique est indispensable.

Parmi les différents traitements immunomodulateurs, on trouve également les antimétabolites qui ont une action antiproliférative prédominante sur les lymphocytes T. Les quatre médicaments de cette famille actuellement disponibles sont **l'azathioprine**, **l'acide mycophénolique** (et sa pro-drogue, le mycophénolate mofétil), et le **méthotrexate**. L'azathioprine à la dose de 100 à 150 mg/j a notamment montré son efficacité dans l'EC chronique au parthénium (Sharma et al., 1998). Le méthotrexate, analogue de l'acide folique, est quant à lui le plus utilisé hors AMM. Une récente étude a montré sa non-infériorité par rapport à la ciclosporine dans le traitement de l'eczéma atopique (Goujon et al., 2018). Par ailleurs, son efficacité a été rapportée dans l'EC au parthenium (Sharma et al., 2007) et une étude rétrospective incluant 32 patients atteints d'ECA a montré une amélioration clinique sous méthotrexate chez 78% d'entre eux (A. Patel et al., 2018).

Bien que plusieurs de ces traitements aient montré leur intérêt dans le traitement des eczémas de contact, il est important de souligner qu'aucun n'a aujourd'hui l'AMM dans cette indication.

5.2.2.4 *Les biothérapies et les nouvelles petites molécules*

Le développement des agents biologiques a révolutionné le traitement et la qualité de vie de nombreux patients atteints de maladies inflammatoires et auto-immunes. Contrairement aux immunomodulateurs traditionnels qui agissent sur l'ensemble du système immunitaire, les biologiques sont des molécules très complexes qui agissent en bloquant les interactions entre certaines cellules du système immunitaire et les voies inflammatoires spécifiques responsables de l'apparition des symptômes d'une pathologie donnée. On peut les diviser en plusieurs catégories : des anticorps monoclonaux neutralisant une cytokine ou son récepteur,

des protéines recombinantes ciblant les molécules de co-stimulation, des antagonistes de récepteurs, des récepteurs solubles de cytokine.

En dermatologie, **les anticorps anti-TNF α** ont été les premiers traitements biologiques utilisés et ont radicalement amélioré la prise en charge des patients atteints de psoriasis (LaDuca & Gaspari, 2001). Parmi eux, on peut citer l'étanercept, l'infliximab et l'adalimumab. Bien que les effets de ces agents biologiques dans les EC ne soit pas assez définis, le rationnel pour leur utilisation est basé sur le fait que le TNF α est impliqué en tant que cytokine inflammatoire à la fois dans les formes irritatives et allergiques (Dittmar & Schuttelaar, 2017; LaDuca & Gaspari, 2001). Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant le TNF α dans des modèles expérimentaux murins d'ECA et ECI a montré une réduction significative de l'inflammation cutanée (Piguet et al., 1991). De plus, en 2006, Cassano et al. ont rapporté le cas d'un homme de 30 ans présentant une dermatite atopique sévère de longue date associée à une allergie de contact et répondant mal aux traitements conventionnels. L'utilisation de l'infliximab chez ce patient a entraîné une amélioration spectaculaire des lésions cutanées et du prurit (Cassano et al., 2006).

Parmi les biothérapies, on peut également citer le **dupilumab**, un anticorps monoclonal ciblant la sous-unité alpha du récepteur de l'IL-4 et de l'IL-13, et la première biothérapie à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché dans l'eczéma atopique. Bien que l'on considère historiquement que l'ECA soit principalement médié par des cytokines pro-inflammatoires de type 1, on sait aujourd'hui qu'il existe un part non négligeable de production de cytokine de type 2 par les LT. La variabilité de polarisation des LT dépendrait par ailleurs du type de chimiques impliqué dans la réaction (Dhingra et al., 2014). Le Dupilumab aurait alors toute sa place dans l'arsenal thérapeutique de l'ECA, et pourrait donc être utile dans certains cas, en considérant l'allergène spécifique responsable. Par ailleurs, plusieurs auteurs ont rapporté une efficacité de ce traitement dans des cas d'ECA (Machler et al., 2019; Slodownik et al., 2022; Wilson et al., 2021).

Plus récemment encore, les **inhibiteurs de la Janus kinase**, tels que le baricitinib, l'upadacitinib, l'abrocitinib et le ruxolitinib, qui interagissent avec de multiples voies de transduction du signal liées à plusieurs récepteurs de cytokines et voies immunitaires, ont vu le jour et certains ont obtenu l'AMM dans le traitement de l'eczéma atopique et pourraient ainsi ouvrir nouvelles portes dans le potentiel traitement de l'EC (He & Guttman-Yassky, 2019).

5.3 Éducation des patients

L'éducation des patients est une composante essentielle à la prise en charge des EC. Il est primordial de leur fournir des explications orales et écrites sur les mécanismes et les

symptômes de leur pathologie, les facteurs étiologiques ainsi que les moyens d'évitement et de préventions de ces facteurs. En cas de réactions positives cliniquement pertinentes aux tests épicutanés, il convient alors de remettre au patient des **fiches d'éviction** concernant chacun des haptènes auxquels il est sensibilisé. Ces fiches doivent contenir les différentes dénominations possibles des substances (afin d'aider le patient dans la lecture des étiquettes des produits), leur utilisation et les sources d'expositions potentielles, ainsi que les éventuels risques de réactions croisées. Par ailleurs, plusieurs applications mobiles ont été développées afin de vérifier facilement les compositions des produits commerciaux et ainsi éviter des expositions accidentelles. Il faut également accompagner le patient dans la recherche de produits alternatifs et limiter les stratégies d'éviction abusive que certains peuvent croire nécessaires. L'identification et la proposition d'équipements de protection individuelle adaptés et des conseils concernant leur bonne utilisation, peuvent aussi être nécessaires, notamment en cas d'EC professionnel.

Par ailleurs, que ce soit dans un contexte d'ECA ou d'ECI, l'éducation concernant l'éviction des facteurs irritatifs est indispensable. Par exemple, il faut conseiller d'éviter les contacts directs de la peau avec les solvants, les huiles, les détergents, les contacts prolongés avec l'eau (éviter les lavages de mains abusifs, préférer les douches aux bains), utiliser de l'eau froide ou tiède plutôt que chaude, des huiles lavantes plutôt que des savons...

Enfin, l'explication approfondie des thérapeutiques est également un point non négligeable dans la prise en charge des patients atteints d'eczéma. Il convient notamment de lutter contre la corticophobie, de rappeler les posologies d'application des dermocorticoïdes (avec l'utilisation de l'unité phalangette), ou d'insister sur l'importance des émoullients (à utiliser quotidiennement que ce soit en période de poussée ou de rémission notamment dans les ECI).

Des **programmes d'éducatifs thérapeutiques**, comprenant des ateliers de groupes ou individuels, mais également un soutien psychologique ou social, peuvent également être mis en place. Ceux-ci « visent à aider les patients à acquérir ou maintenir les compétences dont ils ont besoin pour gérer au mieux leur vie avec une maladie chronique [...], dans le but de les aider à maintenir et améliorer leur qualité de vie », selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

5.4 Évolution de la pathologie

La différence majeure entre ECA et ECI réside dans l'évolution de la maladie. En effet, de par son mécanisme physiopathologique impliquant une mémoire immunologique, **l'ECA persiste à vie.**

Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement permettant une guérison totale et définitive des EC, ni de possibilité de désensibilisation à la ou les substance(s) en cause dans le contexte des ECA. La seule manière pour le patient de prévenir la récurrence des lésions d'ECA est l'éviction totale du xénobiotique en cause dans son environnement proche. L'évolution des EC dépendra donc principalement du comportement du patient vis-à-vis de cette éviction (notamment sur sa connaissance des sources d'exposition à l'haptène), ainsi que de l'occurrence de la substance dans son environnement, certaines substances sensibilisantes étant ubiquitaires. En l'absence d'éviction, l'EC pourra revêtir une forme chronique.

5.5 Prévention

Lorsque l'on parle de prévention, on distingue classiquement la prévention primaire qui agit en amont de la maladie (telles que les actions sur les facteurs de risque), la prévention secondaire qui agit à un stade précoce de son évolution (comme le dépistage), et la prévention tertiaire qui agit sur les complications et les risques de récurrence.

La prévention des ECA passe tout d'abord par la prévention des ECI (Nosbaum et al., 2009). En effet, l'utilisation d'émollients et d'équipement de protection par exemple permet de réduire les risques d'irritation cutanée et de stabiliser la fonction barrière de la peau afin de limiter la pénétration des allergènes de contact (Martin et al., 2011). Des efforts doivent également être déployés par le secteur industriel afin de réduire les expositions aux allergènes (même faibles) chaque fois que cela est possible.

L'évaluation du risque (c'est-à-dire le potentiel sensibilisant d'une substance) est également essentielle pour assurer la sécurité toxicologique des produits chimiques utilisés dans les produits de consommation. Réglementairement, les substances sensibilisantes et irritantes font l'objet d'un étiquetage obligatoire sur l'emballage des produits, d'une limitation de leur utilisation ou encore de leur interdiction.

La prévention secondaire des EC repose essentiellement sur l'identification des facteurs de contact responsables des lésions afin d'effectuer une éviction de ces derniers le plus précocement possible (Halbert et al., 1992). Ce dépistage repose essentiellement par la réalisation des patch tests. Malheureusement il existe aujourd'hui souvent un **délai très important entre l'apparition des symptômes et la prise en charge diagnostique des patients**. Une étude australienne a rapporté une durée moyenne de 120 semaines entre les premiers symptômes et la première consultation médicale (Keegel et al., 2005). D'autres études rapportent que plus d'un quart des patients attendent plus d'un an avant de consulter

un médecin généraliste (S et al., 2014) et plus de deux ans pour un spécialiste (Hald et al., 2009). Ce retard diagnostique est associé à un pronostic plus péjoratif.

Enfin, la prévention tertiaire de la pathologie repose sur la mise en place de mesures d'éviction efficaces et l'instauration de traitements en cas de nécessité, mais surtout sur une éducation renforcée des patients. En effet, on a par exemple constaté que les patients souffrant de dermatoses professionnelles récemment diagnostiquées avaient une mauvaise connaissance de leur pathologie mais surtout des soins et des traitements (Fisker et al., 2013).

La prévention des eczémas de contact est donc primordiale et comporte ainsi une importante série de mesures, associant des approches multidisciplinaires.

5.6 Qualité de vie et impact professionnel

Le retentissement physique et psychologique des EC est considérable. Le prurit étant souvent féroce, l'affection doit être considérée comme une urgence dermatologique lors de la phase aiguë et nécessite une prise en charge rapide, visant à soulager le plus vite possible le patient.

Il a été estimé que les eczémas (les analyses concernent à la fois les EC et la dermatite atopique) ont la **morbidité mondiale la plus élevée** parmi l'ensemble des affections cutanées mesuré en espérance de vie corrigée par l'incapacité (DALYs : « Disability-adjusted life years ») (Karimkhani et al., 2017). Cet indicateur synthétique du fardeau sanitaire exprime l'impact d'une maladie en années de vie perdues en combinant la mortalité prématurée et l'incapacité engendrée par la pathologie donnée. Les données suggèrent un **impact majeur des eczémas sur la qualité de vie des patients** non seulement du aux **effets directs des symptômes** comme le prurit et l'altération du sommeil (Anderson & Rajagopalan, 2001; Botto et al., 2019; Raffi, Elaine Allen, et al., 2020), mais également à un **retentissement psychosocial** important ainsi que des **répercussions fonctionnelle et socio-économiques**, en particulier dans les eczémas professionnels (Holness et al., 2013; Kadyk et al., 2003) . Il est important de noter que dans la majorité des cas l'altération subjective de la qualité de vie l'emporte sur l'évaluation objective de la gravité de la maladie et que son évaluation est donc cruciale pour la prise en charge adaptée des patients (Anderson & Rajagopalan, 1997; Boonchai et al., 2020).

Des outils de mesures de qualité de vie, simple d'utilisation, ont ainsi été développés comme le DLQI (« Dermatology life quality index »), le « Skin index » ou encore le HECSI (« Hand eczema severity index ») dans le contexte d'eczéma des mains (Finlay & Khan, 1994; Oosterhaven & Schuttelaar, 2020). De nombreuses études utilisant ces outils ont montré que

les patients atteints d'EC rapportent une qualité de vie inférieure aux patients atteints de psoriasis (Boonchai et al., 2020; Nagpal et al., 2019).

Il convient de noter que l'impact émotionnel des EC est souvent associé à des localisations particulières, comme les eczémas du visage ou des mains (zones les plus visibles du corps) (Boonchai et al., 2020; Hald et al., 2009), et il n'est pas rare d'observer des symptômes dépressifs chez ces patients (Boehm et al., 2012). On comprend donc qu'une approche plus personnalisée avec proposition d'un soutien psychologique, voir psychiatrique, est nécessaire à une meilleure prise en charge des individus.

Par ailleurs, des études ont montré de façon intéressante une amélioration significative de la qualité de vie chez tous les patients ayant bénéficié de tests épicutanés (Boonchai et al., 2020). D'autres suggèrent une amélioration plus marquée uniquement chez ceux ayant présenté un test positif (Korkmaz & Boyvat, 2019). On peut donc présumer que le fait de poser un diagnostic clair et précis et surtout l'identification du facteur de contact responsable de la maladie a un impact bénéfique majeure sur la qualité de vie des patients, raison pour laquelle le diagnostic doit être le plus précoce possible.

En plus de l'anxiété et la dépression provoquées par la maladie, d'autres problèmes sociaux tels que l'isolement, le chômage et l'invalidité temporaire ou définitive peuvent survenir, entraînant par la suite un retentissement économique parfois important. C'est particulièrement le cas dans le contexte des EC professionnels. En effet, ceux-ci sont souvent à l'origine de congés maladie (à répétition), voire de reclassement professionnel ou même d'inaptitude. Le recours à des traitements systémiques coûteux est également plus fréquent. Une prise en charge multidisciplinaire, en lien étroit avec les services de médecine professionnelle sont alors nécessaires pour une prise en charge optimale des patients.

Peu d'études se sont penchées sur l'impact économique réel des eczémas de contact (la plupart comprenant également la dermatite atopique), mais on peut affirmer sans trop s'avancer que la prise en charge des consultations médicales consécutives, des traitements parfois très coûteux et des arrêts de travail multiples entraînent un coût non négligeable aux entreprises et aux services de protection sociale des différents pays européens. En 2008, le coût direct de la dermatite de contact dans l'UE a été estimé à 2,3 milliards d'euros par an (Wijnhoven et al., 2008). Une étude danoise de 2014 a en outre rapporté un coût de productivité de 10 722 € pour l'EC professionnelle et de 3 074 € pour l'EC non professionnelle par patient en plus des coûts de soins, sur une période de 5 ans (Saetterstrøm et al., 2014).

Une approche intégrative, incluant les aspects psycho-sociaux dans la gestion des EC peut donc avoir un impact important et bénéfique tant sur la qualité de vie des patients que les coûts de santé publique.

Chapitre 2 : Nouvelles approches diagnostiques dans les dermatoses inflammatoires

La démarche diagnostique en dermatologie est unique dans le sens où elle implique des lésions cutanées immédiatement accessibles à l'examen visuel. La synthèse de ces éléments cliniques couplée à l'anamnèse permet d'émettre des hypothèses diagnostiques. Néanmoins, les lésions élémentaires (comme les papules, vésicules, bulles...) sont pour la plupart du temps communes à de nombreuses dermatoses, expliquant la complexité du diagnostic différentiel en dermatologie. Par exemple, il peut s'avérer très difficile de faire la différence entre un eczéma de contact allergique, irritatif et atopique, ou même un psoriasis. Les examens complémentaires permettant de guider le diagnostic de certitude et disponibles en routine restent aujourd'hui très limités. Bien que l'anatomopathologie soit considérée comme le complément essentiel de la dermatologie clinique, son apport dans le diagnostic spécifique des dermatoses inflammatoires est très discutable, les critères histologiques étant souvent superposables. Au cours des dernières années, le domaine de la dermatopathologie s'est étendu bien au-delà de l'examen histopathologique conventionnel d'une biopsie cutanée, et la dermatopathologie moderne comprend actuellement l'intégration de méthodes plus récentes comme l'immunohistochimie, l'imagerie *in vivo* et la biologie moléculaire.

Malheureusement, ces techniques sont à l'heure actuelle peu accessibles à la pratique courante et restent pour la plupart du domaine de la recherche.

Néanmoins, face à l'essor des progrès scientifiques et technologiques, il est certain que ces nouvelles techniques deviendront indispensables au diagnostic de certitude et permettront ainsi de guider le clinicien dans la prise en charge des patients.

Dans ce contexte, la mise en évidence de biomarqueurs robustes et objectifs pour discriminer les différents sous-types de dermatoses inflammatoires afin d'en assurer un diagnostic plus fiable, plus sensible, et plus rapide, est un véritable défi à relever.

1. Recherche de biomarqueurs comme plateforme de nouveaux tests diagnostiques

1.1 Définition d'un biomarqueur

Le terme “biomarqueur” apparait dans les années 70, et le cadre réglementaire a été précisé au début des années 2000 par l'EMA (« European Medicines Evaluation Agency ») et le NIH (« National Institute of Health »). Selon le NIH, **un biomarqueur se définit comme « une caractéristique biologique mesurée de façon objective et évaluée comme un indicateur soit de processus biologiques normaux ou pathologiques, soit de réponses pharmacologiques résultant d'une intervention thérapeutique »** (Biomarkers Definitions Working Group., 2001) . Ce concept n'est donc pas nouveau. Par exemple, dès 1848, on utilisait la mesure de la glycémie, tant pour caractériser le diabète que pour suivre l'efficacité des traitements.

L'OMS étend cette définition à “ **toute substance, structure ou processus pouvant être mesuré dans le corps humain ou les matrices biologiques susceptible d'influencer ou de prédire l'incidence ou l'apparition d'une maladie**” (Strimbu & Tavel, 2010). Elle inclut alors dans la grande famille des biomarqueurs “**presque toutes les mesures reflétant une interaction entre un système biologique et un danger potentiel, qui peut être chimique, physique ou biologique**”. Ainsi, la réponse mesurée peut être de différentes natures : fonctionnelle ou biochimique ; mais aussi à différentes échelles : au niveau cellulaire ou moléculaire. Les biomarqueurs représentent donc un large domaine utile en clinique comme en recherche et développement. Devant la diversité des biomarqueurs et les différents domaines d'applications qu'ils peuvent couvrir, le NIH a proposé une classification plus précise de ceux-ci (**Tableau 4**)

L'objectif ultime d'un biomarqueur est d'**améliorer la prise en charge d'une pathologie donnée**, c'est à dire **prédire son risque de survenue, la dépister précocement, la diagnostiquer précisément, prédire son pronostic et la réponse au traitement, orienter le traitement, surveiller son évolution et l'efficacité du traitement**. Par ailleurs, l'ensemble de ces paramètres doivent pouvoir être quantifiés de manière reproductible, avec exactitude et précision par le ou les biomarqueur(s) sélectionné(s).

Selon ces définitions, il convient de noter que les indications fournies par les biomarqueurs peuvent ne pas corrélérer avec les symptômes ou le ressenti du patient.

Tableau 4. Définition des biomarqueurs selon le NIH. D'après (Biomarkers Definitions Working Group., 2001)

| Dénomination | Définition |
|---|---|
| Biomarqueur | Caractéristique biologique mesurée de façon objective et évaluée comme un indicateur soit d'un processus biologique normal ou pathologique, soit de réponse pharmacologique résultant d'une intervention thérapeutique |
| Biomarqueur de type 0 | Marqueur biologique de la progression de la maladie relié à un paramètre clinique connu |
| Biomarqueur de type I | Marqueur biologique qui reflète les effets d'une thérapeutique selon son mécanisme d'action |
| Biomarqueur de type II | Marqueur biologique considéré comme un critère de substitution : une modification de ce biomarqueur est associée à un bénéfice clinique ou à un risque |
| Critère de substitution [ou « Surrogate endpoint »] | Catégorie de marqueurs destinés à se substituer à un critère d'évaluation clinique devant permettre de déterminer le bénéfice clinique ou le risque à partir de données épidémiologiques, thérapeutiques ou physiopathologiques |
| Critère d'évaluation clinique [ou « Clinical end point »] | Caractéristique ou variable qui reflète l'état du patient. |
| Marqueur pronostique | Marqueur permettant de différencier des catégories de patients à différents risques pour une évolution déterminée, indépendamment du choix du traitement administré (ou du choix de ne pas administrer de traitement) |
| Marqueur prédictif | Marqueur permettant de prévoir les éventuels bénéfices (efficacité) et risques (toxicité) d'un traitement selon le statut du marqueur. |

1.2 Différents types de biomarqueurs

Il existe de multiples façons de classer les biomarqueurs : selon leur fonction, selon leur nature, selon leur méthode de détection analytique ou encore selon les différentes autorités de santé. Ici, nous nous intéresserons à une classification selon leur fonction qui reste la plus utilisée et la plus pertinente dans notre contexte.

Ainsi, on peut distinguer deux grands types de biomarqueurs, subdivisés en plusieurs catégories (Težak et al., 2010) :

- (i) **Les biomarqueurs utilisés indépendamment d'une intervention thérapeutique spécifique.** Ces marqueurs permettent notamment d'identifier une

prédisposition pathologique (*biomarqueur de risque*), d'aider à son diagnostic (*biomarqueur diagnostique*), de définir le degré de sévérité de celle-ci (*biomarqueur du stade pathologique*) ou encore de prédire son évolution (*biomarqueur pronostique*). Il s'agit de marqueurs liés aux caractéristiques biologiques des pathologies, qui ne prennent pas en compte les modifications induites par les éventuelles thérapies.

(ii) **Les biomarqueurs « compagnons »**, associés à un traitement. Il en existe deux catégories :

- a. Les biomarqueurs permettant de sélectionner les patients pouvant bénéficier ou non d'un traitement. Ils sont donc utilisés en amont de l'initiation d'un traitement et permettent de stratifier les patients afin de choisir le traitement le plus adapté et le plus efficace pour chacun. On parle alors de *biomarqueurs prédictifs*.
- b. Les biomarqueurs utilisés conjointement à la prise d'un médicament afin de suivre l'efficacité thérapeutique (*biomarqueur de réponse pharmacologique*).

Qui plus est, avec ce type de biomarqueur, il est aussi possible d'évaluer les effets secondaires voir toxiques possibles du traitement chez un patient donné et ainsi, soit de changer de thérapeutique si cela est possible, soit d'effectuer une surveillance rapprochée des patients concernés. La stratégie thérapeutique associée à l'utilisation de marqueurs prédictifs « compagnons » est souvent qualifiée de médecine personnalisée ou individualisée, bien que le terme de médecine stratifiée serait plus approprié.

Dans ce travail de thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement aux biomarqueurs diagnostiques permettant d'affirmer si le patient est atteint de la pathologie ou non. Ils peuvent être de différente nature : clinique, biochimique, d'imagerie... Parfois, l'utilisation d'un seul biomarqueur ne suffira pas à affirmer l'absence ou la présence d'une pathologie et il sera donc nécessaire d'utiliser **une combinaison de biomarqueurs** afin d'augmenter la sensibilité (capacité à détecter tous les positifs et donc à écarter les faux négatifs) et la spécificité (capacité à détecter tous les négatifs et donc écarter les faux positifs) du test. Ils peuvent parfois être étroitement associés aux biomarqueurs pronostiques dont le but est de prédire l'évolution d'une pathologie et par conséquent de pouvoir évaluer les risques pour le patient (i.e. survie d'un patient selon le stade tumoral).

1.3 Complexité et intérêt du développement d'un biomarqueur

Les biomarqueurs sont donc utilisés dans la recherche et la pratique clinique pour :

- diagnostiquer les maladies ou prévoir les risques de maladie,
- surveiller les individus en bonne santé pour détecter les signes précoces de la maladie,
- déterminer l'efficacité d'un traitement,
- cibler des groupes spécifiques de patients pour lesquels un médicament particulier peut être utile,
- produire des médicaments plus sûrs en prédisant plus tôt le potentiel d'effets indésirables,
- améliorer les connaissances physiopathologiques.

L'impact des biomarqueurs a un intérêt majeur dans le développement de nouveaux outils diagnostiques et de nouvelles thérapeutiques. Des avancées importantes ont notamment été réalisées en oncologie, en neurologie, mais aussi dans les pathologies inflammatoires.

Cette nouvelle approche se déroule par essais successifs de plusieurs stratégies jusqu'au succès de l'une d'entre elles.

Toutefois, le chemin qui mène de la découverte d'un potentiel biomarqueur à sa validation est long, coûteux et très sélectif.

1.3.1 Caractéristiques idéales d'un biomarqueur

Pour qu'un biomarqueur puisse être utile et attractif, il doit être pertinent et précis. Il doit également fournir des informations qui ne pourraient pas être obtenues par d'autres moyens, et pour lesquelles les conséquences des mesures ou des résultats doivent être acceptables par les patients. Idéalement, il doit donc présenter les qualités suivantes :

- Être facile à détecter et mesurer, idéalement par des méthodes peu ou pas invasives et des techniques peu coûteuses, standardisées, reproductibles et rapides.
- Être généralisable, c'est-à-dire présenter une faible variabilité biologique. Il ne doit donc pas être influencé ou modifié par des variations physiologiques ou d'autres facteurs tel que l'âge ou la prise de certains médicaments par exemple.
- Être suffisamment sensible pour assurer un taux élevé (idéalement 100%) de personnes malades reconnues comme telles d'après la valeur du biomarqueur
- Être hautement spécifique de la condition pathologique recherchée, ce qui correspond à un faible taux (voire nul idéalement) de personnes non-malades reconnues malades selon la valeur du biomarqueur.
- Être lié à la réponse clinique dans le contexte des biomarqueurs « compagnons ».

La spécificité et la sensibilité sont deux qualités complémentaires indiscutables d'un biomarqueur, conditionnées par l'association entre le biomarqueur et la condition pathologique recherchée. Elles peuvent être mesurées à l'aide d'une courbe ROC (« receiver operating characteristic »), qui oppose ces deux critères sur un graphique. L'aire sous la courbe (AUC) calculée devra être la plus grande possible (proche de 1), pour que le biomarqueur puisse être jugé comme efficace.

Un biomarqueur peut être utilisé en association avec plusieurs autres biomarqueurs pour augmenter la force diagnostique ou de prédiction.

1.3.2 Découverte, développement et validation des biomarqueurs

La recherche et le développement des biomarqueurs sont réalisés en plusieurs étapes (**Figure 20**).

La première étape consiste en une phase exploratoire en vue d'**identifier un ou des biomarqueurs candidats**. Les méthodes de découverte de biomarqueurs sont très diverses et liées à la variété des composés pouvant être considérés comme molécules d'intérêt. Dans certains cas, le candidat biomarqueur est identifié à partir de connaissances scientifiques et médicales existantes. Néanmoins, le développement de nouvelles méthodes d'approche globale (cf Chapitre 2 :1.4) permet maintenant une identification empirique de nouveaux biomarqueurs.

Quelle que soit l'approche utilisée, la **même stratégie de recherche de biomarqueurs sera appliquée** (J. W. Lee et al., 2006). On effectue une **analyse comparative entre des échantillons “cas” et “contrôle”** provenant de patients parfaitement phénotypés pour la pathologie étudiée et de patients ne la présentant pas. En fonction de la technique utilisée, le nombre d'échantillons à comparer sera aussi à prendre en compte.

Une fois le(s) biomarqueur(s) identifié(s) et caractérisé(s), viennent les étapes de développement d'un test. Il s'agit tout d'abord de **concevoir un test diagnostique** permettant la détection du biomarqueur préalablement identifié et surtout cohérent avec la pratique courante. Il faudra ensuite **démontrer la fonctionnalité du test**. A cette étape, on cherche à obtenir la preuve expérimentale des capacités du test à détecter le biomarqueur en question. En cas de résultat concluant, on pourra alors lancer une **étude de preuve de concept consistant à prouver la faisabilité et la viabilité du test**.

Viennent ensuite **les étapes cruciales de validation** (Allinson, 2018). En effet le test diagnostique développé doit être évalué à trois niveaux :

- **La validité analytique** correspond à l'**évaluation des performances techniques du test**, c'est-à-dire sa capacité à réaliser la mesure d'intérêt de façon exacte et fiable. Les caractéristiques techniques prises en compte comprennent l'exactitude, la sensibilité et la spécificité analytique, la robustesse, la répétabilité, la reproductibilité, et la satisfaction des contrôles qualités. Les performances d'un nouvel essai pourront alors être comparées à celles de dispositifs équivalents s'ils existent.

- **La validité clinique** du test correspond à sa **capacité à prédire avec précision et fiabilité le phénotype clinique d'intérêt**. Il s'agit donc de mesurer les qualités diagnostiques du biomarqueur. La validité clinique prend en compte les paramètres de sensibilité et de spécificité cliniques (qualités intrinsèques), qui seront déterminés à partir de cohortes de sujets atteints et non atteints. Elle permet également de définir les valeurs prédictives positive et négative du test (qualités extrinsèques), qui définissent ses « performances diagnostiques ».

- **L'utilité clinique du test diagnostique** correspond à la **démonstration de l'utilité et de la valeur ajoutée du test pour la prise en charge des patients**. Cela peut couvrir divers domaines d'application. Les résultats peuvent fournir des informations utiles pour la prise de décision concernant la stratégie thérapeutique par exemple.

Les dernières étapes concernant la **réglementation, l'approbation et le lancement du test** en pratique courante, ainsi que **son remboursement**. Cela comprend notamment l'autorisation de mise sur le marché de dispositifs médicaux de diagnostic in vitro (DMDIV), permise par le marquage CE (conformité aux exigences).

Valider un biomarqueur reste donc un processus long et complexe, ce qui explique leur faible nombre en routine.

DEVELOPPEMENT DE BIOMARQUEURS

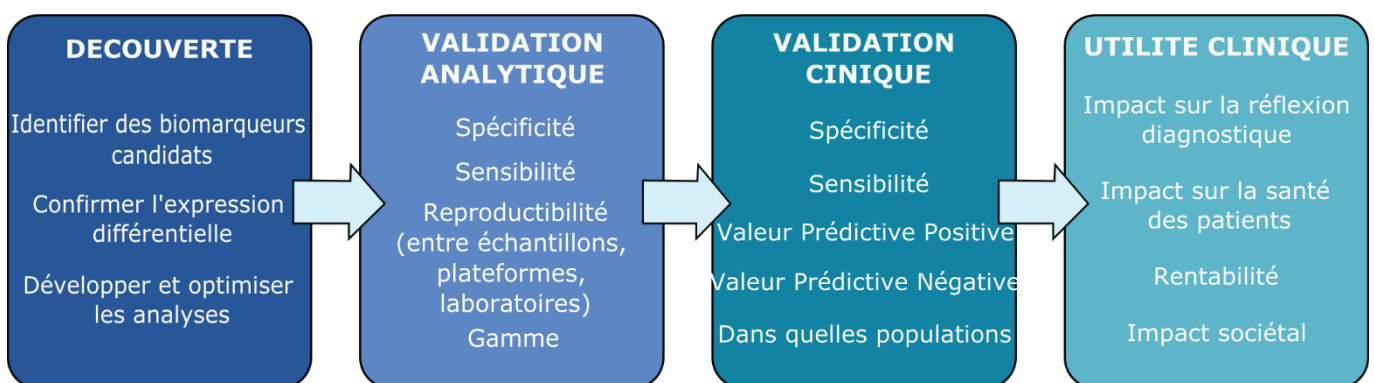


Figure 20. Les différentes étapes de développement des biomarqueurs

1.3.3 Le concept de médecine de précision

Les progrès de la recherche durant ces dernières décennies ont permis de mieux comprendre les mécanismes biologiques à l'origine du développement et de la progression des pathologies humaines. Ces mécanismes, très divers, peuvent varier d'un patient à l'autre pour une même maladie. De cette observation a émergé la notion d'**endotypes** qui représentent des **sous-groupes distincts d'une même maladie, défini par un mécanisme biologique spécifique**.

Ainsi, s'est développé le concept de « **médecine de précision** » qui correspond à un modèle médical permettant de caractériser précisément les individus par leur endotype dans le but de prévenir une maladie, proposer un diagnostic précis, ou encore une thérapeutique adaptée.

L'idée de la médecine de précision est donc de **basculer d'une approche globale « valable pour tous » vers une stratégie individualisée/personnalisée** qui permettra à terme de cibler « le bon patient avec le bon médicament à la bonne dose au bon moment », basée sur les caractéristiques individuelles de la maladie.

Bien que le terme de médecine de précision ait souvent été associé à la création de nouvelle thérapie ciblée, il correspond plutôt à la capacité accrue de **classer/stratifier les individus**. En effet, choisir « le bon traitement » passe d'abord et avant tout par un diagnostic précis et fiable. Ainsi, l'identification de biomarqueurs diagnostiques permettant de stratifier les patients en fonction de leur endotype est un prérequis essentiel à une prise en charge plus personnalisée des patients. Cette approche ciblée pourrait également épargner les surcoûts en évitant les errements diagnostics, les examens à répétition et les traitements inadaptés.

On dispose aujourd'hui de quelques exemples d'application en termes de médecine de précision, notamment dans le domaine de l'oncologie. Par exemple, l'identification du biomarqueur HER2 dans les cancers du sein a permis de classer les patients en fonction de son expression et ainsi proposer une stratégie thérapeutique ciblant les récepteurs de cette protéine avec le trastuzumab (Indini et al., 2021). De la même façon, l'émergence de thérapie anti-BRAF comme le vémurafénib ou le dabrafénib dans les mélanomes n'a été rendu possible que dans les suites de l'identification de la mutation du gène BRAF chez des groupes de patients spécifiques (L. Cheng et al., 2018).

Il convient de noter que la médecine de précision n'a pas seulement pour but d'adapter le traitement aux caractéristiques d'un patient ou de sa tumeur. Elle permet également d'identifier une éventuelle prédisposition à une maladie et ainsi d'offrir une prévention adaptée et individualisée. La prise en compte de l'ensemble de ces dimensions est le fondement d'un

autre concept, la « **médecine 4P** » : **Préventive, Prédicative, Personnalisée et Participative** (Tian et al., 2012).

On assiste ces dernières années à des évolutions technologiques majeures qui conduisent au développement d'outils d'analyse de plus en plus performants. Il devient ainsi possible d'obtenir, pour un grand nombre de patients, un profil moléculaire de plus en plus complet de chaque maladie et ainsi mettre en évidence de nouveaux endotypes.

1.4 L'apport des nouvelles technologies d'approche globale : l'ère de l'« omique » et de la biologie systémique

Par rapport aux stratégies classiques focalisées sur un gène, un ARN ou une protéine à partir d'une hypothèse tirée de la littérature, le développement d'approches globales sans a priori, c'est-à-dire impliquant une investigation complète et systématique des paramètres biologiques, offre une multitude de nouvelles possibilités pour la recherche de biomarqueurs. Elles peuvent être complémentaires de technologies déjà éprouvées telles que l'immunohistochimie et l'immunophénotypage par cytométrie en flux.

Les nouvelles technologies d'approche globale correspondent à **l'ère de l'« omique »** (rendue possible par l'arrivée du séquençage de nouvelle génération) et permettent, par une approche non biaisée de caractériser les variations de séquence (**génomique**) ou d'expression des gènes (**transcriptomique**), des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles (**protéomique**) et des métabolites (**métabolomique**) associées à une pathologie (**Figure 21**). Ces approches ont abouti à la génération d'une quantité massive de nouvelles données, reflétant l'état biologique des populations cellulaires à un moment donné. Avec le progrès technologique constant, il est même désormais possible d'obtenir ces informations à l'échelle d'une seule cellule.

L'analyse de ces données a été permise par le développement de la **bio-informatique translationnelle**, alimentant des méthodes d'**intelligence artificielle** qui pourraient à l'avenir guider la classification, le diagnostic et le traitement des pathologies (Agache & Akdis, 2019), afin de contribuer à mieux personnaliser l'approche médicale.

De cette nouvelle ère est également née le concept de **biologie systémique** qui est une approche « intégrative et holistique » visant à étudier les interactions entre les différents composants d'un même système biologique.

Ces différentes techniques ont ainsi facilité la découverte de biomarqueurs.

L'ERE DE L'OMIQUE

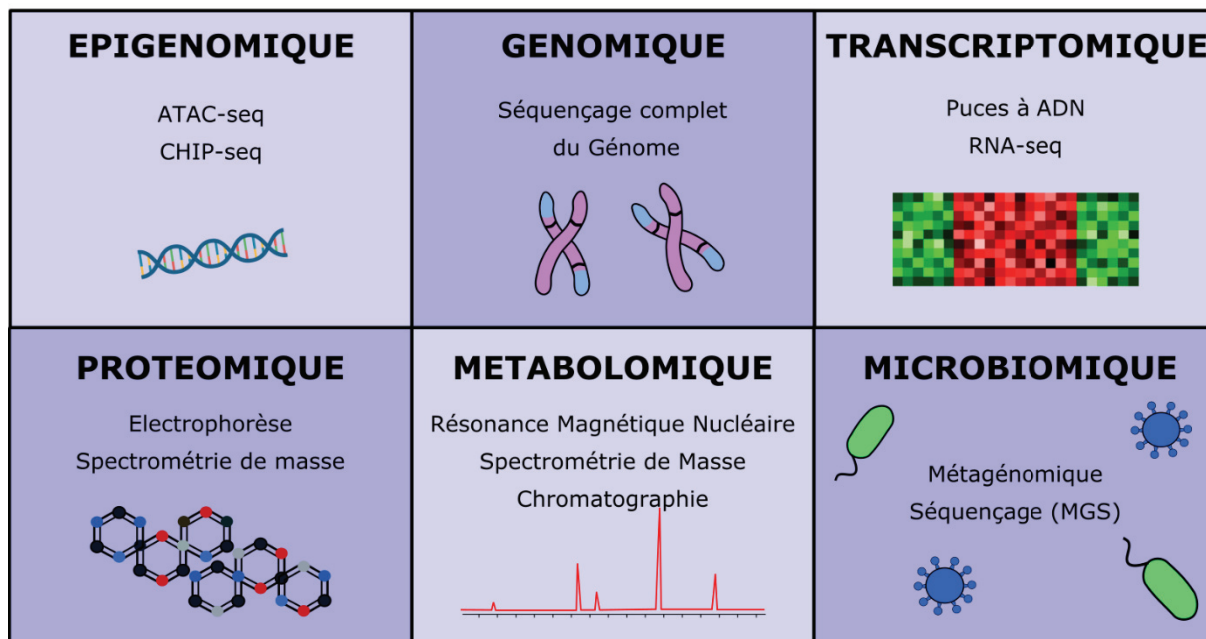


Figure 21. Les différentes technologies « omiques »

1.4.1 Les différents types de données « omiques »

1.4.1.1 *La génomique*

La génomique est par définition la science qui étudie le génome, c'est-à-dire l'ensemble du matériel génétique d'un individu en codé dans son ADN. Elle regroupe diverses approches d'analyse qui permettent de comprendre la constitution, l'organisation et le fonctionnement du génome. Ses applications sont également variées et comprennent notamment la reconstruction d'arbres phylogénétiques d'espèces vivantes par l'analyse de l'histoire évolutive des êtres vivants en lien avec leur écosystème. Dans le domaine médical, la génomique a permis l'émergence de test de dépistage et de diagnostic précoce ainsi que l'identification de marqueurs de susceptibilité de développer des pathologies données.

Le **séquençage haut débit (NGS pour « next generation sequencing »)** a révolutionné le domaine de la génomique au cours des 15 dernières années, en permettant un séquençage de l'ADN beaucoup plus rapide et pour un coût beaucoup plus bas que les méthodes précédemment utilisées comme le séquençage Sanger (technologie de référence jusqu'alors) (L. Liu et al., 2012). Le séquençage permet de déterminer l'ordre des paires de base (ATCG) d'un segment d'ADN. Il existe plusieurs méthodes se partageant le marché du NGS mais la technologie Illumina, utilisant le séquençage par synthèse, est la plus utilisée par la

communauté scientifique (Bentley et al., 2008), représentant à elle seule plus de 90% des données de séquençage générées dans le monde. Il est aujourd'hui possible de séquencer un génome entier en seulement 3 jours avec cette technologie.

Avec l'achèvement du projet génome humain en 2004 et les vastes informations génétiques qu'il a générées, on s'intéresse de plus en plus aux liens entre les génotypes et les phénotypes des différentes pathologies. De nombreuses **études d'association pangénomique (GWAS** pour « **genome-wide association study** ») voient ainsi le jour afin d'identifier des gènes de susceptibilité d'une maladie. Ces études cherchent à mettre en évidence des corrélations entre des variants génétiques, notamment les polymorphismes nucléotidiques (SNP), et des traits phénotypiques pour des pathologies humaines majeures. Ces études ont ainsi révolutionné l'analyse génétique de pathologies multifactorielles telles que les cancers ou l'asthme par exemple (Sud et al., 2017). Depuis la première étude pangénomique conduite en 2005 (Klein et al., 2005), plus de 2500 GWAS incluant au total plusieurs centaines de milliers d'individus ont été conduits pour plus de 280 maladies ou traits phénotypiques. Les variants identifiés peuvent ainsi servir de biomarqueurs.

1.4.1.2 *L'épigénomique*

L'**épigénétique** correspond à l'étude des changements dans l'activité des gènes, indépendants de la séquence ADN et pouvant être transmis lors des divisions cellulaires (Feil & Fraga, 2012). Contrairement aux mutations qui affectent la séquence d'ADN, les modifications épigénétiques sont réversibles. Elles correspondent à des modifications biochimiques de l'ADN (méthylation) ou des protéines qui le structurent : les histones (méthylation, acétylation...) (Potaczek et al., 2017). Ces modifications vont ainsi définir l'état d'un gène comme son expression ou sa répression et interviennent donc dans la régulation de nombreux événements tels que la division cellulaire, la différenciation, la survie, la mobilité... Les anomalies épigénétiques contribuent donc au développement et à la progression de nombreuses pathologies humaines. Le rôle de l'épigénétique est très étudié dans le domaine des maladies complexes et multifactorielles, comme les maladies neurodégénératives ou métaboliques ou encore en oncologie.

L'**épigénomique** permet ainsi d'identifier l'ensemble des modifications épigénétiques caractérisant un génome. Des méthodes de séquençages innovantes ont ainsi vu le jour pour étudier la **méthylation de l'ADN**, comme l'**ATAC-seq** (« **Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput sequencing** »), ou les modifications des histones, tel que le **ChIP-seq** (« **Chromatin ImmunoPrecipitation Sequencing** »).

1.4.1.3 La transcriptomique

Les analyses transcriptomiques, qui visent à étudier tous les transcrits d'ARN dans un échantillon biologique, permettent ainsi d'identifier une grande quantité de gènes modulés dans une condition donnée. Elles sont utilisées pour mettre en évidence les gènes associés à différents phénotypes cliniques et peuvent fournir des informations sur l'activation de voies de signalisation spécifiques impliquées dans la réponse inflammatoire par exemple.

Obtenir le profil d'expression des gènes par analyse transcriptomique permet ainsi une classification moléculaire précise des patients et l'identification de nouveaux biomarqueurs utiles au diagnostic, au pronostic mais également au traitement thérapeutique.

Les technologies d'analyse transcriptomique se sont grandement améliorées au cours des dernières années.

Avec le développement des **puces à ADN** ou « **microarrays** » dans les années 1990, il est devenu possible de visualiser le niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes dans des conditions physiologiques ou pathologiques différentes. Le fonctionnement de cette technologie repose sur le principe d'hybridation entre séquences nucléotidiques complémentaires. Ces « biopuces » sont en fait des supports solides sur lesquels des milliers de fragments d'ADN complémentaires (ADNc) sont déposés. Une puce à ADN standard peut contenir actuellement 18 000 à 20 000 gènes. Ces fragments serviront de sondes pour fixer de façon très spécifique les fragments d'ADNc rétro-transcrits à partir des ARN extraits des échantillons biologiques à tester et préalablement marqués à l'aide de fluorochromes. L'intensité de fluorescence mesurée pour chaque gène représente ainsi son niveau d'expression relatif. Même si cette technique ne permet pas de quantifier de manière absolue le nombre d'ARN messenger (ARNm) par échantillon, elle permet de comparer de manière quantitative le niveau d'expression des gènes dans deux conditions différentes (**Figure 22**).

Plus récemment, le **RNA-seq**, utilisant le **séquençage à haut débit**, a vu le jour. Cette technique puissante permet de mesurer directement l'abondance de toutes les séquences d'ARN d'un échantillon. Le nombre de séquences lues (appelées « reads ») et alignées sur une région d'intérêt (le gène) est considéré comme proportionnel au niveau d'expression de cette région d'intérêt. En effet, plus un gène s'exprime, plus le nombre de ses transcrits est grand.

Il convient de noter, qu'une fois qu'un ou des biomarqueurs auront été identifiés par ces techniques, d'autres approches d'analyses moléculaires pourront alors être utilisées pour les mesurer, comme la **PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)**. Cette méthode basée sur le principe de **transcription inverse** suivi par une étape **d'amplification par réaction de**

polymérisation en chaîne est sensible et peu coûteuse, et permet l'analyse de l'expression relative de transcrits donnés.

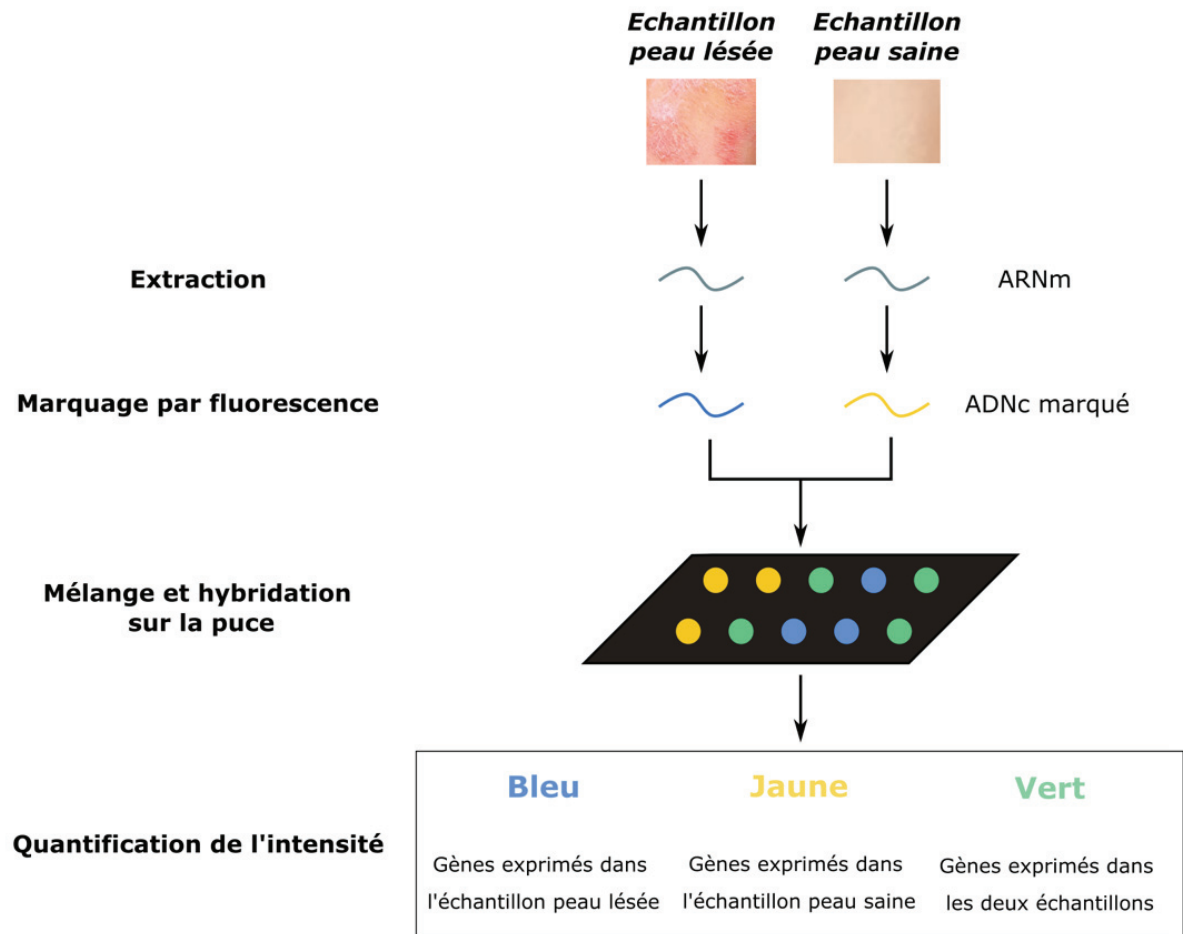


Figure 22. Illustration des puces à ADN (microarrays).

Une puce à ADN permet de refléter le niveau d'expression de milliers de gènes à un moment donné. Une librairie de clones d'ADNc distincts est tout d'abord fixée sur la puce (sondes). Les ARN totaux sont ensuite extraits à partir des échantillons étudiés puis transformés en ADNc par une technique de rétrotranscription et marqués à l'aide de deux fluorochromes différents. Ces cibles ainsi marquées sont alors hybridées sur la puce. Celle-ci est ensuite analysée à l'aide d'un scanner utilisant différentes longueurs d'onde afin d'obtenir une intensité numérique pour chaque sonde (spots). Il est ensuite possible de comparer l'intensité des signaux pour chaque gène étudié afin de déterminer dans quelle condition il est le plus exprimé.

1.4.1.4 La protéomique

Le terme « **protéomique** » se définit comme l'étude à grande échelle de l'ensemble des protéines présentes dans une cellule ou un tissu à un temps donné. Cette approche se focalise

donc sur les éléments fonctionnels des cellules et des tissus. La protéomique s'intéresse non seulement à identifier et quantifier les protéines exprimées dans un échantillon, mais également à déterminer leurs modifications post-traductionnelles (phosphorylation, méthylation, acétylation, glycosylation...) et intégrer leurs interactions physiques ou fonctionnelles et leur localisation.

Au cours des deux dernières décennies, le domaine de la protéomique a connu une forte expansion et différentes stratégies ont été développées. Les premières étaient basées sur l'**électrophorèse en deux dimensions** (Dupont et al., 2008) alors que les plus récentes utilisent la **chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse**. La validation des candidats biomarqueurs identifiés se fait ensuite par des méthodes immuno-enzymatiques telles que l'**ELISA** (« **enzyme-linked immunoassay sorbent** »).

Les techniques de protéomique offrent une approche complémentaire pour étudier la complexité d'une maladie. En effet, l'analyse transcriptomique ne reflète pas toujours le profil d'expression de la protéine correspondante, et le niveau d'expression d'une protéine peut varier en fonction de modifications environnementales. Les biomarqueurs protéomiques refléteront ainsi la réponse d'une cellule ou d'un organe à une maladie (McGregor & Dunn, 2006).

1.4.1.5 *La métabolomique*

La métabolomique est une discipline récente qui comprend l'identification et la mesure des métabolites (Patti et al., 2012). Un métabolite est une substance de petite taille (en général moins d'un kilodalton) formée au cours du métabolisme, qu'il s'agisse du produit final ou d'un intermédiaire. Dans un système biologique, les métabolites peuvent être produits par l'hôte (on parle de métabolites endogènes) mais également par les espèces le colonisant (métabolites exogènes), et comprennent notamment les sucres, les lipides, les acides aminés, les acides gras, etc.

L'analyse des métabolites présents dans l'organisme ou rejetés avec les sécrétions naturelles, permettrait ainsi de constituer une signature métabolomique évoluant au cours de la vie, au rythme des mutations, des modifications de l'organisme et des maladies associées (A. Zhang et al., 2012). Ils reflètent alors les différents processus biologiques associés. Des publications récentes ont estimé le métabolome humain à 3 000 molécules.

Les techniques utilisées associent la **chromatographie (en phase gazeuse ou liquide)** à la **spectrométrie de masse** ou à la **résonance magnétique nucléaire** en fonction des échantillons analysés.

Pour faciliter l'identification des métabolites humains associés à une situation physiologique particulière et la diffusion des résultats, une base de données est mise à jour régulièrement (Wishart et al., 2013). Elle permet d'obtenir, pour chaque métabolite recherché, des informations biochimiques et cliniques, telles que le seuil de détection ou la pathologie concernée par une modification du niveau d'expression.

1.4.1.6 *La microbiomique*

La microbiomique correspond à la mesure de l'ADN, de l'ARN et des protéines des micro-organismes qui colonisent un être vivant (connus sous le nom plus générique de microbiote). Elle se distingue de la **métagénomique**, encore appelée génomique environnementale, qui s'intéresse à l'étude de l'ensemble des micro-organismes dans un environnement donné (comme les écosystèmes marins).

La principale technologie utilisée pour étudier le microbiote bactérien est le **séquençage de l'ARN 16s** (Sanschagrin & Yergeau, 2014), qui est en fait le gène marqueur le plus couramment utilisé pour décrire la composition des bactéries. Cette technique ciblée est beaucoup plus rapide et moins coûteuse que les techniques de séquençage globale.

Cette méthode a pour but d'approfondir notre compréhension des interactions entre microbiote et système immunitaire de l'hôte, et ainsi d'identifier sa contribution au développement des pathologies humaines.

1.4.2 Le concept de biologie systémique ou intégrative

Comme nous venons de le voir, les avancées technologiques, notamment faites dans le domaine du séquençage haut-débit, permettent aujourd'hui de produire de grands volumes de données biologiques, et ceci à différentes échelles du vivant. La puissance de ces technologies en termes de genèse de données et d'informations oblige donc à être encore plus précis et plus rigoureux dans leur application et leur interprétation. Par ailleurs, la complexité et l'hétérogénéité des maladies humaines font qu'il est très peu probable qu'un seul biomarqueur ou une seule approche « omique » suffise. L'intégration de données à des échelles multiples est nécessaire pour construire des modèles qui faciliteront notre compréhension des réseaux interactifs et dynamiques qui sous-tendent les maladies et leurs différents phénotypes ou endotypes (Starchenko & Lauffenburger, 2018). Les méthodes intégratives cherchent ainsi à considérer un système biologique comme un tout, c'est-à-dire un ensemble de signatures moléculaires entrelacées allant du gène à son expression finale : la fonction.

Il faut garder à l'esprit que les fonctions biologiques correspondent à un processus dynamique alors qu'une signature moléculaire obtenue à partir d'une analyse d'approche globale (génomique, transcriptomique, protéomique...) ne représente un phénomène biologique qu'à un moment donné. Le résultat doit donc être mis en regard d'autres paramètres comme les fonctions anatomiques, biochimiques, phénotypiques, cliniques et fonctionnelles du système étudié. De cette nécessité d'avoir une compréhension globale d'un système biologique est née une approche qualifiée aujourd'hui de **biologie systémique** (« **systems biology** »).

La biologie systémique est intrinsèquement interdisciplinaire, réunissant biologistes, médecins, physiciens, chimistes, ingénieurs, mathématiciens, statisticiens, informaticiens autour des mêmes questions scientifiques, et se fonde sur des analyses mathématiques et statistiques standardisées pour intégrer les données biologiques générées à différents niveaux et développer des modèles prédictifs du comportement biologique (encore appelés réseaux biologiques) (**Figure 23**).

Ce domaine n'en est qu'à ses balbutiements, évoluant de manière constante, et les méthodologies doivent encore être affinées pour pouvoir extrapoler plus facilement ces données à la clinique.

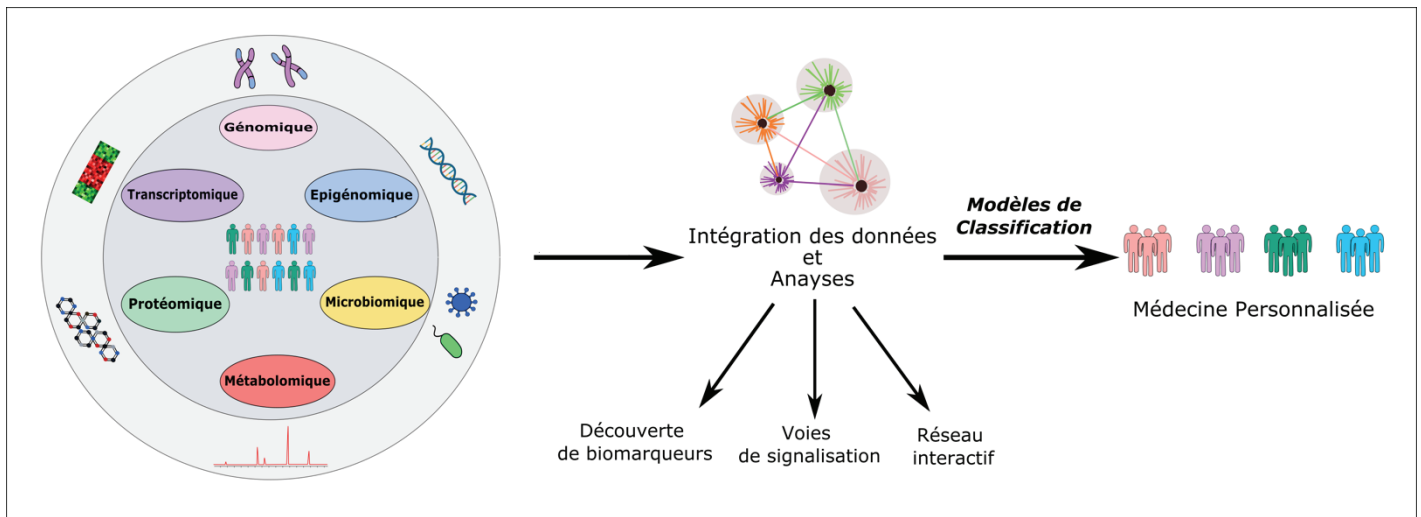


Figure 23. L'intégration des données « omiques » : concept de la biologie systémique

Les avancées des nouvelles techniques de séquençage ont permis de produire des données hétérogènes, volumineuses, de grande dimension et à différentes échelles du vivant. L'intégration de ces différentes données est un défi de taille qui permettrait de tirer le meilleur parti possible de l'accumulation d'informations biologiques pour leur interprétation et leur exploitation. L'analyse de données multi-omiques a pour but de modéliser des systèmes de réseaux biologiques interactifs sous-tendant les maladies, afin d'identifier des biomarqueurs plus sensibles, et ce dans un but de médecine personnalisée.

1.4.3 L'analyse statistique des données transcriptomiques

Au cours de mon travail de thèse, j'ai principalement travaillé à partir de données transcriptomiques issues de l'utilisation de puces à ADN (microarrays). C'est pourquoi dans cette partie, nous introduirons succinctement les principales méthodes d'analyses statistiques classiques des données transcriptomiques qui auront notamment été utilisées au cours de mes travaux. Nous n'aborderons pas ici les étapes de pré-traitements des données, bien que cruciales pour les suites de l'analyse. Celles-ci diffèrent selon la méthode utilisée et comprennent des étapes d'analyse d'image, de réduction du bruit de fond, de normalisation pour les puces à ADN, et de contrôle qualité, d'alignement et d'assemblage dans les analyses de RNA-seq.

Tout d'abord, il faut rappeler que les analyses « omiques » génèrent une quantité considérable de données. Mais ces masses de données non structurées n'apportent une valeur ajoutée que si elles sont traitées et analysées correctement, ce qui nécessite souvent des méthodes statistiques sophistiquées et adaptées pour les exploiter pleinement. L'analyse des données « omiques » est parfois désignée par le terme de « **data mining** » (qui se traduit littéralement par « **fouille de données** »). Cette approche vise notamment à l'extraction d'une information à partir de grandes quantités de données, par des méthodes automatiques ou semi-automatiques, utilisant un ensemble d'algorithmes statistiques et bio-informatiques, pour construire des modèles à partir des données disponibles. De nombreux outils ont été développés en ce sens, utilisant des langages de programmation spécifiques tels que R ou Python.

Néanmoins, avant d'utiliser des méthodes d'analyses complexes, il est toujours prudent de commencer par une étude exploratoire. Cette étape est primordiale pour se familiariser avec le jeu de données et surtout dépister des sources de problèmes comme les valeurs manquantes ou atypiques, ou les distributions anormales, ce qui pourrait conduire à des étapes complémentaires de pré-traitements des données (telles que des méthodes de transformations des variables) afin qu'elles soient correctement exploitables.

1.4.3.1 *Visualisation des données*

La visualisation des données est un élément majeur de l'analyse des données transcriptomiques.

Les méthodes les plus communément utilisées sont des **méthodes d'analyses factorielles**, telles que l'**analyse en composantes principales (ACP)**. Cette analyse n'est autre qu'une représentation graphique synthétique de l'ensemble des données (**Figure 24**). Plus précisément, cette méthode vise à réduire le nombre de variables appliquées à des

individus, pour simplifier les observations tout en conservant un maximum d'informations. Les axes factoriels sont donc des axes virtuels issus d'une synthèse entre les variables (ici les gènes) de l'analyse. Chaque point (dont les coordonnées correspondent aux données d'expression des gènes pour un individu) est ensuite construit en projection sur les plans factoriels. Elle permet ainsi de visualiser des corrélations entre les variables et d'identifier des groupes homogènes d'individus, ou à l'inverse de mettre en évidence des observations atypiques en se basant sur les distances entre chaque individu. Le principe de l'ACP est ensuite de rechercher les facteurs qui rendent le mieux compte des données (Witten et al., 2009).

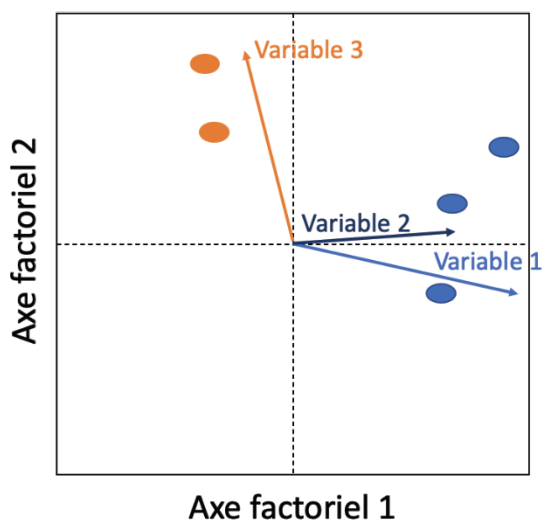


Figure 24. Analyse en composantes principales.

Chaque axe factoriel est construit de telle sorte à maximiser la variance des points projetés. Les coordonnées de chaque point (individus) correspondent aux données d'expression pour chaque variable. Les variables 1 et 2 sont corrélées à l'axe 1 et semblent expliquer la projection des points bleus. A l'inverse la variable 3 corrèle avec l'axe 2 et les points orange. Plus les points sont proches plus ils présentent de similitudes.

1.4.3.2 Détection de gènes différentiellement exprimés

Comme nous l'avons vu précédemment, l'objectif des expériences dites de transcriptomique est principalement de mesurer l'expression d'un grand nombre de gènes sans a priori dans des conditions expérimentales données. Cependant, dans un contexte de recherche de biomarqueurs, seuls les gènes variants entre les différentes conditions expérimentales présentent un intérêt. Ainsi, **la détection et la sélection de ces gènes différentiellement exprimés (DEG)** est primordiale et constitue souvent une des premières étapes de l'analyse des données transcriptomiques. Il existe différentes méthodes d'analyse différentielle que nous ne décrivons pas ici (Jeanmougin et al., 2010). Les résultats sont généralement rapportés en « Log2 Fold Change », le **fold change** correspondant au **rapport du niveau moyen d'expression d'un gène dans une condition par rapport à une autre**.

Il convient également de rappeler que comme avec tout test statistique, il existe une **probabilité de commettre une erreur d'identification**. Afin contrôler cette probabilité il a été

proposé d'utiliser une mesure appelée le « FDR » pour « **False Discovery rate** » qui permet de contrôler le taux d'erreur attendu (Hochberg & Benjamini, 1990)/

Les gènes sélectionnés à cette étape pourront ensuite être visualisés à l'aide d'une **Heatmap (carte thermique) (Figure 25)**. Celle-ci permet une comparaison visuelle rapide de l'expression des gènes en fonction des conditions expérimentales à l'aide d'une échelle d'intensité de couleurs. Chacune des conditions comparées est représentée par une colonne et chaque ligne correspond à un gène (Eisen et al., 1998).

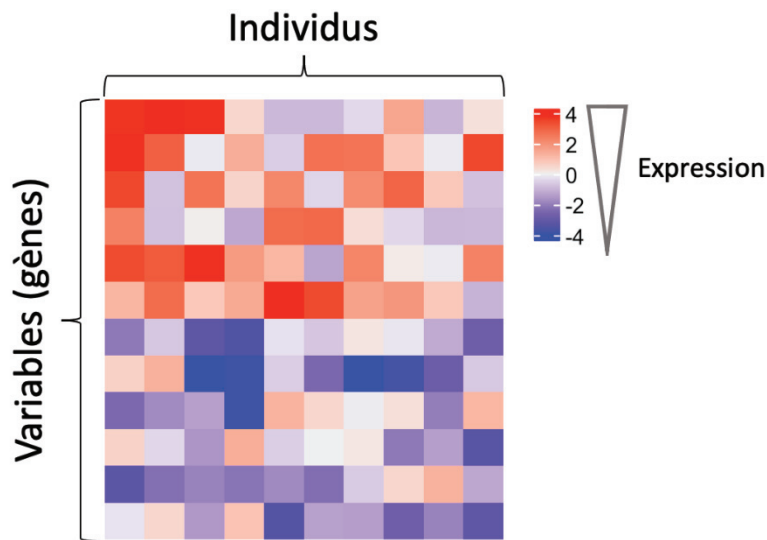


Figure 25. Visualisation des données sur une heatmap.

Une heatmap permet de visualiser rapidement un grand nombre de données. Chaque colonne représente un individu (ou échantillon), chaque ligne représente une variable (ou un gène), et l'expression de chaque variable pour chaque individu est représenté par un code couleur (valeur la plus élevée en rouge et la plus basse en bleu).

1.4.3.3 Clustering

La **classification non supervisée**, plus communément connu sous le nom de « **clustering** » est une étape indispensable à l'interprétation des données. Dans le cadre des données transcriptomiques, le clustering peut s'appliquer à la fois pour classer des individus ou des variables (ici les gènes). L'hypothèse est faite que les variables classées ensemble partagent des propriétés similaires. D'un côté, la classification permet donc d'identifier des groupes d'individus présentant des caractéristiques communes ou proches, c'est-à-dire des profils d'expression génique similaires. Cela permet ainsi d'étudier la particularité des groupes formés ou les différences entre les différents groupes (renvoyant ici au concept d'endotypes introduit précédemment). D'un autre côté, le clustering de gènes permet l'identification des groupes fonctionnels, et des voies métaboliques. C'est donc sur la base de ces clusters (groupes) que se fait l'interprétation et la caractérisation biologique.

Différentes méthodes de clustering peuvent être utilisées dont les plus connues sont le **clustering hiérarchique**, utilisant une **représentation phylogénique des objets**

(dendrogramme), ou la **partition des données (méthode des k-means)** (Hartigan & Wong, 1979) (**Figure 26**).

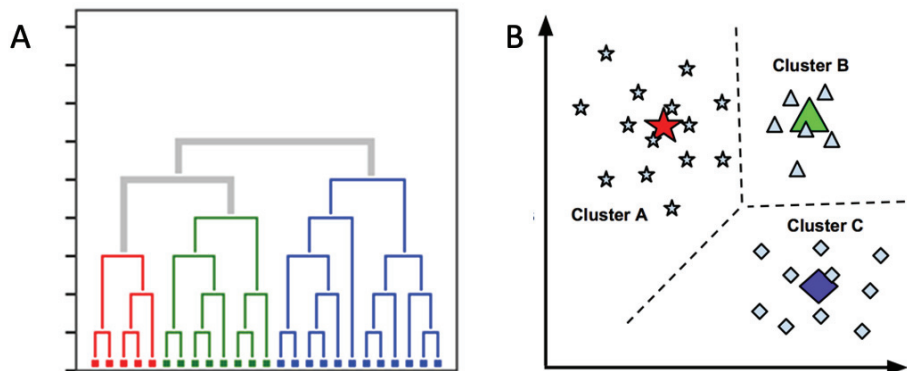


Figure 26. Méthodes de classification non supervisée

- (A) Clustering hiérarchique effectue une classification des individus basée sur la distance ou sur le degré de similarité entre eux. Le résultat d'un calcul de clustering hiérarchique s'affiche sous la forme d'un dendrogramme, qui est une hiérarchie à structure arborescente. Chaque noeud de l'arborescence contient un groupe d'individus similaires, et les noeuds sont regroupés en fonction de leurs similitudes.
- (B) La méthode des k-means est une autre technique de classification non supervisée permettant de regrouper les individus en différents groupes selon leur ressemblance. Cette méthode de partition des données utilise la distance de chaque individu par rapport au centre de chaque groupe pour son attribution à une classe donnée.

1.4.3.4 Caractérisation biologique

L'interprétation biologique des données est une étape clé de l'analyse transcriptomique. Cette étape permet notamment d'émettre des hypothèses sur les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent la condition étudiée en **regroupant les gènes qui contribuent à des voies de signalisation communes** (d'où le terme d'analyse de « **Pathways** »).

La caractérisation biologique nécessite l'utilisation de **bases de données contenant des informations biologiques sur les gènes**, tels que des annotations fonctionnelles de type **Gene Ontology** (Ashburner et al., 2000), et consiste à attribuer à un ensemble de gènes (issu soit d'une sélection, soit d'un cluster), des fonctions biologiques qui le caractérisent. D'un point de vue méthodologique, cette analyse fonctionnelle, encore appelée **analyse d'enrichissement**, revient à effectuer un test exact de Fisher afin de comparer la proportion de gènes associés à la fonction dans l'ensemble à caractériser par rapport à la proportion de gènes associés à la fonction dans un ensemble de références (Fisher & Russell, 1922).

1.4.3.5 *L'apprentissage automatisé pour l'identification et la validation de biomarqueurs pertinents*

Le recours au séquençage de l'ARN permet ainsi de dresser des profils moléculaires caractérisant les pathologies humaines. Néanmoins, un des objectifs majeur dans le domaine de la santé est de pouvoir obtenir un diagnostic fiable, basé sur la mesure du niveau d'expression de quelques gènes seulement. Ce problème est donc différent de ceux traités par les analyses exposées précédemment. En effet, les gènes les plus différenciellement exprimés et les plus significatifs statistiquement ne sont pas nécessairement les gènes les plus prédictifs.

L'identification de biomarqueurs fiables et robustes à partir des données transcriptomiques est aujourd'hui rendue possible par le développement de l'**apprentissage automatique** (ou « **machine learning** »). Cette discipline a été introduite dès 1959 par Arthur Samuel. Selon lui, l'apprentissage automatique donne "aux ordinateurs la capacité d'apprendre sans être explicitement programmés". Une définition plus précise sera donnée en 1998 expliquant que "*l'apprentissage automatique explore l'étude et la construction d'algorithmes qui peuvent apprendre à partir de données et faire des prédictions sur celles-ci*" (Kohavi & Provost, 1998).

En d'autres termes, cette discipline consiste à utiliser des principes de mathématique et statistique avancés pour extraire l'information utile et pertinente contenue dans un jeu de données existant, afin de générer des modèles de prédiction/classification généralisables à de nouvelles données entrantes. Ces algorithmes pourraient décupler les capacités diagnostiques et pronostiques par l'identification de biomarqueurs pertinents permettant de classer les patients.

Dans cet objectif, la **combinaison de l'apprentissage supervisé et de la sélection de caractéristiques sur des données transcriptomiques** est de plus en plus utilisée pour identifier des signatures transcriptomiques associées à des maladies (Yoosuf et al., 2020). Plusieurs **algorithmes d'apprentissage/classification supervisé(e)** ont été développés, comme les **machines à vecteurs de support** (« **support vector machine** » ou **SVM**), les **réseaux de neurones** ou encore la méthode des **forêts aléatoires** (« **random forest** ») que nous expliciterons brièvement ici. Cette dernière méthode est très appréciée de la communauté scientifique du fait de ses bonnes performances et nous l'avons utilisée au cours de mes travaux de thèse.

De façon générale, l'apprentissage supervisé nécessite des données « étiquetées », c'est-à-dire des données pour lesquelles nous disposons de variables (expression des gènes) et connaissons déjà le résultat (par exemple individu malade ou individu sain). Son objectif est

donc d'apprendre les relations entre les variables et les résultats afin de pouvoir prédire le résultat pour de nouvelles données "non étiquetées" dans les suites (Mitra & Acharya, 2005).

Le jeu de données initial utilisé pour entraîner le modèle est appelé « **données d'apprentissage** ». Un jeu de « **données test** » est ensuite utilisé pour évaluer la qualité de la prédiction sur de nouvelles données.

Ces jeux de données peuvent être générés par **division aléatoire du jeu de données initial** (généralement 2/3 pour l'apprentissage et 1/3 pour le test). Néanmoins, lorsque nous disposons d'un nombre d'échantillons limité (ce qui est souvent le cas dans les études « omiques »), il est parfois intéressant de recourir des **techniques de validation croisée**, permettant d'utiliser l'intégralité de notre jeu de données pour à la fois pour l'entraînement et pour la validation. La **méthode des k-fold** est souvent utilisée. Cette méthode consiste ainsi à découper aléatoirement le jeu de données initial en k parties de taille approximativement égale (k étant souvent compris entre 5 et 10). Tour à tour, chacune des k parties est utilisée comme jeu de test, le reste étant utilisé pour l'entraînement. On obtient donc une prédiction par échantillon sans qu'aucune de ces prédictions n'ait été faite avec un jeu d'entraînement contenant l'échantillon en question. Le principe de ne pas valider sur le jeu d'entraînement afin d'éviter le sur-apprentissage est ainsi respecté ! Le taux d'erreur est ensuite agrégé en faisant la moyenne du taux d'erreur de chaque estimation individuelle.

Pour déterminer l'efficacité du modèle, différentes mesures de performance peuvent être utilisées, telles que :

- **la précision** qui correspond au pourcentage d'observations positives correctement prédites par rapport au nombre total d'observations positives prédites. Une précision élevée reflète un faible taux de faux positifs.
- **le rappel** (ou **sensibilité**) indique le pourcentage d'observations positives correctement prédites par rapport au nombre total d'observations réellement positives.
- **le score F1** qui est défini comme étant la moyenne harmonique de la précision et du rappel.

Les courbes ROC sont également utilisées pour identifier les performances de l'algorithme de classification en utilisant la mesure de l'aire sous la courbe.

Dans les suites, il conviendra de valider le modèle sur de nouveaux jeux de données à partir de nouvelle cohorte de patients afin de prouver ses capacités de généralisation.

Au-delà du problème de classification, le but de l'apprentissage supervisé repose également sur **la sélection de caractéristiques pertinentes**, c'est-à-dire un sous-ensemble minimum de gènes, qui donne une meilleure compréhension des variables d'entrée tout en

fournissant un prédicteur non seulement plus rapide, plus rentable, mais aussi plus performant (Guyon & Elisseeff, 2003). Selon la façon dont on combine les techniques de sélection des caractéristiques avec la modélisation du classificateur, il existe quatre types de sélection des caractéristiques, à savoir les filtres, les enveloppes, les méthodes intégrées et les méthodes hybrides.

- **Les méthodes filtres** (« **filter methods** ») évaluent le pouvoir discriminant des gènes en ne se basant que sur les données d'expression et est donc complètement indépendante de la classification. Elles estiment un score de pertinence pour chaque variable. Un seuil est ensuite défini pour sélectionner les plus pertinentes qui seront utilisées dans le modèle de prédiction (Guyon & Elisseeff, 2003).

- **Les méthodes enveloppes** (« **wrapper methods** ») sont quant à elles dépendantes du classificateur puisqu'elles sélectionnent le sous-ensemble de caractéristiques le plus discriminant en réduisant au minimum l'erreur de prédiction de ce dernier (Kohavi & John, 1997; H. Zhang et al., 2012). Ces méthodes ne garantissent donc pas que les gènes ou les biomarqueurs sélectionnés puissent être généralisables à d'autres méthodes de classification que celle utilisée pour la sélection.

- **Les méthodes intégrées** (« **embedded methods** ») sont une autre technique dépendant spécifiquement du modèle de classification puisque les gènes sont sélectionnés au cours du processus d'entraînement du modèle de prédiction. (Quinlan, 1986).

- **Les méthodes hybrides**, plus récentes, utilisent généralement l'information de classement obtenue par les méthodes filtres dans une étape de pré-sélection d'une majorité de gènes les plus pertinents, pour ensuite guider la recherche dans les algorithmes d'optimisation utilisées dans les méthodes wrapper (X. Liu et al., 2005).

Cette dernière méthode semble aujourd'hui la plus pertinente pour l'identification de biomarqueurs.

L'un des algorithmes les plus en vogue parmi les scientifiques aujourd'hui est celui des forêts aléatoires (« random forest »), proposé par Breiman (Breiman, 2001), qui sont construites par agrégation d'arbres de classification (**Figure 27**). Chaque arbre est indépendant et estimé sur un « **échantillon bootstrap** ». Le bootstrap consiste à utiliser plusieurs ensembles de données ré-échantillonnées à partir de l'ensemble des données à disposition et ce à l'aide d'un tirage aléatoire avec remise. A la fin, tous ces arbres de décisions sont assemblés, on parle alors de « **bagging** ». Cette technique consiste en l'assemblage d'un grand nombre d'algorithmes afin de réduire la variance du modèle et de limiter son surapprentissage. La prédiction faite par le random forest renvoie ainsi au nombre de votes (pour une classe donnée) de tous les arbres.

L'algorithme des random forest permet également d'attribuer un indicateur d'importance à chacune des variables explicatives (les gènes), aidant ainsi à identifier les biomarqueurs les plus pertinents (méthode enveloppe).

Les forêts aléatoires sont reconnues comme étant robustes et ont montré de grandes performances dans de nombreux problèmes de classification.

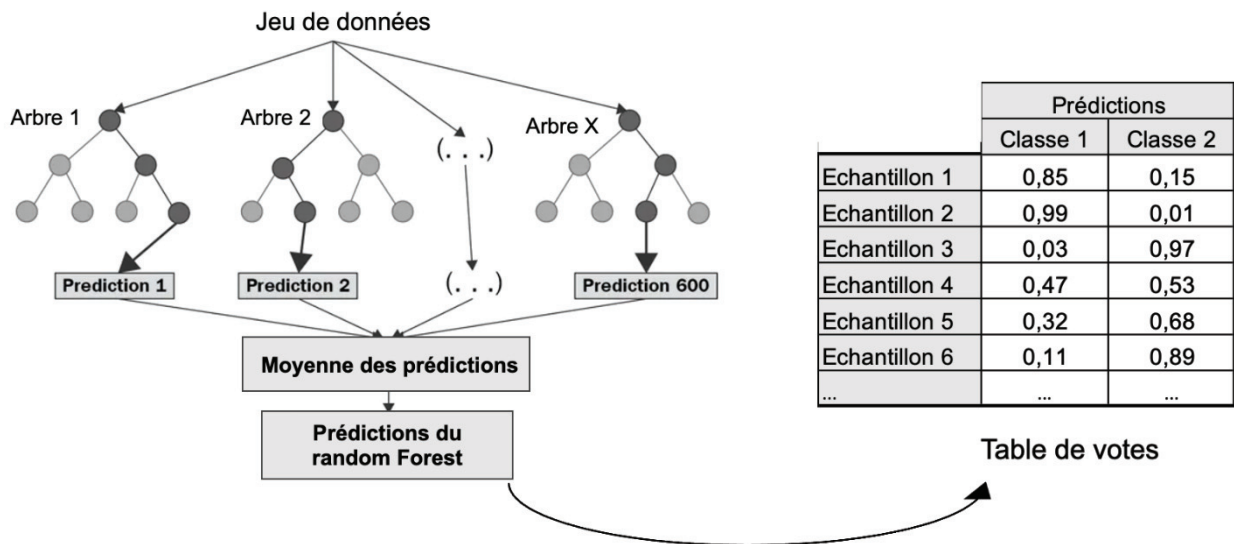


Figure 27. Principe des « random forest » (ou forêts aléatoires)

Un random forest est constitué d'un ensemble d'arbres de décision indépendants. Chaque arbre dispose d'une vision parcelaire du problème du fait d'un double tirage aléatoire : (i) un tirage aléatoire avec remplacement sur les observations (= les échantillons) (c'est le bootstrap) ; (ii) un tirage aléatoire sur les variables (= les données d'expression pour les biomarqueurs).

A la fin, tous ces arbres de décision indépendants sont assemblés (c'est le bagging). La prédiction faite par le random forest est alors la moyenne (ou le vote) de tous les arbres. La table de vote rend ensuite compte de chaque proportion de prédiction (%) par individu pour une classe donnée.

Néanmoins, les modèles d'apprentissage supervisé restent le plus souvent des « boîtes noires », dont les algorithmes sont difficiles à appréhender et à interpréter. Cela explique probablement pourquoi peu d'entre eux sont utilisés en pratique courante malgré les performances affichées. Il reste donc encore un certain nombre de verrous à lever, comme la standardisation de ces méthodes et de leurs résultats.

Cependant, grâce aux progrès technologiques et avec le développement croissant des techniques moléculaires permettant la découverte d'une multitude de biomarqueurs, il est très probable qu'avec le temps ces méthodes viennent compléter les outils du clinicien en pratique courante. Elles permettront ainsi, dans un temps limité, de poser des diagnostics précis, suivre l'efficacité thérapeutique de manière plus fine, et prévenir certaines pathologies.

Par ailleurs, l'interprétation biologique des biomarqueurs découverts permettront également une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent les différentes pathologies humaines.

2. Place des biomarqueurs dans les dermatoses inflammatoires

La révolution « omique » a permis une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les maladies telles que les dermatoses inflammatoires.

Le psoriasis et la dermatite atopique (DA) sont deux exemples pour lesquels ces progrès technologiques ont conduit à une caractérisation moléculaire de plus en plus précise des mécanismes immunitaires sous-tendant ces pathologies, conduisant à l'émergence de nouvelles thérapies ciblées en fonction des voies immunologiques impliquées. L'identification de biomarqueurs à partir de tissus ou de fluides corporels a également conduit à une meilleure stratification des patients et ces approches pourraient donc profondément modifier les algorithmes de prise en charge des patients.

Dans un premier temps, nous nous concentrerons sur le développement et l'utilisation des biomarqueurs dans la DA et le psoriasis afin d'illustrer l'apport de ces nouveaux outils dans la pratique clinique ; puis nous aborderons les différentes approches utilisées pour l'identification de biomarqueurs potentiels dans les EC.

2.1 Exemple de la dermatite atopique et du psoriasis

La dermatite atopique (DA) et le psoriasis constituent avec les EC les dermatoses inflammatoires chroniques les plus fréquentes, ayant un fort impact sur la qualité de vie des patients. (Michalek et al., 2017; Weidinger et al., 2018).

La **DA se caractérise par une xérose cutanée diffuse, un prurit intense, et des lésions eczématiformes** évoluant par périodes de poussée-rémission. Elle fait partie du spectre des maladies atopiques et peut-être associée au développement ultérieur d'allergies alimentaires, d'asthme ou de rhino-conjonctivite allergique (dans le cadre de la marche atopique). Il s'agit d'une pathologie complexe, **d'origine multifactorielle**, mêlant facteurs immunologiques, génétiques et environnementaux. Les principaux mécanismes physiopathologiques décrits associent une altération de la barrière cutanée à une inflammation de type 2 (Mansouri & Guttman-Yassky, 2015; Roediger et al., 2013) et 22 (Gittler et al., 2012). Néanmoins, la caractérisation moléculaire de la DA a ensuite révélé qu'il s'agissait en fait d'une **inflammation mixte**, présentant également des degrés variables de réponses de type

1 et 17 (Noda et al., 2015; D. Wang & Beck, 2016) ; et des études ont apporté la preuve que des endotypes distincts existaient dans la DA, liés à l'implication de différentes voies inflammatoires.

Dans sa forme la plus fréquente, le **psoriasis se manifeste par des plaques érythémato-squameuses bien délimitées**, souvent localisées sur le scalp, les coudes, les genoux, la région ombilicale et sacrée. Cette forme connue sous le nom de psoriasis vulgaire ou encore psoriasis en plaque représente environ 90% des cas. D'autres phénotypes cliniques peuvent donc être rencontrés dont le psoriasis pustuleux, le psoriasis en goutte, ou la forme érythrodermique qui représente une atteinte sévère. Bien que le psoriasis soit considéré comme une maladie de la peau, les patients peuvent développer, en plus des lésions cutanées, des **comorbidités** telles que le rhumatisme psoriasique, des syndromes métaboliques et des maladies cardiovasculaires (Korman, 2020). En outre, les études s'intéressant aux mécanismes immunitaires impliqués dans le développement de la pathologie ont considérablement fait progresser notre compréhension de la pathogénèse du psoriasis. Celui-ci se caractérise par **une réponse immunitaire de type 1 et 17/22** avec un rôle central de plusieurs cytokines : le $TNF\alpha$, l'IL17, l'IL-22 et l'IL-23 (Loves et al., 2014).

La meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques de ces maladies et de leur hétérogénéité combinée au besoin d'améliorer leur prise en charge a ainsi créé un environnement favorisant le développement de nouveaux traitements ciblés changeant radicalement la prise en charge des patients (Rønholt & Iversen, 2017).

Ces progrès ont été rendus possibles grâce aux avancées technologiques ayant conduit à l'identification de nombreux biomarqueurs. Mais au-delà de l'amélioration thérapeutique, et de la stratification des patients, le développement de biomarqueurs d'intérêt dans ces pathologies offre de nombreuses perspectives en termes d'applications pour leur utilisation telles que l'évaluation ou la prédiction de la progression de la maladie et de la réponse thérapeutique, ainsi que l'identification des patients à risque de développer des comorbidités associées (Corbett et al., 2022; Ramessur et al., 2022). Par ailleurs, la découverte et l'utilisation de biomarqueurs pour l'aide au diagnostic différentiel entre différentes dermatoses inflammatoires est également un défi de taille.

2.1.1 Méthodes d'identification de biomarqueurs

Le sang a longtemps représenté le choix de prédilection pour l'étude des biomarqueurs du fait de sa facilité d'accès, nécessitant des méthodes de prélèvement peu invasives, et n'étant pas extrêmement limité en termes de quantité de matériel. Il est par ailleurs assez simple à conserver et à manipuler. Ainsi, de nombreux **biomarqueurs sanguins** ont été

analysés dans le contexte de la DA ou du psoriasis, dont plusieurs semblent intéressants (Czech et al., 1992; Kägi et al., 1992; Kou et al., 2014; Morishima et al., 2010; J. Thijs et al., 2015). Pour exemple, un des plus prometteurs pour la DA est la chimiokine CCL-17 (« C-C motif chemokine 17 ») aussi connu sous le nom de TARC (« Thymus and activation-regulated chemokine ») (J. Thijs et al., 2015). Il s'agit d'une protéine appartenant à la famille Th2, produite par le thymus, impliquée dans la domiciliation cutanée des LT exprimant CCR4. Cette protéine a montré une forte corrélation avec la sévérité de la maladie à la fois dans les populations adulte et pédiatrique (coefficient de corrélation de 0,6) (Ahrens et al., 2015; Fujisawa et al., 2009; Hijnen et al., 2004; Song et al., 2006) et un test a même été commercialisé depuis une dizaine d'année au Japon pour suivre la réponse aux traitements et évaluer le risque de rechute (Kataoka, 2014; Yasukochi et al., 2014).

Le **tissu cutané** étant la cible principale de l'inflammation dans les pathologies dermatologiques, il représente donc une autre source extrêmement pertinente et intéressante de biomarqueurs. **L'étude comparative de la peau saine ou lésée chez un même patient, en comparaison également avec des peaux saines de donneurs non atteints** permet ainsi d'apporter des informations majeures sur les mécanismes physiopathologiques de la maladie et reflète la complexité de l'inflammation locale, à l'inverse des biomarqueurs circulants (Lyubchenko et al., 2021).

Les **biopsies cutanées** sont utilisées de longue date en dermatologie et grâce aux progrès technologiques et à l'ère de l'« omique », de nombreux marqueurs biologiques associées à la réponse immunitaire et à l'altération de la fonction barrière ont pu être mis en évidence. Elles ont ainsi permis une classification plus précise des différents endotypes de la DA. L'étude de biopsies cutanées permet par ailleurs de suivre les modifications précoces ou tardives associées à un traitement. Ce suivi de la réponse thérapeutique fournit des informations indispensables sur la capacité d'un médicament à inhiber sa cible, sa répercussion sur les autres axes immunitaires, ainsi que la relation entre l'inhibition d'une voie spécifique et la restauration de la barrière cutanée.

Néanmoins, la réalisation de biopsies cutanées en pratique courante est limitée du fait de son caractère invasif, et donc difficilement acceptable de la part du patient en routine. Dans ce contexte, de plus en plus d'investigateurs utilise la **méthode du « tape-stripping » (Figure 28)**. Cette méthode peu invasive permet de prélever la couche cornée de l'épiderme par l'application répétée d'une bandelette ou d'un disque adhésif (Hughes et al., 2021).

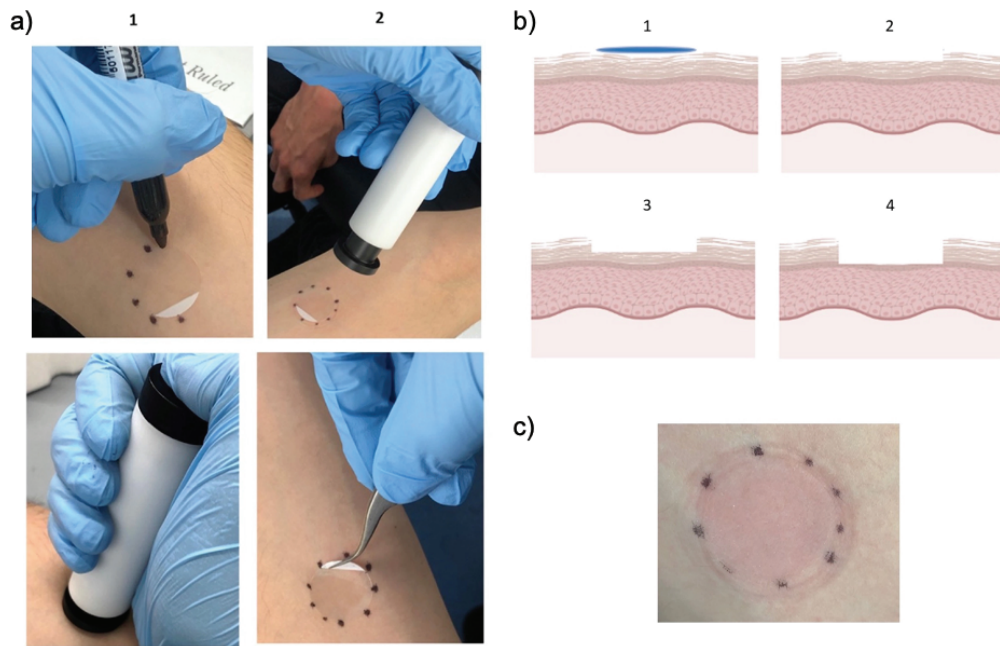


Figure 28. Méthode du tape-stripping. D'après (Hughes et al., 2021)

- (a) Photographies illustrant la procédure de tape-stripping (TS). (1) Le TS est placé sur la peau et marqué avec un stylo pour s'assurer que le même site sera ré-utilisé. (2-3) Une pression standardisée est ensuite appliquée à l'aide d'un poussoir pendant une durée de 5 à 10 secondes. (4) Le TS est retiré, idéalement avec des pinces, et un nouveau TS peut être placé sur le même site. (b) Illustration montrant comment les couches successives de la couche cornée sont retirées. (1) La couche cornée est intacte lorsque le TS est placé. (2) Les composants superficiels de l'épiderme adhèrent à la première TS et sont retirés avec elle. Les TS 1-4 peuvent être utilisées pour détecter les microbes à la surface de la peau, les lipides/céramides et les protéines et peptides exprimés superficiellement, tels que le facteur d'hydratation naturel, les protéases et certaines cytokines. (3) Avec un nombre croissant de TS, on accède à des couches plus profondes du stratum corneum (SC). Les TS 5-10 peuvent détecter les protéines structurales de la couche cornée telles que la filaggrine et les protéines solubles sécrétées telles que les cytokines. (4) Après environ 20 TS, le SC a été dépouillé et la couche granulaire est accessible. Les TS 11-20 ont l'ARN le plus abondant, et les lipides à ce niveau sont moins susceptibles d'être oxydés. (c) Cette méthode ne laisse qu'un érythème en fin de procédure.

Des techniques d'analyses transcriptomiques ou protéomiques sont ensuite utilisées pour identifier des biomarqueurs à partir du matériel prélevé. Plusieurs études ont ainsi cherché à comparer les résultats en termes d'expression de biomarqueurs identifiés par la technique du tape-stripping versus les biopsies cutanées. La principale différence résidant dans la profondeur du prélèvement, les biopsies cutanées reflètent bien mieux la réponse inflammatoire immunitaire, en capturant par exemple de façon très sensible les cytokines

inflammatoire par rapport au tape stripping qui se restreint principalement à l'identification de marqueurs associés à la barrière épidermique (par exemple, les marqueurs de différenciation épidermique terminale ou ceux liés aux lipides) (Berdyshev et al., 2018; Dyjack et al., 2018; Guttman-Yassky, Diaz, et al., 2019; He et al., 2021; Leung et al., 2019; McAleer et al., 2019). Par ailleurs, le tape stripping présente plusieurs défis techniques comme l'extraction du matériel biologique à partir des tissus prélevés (limité par sa faible quantité). Le nombre et le temps d'application de l'adhésif, ou encore les différences en termes d'épaisseur épidermique peuvent également avoir un impact important sur la qualité de détection des biomarqueurs (du fait des différences de profondeur de prélèvement qui en découle). Cette méthode nécessite donc une standardisation afin de pouvoir être implémentée dans la pratique courante.

Néanmoins, si les méthodes non (ou mini) invasives telles que le « tape-stripping » ont des taux de détection plus limités de certains biomarqueurs que les biopsies, et ne permettent d'étudier que la couche cornée, elles ont l'avantage d'être indolores, sans séquelle et peuvent donc être répétées de nombreuses fois. Ceci présente un avantage non négligeable lorsqu'il s'agit de suivre l'évolution de biomarqueurs au cours du temps (comme pour l'évaluation de la réponse thérapeutique).

Les biopsies et les « tape-strip » peuvent donc apporter des informations différentes mais complémentaires et il semble donc tout à fait envisageable d'associer ces techniques au cours de la prise en charge des patients.

2.1.2 Biomarqueurs potentiels et champs d'application

Les principaux biomarqueurs sanguins et cutanés de la DA et du psoriasis sont résumés dans la **Figure 29** et le **tableau 5** respectivement.

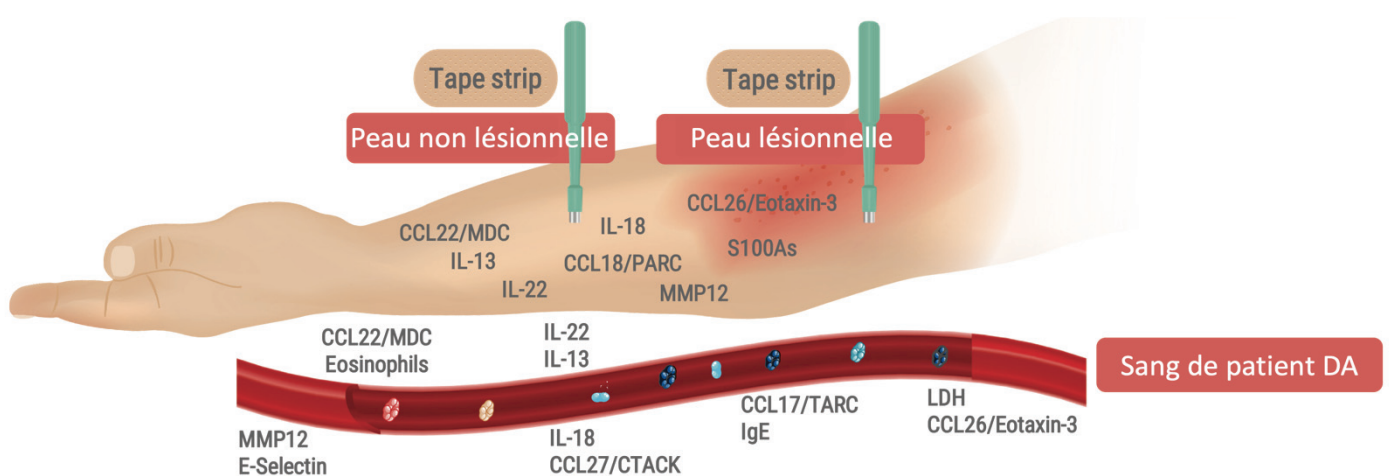


Figure 29. Biomarqueurs potentiels dans la DA, en peau saine, en peau lésée et dans le sang.
D'après (Renert-Yuval et al., 2021)

Tableau 5. Principaux biomarqueurs associés à l'évolution du psoriasis. D'après (Ramessur et al., 2022)

| Principaux biomarqueurs associés à l'évolution du psoriasis | | |
|---|---------------------------|--------------------|
| Sévérité clinique | Arthrite psoriasique | Diabète de type 2 |
| LCE3D (génomique) | IL23R (génomique) | IL 12B (génomique) |
| IL23R (génomique) | IL13 (génomique) | IL23R (génomique) |
| IL23A (génomique) | HLA-C*06:02 (génomique) | |
| NFKBIL1 (génomique) | HLA-B*27 (génomique) | |
| HLA-C*06:02 (génomique) | HLA-B*38 (génomique) | |
| IL-17A (proteomique) | HLA-B*08 (génomique) | |
| IgG aHDL (proteomique) | IL-17A (proteomique) | |
| GlycA (proteomique) | CXCL10 (proteomique) | |
| I-FABP (proteomique) | M2BP (proteomique) | |
| Kallikrein 8 (proteomique) | Integrin b5 (proteomique) | |
| Tyramine (metabolomique) | MMP-3 (proteomique) | |
| | M-CSF (proteomique) | |
| | Mucic acid(metabolomique) | |
| | Tyramine (metabolomique) | |

Ces biomarqueurs sont **utilisés pour différentes finalités**, notamment pour déterminer de façon objective la sévérité de la maladie, ou prédire son risque de survenue et son évolution. En plus de ces biomarqueurs pronostiques, un des enjeux de la médecine de précision réside dans le développement de biomarqueurs permettant de guider le choix thérapeutique. Par ailleurs, dans la DA, de nombreux auteurs se sont également intéressés à la caractérisation d'endotypes ; l'objectif étant de regrouper les patients en clusters homogènes sur la base de ces marqueurs afin de permettre une prise en charge plus personnalisée et plus adaptée.

2.1.2.1 Biomarqueurs pour prédire le risque de survenue et l'évolution de la maladie (biomarqueurs pronostiques)

Que ce soit dans la DA ou le psoriasis, diverses études ont montré qu'il serait possible de **prédire l'apparition de la maladie**, et ce dès la naissance.

Par exemple, l'élévation de TARC et des IgE mesurée dans le sang de cordon ombilicale (Miyahara et al., 2011; Wen et al., 2011) , ou encore la diminution des niveaux de facteurs naturels d'hydratation (NMF) identifiée par une méthode d'analyse non invasive par spectrométrie Raman chez les nouveaux nés (Ní Chaoimh et al., 2020) corrélerent avec la survenue ultérieure de DA. De plus, l'expression cutanée de TSLP à l'âge 2 mois (mesurée

par tape-stripping) semblerait être associée à un risque 5,3 fois plus élevé de développer une DA avant l'âge de 2 ans (J. Kim et al., 2016).

Le psoriasis de son côté est une maladie pour laquelle les facteurs génétiques pourraient expliquer jusqu'à 70% de la **susceptibilité à développer la maladie** (Farber et al., 1974, 1974). Ainsi, de nombreuses études d'association pangénomique (GWAS) à grande échelle ont été menées afin d'identifier les loci génétiques associés à la susceptibilité au psoriasis (n > 60) (Cargill et al., 2007; Hüffmeier et al., 2010; Tsoi et al., 2012, 2017). A noter qu'il existe une association forte entre le locus PSOR1 (situé sur le chromosome 6p) et le psoriasis, dont l'allèle de susceptibilité HLA-Cw6 serait responsable de plus de 50% de l'héritabilité de la maladie (Capon et al., 2012; Trembath et al., 1997). HLA-Cw6 serait également associé à divers aspects du psoriasis en plus de la susceptibilité génétique, telle que les manifestations cliniques, la sévérité ou encore les comorbidités associées et l'efficacité du traitement (Gulliver et al., 2011), ce qui en fait un excellent marqueur pronostique.

Par ailleurs, des biomarqueurs permettant ensuite **de prédire l'évolution de la maladie** une fois installée ont également été rapportés. Par exemple, un taux sérique élevé d'IL-19, IL-17, et MIP-1b (CCL4) serait associé à un risque de persistance de la DA et de la survenue de comorbidités atopiques (Lauffer et al., 2021). Le taux de plusieurs biomarqueurs (tels que la CRP, le taux d'acétylation des glycoprotéines circulantes (GlycA) ou encore l'IL-18) a été rapporté comme étant corrélé à l'athérosclérose subclinique et donc au risque de développer des maladies cardio-vasculaires chez les patients atteints de psoriasis (Abed, 2018; Joshi et al., 2016; Niknezhad et al., 2020). De la même façon, Un niveau basal élevé de CXCL10 dans le sérum des patients permettrait ainsi d'identifier un rhumatisme psoriasique à un stade pré-clinique (Abji et al., 2016).

Ainsi, **l'identification de facteurs de risque objectifs** (qui pourraient également combiner à la fois des marqueurs biologiques et cliniques) **ayant une forte corrélation avec la survenue de la maladie ou son évolution pourrait permettre de développer des programmes de prévention plus adaptés.**

2.1.2.2 *Évaluation de la sévérité de la maladie*

L'évaluation de la sévérité de ces deux pathologies repose actuellement sur différents scores cliniques, tels que l'EASI (« Eczema Area and Severity Index ») ou le SCORAD (« SCORing Atopic Dermatitis ») pour la DA et le PASI (« Psoriasis Area Severity Index ») pour le psoriasis. Bien que spécifiquement développés pour ces maladies de peau, ils sont opérateur-dépendants et représentent donc une mesure subjective et pas toujours reproductible de la sévérité de la maladie. Dans ce contexte, plusieurs biomarqueurs ont été

identifiés afin de permettre une mesure objective de l'évaluation de l'activité de la maladie ou de la réponse aux traitements (Gittler et al., 2012; Hijnen et al., 2004; Jahnz-Rozyk et al., 2005; K et al., 2012; Kakinuma et al., 2001; Khashaba et al., 2021; Mercurio et al., 2018; Morita et al., 2020; Nakazato et al., 2008; Romaní et al., 2013; Shahidi-Dadras et al., 2016; Simon et al., 2004; Sun et al., 2022; Ungar et al., 2017). Ces biomarqueurs pourraient donc représenter des critères de substitutions intéressants (Kolbinger et al., 2017).

Thijs et ses collaborateurs ont notamment développé un score de sévérité dans la DA alliant l'expression de 4 protéines sériques (TARC, CCL18, IL-22, et IL-2R), démontrant que l'utilisation d'un panel de biomarqueurs permet des mesures plus sensibles que l'expression d'un seul marqueur pris individuellement (J. L. Thijs et al., 2015).

2.1.2.3 *Caractérisation d'endotypes dans la DA*

Il existe deux approches principales pour la **caractérisation et la stratification des endotypes** de la DA. L'une utilise l'analyse moléculaire pour comparer des groupes de phénotypes distincts de la maladie, basés notamment sur le « statut IgE » (immunoglobulines E) des patients (permettant de différencier les DA intrinsèques et extrinsèques définies respectivement par l'absence ou la présence d'IgE spécifiques), ou des données démographiques telles que l'ethnicité et l'âge (**Figure 30**). Par exemple, des études ont mis en évidence une surexpression des marqueurs d'inflammation de type 2 chez l'enfant alors que les populations adultes présentent un profil de type 1 et 17 plus marqué (Brunner et al., 2018). On retrouve une forte expression de biomarqueurs de type 17, aussi bien au niveau sanguin que cutané, chez les patients d'origine asiatique par rapport au patient d'origine caucasienne (Bieber et al., 2017b; Czarnowicki et al., 2019). Les patients afro-américains montrent quant à eux une activation plus importante de la voie de type 22, et ne présentent aucune mutation du gène codant pour la filaggrine, comme on peut l'observer chez les européens (Thawer-Esmail et al., 2014).

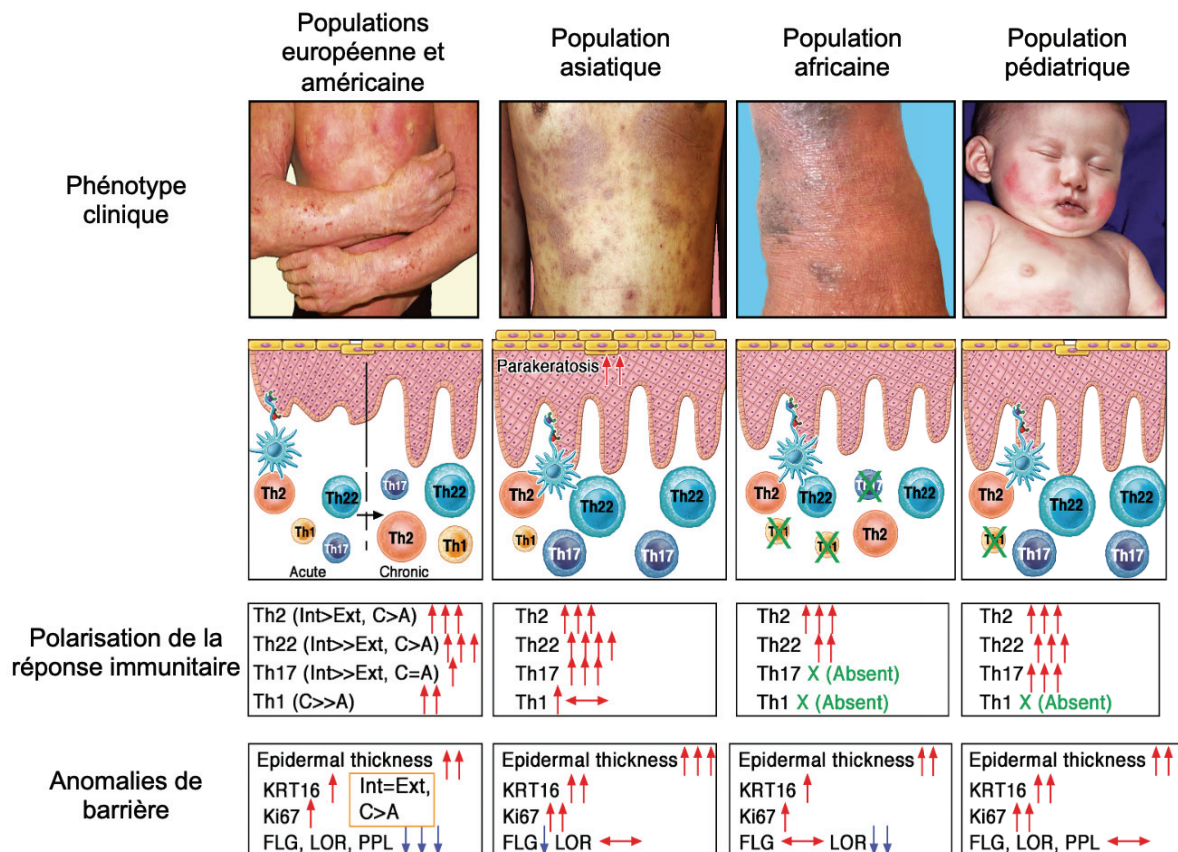


Figure 30. Endotypes associés à différents phénotypes cliniques de DA.

Différents endotypes ont été caractérisés en fonction de l'origine ethnique et de l'âge des patients. Les sous-types intrinsèque (Int), extrinsèque (Ext), aigu (A) et chronique (C) n'ont été caractérisés que chez les patients caucasiens (européens-américains). Il existe des différences en termes de polarisation immunitaire et de modifications de la barrière épidermique entre chacun des phénotypes cliniques étudiés. D'après (Czarnowicki et al., 2019)

A l'inverse, une méthode alternative se base sur le profilage moléculaire de l'ensemble du spectre clinique de la DA. Une récente analyse en composantes principales basée sur 143 biomarqueurs sériques étudiés chez 146 patients atteints de DA a permis d'identifier 4 clusters de patients caractérisés par des profils moléculaires uniques (Bakker et al., 2021). Ces résultats confirment ceux d'une précédente étude, menée par le même groupe à partir d'une autre cohorte de patients (J. L. Thijs et al., 2017). De plus, en utilisant l'algorithme des random forest, les auteurs ont construit un modèle de prédiction permettant de classer les patients dans chacun des 4 clusters avec un taux de bonne prédiction de 94,1%. En réduisant le nombre de biomarqueurs à 10 ou 20, les performances du modèle restaient très bonnes avec 86,7% et 90,4% de classifications exactes.

Il faut noter qu'avec cette approche, mis à part la sévérité de la maladie, aucune autre caractéristique clinique ou démographique n'a été associée à un cluster en particulier, ce qui

souligne l'importance d'identifier des sous-groupes biologiques plus que cliniques pour adapter la prise en charge.

Les mêmes auteurs ont mené une étude identique dans la population pédiatrique (Bakker et al., 2022). De la même manière, 4 clusters reflétant la sévérité de la maladie ont été mis en évidence, mais un seul était comparable à ceux retrouvés chez l'adulte. Il est également intéressant de noter que le cluster regroupant les enfants présentant l'atteinte cutanée la plus sévère, était également associé à des fréquences plus élevées d'allergie alimentaire.

Définir des endotypes à l'aide d'une combinaison de biomarqueurs pourrait donc permettre de **stratifier les patients** et ensuite **cibler les groupes les plus susceptibles de répondre à un traitement donné**. Il faut tout de même garder à l'esprit que les clusters identifiés ne sont pas figés dans le temps et qu'ils sont amenés à évoluer de façon dynamique, comme le soulignent les différences entre les clusters identifiés dans les populations adulte et pédiatrique, ce qui constitue la principale limite de ce type de classification.

2.1.2.4 *Développement de nouveaux traitements et évaluation/prédiction de la réponse thérapeutique*

La meilleure caractérisation de la pathogénèse de la DA et du psoriasis par des approches moléculaires a permis l'émergence de **nouvelles thérapies** ciblant spécifiquement les voies immunologiques impliquées. Les différents traitements ainsi développés ou en cours de développement dans la DA sont discutés dans la revue intitulée « Médecine personnalisée dans la dermatite atopique », publiée dans la *Revue Française d'Allergologie* et disponible en **Annexe 2**.

Néanmoins, en raison de la nature hétérogène de la physiopathologie de ces maladies, il est peu probable que les traitements proposés entraînent des niveaux de réponses comparables chez tous les patients (Blauvelt et al., 2017; Simpson et al., 2016).

Les essais cliniques intègrent donc de plus en plus d'analyses de biomarqueurs potentiels à la fois sériques et cutanés afin de rapporter des mesures objectives de la réponse des patients au traitement mais également d'élucider le mécanisme d'action du médicament (Brunner et al., 2019; Guttman-Yassky, Bissonnette, et al., 2019; Khattri et al., 2017). Ainsi, en plus des marqueurs de sévérité précédemment cités qui permettent de suivre la réponse thérapeutique de manière générale, des biomarqueurs prédictifs spécifiques pour certains traitements ont pu être identifiés.

Par exemple, les patients atteints de DA et présentant un taux basal élevé d'IL22 cutanée seraient plus susceptibles de répondre à un traitement par fezakinumab (Brunner et al., 2019).

De même, l'expression de la chimiokine CXCL2 serait prédictive de la réponse au Dupilumab (Glickman et al., 2020).

Une étude a également démontré que l'analyse transcriptomique de peau lésionnelle de psoriasis au cours des 4 premières semaines de traitement (avec quatre médicaments spécifiques : l'étanercept, l'ustekinumab, l'adalimumab et le méthotrexate) permettait de prédire la réponse clinique à la 12e semaine. Grâce à cette technique le délai entre l'instauration du traitement et l'évaluation de la réponse clinique pourrait ainsi être réduit de 2 mois (Correa da Rosa et al., 2017).

Une autre étude très récente a montré qu'il était possible de prédire la réponse aux anticorps anti-TNF, en utilisant un modèle de régression logistique basé sur l'expression basale de gènes associés aux réponses cytokiniques dans les peaux non lésionnelles de patients atteints de psoriasis. Cela permettrait ainsi de discriminer en amont les patients répondeurs des non répondeurs (Tsoi et al., 2022). Enfin, l'utilisation d'algorithmes de machine learning basés sur l'expression de biomarqueurs cutanés chez des patients naïfs de tout traitement a également permis de prédire la réponse thérapeutique à différentes classes de thérapies ciblées telles que les anticorps anti-TNF, anti-IL17 et les anti-IL-23 (Bagel et al., 2021).

Cette approche permettrait donc de **sélectionner un traitement de manière individualisée pour chaque patient**, et ouvre des pistes prometteuses. La création d'un panel plus complet pourrait conduire au développement d'**outils de stratification pour guider la décision thérapeutique**. Cela permettrait une avancée majeure en termes de prise en charge des patients et diminuerait fortement les coûts associés.

2.1.2.5 *L'identification de biomarqueurs pour le diagnostic différentiel entre DA et psoriasis*

Une autre utilité des biomarqueurs, et pas des moindres, réside dans leur **apport dans le diagnostic de certitude**. En effet, il peut parfois s'avérer difficile de distinguer cliniquement une DA d'un psoriasis, notamment lors d'atteintes particulières telles que les mains, les pieds ou le cuir chevelu. L'examen anatomopathologique peut alors parfois permettre de différencier ces deux dermatoses, mais sa sensibilité n'est pas optimum. En cas de lésions chroniques, les critères histologiques sont souvent comparables.

L'analyse des profils inflammatoires à l'aide de biomarqueurs pourrait donc permettre de discriminer ces deux dermatoses de façon plus fiable.

Dans cet objectif, Quaranta et ses collaborateurs ont cherché à identifier les gènes communs et spécifiques du psoriasis et de l'eczéma en effectuant une analyse

transcriptomique par puces à ADN à partir de biopsies cutanées de patients présentant à la fois des lésions d'eczéma et de psoriasis (ce qui a permis de s'abroger des variations interindividuelles) (Quaranta, Knapp, et al., 2014). Il convient de noter que dans cette étude l'eczéma comprenait à la fois des lésions de DA ou d'EC. A partir des analyses d'expression génique, les auteurs ont ensuite cherché à construire un **modèle de prédiction permettant de classer chacune des pathologies** (eczéma versus psoriasis) en utilisant la méthode des SVM. De façon très intéressante, le classificateur proposé ne comprenait que deux gènes, NOS2 et CCL27, et a permis un taux de bonne prédiction de 94%. Le gène NOS2, qui est associé aux processus métaboliques et aux réponses inflammatoires de type 1 et 17, était régulé à la hausse dans le psoriasis. CCL27/ CTACK, qui est un biomarqueur associé à la DA était quant à lui surexprimé dans les lésions d'eczéma et sous-exprimé dans les lésions de psoriasis (Garzorz-Stark et al., 2016; Quaranta, Knapp, et al., 2014). Il est intéressant d'observer que l'expression de ces gènes mesurée dans les peaux lésionnelles (par qRT-PCR) suffit à elle seule pour discriminer les eczémas des psoriasis, sans qu'il soit nécessaire de la comparée aux niveaux basaux retrouvés dans les peaux saines des mêmes patients. Par ailleurs, ce classifieur a également été validé en utilisant cette fois l'expression protéique des 2 biomarqueurs par immunofluorescence sur coupes FFPE (tissus fixés au formol et inclus en paraffine) (Garzorz-Stark et al., 2016). Ces deux biomarqueurs ont été retrouvés dans une étude encore plus récente, et, en association avec les marqueurs IL36G et C10orf99, ils ont permis de discriminer les lésions de psoriasis de celles de DA, de lichen ou encore d'EC avec une précision de 96,4% (Reimann et al., 2019).

Une autre étude transcriptomique par séquençage ARN à partir de biopsies cutanées prélevées en peau lésionnelles et saines chez des patients atteints de DA ou de psoriasis à identifier 2800 DEG commun, correspondant à 41% et 81% des DEG identifiés de façon spécifique pour le psoriasis et la DA respectivement. Cela suggère donc une signature moléculaire commune aux deux dermatoses. En utilisant l'algorithme des random forest, les auteurs ont pu établir une classification presque parfaite des deux pathologies basées sur l'expression combinée de l'IL17A, IL13 et IL36G (aire sous la courbe de 0.99). De façon très intéressante, ils ont également pu définir un modèle permettant de diagnostiquer une DA ou un psoriasis à partir de biopsies de peaux non lésionnelles. Ces résultats renforcent la présence d'une signature " pré-inflammatoire " dans la peau non lésée de patients atteints de ces pathologies et permettrait ainsi de pouvoir effectuer un diagnostic de certitude en dehors de toute poussée (Tsoi et al., 2019).

Enfin, encore plus récemment, He et ses collaborateurs ont confirmé ces résultats dans une analyse par séquençage ARN à partir de matériel biologique prélevé par la méthode du tape-stripping, suivi d'une validation de nombreux marqueurs (n=99) par qRT-PCR. (He et al.,

2021) Il convient de noter que les auteurs rapportent une excellente corrélation entre les marqueurs détectés à partir de tape-strip avec ceux identifiés dans des biopsies cutanées. Par ailleurs, l'expression seule de NOS2 permettrait de différencier de façon quasiment parfaite le psoriasis de la DA (AUC de 0,97).

L'ensemble de ces données confirment donc que le psoriasis et l'eczéma sont modulés par différentes voies immunitaires ; et que **l'expression d'un nombre minimum de biomarqueurs permettraient de discriminer les deux maladies**. Ces résultats prometteurs ouvrent donc la voie au développement de tests de diagnostic différentiel dans les dermatoses inflammatoires.

Ainsi, la DA et le psoriasis font partie des premières dermatoses inflammatoires pour laquelle nous avons vu émerger un nombre considérable de biomarqueurs. Qu'ils soient cutanés ou sanguins, en peau saine ou en peau lésée, ils **permettent d'identifier des facteurs pronostics, des critères de sévérité objectifs, des outils de suivi de la réponse thérapeutique et enfin d'identifier des clusters de patients selon leurs profils inflammatoires : les endotypes qui permettront à terme de guider le choix thérapeutique (Figure 31)**. Grâce à ces avancées, nous passons progressivement d'une ligne de conduite unique pour tous à une médecine de précision adaptée à chacun, combinant des données biologiques, cliniques, génétiques et environnementales.

Néanmoins, malgré la mise en évidence de nombreux biomarqueurs d'intérêt dans ces maladies et leur utilisation de plus en plus fréquente dans les études cliniques, aucun n'a atteint le dernier stade de validation et n'a été étendu à la pratique clinique conventionnelle à ce jour (Bieber et al., 2017b).

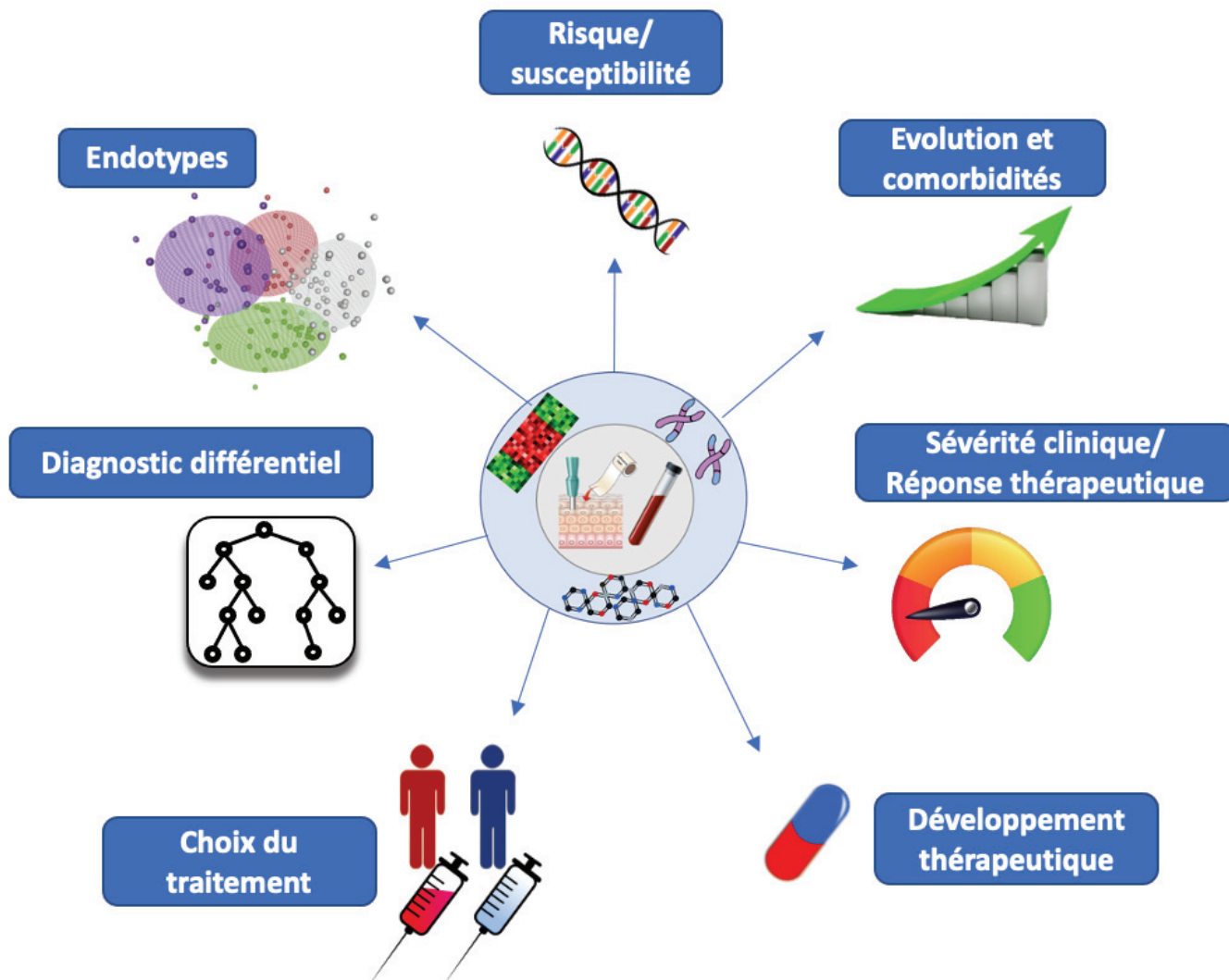


Figure 31. Utilité clinique des biomarqueurs dans la dermatite atopique et le psoriasis

De nombreux biomarqueurs cutanés (biopsies ou tape-stripping) et sanguins ont été identifiés par des méthodes de génomique, transcriptomique et protéomique. Ces derniers ont été développés pour diverses finalités. Ils permettent de (i) prédire le risque de développer la maladie (susceptibilité), (ii) prédire son évolution et le risque de développer des comorbidités associées, (iii) évaluer la sévérité clinique et la réponse thérapeutique, (iv) identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans un but de développement de médicaments, (v) stratifier les patients pour guider le choix du traitement, (vi) faire un diagnostic plus fiable, (vii) identifier des endotypes.

2.2 Vers l'identification de biomarqueurs dans les eczemas de contact

A l'inverse du psoriasis et de la DA, la recherche et la découverte de biomarqueurs dans les EC n'en est qu'à ses prémices. Pourtant, il existe un besoin majeur de développer de nouvelles approches afin d'améliorer la procédure actuelle de diagnostic.

Dans ce contexte, la mise en évidence de biomarqueurs fiables et objectifs pour discriminer les différents sous-types d'EC (voir les discriminer des autres dermatoses inflammatoires) afin d'assurer un diagnostic plus fiable, plus sensible et plus rapide est un véritable défi à relever. Par ailleurs, la découverte de biomarqueurs dans les EC sera importante pour établir de nouveaux mécanismes physiopathologiques et de nouvelles cibles thérapeutiques.

Plusieurs approches telles que l'analyse histologique ou immunohistochimique, l'imagerie *in vivo*, le développement de tests immunobiologiques, ou plus récemment l'analyse moléculaire ont été utilisées afin de chercher à identifier des biomarqueurs caractérisant les ECA et ECI.

2.2.1 Analyses sur coupes histologiques

L'ECA et l'ECI présentent des caractéristiques histologiques similaires telles que le spongiose, l'acanthose, l'hyperkératose et l'exocytose. De plus, la mise en évidence de lymphocyte T dans une biopsie cutanée de lésion d'eczéma par immunohistochimie n'est en aucun cas pathognomonique d'ECA puisque toute réaction inflammatoire s'accompagne d'un infiltrat polymorphe de cellules immunitaires parmi lesquelles on retrouve une proportion plus ou moins importante de LT. L'étude de marqueurs de l'inflammation plus spécifiques est donc nécessaire.

Frings et ses collaborateurs ont récemment réévalué divers critères **histopathologiques et immunophénotypiques** dans le but de distinguer les différents types d'eczéma, incluant DA, ECA et ECI (Frings et al., 2018). Seule la présence d'un nombre important d'éosinophiles dans l'infiltrat dermique était significativement associée à la DA et permettait de la discriminer des EC, mais aucun autre critère n'a permis de distinguer les différentes formes d'eczéma de contact.

Une étude récente a cherché à déterminer si les réponses inflammatoires allergiques et irritantes induites expérimentalement par la méthode des patch tests (nickel et SLS respectivement) présentaient des différences immunohistochimiques (Ulfgren et al., 2000). Malheureusement, les auteurs ont conclu que les profils cytokiniques étudiés (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α et IFN- γ) n'ont pas permis de discriminer un ECA d'un ECI. De plus, même si certains marqueurs peuvent être induits à des niveaux différents en fonction des

allergènes impliqués dans les réactions, aucun n'a jusqu'alors montré de spécificité pour un haptène donné (Dhingra et al., 2014).

Le **moment du prélèvement** peut également avoir un impact majeur sur la détection de biomarqueurs. En effet, des profils cytokines distincts ont été identifiés entre les phases aiguë et chronique de l'ECA au nickel. Pour exemple, l'IL-2 et l'IL-23 ont été principalement retrouvées dans les lésions d'ECA à 48h, tandis que des biomarqueurs de type 2 telles que l'IL-4 et l'IL-13 caractérisent les lésions chroniques. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée concernant les marquages TNF- α , IFN- γ , IL-17 et IL-10 entre les phases aiguës et tardives (Silvestre & Reis, 2018).

Si les techniques classiques d'**histologie et d'immunohistochimie** n'ont jusqu'à présent pas fait leurs preuves pour discriminer les différentes formes d'EC, la détection d'ARNm de chimiokines spécifiques dans les tissus par hybridation *in situ* associée à l'immunohistochimie semble plus prometteuse. En effet, l'expression de CXCL9, CXCL10, CXCL11, ligands du CXCR3 impliqués dans le chimiotactisme des LT, a été détectée de manière significative dans les coupes histologiques provenant de lésions d'ECA, mais pas dans celles d'ECI induites expérimentalement par l'application de SLS. Par ailleurs, l'expression de ces chimiokines combinée à celle de ICAM-1 (« Intercellular Adhesion Molecule 1 ») et HLA-DR sur les kératinocytes ainsi que CXCR3 sur les cellules infiltrant la peau (mesurée par immunohistochimie) permet de discriminer de façon fiable ECA et ECI (Flier et al., 1999). Néanmoins, une autre étude a montré que l'expression de ces mêmes chimiokines était également retrouvée dans les lésions cutanées de psoriasis, lichen ou lupus érythémateux et ne sont donc malheureusement pas spécifiques des ECA (Flier et al., 2001).

2.2.2 Imagerie *in vivo*

Bien que l'**histopathologie** soit toujours considérée comme le gold standard pour l'évaluation morphologique de la peau, des outils d'imagerie non invasive *in vivo* ont été développés dans les années 1980 et ont fait leur preuve dans le diagnostic des pathologies cutanées, principalement dans le domaine de l'oncologie (Bakos et al., 2018) :

- **La microscopie confocale à réflectance (RCM)** permet d'obtenir des images en coupes horizontales de la peau, à une résolution de niveau cellulaire (0,5-1 μ m) et à une profondeur de 200-300 μ m, de l'épiderme au derme papillaire (Rajadhyaksha et al., 1999).
- **La tomographie par cohérence optique (OCT)** produit des images en coupe horizontale jusqu'à une profondeur de 1 à 2 mm et une résolution de 15 à 3 μ m, selon le système utilisé (Sattler et al., 2013).

- **La tomographie par cohérence optique confocale à champ linéaire (LC-OCT)** combine les avantages techniques de la RCM et de l'OCT conventionnelle en termes de résolution spatiale (1 µm), de pénétration (500 µm) et d'orientation (combinaison de vues horizontales et verticales) (Ruini et al., 2021). Ce système permet également des reconstructions tridimensionnelles et l'acquisition de vidéos.

Ces outils permettent ainsi une évaluation cutanée en temps réelle sans avoir recours à des prélèvements invasifs.

Dans le but de proposer de nouveaux outils diagnostiques, la RCM et l'OCT ont été évalués dans les eczémas de contact. Des critères morphologiques pour l'ECA et l'ECI, corrélés aux signes histologiques ont été décrits à partir de 1999 (Astner, Gonzalez, et al., 2005; Astner, González, et al., 2005; Boone et al., 2015; González et al., 1999; Swindells et al., 2004). En résumé, l'ECA serait associé à la présence d'un grand nombre de vésicules avec un stratum corneum intact. Au contraire, les lésions d'ECI montrent une perturbation plus importante de la couche cornée, se définissant par une parakératose et un détachement des cornéocytes. Dans les deux cas, un œdème, une vasodilatation et un infiltrat de cellules inflammatoires sont présents. Par ailleurs, à ce jour, l'identification de la nature exacte du type de cellules infiltrant l'épiderme n'est pas possible avec ces techniques (Ardigò et al., 2012).

Néanmoins, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédents les critères histologiques ne sont pas assez sensibles pour discriminer l'ECA et l'ECI, il est donc peu probable que ces outils puissent réellement apporter une aide dans le diagnostic étiologique des EC en se basant sur ces seuls paramètres.

Ces outils pourraient cependant renforcer la lecture clinique des patch tests. En effet, l'analyse des changements morphologiques *in vivo* dans les réactions aux tests épicutanés permettrait une mesure plus objective du score de la réaction clinique. L'utilisation de l'OCT dans ce contexte a notamment entraîné l'attribution d'un score plus élevé aux patch tests dans 50% des cas et a permis d'attribuer un grade à toutes les lésions cliniquement peu claires (Ruini et al., 2021). Ces techniques pourraient également aider à identifier les patch tests faussement négatifs en détectant des changements histopathologiques typiques en l'absence de réaction clinique (Astner, González, et al., 2005; Swindells et al., 2004).

Le développement d'algorithmes basés sur ces méthodes d'imagerie pourrait ainsi aider les cliniciens dans la classification des tests épicutanés.

2.2.3 Étude de la barrière épidermique par des approches peu invasives

Étant donné que l'altération de la barrière épidermique a été décrite comme un critère majeur de l'irritation, plusieurs études se sont donc intéressées aux **modifications de la**

topographie de surface des cornéocytes, évaluées par l'indice de texture dermique (IDT) déterminé en microscopie à force atomique, et aux **niveaux de facteur d'hydratation naturel (NMF) de la couche cornée**, à partir de prélèvements épidermiques par tape stripping. L'étude de ces paramètres dans des lésions d'ECl expérimentalement induites ont montré une nette augmentation de l'IDT, corrélée à une diminution du NMF par rapport à la peau saine. Le NMF, défini comme la somme des concentrations en acide pyrrolidone-carboxylique, acide urocanique et histidine, était le seul paramètre significativement modifié par l'ensemble des irritants testés et donc le plus sensible (Soltanipoor et al., 2018). Néanmoins, ce facteur a également été retrouvé diminué dans les réactions positives de patch tests à des niveaux variables en fonction des haptènes testés, et ne permet donc pas de discriminer de façon fiable ECA et ECl (Brans et al., 2021; Koppes, Ljubojević Hadžavdić, et al., 2017). Cependant, bien que certains allergènes comme la méthylisothiazolinone entraîne des altérations de structure des cornéocytes, aucun des allergènes testés n'a montré de changement en termes d'IDT comparativement au SLS (Koppes, Ljubojević Hadžavdić, et al., 2017).

Ces résultats basés uniquement sur des modèles expérimentaux et de petites cohortes doivent être validés dans le futur.

2.2.4 Biomarqueurs sériques

A l'instar de la DA et du psoriasis, plusieurs auteurs ont cherché à identifier des marqueurs sériques des EC et plus particulièrement des ECA.

Une étude réalisée en 2016 s'est intéressée aux **niveaux d'expression** de 102 marqueurs comprenant des **cytokines, chimiokines et facteurs de croissance** à partir de sérum prélevé chez 16 patients atteints d'ECA (à différents allergènes) à la fois en phase aiguë et en phase de rémission, ainsi que chez 16 témoins (Zinkevičienė et al., 2015). Les auteurs ont ainsi retenu 11 biomarqueurs potentiels permettant de différencier les patients atteints d'ECA des patients témoins. Ces marqueurs comprennent l'adiponectine, le CCL5, la CRP, la CHI3L1 (« Chitinase-3-like protein 1 »), le CFD (facteur D du complément), l'endogline, la lipocaine 2, l'ostéopontine, le RBP4 (protéine 4 de liaison au rétinol), le PF4 (facteur 4 plaquettaire) et le TFF3 (« Trefoil Factor 3 »). De façon très intéressante, les taux de deux de ces marqueurs, le CCL5 et le TFF3, ainsi que du ICAM-1 et du PDGF-AB/BB variaient de manière significative entre les phases aiguës et de rémission chez les patients atteints d'ECA. Ils pourraient ainsi permettre de suivre l'évolution clinique de la maladie et ainsi évaluer l'efficacité thérapeutique.

Il convient de noter que parmi les 11 biomarqueurs identifiés dans cette étude, l'ostéopontine avait déjà été rapporté comme potentiel marqueur sanguin d'ECA, les taux

corrélant avec l'intensité clinique des réactions (Reduta et al., 2015). Le rôle de cette protéine dans les ECA avait notamment été illustré par Seier et ses collaborateurs qui ont montré que les souris déficientes en ostéopontine développent des réactions d'hypersensibilité de contact significativement réduites (Seier et al., 2010).

D'autres marqueurs sériques associés à l'ECA ont été rapportés, tels que TIMP-1 (« Tissue inhibitor matrix metalloproteinase 1 »), dont l'expression corrèlerait avec l'activité de la maladie (Reduta et al., 2007), ou encore l'IL-22 retrouvée significativement augmentée chez les patients atteints d'ECA au nickel (Ricciardi et al., 2009).

Plus récemment, une étude portant sur une cohorte de 216 patients atteints d'ECA a proposé la protéine cationique des éosinophiles (ECP) comme marqueur diagnostique. Un niveau élevé d'ECP permettrait notamment de renforcer la pertinence clinique d'un résultat positif au test épicutané chez les patients atteints d'ECA. Son dosage serait donc particulièrement utile dans les cas douteux afin d'identifier les résultats faussement positifs. Néanmoins, il faut souligner que des taux sanguins élevés d'ECP sont également retrouvés chez les patients atteints d'asthme ou de DA (S. Y. Park et al., 2014).

Enfin, une étude a comparé les profils d'expression sérique de 12 marqueurs d'inflammation chez des patients atteints d'ECA, de psoriasis, et des individus sains. 6 biomarqueurs différaient significativement entre les deux types de dermatoses. Les taux d'IFN- γ , d'IL-1 α , d'IL-8, d'IL-10 et de VEGF étaient significativement plus élevés chez les patients atteints de psoriasis, tandis que la concentration de MCP-1 (CCL2) était associée à l'ECA. Aucune différence statistique n'a été détectée quant aux niveaux d'expression systémique de TNF- α , IL-1 β , IL-6 et EGF (« epidermal growth factor ») entre les deux groupes de patients, bien que les résultats aient mis en évidence une tendance à l'augmentation de ces cytokines dans l'ECA comparativement au psoriasis (Kaur et al., 2012).

2.2.5 Caractérisation des cellules T circulantes spécifiques d'allergènes

L'une des stratégies pour discriminer de façon fiable un ECA d'un ECI consiste à démontrer la **présence de LT spécifiques d'allergènes**. Ainsi, les progrès en immunologie ont permis le développement de méthode *in vitro* de détection de LT circulants spécifiques.

Parmi eux, le **test de transformation lymphocytaire (TTL)** quantifie la prolifération des lymphocytes après activation par des allergènes potentiels (comme le nickel, le chrome, le cobalt). Il consiste à prélever un échantillon de sang du patient dont on isole les cellules mononuclées (par un gradient de Ficoll), que l'on va ensuite mettre en culture avec des concentrations croissantes du ou des allergène(s) suspect(s) (Rozières et al., 2009). On mesure ensuite la prolifération lymphocytaire à l'aide de l'incorporation de thymidine tritiée

³TH. Le résultat est rendu sous forme d'index de stimulation (SI), correspondant au ratio de thymidine tritiée incorporée par les cellules stimulées par l'allergène sur l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules non stimulées (témoin négatif) (**Figure 32**). Cette méthode diagnostique est notamment utilisée pour les hypersensibilités retardées aux médicaments (Pichler & Tilch, 2004).

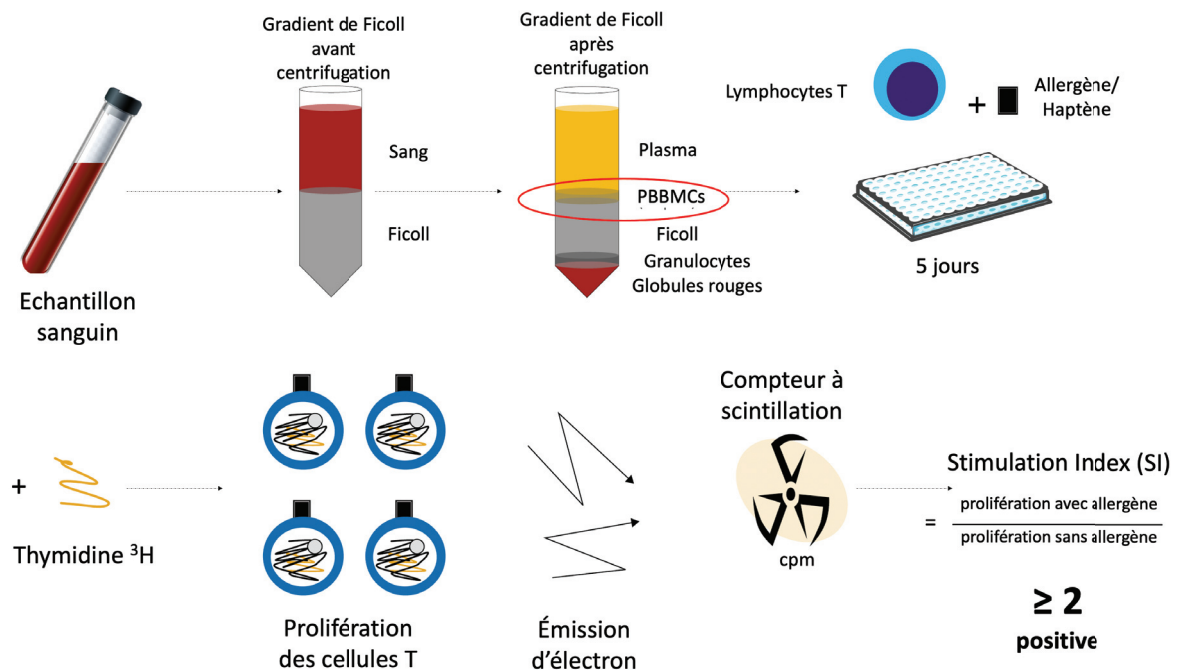


Figure 32. Principe du test de transformation lymphocytaire

Les cellules mononucléées sont isolées à partir d'un prélèvement sanguin par centrifugation dans un gradient de ficoll. Les cellules sont ensuite mises en culture en présence de l'allergène présumé à plusieurs concentrations, dans une micro plaque de 96 puits, pendant 5 jours à 37° et sous une atmosphère à 5% de CO₂. 12h avant l'arrêt de la culture, la thymidine tritiée est ajoutée, celle-ci sera incorporée proportionnellement à la prolifération lymphocytaire (dans l'ADN en synthèse). Un compteur à scintillation permet ensuite la détection de la radioactivité intracellulaire. Des témoins positifs stimulant de façon non spécifique les lymphocytes, et des témoins négatifs utilisant les lymphocytes seuls en l'absence de l'allergène sont réalisés. La prolifération est ensuite estimée en calculant un index de stimulation qui correspond au ratio de thymidine tritiée incorporée par les cellules stimulées par l'allergène sur l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules non stimulées.

Il convient de noter que des variantes ont été développées, utilisant la méthode de **cyrtométrie en flux par mesure de la dilution du CFSE** (« Carboxyfluorescein succinimidyl ester »), afin de s'amender de la radioactivité (de Graaf et al., 2020).

Dans l'ECA, le TTL a été développé pour caractériser les réponses spécifiques à divers allergènes de contact, comme les sels métalliques tels que le nickel, le cobalt ou le chrome, les isothiazolinones ou la PPD. Le **test MELISA (Memory Lymphocyte Immuno Stimulation Assay)**, se basant sur la technique du TTL, a même été commercialisé en Allemagne et en Suisse pour la détection des allergies aux métaux dans les contextes de réactions aux implants métalliques (Valentine-Thon & Schiwara, 2003).

Pour le diagnostic de l'allergie au nickel, une étude récente a retrouvé une sensibilité de 88% et une spécificité de 96% pour le TTL (Ständer et al., 2017). Ces résultats obtenus à partir d'une petite cohorte de patients, restaient légèrement inférieurs aux performances des patch tests. Il a été montré de façon très intéressante que le répertoire TCR des clones de LT spécifiques du nickel dérivés du sang des patients étaient similaires à celui des LT cutanés, ce qui signifie que la caractérisation *in vitro* des LT réactifs au nickel à partir du sang périphérique reflète avec précision la nature de la réponse allergique dans la peau (Werfel et al., 1997).

Un des atouts du TTL pourrait être sa capacité à identifier les patch tests cliniquement pertinents. En effet, deux études se sont intéressées à comparer les résultats des TTL chez des patients présentant des allergies de contact (patch tests positifs) pour le chrome ou les isothiazolines avec ou sans ECA. Pour la majorité des cas, le TTL a permis de discriminer les patients présentant des patch tests positifs cliniquement pertinents de ceux présentant un patch test positif sans réaction d'ECA associée (Lindemann et al., 2008; Stejskal et al., 1990). Ainsi, parmi une cohorte de 56 patients avec une allergie de contact au chrome, le TTL a pu prédire un ECA avec une sensibilité de 70 % et une spécificité de 74 % (Lindemann et al., 2008).

Des stratégies alternatives ou complémentaires ont également été adoptées pour améliorer la sensibilité du test, comme l'ajout de certaines cytokines dans le milieu de culture permettant ainsi d'améliorer la survie cellulaire ou le potentiel prolifératif des LT spécifiques sans pour autant entraîné d'activation non spécifique (de Graaf et al., 2020; Moed et al., 2005); ou la quantification de cellules T exprimant le marqueur CD69 après stimulation pour estimer le niveau d'activation des cellules (Zahid et al., 2019).

Par ailleurs, la plupart des produits chimiques étant lipophiles, leur utilisation dans le TTL est souvent limitée du fait de l'absence de solubilité dans les milieux de cultures. **L'encapsulation de ces derniers dans des nanoparticules** semble une technique prometteuse pour lever ce verrou, en augmentant leur solubilisation dans les milieux de culture permettant une réactivation spécifique et robuste des cellules T (Cortial et al., 2015).

En parallèle de leur prolifération, les cellules T activées produisent des cytokines mesurables par différentes techniques comme l'**ELISpot** (« enzyme-linked immune absorbent spot »). L'ELISpot IFN- γ a montré des performances identiques au TTL pour le diagnostic de l'allergie au nickel ou à la PDD (Bordignon et al., 2015; Lindemann et al., 2003).

Néanmoins, il faut rappeler que l'ensemble de ces tests *in vitro* nécessitent d'avoir identifié au préalable l'allergène potentiellement responsable des lésions cliniques. Par ailleurs, leur implémentation dans la pratique clinique est actuellement limitée du fait d'un manque de standardisation, d'harmonisation et de validation.

2.2.6 L'apport de la biologie moléculaire dans la recherche de biomarqueurs cutanés des EC

La recherche de biomarqueurs diagnostiques des EC, permettant de discriminer les différents sous-types d'EC mais également de les distinguer des autres dermatoses inflammatoires à l'aide des différentes méthodes exposées précédemment est assez limitée. Des approches moléculaires, basées sur la compréhension croissante des mécanismes physiopathologiques des différents sous type d'eczéma, ou encore sans a priori grâce à l'avènement des techniques « omiques », semblent ouvrir la voie à des pistes bien plus prometteuse en termes d'identification de biomarqueurs.

2.2.6.1 *Caractérisation des profils moléculaires de l'inflammation cutanée allergique et irritante à partir de modèles murins*

Plusieurs auteurs ont étudié les différents **mécanismes moléculaires** sous tendant les réponses cutanées induites par les allergènes et les irritants dans des modèles expérimentaux murins.

Meller et ses collaborateurs ont rapporté de profondes différences dans l'expression génique de diverses chimiokines étudiées par RT-PCR quantitative entre l'ECA (au DNFB) et l'ECI (induit par application de croton oil) chez la souris. L'expression des gènes **CXCL9 et CXCL10** (déjà rapporté précédemment), était spécifiquement induite au cours de la réponse immunitaire spécifique aux haptènes, mais absente dans l'inflammation irritative. A l'inverse, l'application d'un irritant chimique avait induit l'expression de chimiokines telles que CCL2, CCL3, CCL4, CCL11, CCL17, CCL19 et CCL20. Le niveau d'expression de ces dernières corrélaient directement avec la réponse inflammatoire clinique irritante (Meller et al., 2007). Il convient de noter que les auteurs ont analysé le même panel de chimiokines chez l'homme et ont ainsi identifié CXCL10 comme le marqueur le plus discriminant entre les réponses

inflammatoires allergiques (induite par le nickel) et irritantes (induite par le SLS). Par ailleurs l'expression de CCL2 était spécifiquement associée à l'irritation et pas à l'allergie.

Ku et ses collaborateurs ont conduit de leur côté une analyse transcriptomique par puce à ADN à partir d'échantillons cutanés de souris exposées à différents allergènes et un irritant afin d'identifier des profils d'expression génique et des voies de signalisation spécifiques des différents types d'inflammation (Ku et al., 2009). Grâce à l'analyse de gènes différentiellement exprimés, les auteurs ont retenus 4 marqueurs spécifiques de l'inflammation allergique permettant de la discriminer de l'irritation : **CXCL9 et CXCL10**, les ligands de CXCR3 induits en réponse à l'IFN- γ et associés au chimiotactisme des LT et des DCs, ainsi que **OASL2 et ZBP1** tous deux associés à la réponse immunitaire induite par l'interféron et à la mort cellulaire.

Ainsi ces études ont mis en évidence la possibilité d'identifier des marqueurs sensibles et spécifiques en fonction des types d'inflammation.

2.2.6.2 *Études transcriptomiques chez l'homme à partir du modèle des patch tests*

Plus récemment, avec l'essor des technologies « omiques », plusieurs auteurs ont cherché à **caractériser les signatures transcriptomiques des inflammations allergiques et irritantes induites expérimentalement par l'utilisation du modèle du patch test.**

Quaranta et ses collaborateurs ont comparé les profils d'expression génique (par puce à ADN) de différents types d'eczémas : DA et ECA (Quaranta, Knapp, et al., 2014). L'analyse des DEG a permis d'identifier 172 gènes spécifiquement induits dans les réactions positives de patch tests au nickel. 33 gènes étaient modulés de façon similaire dans les deux types d'eczéma. Les biomarqueurs potentiels de l'ECA comprenaient une majorité de gènes associés à l'inflammation aiguë et à la réponse immunitaire, dont l'expression était fortement régulée à la hausse comparativement à la DA. Parmi eux, on retrouve des biomarqueurs précédemment identifiés tels que **CXCL9, CXCL10, CXCL11** (Flier et al., 1999; Meller et al., 2007), ainsi que des gènes associés à l'inflammasome (**IL1B et AIM2**), ou encore au chimiotactisme des neutrophiles (**CXCL8**).

Kamsteeg et ses collaborateurs ont de leur côté cherché à caractériser des profils moléculaires uniques permettant de distinguer ECA, ECI, DA et psoriasis, en se basant sur l'expression de 12 biomarqueurs analysée par RT-PCR quantitative. Dans cette étude, les lésions d'ECA et d'ECI ont été respectivement induites par l'application de nickel ou de fragrances et de sodium dodecyl sulphate (SDS) (Kamsteeg et al., 2010). Ainsi, l'ECA pouvait être discriminé des autres types d'inflammation par l'expression unique de **CCL17 et CXCL10**. A noter que CCL17 a également été rapporté comme discriminant l'ECA de la DA et du

psoriasis dans une autre étude (Riis et al., 2011). L'ECl quant à lui était caractérisé par une absence d'expression du **CXCL8** comparativement aux 3 autres dermatoses. Enfin, l'utilisation d'une approche de clustering par des analyses bio-informatiques basées sur l'expression de 7 biomarqueurs (CAII, NELL2, hBD-2, IL-1F9, CXCL8, CXCL10 et CCL17) a permis de classer correctement l'ensemble des 63 échantillons cutanés de cette étude entre ECA, ECl, psoriasis, DA et peau saine, avec seulement deux erreurs (une DA classée comme ECA et inversement).

Afin d'identifier des biomarqueurs diagnostiques encore plus précis et fiable, Inkeles et ses collaborateurs ont mené une étude impliquant un large éventail de maladie cutanées, incluant non seulement des dermatoses inflammatoires mais également des conditions infectieuses et néoplasiques (Inkeles et al., 2015). Ils ont ainsi exploité des données transcriptomiques (générées à partir de puces à ADN) à partir de bases de données publiques de 16 pathologies dermatologiques (incluant 311 biopsies cutanées), afin de définir les signatures moléculaires spécifiques de chaque maladie et générer un modèle de classification multi-maladies. De façon intéressante, il a été constaté une corrélation inverse entre les signatures associées à l'IFN- β et celle de l'IFN- γ dans les 16 affections cutanées étudiées. Par ailleurs, en utilisant **la méthode des random forest**, les auteurs ont conçu un **classificateur** à partir des données d'expression génique permettant de prédire avec précision le diagnostic de la maladie avec une sensibilité de 92 % et une spécificité de plus de 99 %, pour une performance globale de 93%. Le classificateur a ensuite été validé sur 194 échantillons indépendants confirmant les performances initiales. Les auteurs ont également fourni des exemples très intéressants d'application clinique d'un tel outil. Dans un cas, le prélèvement cutané d'un patient diagnostiqué initialement comme une DA a été reclassé par le classificateur comme un prélèvement présentant des caractéristiques de psoriasis. Ce patient a par la suite développé des lésions cliniques typiques de psoriasis, confirmant donc le résultat du modèle de prédiction, démontrant tout l'intérêt du diagnostic moléculaire pour confirmer/infirmier le diagnostic clinique initial.

Collectivement ces études ont donc fourni des informations précieuses sur les processus moléculaires qui sous-tendent les diverses maladies et permettent de les discriminer.

Enfin, deux études très récentes, publiées l'année dernière, se sont cette fois spécifiquement concentrées sur l'analyse du transcriptome des ECA et ECl, avec comme objectif d'identifier des biomarqueurs diagnostiques.

Une étude transcriptomique par puces à ADN à partir de biopsies de réactions positives à des patch tests pour différents allergènes et irritants a ainsi mis en évidence des profils d'expression génique communs et différents pour les deux types d'inflammation (Fortino et al., 2020) . L'utilisation d'algorithmes de **marchine learning** a ensuite permis d'identifier de

nombreuses **combinaisons de biomarqueurs permettant de prédire avec précision la nature de la réaction**. En parallèle, une autre équipe a utilisé la méthode du tape stripping pour étudier un panel de biomarqueurs épidermiques par RT-PCR quantitative. Malheureusement, les résultats ont été peu contributifs puisqu'un seul marqueur, la LOR, a permis de discriminer de façon statistiquement significative les réactions allergiques et irritantes (Tam et al., 2021).

2.2.6.3 *Signatures moléculaires des lésions cliniques d'EC*

Si de nombreuses études ont exploré les signatures moléculaires d'ECA et d'ECI à partir de lésions induites expérimentalement, peu d'investigateurs se sont intéressés directement aux signatures présentes dans les lésions cliniques (aigues ou chroniques) des patients.

En 2015, D'Erme et ses collaborateurs. ont analysé les profils d'expression génique chez 150 patients atteints de diverses dermatoses inflammatoires telles que le psoriasis, la DA, le lichen et les EC (sans réelle distinction entre ECA et ECI dans les analyses) (D'Erme et al., 2015). Cette fois-ci les analyses ont été effectuées à partir de biopsies cutanées provenant de lésions chroniques d'EC. Bien que l'étude ait été spécifiquement conçue pour identifier des biomarqueurs associés au psoriasis, les auteurs ont tout de même mis en évidence des groupes de gènes spécifiques pour chacune des pathologies étudiées. Pour exemple, l'expression de CCL17 et CCL19 était retrouvée dans les EC, la DA et le lichen mais pas dans le psoriasis ; les gènes associés au système HLA tel que HLA-DRA permettait de discriminer les EC et le lichen du psoriasis et de la DA ; ou encore CXCL9 était un marqueur de l'ECA et du psoriasis mais n'était pas associé à la DA. Cependant, cette étude n'a pas rapporté aucun marqueur unique de l'EC comparativement aux autres dermatoses.

Dans une autre étude plus récente, le transcriptome épidermique de l'eczéma des mains a été étudié à la suite d'un prélèvement par tape-stripping (Sølberg et al., 2022). Les étiologies étaient diverses et comprenaient notamment des DA, des ECA et des ECI. En comparant spécifiquement ces 3 conditions, les auteurs ont retrouvé 32 gènes permettant de discriminer DA et ECI mais aucun ne permettait une distinction entre DA et ECA. Par ailleurs, 6 gènes étaient exprimés de manière différentielle entre l'ECA et l'ECI : **PD2D4, EPHA1, ACTN3, LLGL2, RNF220, WDR62**. A noter qu'aucun gène associé à l'inflammation n'a pu être détecté par cette méthode de prélèvement peu invasive et peut être trop superficielle. Par ailleurs, ces résultats se basent sur un faible nombre de patients (environ 5 par conditions) et devront donc être validés à partir de cohortes incluant un nombre de patients plus important.

2.2.6.4 *Impact du type de chimiques et des dermatoses associées sur l'identification des biomarqueurs des EC*

Il faut rappeler que les produits chimiques pouvant entraîner des lésions d'EC sont extrêmement nombreux et divers. Ainsi la recherche de biomarqueurs à partir du modèle du patch test en se basant sur un allergène unique peut être biaisée.

En effet, Dhingra et ses collaborateurs ont réalisé une analyse transcriptomique en comparant des échantillons cutanés provenant de réactions positives de patch tests pour 15 allergènes différents tel que le nickel, des allergènes de parfums, de caoutchouc et d'autres métaux (Dhingra et al., 2014). Ils ont ainsi identifié un **transcriptome unique de l'ECA commun à tous les haptènes testés**, comprenant 149 gènes. Parmi ceux-ci on retrouve des marqueurs associés aux cellules T (**GZMB, IL2RA, CD3D, BATF3...**), des chimiokines (**CXCL1, CCL17, CCL26**) et des marqueurs de l'inflammation générale (**MMP12**). Par ailleurs, **chaque allergène présentait une signature bien spécifiquement** avec par exemple 1899 gènes spécifiquement induit par le nickel, contre 136 pour les caoutchoucs ou 41 pour les parfums. De façon intéressante, les auteurs ont mis en évidence des **différences en termes de polarisation de l'inflammation en fonction des chimiques**. Le nickel induisait une forte polarisation de type 1/17, tandis que les allergènes de parfums (et de caoutchouc, dans une moindre mesure) induisent une polarisation de type 2/22 avec un axe 1/17 plus faible.

De la même manière, une autre équipe a comparé les signatures transcriptomiques induites à la suite de l'application cutanée de deux irritants, le SLS et l'acide non anionique, et ont mis en évidence des **voies de signalisations bien distinctes** en plus d'une signature commune (Clemmensen et al., 2010).

Ainsi, ces études montrent bien que si les produits chimiques induisent des réactions cliniques similaires, les réponses immunitaires sous-jacentes peuvent être très différentes. Ce concept présente également un intérêt thérapeutique pour les EC, dont la prise en charge pourrait être guidée en fonction du chimique impliqué. Cependant, un panel plus large de produits chimiques doit être testé avant de pouvoir tirer des conclusions générales.

Une autre question importante est de savoir si les mécanismes immunitaires impliqués dans les réactions d'EC peuvent être modifiées en cas de pathologie cutanées inflammatoire pré existante.

Une étude a mis en évidence que les réactions d'ECA chez les patients atteints de psoriasis pouvaient survenir de manière retardée, impliquant une lecture plus tardive des PT pour ne pas passer à côté de réactions faussement négatives. Néanmoins, les auteurs n'ont observé aucune modification en termes de profil transcriptomique (Quaranta, Eyerich, et al., 2014). De leur côté, Correa da Rosa et ses collaborateurs ont étudié les profils inflammatoires

de patch test positifs chez des patients présentant une DA comparativement à des patients sans DA. De manière générale, les réactions cliniques semblaient atténuées. Par ailleurs, la comparaison des signatures transcriptomiques a montré des **différences en termes de polarisation avec une nette diminution des marqueurs de types 1 au profit d'une inflammation de type 17 et de type 2 plus marquée chez les patients atteints de DA**, et ceci quel que soit l'allergène testé (Correa da Rosa et al., 2015).

2.2.7 Analyses protéomiques

Quelques études ont cherché à identifier des biomarqueurs discriminant ECA et ECI par des méthodes d'analyse protéomique sur des échantillons épidermiques (tape stripping). Dans l'une de ces études, **l'IL-16** a été identifiée comme biomarqueur potentiel de l'ECA puisque seule l'expression de ce marqueur a été retrouvée comme significativement augmentée pour l'ensemble des allergènes testés (nickel, chrome, PPD, MIT) par rapport au SLS (Koppes, Ljubojevic Hadzavdic, et al., 2017). De plus, une forte corrélation négative a été trouvée entre l'intensité de la réaction clinique du test épicutané et les niveaux d'IL-1 α . Une seconde étude incluant des allergènes de caoutchouc et de parfum a confirmé l'induction d'expression de l'IL16 dans les réactions positives et a également retrouvé une élévation significative de l'expression de **CXCL10, CXCL8 et CCL17** (Brans et al., 2021).

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que l'analyse moléculaire est très utile pour comprendre la différence dans les mécanismes impliqués dans les ECA et ECI. Il devient ainsi possible d'identifier de nouveaux biomarqueurs susceptibles de contribuer à l'amélioration du diagnostic des EC, à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques voire au développement de tests pour l'identification des allergènes de contact. Par ailleurs, la bio-informatique offre des outils précieux pour se rapprocher d'une médecine de précision en permettant une classification plus fiable des différentes pathologies et de leurs endotypes.

Bien qu'il ne soit pas encore possible de tirer des conclusions définitives, et que l'identification de biomarqueurs transposables en pratique courante nécessite encore des recherches supplémentaires, ces nouvelles données nous permettent de progresser dans la compréhension de la pathogénèse des EC et ouvre la voie au développement de nouvelles technologies et méthodes permettant de différencier clairement l'eczéma de contact allergique et irritant.

Conclusion de la synthèse bibliographique et objectifs du travail de thèse

Les connaissances scientifiques sur les mécanismes physiopathologiques des dermatoses inflammatoires ont considérablement progressé ces dernières années. Les innovations technologiques ont ouvert la voie à la détection de nombreux biomarqueurs moléculaires qui peuvent être utilisés non seulement dans le dépistage et le diagnostic de la maladie, son évaluation mais également pour guider le choix du traitement. La recherche de biomarqueurs, qui est l'un des piliers la médecine de précision, a également conduit à un enrichissement progressif de l'arsenal thérapeutique dans le psoriasis et la dermatite atopique, donnant lieu à des avancées majeures en matière de soins pour ces deux maladies dermatologiques.

Les eczémas de contact allergiques et irritatifs sont les grands oubliés de cette révolution. Pourtant, leur prise en charge est aujourd'hui limitée par l'absence de méthodes diagnostiques fiables et reproductibles. La découverte de biomarqueurs diagnostiques, correspondant à des molécules biologiques générées au cours de la réponse inflammatoire induite par le contact avec des produits chimiques aux propriétés physico-chimiques distinctes, pourrait ainsi jouer un rôle primordial dans la détection et la classification des sous-types d'EC.

Dans ce contexte, ce travail de thèse s'est intéressé à l'identification et la validation de biomarqueurs moléculaires permettant de discriminer de façon fiable ECA et ECI. Ces biomarqueurs peuvent être exprimés par différents types cellulaires impliqué dans la réponse immunitaire.

Le premier objectif a donc été d'identifier des candidats biomarqueurs différenciant les deux types d'inflammation à partir du modèle du patch test, en utilisant une méthode d'analyse transcriptomique à l'aide de puces pangénomiques (microarrays) (**Article n°1**). Cette approche a permis d'étudier l'expression de plus de 22000 transcrit d'ARNm dans des biopsies cutanées de patch tests positifs pour des allergènes/haptènes ou des irritants de référence. Des analyses bio-informatiques ont été conduites afin de caractériser les signatures moléculaires spécifiques de l'inflammation induite par les différents produits chimiques, puis de sélectionner les biomarqueurs les plus discriminant. Nos résultats ont ainsi permis d'identifier différentes combinaisons de biomarqueurs présentant une sensibilité et spécificité excellentes. Enfin, nous avons validé une douzaine de biomarqueurs par une technologie complémentaire de qRT-PCR. Nous avons ainsi apporté la preuve expérimentale que cette

méthodologie utilisable en pratique courante permettait une détection sensible et reproductible de nos candidats biomarqueurs et avons abordé une première étape de validation analytique.

La seconde partie de ce travail a consisté à démontrer la validité et l'utilité clinique des biomarqueurs préalablement sélectionnés. Nous avons évalué différents paramètres tels que la corrélation clinique et la valeur prédictive de nos biomarqueurs. Dans une première étude, nous avons ainsi pu mettre en évidence une corrélation entre la réponse moléculaire et l'intensité clinique des réactions positives de patch test pour un allergène mais également avec la dose d'haptène appliquée (**Article n°2**). Pour cela, nous avons retesté des patients étiquetés allergiques à l'amerchol avec une série de 4 concentrations différentes en patch test et avons étudié les signatures moléculaires à la fois par des techniques de puces microarrays et de qRT-PCR. Cette étude nous a également permis de caractériser les réponses induites par l'amerchol, un allergène souvent questionnable en pratique clinique. En comparant les résultats avec ceux de la précédente étude, nous avons pu montrer que les réactions positives aux patch tests étaient pour la grande majorité de nature allergique. Cependant, l'analyse moléculaire a également permis d'identifier des tests épicutanés faussement positifs.

Enfin, dans une dernière étude, nous avons comparé les signatures moléculaires détectées dans les lésions actives de patients souffrant d'EC à celles identifiées à partir du modèle du patch test (Article n°3). Nous avons pu montrer que l'expression de 12 biomarqueurs par qRT-PCR dans les lésions actives était prédictive du diagnostic des patients et que le même profil moléculaire était détecté dans les patchs tests positifs et pertinents correspondants. Ce test diagnostique a permis d'identifier 100% des patients souffrant d'ECA, en se basant sur l'expression combinée des biomarqueurs dans les lésions actives, renforçant ainsi l'utilité clinique de ces derniers.

TRAVAUX PERSONNELS DE RECHERCHE

Article 1 : Unique molecular signatures typify skin inflammation induced by chemical allergens and irritants

Mes premiers travaux de recherche se sont intéressés à caractériser les signatures moléculaires de l'inflammation cutanée induite par des haptènes et/ou des irritants de référence afin d'identifier des biomarqueurs qui permettraient de discriminer l'ECA de l'ECI.

Dans cet objectif, nous avons induit expérimentalement des lésions cliniques d'allergie et d'irritation chez 47 patients, en utilisant le modèle du patch test. Nous avons ensuite effectué une analyse transcriptomique globale par puce à ADN, à partir de biopsies cutanées réalisées sur 37 réactions cutanées positives pour des allergènes de contact et 18 lésions induites par des irritants dénués de tout pouvoir allergisant. Les données ainsi générées ont été analysées grâce à des outils de bio-informatique afin d'identifier les gènes les plus différenciellement exprimés entre les deux types d'inflammations et de caractériser les voies biologiques communément ou spécifiquement modulées. Des algorithmes d'apprentissage automatisé ont également été utilisés afin de sélectionner des combinaisons de biomarqueurs permettant de classer correctement les ECA et les ECI. Les performances des différents classificateurs ont été évaluées à la fois par des techniques de validation croisée mais également sur des jeux de données externes disponibles sur les bases de données publiques.

Nos résultats ont montré que :

- (i) la signature moléculaire de l'inflammation cutanée induite par des allergènes est très différente de celle induite par des irritants ;
- (ii) les allergènes activent principalement des voies de signalisation associées à l'immunité adaptative et à la détoxification de ces composés, tandis que les irritants activent des voies de signalisation associées au remodelage tissulaire ;
- (iii) l'intensité de la réaction clinique corrèle avec l'intensité de l'activation moléculaire.
- (iv) Enfin, en utilisant une approche de « machine learning », nous avons identifié plusieurs combinaisons minimales de biomarqueurs permettant de discriminer allergie d'irritation cutanée.

En outre, nous avons validé une douzaine de biomarqueurs par qRT-PCR, confirmant le résultat précédent.


















Cette étude démontre donc que l'analyse de l'expression cutanée d'un petit ensemble de biomarqueurs moléculaires permet de discriminer de façon fiable les inflammations induites par les allergènes et les irritants, et par extension, les ECA des ECI. Ces résultats soulignent l'intérêt du développement de nouveaux tests diagnostic pour l'amélioration de la prise en charge de ces pathologies.

Néanmoins, avant d'atteindre un tel objectif, plusieurs questions subsistent : 1) Les mêmes signatures moléculaires caractérisent-elles les lésions cliniques d'ECA et d'ECI ? L'utilisation du modèle du patch test nous a contraint à étudier la réponse inflammatoire à une cinétique bien précise : ici 72 heures, il est donc légitime de se poser la question si les biomarqueurs sélectionnés seront également exprimés dans des lésions d'eczéma chronique. 2) Les combinaisons de biomarqueurs permettent-elles de distinguer les réactions de patch test faussement positives ? Dans cette étude, nous ne disposons des informations nécessaires pour établir la pertinence clinique des patch tests, et toutes les analyses effectuées se basaient sur l'hypothèse qu'aucune des réactions positives pour les allergènes n'étaient le résultat d'un test faussement positif. Néanmoins, nous avons observé que certains patients présentant des réactions cliniques faiblement positives (PT +/- ou +) aux allergènes ne montraient aucune activation des voies moléculaires induites classiquement par ces molécules, soulevant ainsi la question de la pertinence des résultats de ces tests. 3) Enfin, il serait également intéressant de soulever la question de la caractérisation biologique des biomarqueurs identifiés. En effet, si certains biomarqueurs sont de façon évidente impliqués dans la physiopathologie des EC, le rôle mécanistique d'autres biomarqueurs (récepteurs, enzymes, ect) identifiés ici n'a peu ou pas été caractérisé dans les EC jusqu'à présent.

ORIGINAL ARTICLE

Basic and Translational Allergy Immunology

Unique molecular signatures typify skin inflammation induced by chemical allergens and irritants

Marine-Alexia Lefevre^{1,2}  | Audrey Nosbaum^{1,3}  | Aurore Rozieres¹  | Vanina Lenief¹  |
 Amandine Mosnier¹  | Angèle Cortial¹  | Margaux Prioux¹  | Simon De Bernard⁴  |
 Julien Nourikyan⁴  | Pierre-Emmanuel Jouve⁴  | Laurent Buffat⁴  | Florence Hacard³  |
 Marie-Christine Ferrier-Lebouedec⁵ | Pauline Pralong⁶  | Charles Dzviga² |
 Anne Herman⁷  | Marie Baeck⁷  | Jean-François Nicolas^{1,3}  | Marc Vocanson¹ 

¹CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, (Team Epidermal Immunity and Allergy), INSERM, U1111, Univ Lyon, Université de Lyon 1, Ecole Normale Supérieure de Lyon, CNRS, UMR 5308, Lyon, France

²Department of Dermatology and Allergology, Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne, Saint-Priest-en-Jarez, France

³Department of Allergy and Clinical Immunology, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Benite, France

⁴Altrabio, Lyon, France

⁵Department of Dermatology, Centre Hospitalier Universitaire de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

⁶Department of Dermatology, Allergology and Photobiology, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, La Tronche, France

⁷Department of Dermatology, Cliniques universitaires Saint-Luc, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium

Correspondence

Marc Vocanson, CIRI-INSERM U1111, 21 avenue Tony Garnier 69007 Lyon, France. Email: marc.vocanson@inserm.fr

Funding information

Institut Nationale de la Santé et de la Recherche Médicale; Société Française d'Allergologie

Abstract

Background: Skin exposure to chemicals may induce an inflammatory disease known as contact dermatitis (CD). Distinguishing the allergic and irritant forms of CD often proves challenging in the clinic.

Methods: To characterize the molecular signatures of chemical-induced skin inflammation, we conducted a comprehensive transcriptomic analysis on the skin lesions of 47 patients with positive patch tests to reference contact allergens and nonallergenic irritants.

Results: A clear segregation was observed between allergen- and irritant-induced gene profiles. Distinct modules pertaining to the epidermal compartment, metabolism, and proliferation were induced by both contact allergens and irritants; whereas only contact allergens prompted strong activation of adaptive immunity, notably of cytotoxic T-cell responses. Our results also confirmed that: (a) unique pathways characterize allergen- and irritant-induced dermatitis; (b) the intensity of the clinical reaction correlates with the magnitude of immune activation. Finally, using a machine-learning approach, we identified and validated several minimal combinations of biomarkers to distinguish contact allergy from irritation.

Conclusion: These results highlight the value of molecular profiling of chemical-induced skin inflammation for improving the diagnosis of allergic versus irritant contact dermatitis.

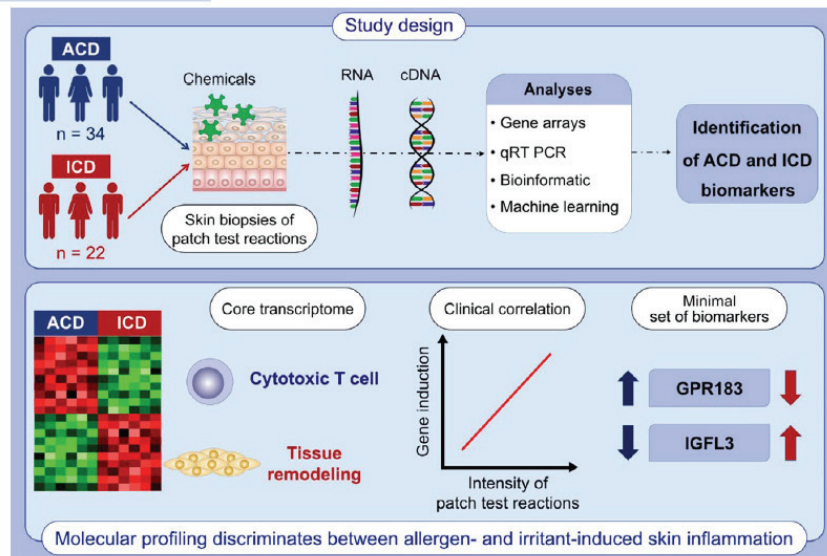
KEYWORDS

allergic contact dermatitis, chemical allergens, chemical irritants, biomarker, transcriptomic profiling

Abbreviations: ACD, Allergic contact dermatitis; CD, Contact dermatitis; CTL, cytotoxic CD8+ T cell; DEG, Differentially expressed gene; Fc, Fold change; FDR, False discovery rate; GNLy, Granulysin; GZMB, Granzyme B; ICD, Irritant contact dermatitis; IFNG, Interferon gamma; MI, Methylisothiazolinone; PCA, Principal component analysis; PT, Patch test; SLS, Sodium lauryl sulfate; Tef, Effector T cells; Tmem, Memory T cells.

Marine-Alexia Lefevre, Audrey Nosbaum, Jean-François Nicolas and Marc Vocanson contributed equally to this work.

© 2021 EAACI and John Wiley and Sons A/S. Published by John Wiley and Sons Ltd.



GRAPHICAL ABSTRACT

The core transcriptome of allergen- and irritant-induced reactions consists of cytotoxic T-cell- and tissue remodeling-related transcripts, respectively. The magnitude of gene activation correlates with the intensity of the clinical reactions. Machine-learning approach identifies several minimal combinations of biomarkers to distinguish allergic versus irritant contact dermatitis.

1 | INTRODUCTION

Contact dermatitis (CD), or contact eczema, is a skin disease affecting approximately 15% to 20% of the general population in industrialized countries.^{1,2} CD is the most frequent occupational disease in many European countries.³ The direct (treatment and compensation) and indirect (sick leave and lack of productivity) costs associated with the disease have resulted in the economic burden of CD being estimated at over 5 billion Euros per year in Europe.⁴ CD typically presents as acute inflammation with itching, redness, edema, vesicles, and oozing, as well as thickening and crusting in its chronic form. CD is induced by repeated skin contacts with external agents. A wide range of substances has been implicated in the disease, notably chemicals with irritant and/or allergenic properties, which are responsible for the irritant (ICD,⁵) and allergic (ACD,⁶) types of CD respectively. Available data indicate that ICD accounts for approximately 70% to 80% of all cases of occupational CD in industrialized countries.⁷

The mechanisms by which chemicals cause ICD are poorly understood, and vary from disorganization of cell membrane lipid bilayers to damage of barrier proteins.⁸ ICD may be caused by acute exposure to corrosive substances such as acids and bases, which trigger intense cell necrosis and major skin barrier disruption, or by chronic exposure to mild irritants such as detergents.⁹ In both cases, irritation is most likely triggered by injured cells releasing reactive oxygen species (ROS) and ATP in response to stress, and generating damage-associated molecular patterns (DAMPs) involving high-mobility group box 1 (HMGB1), heat-shock proteins, and interleukin (IL)-1 α . These alterations are then detected by the innate receptors of surrounding healthy cells,¹⁰ resulting in the

release of a myriad of inflammatory mediators (cytokines, chemokines, arachidonic acid derivatives, proteases, etc.) within minutes to hours after contact.^{11,12} The reaction is further amplified by infiltration from the blood of inflammatory monocytes, neutrophils, etc.¹³

ACD is the prototype of a type IV delayed-type hypersensitivity reaction, which develops in individuals who have previously been sensitized to chemical allergens (also referred to as haptens). The most common clinically relevant allergens associated with occupational or nonoccupational exposure include protein-reactive compounds, such as metals, fragrances, preservatives, or rubbers.¹⁴ ACD is mediated by the recruitment and reactivation of allergen-specific effector/memory T cells (Teff/mem) – key cells involved in the immune response to allergens and skin inflammation.¹⁵ Akin to irritants, certain contact allergens have toxic/proinflammatory properties and activate danger recognition platforms (Toll-like and NOD-like receptors) through the release of stress and DAMP signals to induce T-cell sensitization and ACD development.¹⁶

Although ICD and ACD involve different pathogenic molecular mechanisms,^{17,18} their symptoms and presentation are often similar, making it difficult to distinguish between the two CD forms without performing allergology tests, such as patch tests.¹⁹ Although the robustness of patch tests has long been established, this method can sometimes give inconclusive results, leading to problems in disease management. This is particularly common for patients with highly sensitive skin: these patients mount positive responses both to reference allergens and to noninflammatory doses of irritant controls, leading to questions about the specificity of allergen-induced reactions. A recent 20-year retrospective analysis revealed that 30%–40% of weak positive patch test reactions were not reproduced on retesting.^{20,21} This suggests a lack of

persistence of skin allergy in some patients, or that some of the skin test results were false positives, occurring due to the irritant properties of chemicals applied for several days under occlusion.²²

There is now great interest in developing new diagnostic approaches that could help clinicians make a reliable diagnosis of CD. A recent study concluded that an immunohistochemical phenotyping approach, based on a minimal set of markers (CD3, CD4, CD8, etc.), was not reliable enough to discriminate between the cellular events shaping the ACD and the ICD reactions.²³ Alternatively, several investigators have explored the molecular signatures induced by clinically relevant chemical allergens in human skin.^{24–28} They identified pathways in CD that were distinct from those occurring in dermatoses such as psoriasis and atopic dermatitis,^{24,29} and Fortino *et al.* recently proposed that gene profiling could be of major value for discriminating between ICD and ACD.²⁸

In this study, we then conducted a comprehensive analysis to compare the reactions induced by a large set of allergens ($n = 6$) and irritants ($n = 3$), as well as different degrees of clinical reactions, in order to identify ACD and ICD biomarkers robust enough to allow for the variability of clinical contexts.

Our results identified the core signatures of allergen- and irritant-induced skin inflammation, opening the way for the development of new approaches to improve ACD diagnosis.

2 | METHODS

A brief description of the Methods is provided below. Additional details about study design, gene arrays, qRT-PCR experiments, and bioinformatic and biostatic analyses are provided in the Supplemental Methods section.

Patients suspected for skin allergy were enrolled in the study after being referred to the hospital for routine diagnosis of contact dermatitis. They were patch tested either with the contact allergens: nickel, methylisothiazolinone [MI], and linalool hydroperoxide, or the drug allergens: amoxicillin, piperacillin/tazobactam, and acetazolamide, and/or the irritants: SLS, nonanoic acid, and cantharidin (Table 1). At 72 h, the patch test sites were evaluated for reactivity, and reactions were clinically graded as negative (-), doubtful (+/?), or positive (1+, 2+ or 3+).¹⁹ Biopsies (3 × 3 mm) were collected from positive and negative patch-tested skin, as well as from control areas including nonlesional skin or vehicle (petrolatum or isopropanol) patch-tested skin. Total RNA was then extracted from the biopsies and used for Affymetrix PrimeView Human Gene Expression array and qRT-PCR analysis.

The study was approved by the local ethics committee (N°19-145 CHU Lyon), and written informed consent was obtained from each participant.

3 | RESULTS

Forty-seven patients suspected for ACD (34 females and 13 males; aged 29–88 years, median 61 years) were enrolled in this study and

received patch tests (PT) to different chemicals. Overall, thirty-six patients developed positive reactions to contact allergens (nickel, $n = 10$; MI, $n = 6$; linalool hydroperoxide, $n = 10$) and/or chemical irritants (SLS, $n = 7$; nonanoic acid, $n = 4$; cantharidin, $n = 7$). These patients were biopsied and their samples were subjected to extensive genomic and molecular profiling. In parallel, we biopsied 11 patients with suspected drug allergies, who developed positive patch tests to drug allergens (amoxicillin, $n = 6$; acetazolamide, $n = 1$; piperacillin/tazobactam, $n = 1$) and/or irritants (SLS; $n = 4$). These patients were included in the study because patch test reactions to drugs are thought to exhibit clinical, histological, and pathophysiologic mechanisms similar to those of reactions to contact allergens.

Patient clinical features and patch test scores are detailed in Table 1. All patch test reactions were positive (graded as 1+, 2+, 3+), except for two patients with doubtful (+/?) reactions to linalool hydroperoxide and MI, and five patients with negative reactions to SLS.

3.1 | Molecular profiling discriminates between contact allergy and irritation

We first executed a hypothesis-free principal component analysis (PCA) of data from the full set of genes measured on the arrays. This PCA demonstrated that all allergen and irritant samples were segregated from their respective controls, with the exception of the negative SLS patch test reaction samples (Figure 1). This PCA also showed that the expression profiles of the majority of allergen samples (including those of the drug allergens) diverged from those of the irritant samples. All allergen and irritant samples were on the same side of PC1, suggesting that gene expression was partially shared. However, PC1/PC2 analysis revealed clear differences in expression (Figure 1). Interestingly, the expression profiles of nickel, linalool hydroperoxide, and amoxicillin samples differed from each other. No differences were observed when nickel samples were compared with MI samples. Similar differential profiles were observed with the irritant molecules, notably between cantharidin and SLS (Figure 1).

Although differences in the magnitude of the respective patch test reactions between sample specimens (Table 1) may have an impact on the observed PCA variations, these results confirm that the molecular signatures of positive patch test reactions to allergens and irritants are distinct, and that molecule-dependent profiles exist within each group.^{24–28}

3.2 | Main signaling pathways differentiating allergen- and irritant-induced inflammatory responses

We then searched to define the genes and signaling pathways that differed between the allergen and irritant samples. We first evaluated the number of differentially expressed genes (DEGs) between samples from each patient in each group and their respective controls. The five SLS samples that did not exhibit positive clinical responses

TABLE 1 Patient features and patch test results

| Patient | | Patch test | | | |
|----------------|------------|------------|------------------|------------------------|--------|
| Patient number | Gender/age | Indication | Class | Compound | Result |
| 1 | M/78 | Eczema | Irritant | Cantharidin | 2+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 2 | F/57 | Eczema | Irritant | Cantharidin | 3+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 3 | F/66 | Eczema | Irritant | Cantharidin | 3+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 4 | F/43 | Eczema | Irritant | Cantharidin | 1+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 5 | M/67 | Eczema | Irritant | Cantharidin | 2+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 6 | F/52 | Eczema | Allergen | Linalool hydroperoxide | +/? |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 7 | F/50 | Eczema | Allergen | Nickel | 2+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 8 | M/66 | Eczema | Allergen | Methylisothiazolinone | 2+ |
| | | | Nonlesional skin | - | - |
| 9 | F/50 | Eczema | Irritant | Cantharidin | 3+ |
| | | | Allergen | Nickel | 1+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 10 | F/61 | Eczema | Irritant | Cantharidin | 3+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 11 | F/40 | Eczema | Allergen | Methylisothiazolinone | 3+ |
| | | | Allergen | Nickel | 3+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 12 | F/68 | Eczema | Allergen | Linalool hydroperoxide | 2+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 13 | F/41 | Eczema | Allergen | Nickel | 3+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 14 | F/41 | Eczema | Allergen | Nickel | 2+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 15 | F/60 | Eczema | Allergen | Methylisothiazolinone | 3+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 16 | F/62 | Eczema | Allergen | Nickel | 1+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 17 | F/53 | Eczema | Allergen | Nickel | 2+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 18 | F/34 | Eczema | Allergen | Methylisothiazolinone | 2+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 19 | M/42 | Eczema | Allergen | Linalool hydroperoxide | 2+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 20 | F/66 | Eczema | Allergen | Linalool hydroperoxide | 1+ |
| | | | Nonlesional skin | - | - |
| 21 | F/65 | Eczema | Allergen | Linalool hydroperoxide | 3+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

| Patient | | Patch test | | | |
|----------------|------------|------------|------------------|------------------------|--------|
| Patient number | Gender/age | Indication | Class | Compound | Result |
| 22 | F/67 | Eczema | Allergen | Methylisothiazolinone | 2+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 23 | F/57 | Eczema | Allergen | Linalool hydroperoxide | 2+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 24 | F/76 | Eczema | Allergen | Methylisothiazolinone | +/? |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 25 | F/35 | Eczema | Irritant | SLS | 3+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 26 | F/50 | Eczema | Allergen | Nickel | 1+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 27 | F/48 | Eczema | Irritant | Nonanoic acid | 1+ |
| | | | Vehicle | Isopropanol | - |
| 28 | F/29 | Eczema | Allergen | Linalool hydroperoxide | 3+ |
| | | | Irritant | Nonanoic acid | 1+ |
| | | | Nonlesional skin | - | - |
| 29 | M/44 | Eczema | Irritant | Nonanoic acid | 1+ |
| | | | Vehicle | Isopropanol | - |
| 30 | M/62 | Eczema | Irritant | Nonanoic acid | 1+ |
| | | | Vehicle | Isopropanol | - |
| 31 | F/29 | Eczema | Allergen | Linalool hydroperoxide | 1+ |
| | | | Irritant | SLS | - |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 32 | F/57 | Eczema | Allergen | Nickel | 1+ |
| | | | Irritant | SLS | - |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 33 | F/44 | Eczema | Allergen | Nickel | 1+ |
| | | | Irritant | SLS | - |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 34 | F/71 | Eczema | Allergen | Linalool hydroperoxide | 1+ |
| | | | Irritant | SLS | - |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 35 | M/54 | Eczema | Allergen | Linalool hydroperoxide | 2+ |
| | | | Irritant | SLS | - |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 36 | M/86 | Eczema | Irritant | SLS | 1+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 37 | M/88 | cADRs | Allergen | Amoxicillin | 1+ |
| | | | Irritant | SLS | 1+ |
| | | | Nonlesional skin | - | - |
| 38 | M/75 | cADRs | Irritant | SLS | 1+ |
| | | | Nonlesional skin | - | - |
| 39 | F/78 | cADRs | Allergen | Acetazolamide | 3+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

| Patient | | Patch test | | | |
|----------------|------------|------------|------------------|-------------------------|--------|
| Patient number | Gender/age | Indication | Class | Compound | Result |
| 40 | M/43 | cADRs | Allergen | Amoxicillin | 2+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 41 | F/66 | cADRs | Allergen | Amoxicillin | 1+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 42 | F/68 | cADRs | Irritant | SLS | 1+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 43 | F/73 | cADRs | Allergen | Amoxicillin | 2+ |
| | | | Nonlesional skin | - | - |
| 44 | M/64 | cADRs | Allergen | Amoxicillin | 1+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |
| 45 | F/68 | cADRs | Allergen | Piperacillin/Tazobactam | 2+ |
| | | | Nonlesional skin | - | - |
| 46 | M/73 | cADRs | Allergen | Amoxicillin | 1+ |
| | | | Nonlesional skin | - | - |
| 47 | F/68 | cADRs | Irritant | SLS | 1+ |
| | | | Vehicle | Petrolatum | - |

Note: Patch test reactions were scored at 72 h in accordance with International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) criteria and European Society of Contact Dermatitis (ESCD) guidance.

-, negative reaction; +/-, doubtful reaction (erythema only, no infiltration); 1+, mild positive reaction (redness, induration, and possibly papules); 2+, strong positive reaction (erythema, induration, papules, and vesicles); 3+, extreme positive reaction (intense erythema, induration, and coalescing vesicles); F, Female; M, Male; cADRs, cutaneous Adverse Drug Reactions.

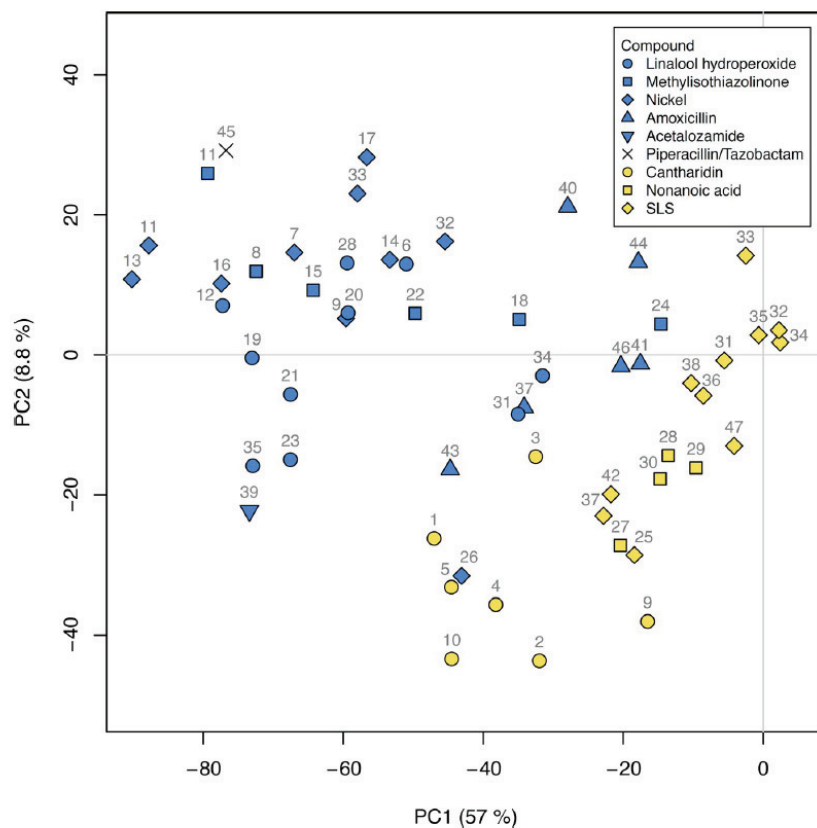


FIGURE 1 Intra-individual comparison of gene expression in allergen and irritant samples. Principal component analysis performed on the full set of genes measured on the arrays. To compensate for donor-induced variability, the gene expression level of the control sample from each donor was subtracted from that of the corresponding treated sample from the same donor. Results depict the sample location (symbols) in the first two principal components (PCs), with the controls a coordinate 0. Together, the first two components represented approximately 65% of the variance. Patient numbers are reported above each sample

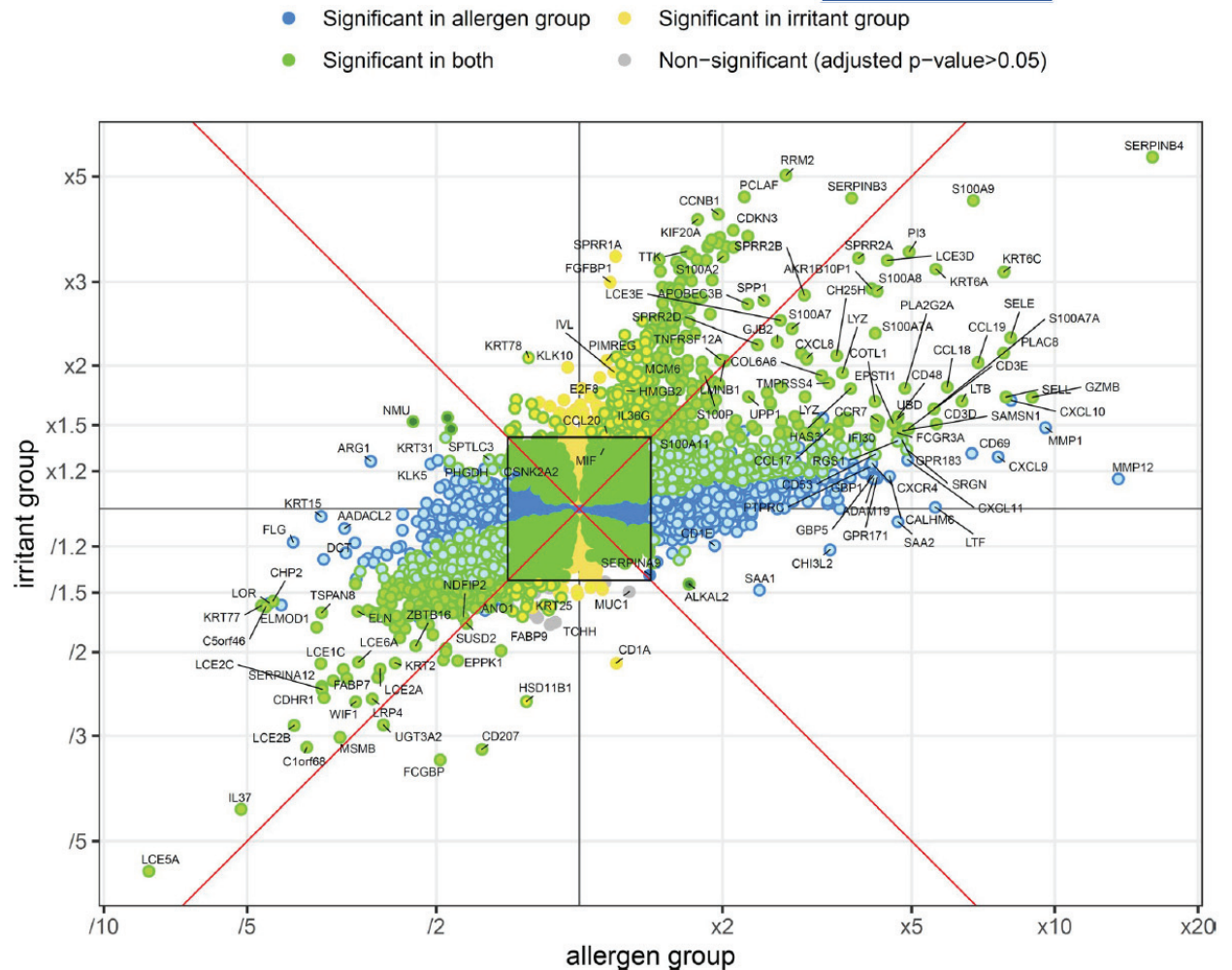


FIGURE 2 Common and distinct molecular responses induced by allergens and irritants. Each point of the graph illustrates the variation in the average expression levels of each gene in the allergen and irritant groups, after correction for the donor effect (mean fold changes). Green dots indicate genes ($n = 457$) significantly modulated in both groups. Blue dots indicate genes ($n = 1956$) predominantly modulated in the allergen group. Yellow dots indicate genes ($n = 255$) predominantly modulated in the irritant group. Gray dots indicate nonsignificant differences (adjusted P value $< .05$). The black square delimits fold changes >1.41 or $<1/1.41$

were excluded. The expression of 2371 and 699 genes was found to be modulated consistently among the 34 allergen and 17 irritant samples, respectively (Tables S1 and S2). Assuming a common response for all the tested molecules in a given group, we subsequently estimated the average expression level of each DEG, after correction for the donor effect, to establish whether this modulation was specific to the allergen group or the irritant group, or present in both groups. We detected 1956 DEGs predominantly modulated in the allergen group, 255 DEGs predominately modulated in the irritant group, and 457 DEGs that were modulated in both groups (Figure 2).

Gene ontology (GO) annotations revealed several commonly regulated pathways pertaining to the epidermal compartment ("peptide cross-linking" or "extracellular matrix assembly"), involved in metabolism ("cellular response to ketone" or "response to fatty acid") or implicated in cell proliferation ("sister chromatid segregation",

"negative regulation of cell division", or "regulation of centrosome cycle") (Figure 3A and Table S3). Pathways predominantly modulated in the irritant group were mainly related to cell proliferation. Among the most significant hits were "DNA replication", "mitotic nuclear cell division", or "deoxyribonucleotide metabolic process" (Figure 3B and Table S3). Finally, GO terms most commonly associated with the allergen group were related to immune pathways ("inflammatory pathways", "leukocyte activation", "response to virus", "regulation of apoptotic signaling pathway", "regulation of type-I interferon", etc.), but GO terms associated with chemical detoxification and the epidermal compartment were also identified, with significant down-regulation of genes associated with the "cornification" pathway (Figure 3C and Table S3).

Thus, distinct signaling pathways are activated in allergen and irritant patch test responses.

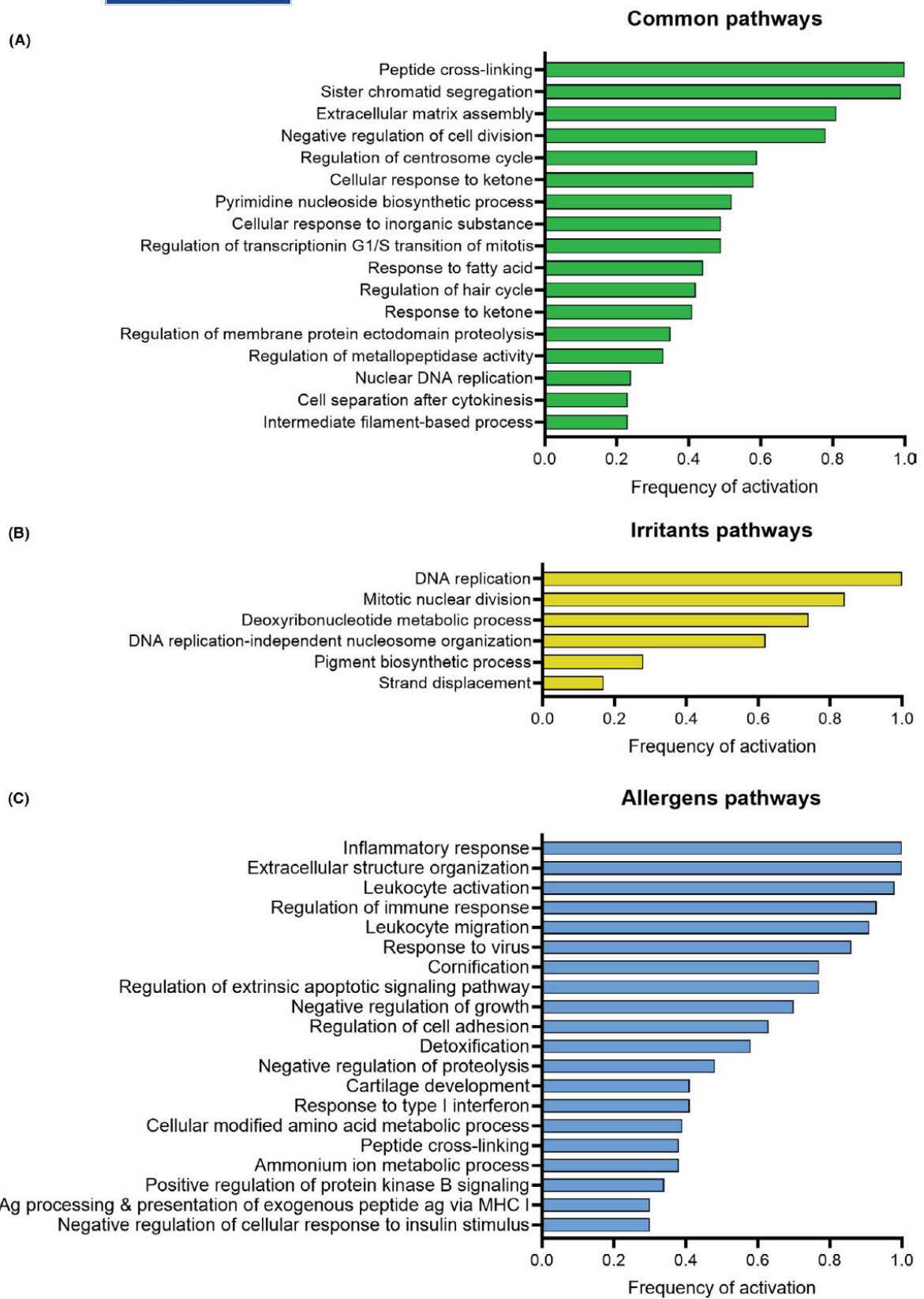


FIGURE 3 Signaling pathway analysis of allergen and irritant patch test responses. Shown are the most significant hits for the "biological process" GO terms for genes commonly (A) or predominantly regulated in the irritant (B) and allergen (C) groups. The size of the bar indicates the level of the estimated frequency of activation of the respective pathway (from 0 to 1)

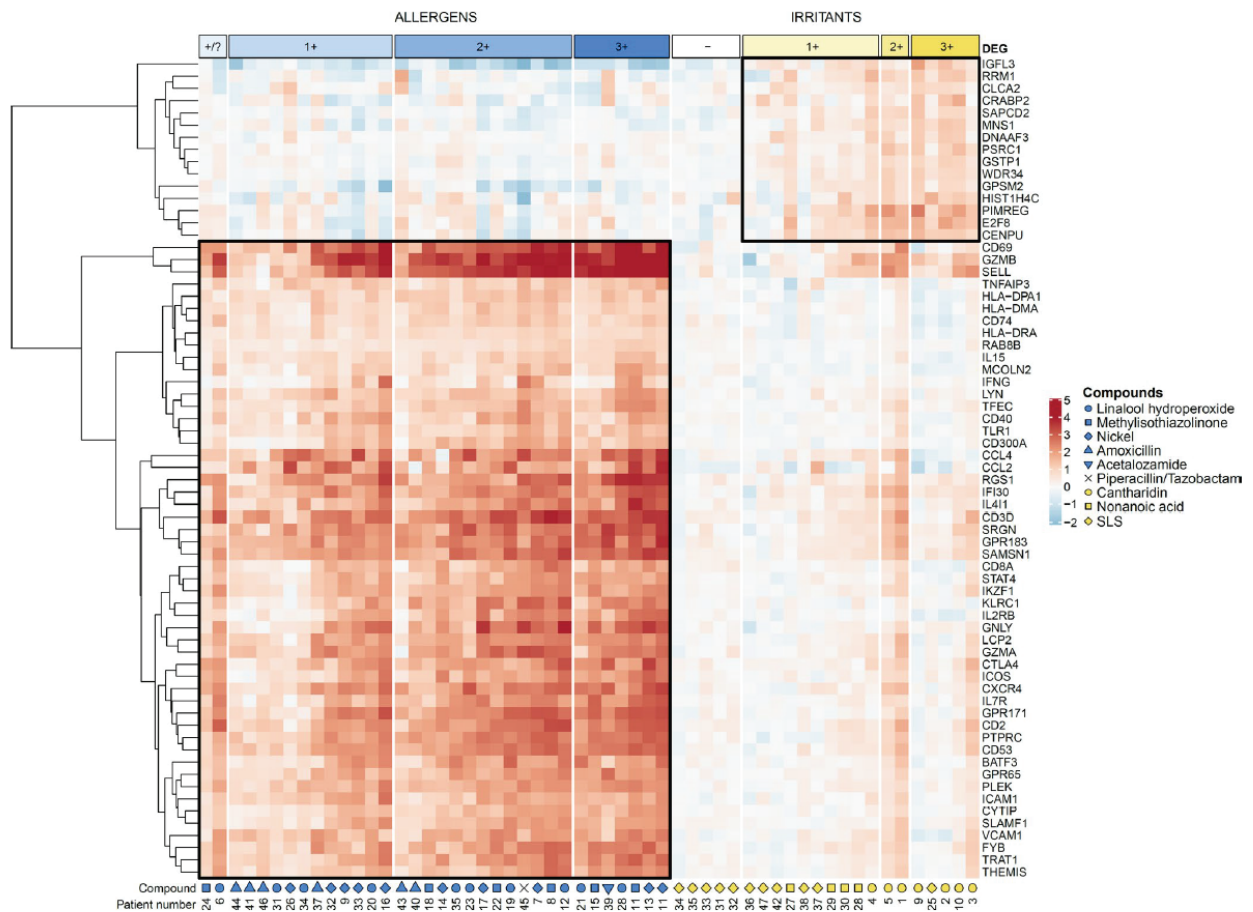


FIGURE 4 Unique molecular signatures for allergens and irritants. A set of 67 DEGs was used to illustrate the core transcriptomes of the 52 positive allergen and irritant-induced reactions. Results are depicted as a heatmap, in which samples are grouped by allergens and irritants and stratified by clinical reaction scores (+/? to 3+) (top of the figure). Blue, white, and red colors represent low, moderate, and high signal intensity, respectively. Chemical compounds and patient numbers are reported at the bottom of the figure

3.3 | The core transcriptome of allergen-induced reactions mainly consists of T-cell-related transcripts

By comparing DEGs from the allergen and irritant samples, we were then able to define a core transcriptome specific for each reaction. We first selected genes with the highest positive fold change (Fc) and false detection rate (FDR) responses, i.e., genes with the highest and most reproducible differential expression among all the samples from the respective groups. The allergen and irritant transcriptomes are illustrated in a heatmap (Figure 4).

The irritant transcriptome consisted of several cell cycle-related genes, such as E2F8, MNS1, PSCR1, MLF1IP, FAM64A, SAPCD2, or RRM1. It also included genes involved in epithelial cell differentiation, including GPM2 or CLCA2. Among other irritant genes, we also detected genes associated with retinoic acid metabolism, such

as CRABP2 and RDH12, and with cellular energy metabolism, like IGFL3 (Figure 4 and Table S2). Importantly, these markers were not upregulated in the five SLS-negative reactions.

The allergen transcriptome consisted of (a) several T-cell-related transcripts, including CD2, CD3D, CD3E, TRAC, or TCRBC1 (Figure 4 and Table S1); (b) DEGs down-stream of TCR signaling, such as LCK, THEMIS, FYB, TRAT1, or LCP2, and also (c) numerous DEGs involved in the activation and differentiation of type-1 cytotoxic CD8+ T cells (CTLs), comprising CD8A, IFNG, CCL5, IL2RB, GZMA, GZMB, GZMK, GNLY, PRF1, TBX21, EOMES, RUNX3, STAT1, STAT4, IKZF1, BAFT3, CD69, CD300A, ICOS, CTLA4, KLRC1, KLRD1, NKG7, CST7, PLEK, SLAMF1, or SRGN. Among other DEGs, we found (d) several markers known to be upregulated by IFN- γ cytokine on surrounding cells, like HLA-DMA, HLA-DPA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, CD40, CD74, CD86, IL-15, CSF2RB, IL10RA, CCL2, CXCL9, CXCL10,

CXCL11, IDO1, ICAM1, VCAM1, IRF5, IRF8, PDE4B, TNFAIP3, or IFI30 (Figure 4; Table S1).

A previous gene-expression study associated the clinical intensity of patch test reactions to contact allergens with the immune response.²⁵ To confirm these results and extend our analysis to irritant triggers, we estimated the average level of variation in core gene expression for each sample independently. We observed that core marker expression correlated with the intensity of the clinical symptoms, for both allergens (Figure 5A) and irritants (Figure 5B). Of note, the correlation was not only detected at the global level (including the 52 and the 15 genes of the allergen and irritant core signatures, respectively), but also at the individual gene level (Figure S1).

Taken together, these data confirm that unique biomarkers characterize the inflammatory reactions induced by chemical allergens and irritants, and that the expression of these markers strongly correlates with the magnitude of the clinical responses.

3.4 | A small set of biomarkers allows for robust discrimination between allergen- and irritant-induced skin inflammation

Finally, we sought to identify a minimal set of biomarkers susceptible to discriminate between the two types of skin inflammation. To this end, we applied a biomarker discovery approach (using Boruta and Random Forest classification algorithms and k-fold cross validation) to select and assess the performance of different genes or gene combinations (here referred to as classifiers).³⁰ We identified more than 4000 classifiers capable of correctly classifying the different allergen or irritant samples with an accuracy ranging from 90% to 100%. The first 30 are shown in Table 2. Each classifier combined between 1 and 5 different genes, identified among 15 of the major DEGs of the core transcriptomes: GPR183, IGFL3, PLEK, IL15, HLA-DRA, GPR65, SAMS1, HLA-DPA1, RAB8B, MCOLN2, CD69, HLA-DMA, CD74, and HLA-DPB1.

To confirm the predictive potential of the respective models, we next evaluated the best performance classifiers on a previously published²⁷ and newly generated (Ljungberg Silic L. *et al*, manuscript in preparation) gene array datasets. Majority of the classifiers achieved very good prediction results, correctly classifying the allergen (nickel²⁷ and amerchol AL-101 (Ljungberg Silic L. *et al*, manuscript in preparation) or the irritant (SLS²⁷) origin in approximately 90% and 66% of patch-test samples respectively (Table 3). The predictive values of irritant samples from Wisgrill *et al*. were slightly lower, which could be explained by the fact that these investigators used different gene arrays (the sensitivity of fold change measures vary depending on gene arrays).²⁷ We then plotted ROC (receiver operator characteristic) curves, which compare the sensitivity and specificity metrics of the classifiers according to different, and not a unique, decision thresholds. The AUC values derived from ROC curves showed that nickel and SLS samples from Wisgrill *et al*. are in fact highly discriminated by most of the classifiers (Table 3), as illustrated for the GPR183/IGFL3 couple in Figure S2.

Importantly, several of the biomarker genes detected in this study were validated by quantitative RT-PCR, confirming the

differential expression recorded in a large majority of our gene array samples (Figure 6 and Table S4).

Collectively, these results therefore indicate that a small set of biomarkers is sufficient to distinguish between allergen and irritant patch test responses.

4 | DISCUSSION

The main objective of our study was to compare the molecular responses induced by a range of chemicals with distinct proinflammatory properties, with the specific aim of identifying skin biomarkers for contact allergy. Our results clearly showed that the transcriptome of CD/skin inflammation induced by clinically relevant allergens differed from that induced by reference irritants, with core gene modules that were induced by both allergens and irritants. In addition, we confirmed that unique pathways are preferentially activated/inhibited depending on the nature of the tested molecules, with the magnitude of gene activation correlating with the intensity of the patch test-induced clinical inflammation. Finally, using the machine-learning approach, we identified and validated several minimal biomarker combinations, which demonstrated excellent performance in distinguishing contact allergy from irritation.

4.1 | Major hallmarks of the allergen signature

Skin allergy pathophysiology has been studied extensively over the past few decades, both in humans and in models. In contrast, far less is known about the skin inflammation induced by chemical irritants, especially in humans. Several studies had reported that transcripts from chemokines or innate sensors involved in antiviral responses and cell death, distinguished hapten- from irritant-induced responses.^{26-28,31-33} Our results confirmed the potential of CXCL9, CXCL10, and ZBP1, and, more generally, of the antiviral and type I interferon-related pathways (Figure 3) as factors for discriminating between allergic- and irritant-induced skin inflammation. As expected, our results revealed that allergen, but not irritant, core signatures were enriched with numerous T-cell-related transcripts, which we attributed to the differentiation of type-1 cytotoxic CD8+ T cells. Indeed, we detected a significant increase in CD8A transcripts, and to a lesser extent CD8B transcripts, in the allergen reactions, but detected relatively few CD4 transcripts (Figures 2, 4 and 6). Moreover, we found no differential expression for several NK or gamma delta T-cell-specific markers (such as NCR1, NCAM1, STYK1, TCRD, or TCRG; **data not shown**), suggesting that the cytotoxic markers identified were mostly related to CD8+ T lymphocytes. These findings confirm those of previous studies performed in humans and mice, which showed that numerous cytotoxic CD8+ T cells infiltrate the skin of allergic individuals to instigate the formation of eczematous lesions.³⁴⁻³⁷ In another recent study, we showed that these cells persist for months in previously affected skin sites, as resident memory T cells, precipitating eczema relapses.³⁸ Thus, the infiltration of cytotoxic CD8+ T cells represents a major hallmark

TABLE 2 Performance of the 30 best classifier models identified by Random Forest algorithm

| Gene sets | Accuracy | Precision-Allergen | Precision-Irritant | Recall-Allergen | Recall-Irritant | F1-Score-Allergen | F1-Score-Irritant | AUC |
|-------------------------------|----------|--------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|------|
| IGFL3, HLA-DRA | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 0.99 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| IGFL3, HLA-DRA, HLA-DMA | 0.99 | 0.98 | 1.00 | 1.00 | 0.96 | 0.99 | 0.98 | 1.00 |
| IGFL3, PLEK | 0.98 | 0.98 | 1.00 | 1.00 | 0.95 | 0.99 | 0.97 | 1.00 |
| IGFL3, HLA-DRA, HLA-DPA1 | 0.98 | 0.98 | 1.00 | 1.00 | 0.95 | 0.99 | 0.97 | 1.00 |
| IGFL3, HLA-DPA1 | 0.98 | 0.99 | 0.98 | 0.99 | 0.98 | 0.99 | 0.97 | 1.00 |
| IGFL3, HLA-DRA, CD74 | 0.98 | 0.98 | 1.00 | 1.00 | 0.95 | 0.99 | 0.97 | 1.00 |
| IGFL3, PLEK, HLA-DRA, MCOLN2 | 0.98 | 0.98 | 1.00 | 1.00 | 0.95 | 0.99 | 0.97 | 1.00 |
| IGFL3, PLEK, HLA-DRA, HLA-DMA | 0.98 | 0.98 | 1.00 | 1.00 | 0.95 | 0.99 | 0.97 | 1.00 |
| IGFL3, PLEK, HLA-DPA1 | 0.98 | 0.98 | 1.00 | 1.00 | 0.94 | 0.99 | 0.97 | 1.00 |
| IGFL3, HLA-DRA, MCOLN2 | 0.98 | 1.00 | 0.96 | 0.97 | 1.00 | 0.99 | 0.97 | 1.00 |
| IGFL3, HLA-DRA, RAB8B | 0.98 | 0.99 | 0.96 | 0.98 | 0.99 | 0.99 | 0.97 | 1.00 |
| HLA-DRA, CD69 | 0.98 | 0.97 | 1.00 | 1.00 | 0.94 | 0.99 | 0.96 | 0.99 |
| IGFL3, HLA-DRA, CD69 | 0.98 | 0.97 | 1.00 | 1.00 | 0.94 | 0.99 | 0.97 | 1.00 |
| GPR183, IGFL3, HLA-DRA | 0.98 | 0.97 | 1.00 | 1.00 | 0.94 | 0.99 | 0.97 | 1.00 |
| GPR183, IGFL3, CD69 | 0.98 | 0.97 | 1.00 | 1.00 | 0.94 | 0.99 | 0.96 | 1.00 |
| IL15, CD69 | 0.98 | 0.97 | 1.00 | 1.00 | 0.94 | 0.99 | 0.96 | 0.98 |
| GPR183, IGFL3 | 0.98 | 0.97 | 1.00 | 1.00 | 0.94 | 0.99 | 0.97 | 1.00 |
| IGFL3, PLEK, HLA-DRA, RAB8B | 0.98 | 0.98 | 1.00 | 1.00 | 0.95 | 0.99 | 0.97 | 1.00 |
| IGFL3, IL15, CD69 | 0.98 | 0.97 | 1.00 | 1.00 | 0.94 | 0.99 | 0.96 | 1.00 |
| IGFL3, PLEK, CD69 | 0.98 | 0.97 | 1.00 | 1.00 | 0.94 | 0.99 | 0.96 | 1.00 |
| IGFL3, IL15, HLA-DRA | 0.98 | 0.97 | 1.00 | 1.00 | 0.94 | 0.99 | 0.96 | 1.00 |
| GPR183, IL15, HLA-DRA | 0.98 | 0.97 | 1.00 | 1.00 | 0.94 | 0.99 | 0.96 | 1.00 |
| IGFL3, PLEK, IL15 | 0.98 | 0.97 | 1.00 | 1.00 | 0.94 | 0.99 | 0.96 | 1.00 |
| GPR65 | 0.98 | 0.97 | 1.00 | 1.00 | 0.94 | 0.99 | 0.96 | 0.99 |
| GPR183, IGFL3, PLEK | 0.98 | 0.97 | 1.00 | 1.00 | 0.94 | 0.99 | 0.96 | 1.00 |
| IL15, HLA-DRA | 0.98 | 0.97 | 1.00 | 1.00 | 0.94 | 0.99 | 0.96 | 1.00 |
| PLEK, IL15 | 0.98 | 0.97 | 1.00 | 1.00 | 0.94 | 0.98 | 0.96 | 0.99 |
| PLEK, CD69 | 0.97 | 0.97 | 0.98 | 0.99 | 0.94 | 0.98 | 0.96 | 0.99 |
| IGFL3, IL15 | 0.97 | 0.97 | 0.98 | 0.99 | 0.94 | 0.98 | 0.95 | 1.00 |
| PLEK, HLA-DRA | 0.96 | 0.97 | 0.96 | 0.97 | 0.94 | 0.97 | 0.94 | 1.00 |
| GPR183, CD69 | 0.96 | 0.95 | 1.00 | 1.00 | 0.88 | 0.97 | 0.93 | 0.98 |

Note: Performance metrics: Accuracy is the rate of correct predictions among the total number of predictions the classifier performed with both allergen and irritant samples. Precision is the rate of correct predictions among the total number of positive predictions (considering both true positive and false positive predictions) for a given class sample (allergen or irritant). Recall is the rate of correct predictions among the total number of predictions (considering both true positive and false negative predictions) the classifier made with samples from a specific class (allergen or irritant). F1-Score for a given class is the harmonic mean of the Precision and Recall values. AUC is the area under the ROC curve calculated for a standard binary classifier. The ROC curve compares the sensitivity (here Recall Allergen) and the specificity (here Recall Irritant) of each binary classifier, when the decision threshold varies. The decision threshold is the value at which the binary classifier considers that a classification belongs to a specific class (allergen or irritant). An AUC value near to the 1.00 means an excellent discrimination of the two classes.

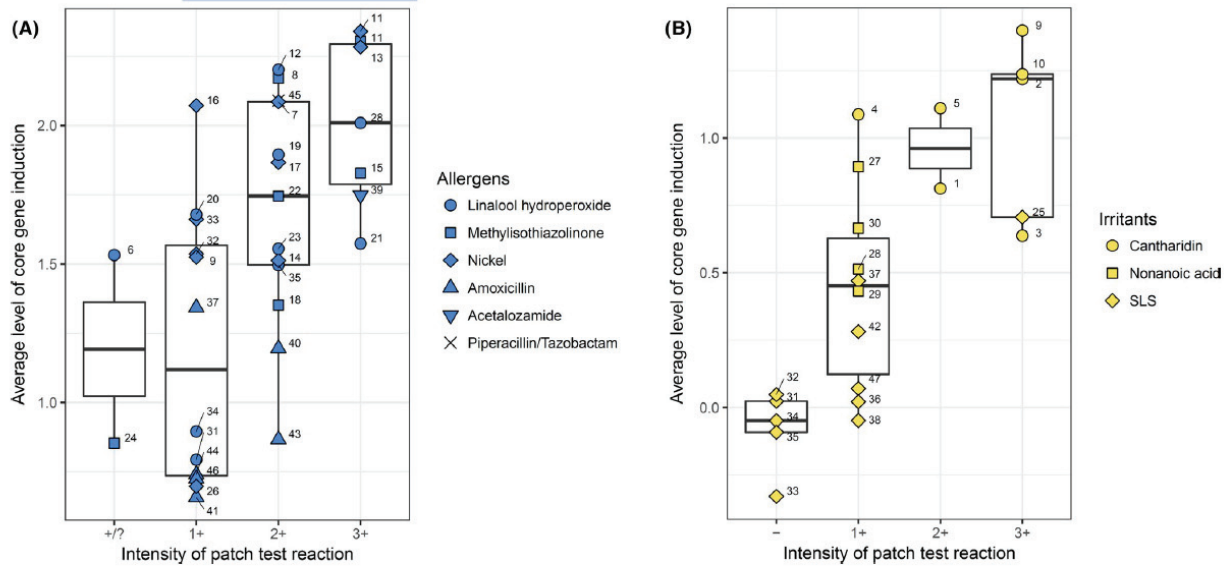


FIGURE 5 Gene expression correlates with the magnitude of the clinical response. Box-and-whisker plots depict the distribution of the average levels of variation in core gene expression for the allergen (A) and irritant (B) groups depending on the clinical score, i.e., the intensity of the PT reactions. Each point represents the average expression level (\log_2 Fc) of core genes (including 52 genes for the allergen signature and 15 genes for the irritant signature) for one sample, after correction for the donor effect. Patient numbers are reported next to each sample

TABLE 3 Validation of the best classifiers using external gene array datasets

| Gene sets | Wisgrill et al. ²⁷ | | | Ljungberg Silic et al. (in preparation) |
|---------------------|-------------------------------------|---------------------------------|------|--|
| | Recall Allergen (Nickel, $n = 11$) | Recall Irritant (SLS, $n = 6$) | AUC | Recall Allergen (Amerchol L-101, $n = 8$) |
| GPR65 | 0.91 | 0.67 | 0.83 | 1 |
| GPR183 IGFL3 | 0.91 | 0.67 | 0.94 | 0.88 |
| PLEK IL15 | 0.91 | 0.67 | 0.85 | 1 |
| PLEK CD69 | 0.91 | 0.67 | 0.86 | 1 |
| IL15 HL-DRA | 0.91 | 0.67 | 0.79 | 1 |
| GPR183 IGFL3 PLEK | 0.91 | 0.67 | 0.92 | 0.88 |
| GPR183 IGFL3 CD69 | 0.91 | 0.67 | 0.92 | 1 |
| IGFL3 PLEK CD69 | 0.91 | 0.67 | 0.88 | 1 |
| IGFL3 IL15 CD69 | 0.91 | 0.67 | 0.86 | 1 |
| IGFL3 PLEK HLA-DPA1 | 0.91 | 0.67 | 0.88 | 1 |

Note: The classifiers shown in Table 2 were validated on two external gene array datasets, generated from biopsies of positive PT samples (i) to nickel and SLS (access code E-MTAB-8945) and (ii) to amerchol (access code GSE169573).

Different metrics, Recall and AUC of ROC curves, are shown for the 10 best performance classifiers.

of the allergen signature, which, in addition, correlates strongly with the magnitude of the clinical response (Figure 5A).

4.2 | Major hallmarks of the irritant signature

In contrast to allergic reactions, the most significant hits recorded for irritant-induced inflammation were associated with

cell proliferation. This was expected as irritants trigger potent keratinocyte damage, followed by rapid and intensive tissue renewal.^{17,39,40} The occurrence of intense tissue remodeling was supported by our observation of strong upregulation of genes associated with cell metabolism (RDH12, CRABP2, IGFL3, etc.), peptide crosslinking (LCE5A, LCE3D, SPFR2A, etc.), and extracellular matrix assembly (MFAP4, MYH11, FBLN5, etc.), with the later genes being upregulated in both irritant and allergen samples

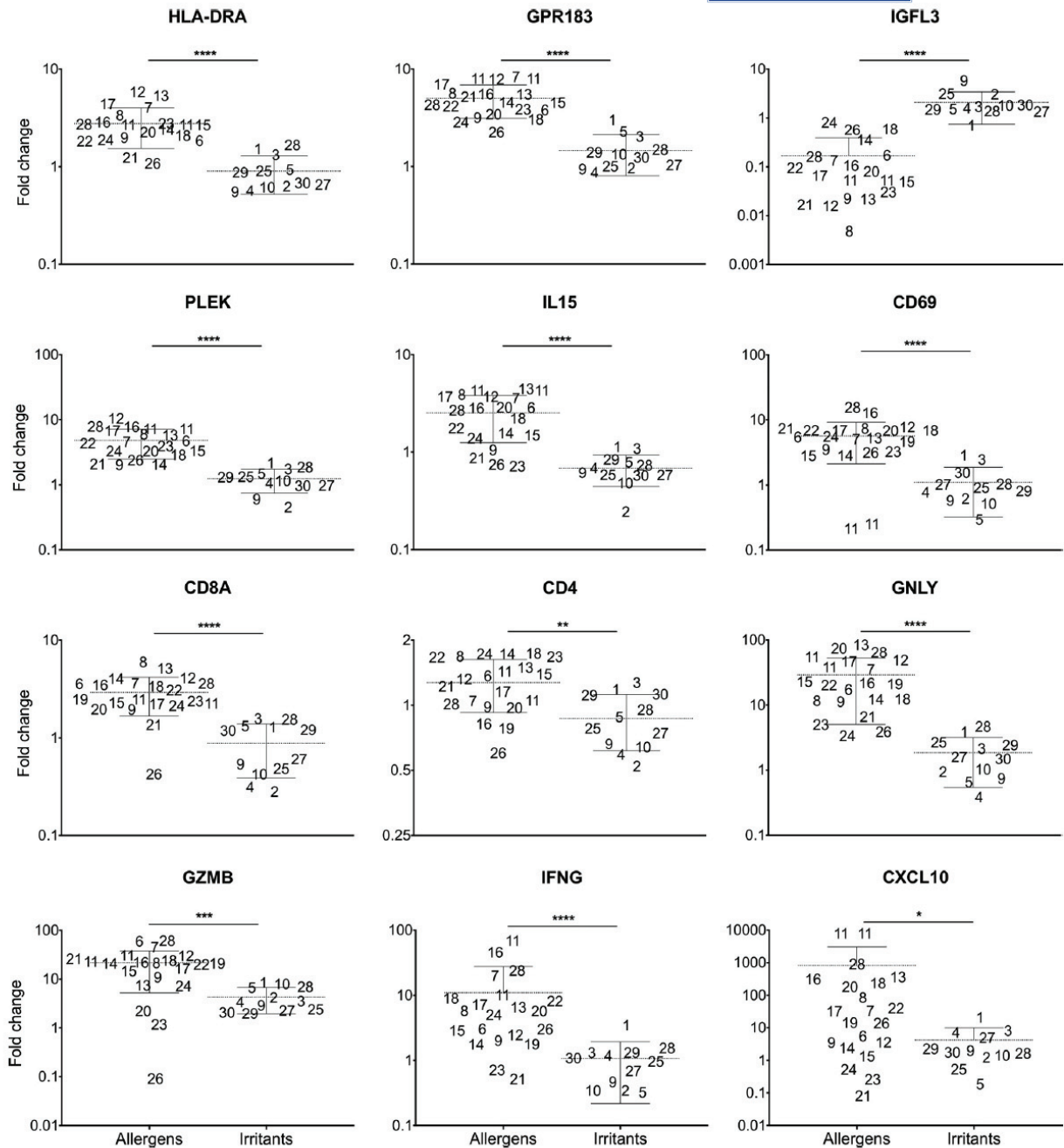


FIGURE 6 Validation of a small set of segregating biomarkers by qRT-PCR. Gene expression of HLA-DRA, GPR183, IGFL3, PLEK, IL15, CD69, CD8A, CD4, GZMB, GNLY, IFNG, and CXCL10 mRNA transcripts in allergen and irritant samples was analyzed by qRT-PCR. Results are expressed as fold changes versus control skin. Patient numbers are reported above each sample. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$, **** $P < .0001$; Mann-Whitney U test

(Tables S1 and S2). In contrast, we detected relatively few GO terms related to "inflammatory pathways", which is surprising because SLS and, more commonly, cantharidin induced strong, and even bullous, reactions in some patients (Table 1). This finding may be explained by the long-time interval before biopsy collection (72 h post application). In the hours following exposure, irritants

trigger keratinocyte release of many cytokines (IL-1 β , IL-6, or TNF- α), chemokines (IL-8/CXCL8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL17, and CCL20), and arachidonic acid derivatives (such as prostaglandin E₂).^{11,12,33,41} At 72 h, the molecular inflammation would be tightly regulated. Nevertheless, we detected upregulation of several DEGs, such as IL-36G, IL-8/CXCL8, CCL2, CCL17, CCL18, MIF, and

diverse HMGB or S100 proteins. All these mediators have been reported to exert crucial roles by stimulating leukocyte recruitment and cytokine production by keratinocytes,⁴²⁻⁴⁵ suggesting that they participate actively in late irritant inflammation. Of note, few cantharidin samples (patients 1, 4, 5) also showed marks of allergen signature. It will be interesting to determine whether it is the result of bystander recruitment and activation of cytotoxic T cells by the inflammatory environment and cytokine signaling, as reported upon microbial infection.^{46,47}

4.3 | The predictive value of molecular signatures to improve the diagnosis of ACD

Beyond gene profiling of allergic and irritant reactions, another objective of this work was to identify a set of predictive biomarkers susceptible to serve as future platforms to improve clinical diagnosis. Using random forest classifier methodology, we identified and validated several classifier models, including 1–5 different genes of the major DEGs of the core transcriptomes, as minimal biomarkers that distinguish allergic and irritant reactions in human skin. The performance of these classifiers confirms a recent study conducted by Fortino et al. on similar material (including 89 biopsies collected from positive and negative patch-test reactions to 4 different allergens and 2 irritants), and which identified 22 potential biomarkers (CD47, BATF, FASLG, RGS16, SYNPO, SELE, PTPN7, WARS, PRC1, EXO1, RRM2, PBK, RAD54L, KIFC1, SPC25, PKMYT, HISTH1A, TPX2, DLGAP5, TPX2, CH25H, and IL37). Interestingly, if none of the biomarkers identified by Fortino et al. were present among our top 50 of the most discriminant genes, possibly due to key differences in experimental setups, most of them were significantly upregulated in the two sample groups (Tables S1–S3 and data not shown). This illustrates that multiple biomarker combinations can be used to discriminate between the two types of skin inflammation.

Nevertheless, whatever the final combination chosen, it will be crucial to demonstrate in a future study that it is sufficiently efficient in detecting false positive patch-test reactions, which are triggered by the proinflammatory properties of allergens in nonallergic individuals, and which remains the main problem encountered in the clinic. Indeed, all the analyses performed in this study were based on the assumption that none of the collected data for chemical allergens were the results of false-positive reactions. Thus, complementary trials are needed to determine whether biomarkers identified in this study are robust and sensitive enough to detect patients with clinically relevant ACD.

Finally, it will also be important to determine if the same gene signatures characterize both 72-h patch test reactions and clinical lesions of active eczema. The detection of relevant allergy biomarkers in contact dermatitis lesions could help prevent patients from being sent for unnecessary allergology workup. Currently, it is estimated that only one in five patients consulting for ACD is truly allergic,⁴⁸ with the majority of these patients having ICD.

In conclusion, our study characterized the main features of allergic and irritant reactions to chemicals. We have identified several biomarkers that clearly distinguish the two types of inflammation. Our findings provide the basis for the development of new approaches to refine and improve the diagnosis of ACD.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank C.F. Gaudefroy, N. Gilmour, M. Elbaz, F. Boislève, G. Ellis, and B. Smith for their support in the realization of this work in the frame of the MODAL project, and Marielle Romet and Emma Pilling (Santé Active Edition-Synergy Pharm) who provided medical writing assistance. This study was supported by different institutional (Institut de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)) and academic (Société Française d'Allergologie) grants.

CONFLICT OF INTEREST

All authors are public employees from the INSERM, universities, and French or Belgian hospitals. AN reports other from Pfizer, during the conduct of the study; grants, personal fees and non-financial support from Sanofi Regeeron, personal fees and non-financial support from Novartis, grants and personal fees from Pfizer, personal fees and non-financial support from Abbvie, grants and non-financial support from Pierre Fabre, personal fees and non-financial support from Medac, personal fees and non-financial support from Lilly, personal fees and non-financial support from Leo Pharma, grants, personal fees and non-financial support from Incyte, personal fees and non-financial support from Janssen, personal fees from Celgene, outside the submitted work. SDB, JN, PEJ, and LB report grants from Association SIV, during the conduct of the study. MAL, AR, VL, AM, AC, MP, FH, MCLB, PP, CD, AH, MB, JFN, and MV have nothing to disclose.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MAL, AN, VL, AM, and AC carried out the experiments and analyzed the data. MP, SDB, JN, PEJ, and LB provide support for bioinformatic/biostatistics analysis. MAL, AN, AR, FH, MCFL, PP, CD, AH, and MB managed the clinical study, performed sample collections, obtained consents, and/or participated in the interpretation of the data. JFN and MV designed the experiments and supervised this study. JFN and MV wrote the manuscript. All authors approved the final submitted and published version.

ORCID

Marine-Alexia Lefevre  <https://orcid.org/0000-0003-1257-2578>

Audrey Nosbaum  <https://orcid.org/0000-0003-2281-9052>

Aurore Rozieres  <https://orcid.org/0000-0003-0293-4002>

Vanina Lenief  <https://orcid.org/0000-0002-7561-6235>

Amandine Mosnier  <https://orcid.org/0000-0002-7300-8359>

Angèle Cortial  <https://orcid.org/0000-0001-5134-5680>

Margaux Prioux  <https://orcid.org/0000-0002-9750-9828>

Simon De Bernard  <https://orcid.org/0000-0002-3390-0924>

Julien Nourikyan  <https://orcid.org/0000-0001-9943-1326>

Pierre-Emmanuel Jouve  <https://orcid.org/0000-0002-3076-8841>

Laurent Buffat  <https://orcid.org/0000-0002-8906-1445>
 Florence Hacard  <https://orcid.org/0000-0001-8300-1233>
 Pauline Pralong  <https://orcid.org/0000-0001-5661-5993>
 Anne Herman  <https://orcid.org/0000-0001-7000-1672>
 Marie Baeck  <https://orcid.org/0000-0003-0499-7939>
 Jean-François Nicolas  <https://orcid.org/0000-0003-4204-803X>
 Marc Vocanson  <https://orcid.org/0000-0002-0181-8862>

REFERENCES

- Svensson A, Ofenloch RF, Bruze M, et al. Prevalence of skin disease in a population-based sample of adults from five European countries. *Br J Dermatol*. 2018;178:1111-1118.
- Diepgen TL, Ofenloch RF, Bruze M, et al. Prevalence of contact allergy in the general population in different European regions. *Br J Dermatol*. 2016;174:319-329.
- Ring J. Occupational skin disease - a major health problem in Europe. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017;31:919-920.
- Sartorelli P, Kezic S, Larese Filon F, John SM. Prevention of occupational dermatitis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011;24:89S-93S.
- Chew A-L, Maibach HI. Occupational issues of irritant contact dermatitis. *Int Arch Occup Environ Health*. 2003;76:339-346.
- Peiser M, Tralau T, Heidler J, et al. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69:763-781.
- Carøe TK, Ebbenhøj N, Agner T. A survey of exposures related to recognized occupational contact dermatitis in Denmark in 2010. *Contact Derm*. 2014;70:56-62.
- Angelova-Fischer I. Irritants and skin barrier function. *Curr Probl Dermatol*. 2016;49:80-89.
- Eskes C, Detappe V, Koëter H, et al. Regulatory assessment of in vitro skin corrosion and irritation data within the European framework: workshop recommendations. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2012;62:393-403. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.10.015>
- Patel S. Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): the derivatives and triggers of inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2018;18:63.
- Clemmensen A, Andersen KE, Clemmensen O, et al. Genome-wide expression analysis of human in vivo irritated epidermis: differential profiles induced by sodium lauryl sulfate and nonanoic acid. *J Invest Dermatol*. 2010;130:2201-2210.
- Fulzele SV, Babu RJ, Ahaghotu E, Singh M. Estimation of proinflammatory biomarkers of skin irritation by dermal microdialysis following exposure with irritant chemicals. *Toxicology*. 2007;237:77-88.
- Calhoun KN, Lockett-Chastain LR, Frempah B, Gallucci RM. Associations between immune phenotype and inflammation in murine models of irritant contact dermatitis. *Toxicol Sci*. 2019;168:179-189.
- Uter W, Werfel T, White IR, Johansen JD. Contact allergy: a review of current problems from a clinical perspective. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15:1108. <https://doi.org/10.3390/ijerph15061108>
- Vocanson M, Hennino A, Rozières A, Poyet G, Nicolas J-F. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*. 2009;64:1699-1714.
- Esser PR, Martin SF. Pathomechanisms of contact sensitization. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017;17:83.
- Nosbaum A, Vocanson M, Rozières A, Hennino A, Nicolas J-F. Allergic and irritant contact dermatitis. *Eur J Dermatol*. 2009;19:325-332.
- Leonard A, Guttman-Yassky E. The unique molecular signatures of contact dermatitis and implications for treatment. *Clin Rev Allergy Immunol Published Online First*. 2018;56:1-8. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8685-0>
- Johansen JD, Aalto-Korte K, Agner T, et al. European Society of Contact Dermatitis guideline for diagnostic patch testing - recommendations on best practice. *Contact Derm*. 2015;73:195-221.
- Dittmar D, Schuttelaar MLA. Contact sensitization to hydroperoxides of limonene and linalool: results of consecutive patch testing and clinical relevance. *Contact Derm*. 2019;80:101-109.
- Bennike NH, Palangi L, Christensson JB, et al. Allergic contact dermatitis caused by hydroperoxides of limonene and dose-response relationship-A repeated open application test (ROAT) study. *Contact Derm*. 2019;80:208-216.
- Dittmar D, Ofenloch RF, Schuttelaar MLA. Persistence of contact allergy: a retrospective analysis. *Contact Derm*. 2018;78:143-150.
- Frings VG, Böer-Auer A, Breuer K. Histomorphology and immunophenotype of eczematous skin lesions revisited-skin biopsies are not reliable in differentiating allergic contact dermatitis, irritant contact dermatitis, and atopic dermatitis. *Am J Dermatopathol*. 2018;40:7-16.
- Pedersen MB, Skov L, Menné T, Johansen JD, Olsen J. Gene expression time course in the human skin during elicitation of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2007;127:2585-2595.
- Dhingra N, Shemer A, Correa da Rosa J, et al. Molecular profiling of contact dermatitis skin identifies allergen-dependent differences in immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:362-372.
- Inkeles MS, Scumpia PO, Swindell WR, et al. Comparison of molecular signatures from multiple skin diseases identifies mechanisms of immunopathogenesis. *J Invest Dermatol*. 2015;135:151-159.
- Wisgrill L, Werner P, Jalonen E, et al. Integrative transcriptome analysis deciphers mechanisms of nickel contact dermatitis. *Allergy*. 2021;76:804-815. Published Online First: 24 July 2020. <https://doi.org/10.1111/all.14519>
- Fortino V, Wisgrill L, Werner P, et al. Machine-learning-driven biomarker discovery for the discrimination between allergic and irritant contact dermatitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117:33474-33485.
- Quaranta M, Knapp B, Garzorz N, et al. Intra-individual genome expression analysis reveals a specific molecular signature of psoriasis and eczema. *Sci Transl Med*. 2014;6:244ra90.
- Breiman L. Random forests. *Mach Learn*. 2001;45:5-32.
- Meller S, Lauerma AI, Kopp FM, et al. Chemokine responses distinguish chemical-induced allergic from irritant skin inflammation: memory T cells make the difference. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:1470-1480.
- Ku H-O, Jeong S-H, Kang H-G, et al. Gene expression profiles and pathways in skin inflammation induced by three different sensitizers and an irritant. *Toxicol Lett*. 2009;190:231-237.
- Kamsteeg M, Jansen P, Van Vlijmen-Willems I, et al. Molecular diagnostics of psoriasis, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis and irritant contact dermatitis. *Br J Dermatol*. 2010;162:568-578.
- Kehren J, Desvignes C, Krasteva M, et al. Cytotoxicity is mandatory for CD8+ T cell-mediated contact hypersensitivity. *J Exp Med*. 1999;189:779-786.
- Vocanson M, Hennino A, Cluzel-Tailhardat M, et al. CD8+ T cells are effector cells of contact dermatitis to common skin allergens in mice. *J Invest Dermatol*. 2006;126:815-820.
- Yawalkar N, Hunger RE, Buri C, et al. A comparative study of the expression of cytotoxic proteins in allergic contact dermatitis and psoriasis: spongiotic skin lesions in allergic contact dermatitis are highly infiltrated by T cells expressing perforin and granzyme B. *Am J Pathol*. 2001;158:803-808.
- Eyerich K, Böckelmann R, Pommer AJ, et al. Comparative in situ topoproteome analysis reveals differences in patch test-induced eczema: cytotoxicity-dominated nickel versus pleiotrope pollen reaction. *Exp Dermatol*. 2010;19:511-517.
- Gamradt P, Laoubi L, Nosbaum A, et al. Inhibitory checkpoint receptors control CD8+ resident memory T cells to prevent skin allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143:2147-2157.e9.

39. Luckett-Chastain LR, Gipson JR, Gillaspay AF, Gallucci RM. Transcriptional profiling of irritant contact dermatitis (ICD) in a mouse model identifies specific patterns of gene expression and immune-regulation. *Toxicology*. 2018;410:1-9.
40. Novak-Bilić G, Vučić M, Japundžić I, Meštrović-Štefekov J, Stanić-Duktaj S, Lugović-Mihić L. Irritant and allergic contact dermatitis - skin lesion characteristics. *Acta Clin Croat*. 2018;57:713-720.
41. Koppes SA, Ljubojevic Hadzavdic S, Jakasa I, et al. Stratum corneum profiles of inflammatory mediators in patch test reactions to common contact allergens and sodium lauryl sulfate. *Br J Dermatol*. 2017;176:1533-1540.
42. Corsini E, Galli CL. Cytokines and irritant contact dermatitis. *Toxicol Lett*. 1998;102-103:277-282.
43. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10:593-619.
44. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol*. 2017;14:43-64.
45. Swindell WR, Beamer MA, Sarkar MK, et al. RNA-Seq analysis of IL-1B and IL-36 responses in epidermal keratinocytes identifies a shared MyD88-dependent gene signature. *Front Immunol*. 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00080>
46. Soudja SM, Ruiz AL, Marie JC, Lauvau G. Inflammatory monocytes activate memory CD8(+) T and innate NK lymphocytes independent of cognate antigen during microbial pathogen invasion. *Immunity*. 2012;37:549-562.
47. Raué H-P, Beadling C, Haun J, Slifka MK. Cytokine-mediated programmed proliferation of virus-specific CD8+ memory T cells. *Immunity*. 2013;38:131-139.
48. Occupational SD, Dermatitis C. Occupational contact dermatitis. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2008;4:59-65.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Lefevre M-A, Nosbaum A, Rozieres A, et al. Unique molecular signatures typify skin inflammation induced by chemical allergens and irritants. *Allergy*. 2021;00:1-16. <https://doi.org/10.1111/all.14989>

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplemental Materials and Methods

Chemicals

Chemical allergens used for patch testing were: nickel sulfate hexahydrate (5% in petrolatum), methylisothiazolinone (0.2% in distilled water) and/or linalool hydroperoxide (1% in petrolatum), all purchased from Chemotechnique Diagnostics (Grasse, France); as well as amoxicillin (2% in NaCl; Panpharma, Luitré, France), piperacillin/tazobactam (4%/0.5% in distilled water; Panpharma, Luitré, France) and/or acetazolamide (10% in distilled water; Cooper, Melun, France). Irritant reactions were induced using patches with sodium lauryl sulfate (0.5% in water; Sigma, St Quentin Fallavier, France), nonanoic acid (90% in isopropanol; Sigma, St Quentin Fallavier, France) and/or cantharidin (0.7% in acetone, collodion, castor oil and camphor; Dormer laboratories, Totonto, Canada). Vehicle (petrolatum and isopropanol) patches were prepared as controls.

Patch test procedure

Patch testing was performed using IQ Ultra chambers (Chemotechnique Diagnostics, Grasse, France). Skin reactions were scored at 72 hours in accordance with International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) criteria and European Society of Contact Dermatitis (ESCD) guidance (1): - negative reaction; +/- doubtful reaction (erythema only, no infiltration); 1+ weak positive reaction (redness, induration, and possibly papules); 2+ positive reaction (erythema, induration, papules, and vesicles); 3+ strong positive reaction (intense erythema, induration, and coalescing vesicles).

Gene arrays

Affymetrix PrimeView Human Gene Expression arrays (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA) were used for the gene array study. They allowed the analysis of more than 36000 transcripts, including approximately 22 000 genes and unigenes.

Sample preparation for the array hybridization was carried out as described in the Affymetrix GeneChip 3' IVT Express Kit user manual. In brief, total RNA was extracted from skin biopsies using the Qiagen RNeasy Mini Kit (Courtaboeuf, France) and contaminating DNA was removed using the DNA-FreeTM DNA Removal kit (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The RNA was then reverse-transcribed into double-stranded copy DNA (cDNA), and then underwent *in vitro* transcription to generate biotin-labeled amplified RNA (aRNA). Purified aRNA was hybridized to the Affymetrix GeneChip Human PrimeView arrays for 16 h at 45° C in a GeneChip hybridization oven. Hybridized arrays were washed and stained in an Affymetrix Fluidics Station FS450, and the fluorescent signals were measured with an Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G. Fluidics and scan functions were controlled by the Affymetrix GeneChip Command Console v4.1.3 software.

Bioinformatics and statistical analysis of gene array data

Quality control of the gene arrays was carried out using standard QC metrics and R package quality control. Data were preprocessed (background correction and normalization) by applying (i) function *backgroundCorrect* from the limma package on the perfect match (PM) signals, (ii) the variance stabilizing transformation algorithm (function *justvs* from the vsn package (2)), and (iii) a quantile normalization (function *normalize* from the affy package with parameter *method*="quantiles").

To filter probe sets, they were marked as informative or noninformative based on the result of the I/NI method (3). Noninformative probe sets were excluded from unsupervised analyses. All sets were included when the statistical models were applied, but only the informative sets were considered when correcting for multiple testing.

Single values for the probe signals for each probe set of each sample were obtained using the summarization step of the Robust Multichip Average (RMA (4)) approach (function *rmaPLM* from the affyPLM package, with parameters *background*=FALSE and *normalize*=FALSE). *rmaPLM* also returned standard error estimates for each estimated expression level: these were used to incorporate weight inputs into the linear regression models.

Expression values were modeled using different mixed linear regression models, with the group of chemicals or the type of molecules as fixed factor and a random effect for each patient. Mixed linear regression models were applied using function *lme* from the nlme package (5). Comparisons of interest were then analyzed through statistical contrasts, using the emmeans package (6). P values from paired t-tests were adjusted for multiple hypotheses using the Benjamini and Hochberg false discovery rate (FDR) controlling procedure (function *p.adjust* from package stats with parameter *method*="BH").

Multiple analyses were performed on the gene array data to determine whether global gene expression levels differed between the different groups (allergens, irritants, controls) of samples. Comparisons were also performed to identify genes or pathways that were specifically and differentially expressed between all the samples from the allergen, irritant and/or control groups, or between the samples from each respective molecule (when the number of samples for a specific molecule was < 2, they were excluded from the analysis).

In **Fig.1**, the PCA of differential expression was performed with probe set fold changes (F_c) neither centered nor scaled, using function *precomp* from package stats.

In **Fig.2** and **Tab.S1&2**, to determine the effect of each group of molecules (allergens or irritants), the statistical model used was $signal \sim -1 + Condition$ where *Condition* represents the group of molecules. To account for the paired design, an additional random effect was included ($\sim 1 | Donor$). The model estimated the average gene expression level in each condition of the experimental design after correction for the donor effect. The statistical contrasts applied allowed analysis of the following comparisons of interest: (Allergen - Control), (Irritant - Control), and (Irritant - Allergen). Genes were then considered as follows:

- positively correlated (\sim on the $Y = X$ line) if they were significant (adjusted $P < 0.05$) and displayed $F_c > 1.41$ or $< 1/1.41$ for both effects.
- anti-correlated (\sim on the $Y = -X$ line) if they were significant (adjusted $P < 0.05$) for both effects and displayed a $F_c > 1.41$ for one effect and $< 1/1.41$ for the other effect (or vice-versa).
- specific to the X-axis ($\log_2(Y) \simeq 0$) if they had a $F_c > 1.41$ or $< 1/1.41$ for the effect represented on the X axis and were significant (adjusted $P < 0.05$) for this effect but did not fulfill one of these criteria for the other effect.
- specific to the Y-axis ($\log_2(X) \simeq 0$) if they had a $F_c > 1.41$ or $< 1/1.41$ for the effect represented on the Y axis and were significant (adjusted $P < 0.05$) for this effect but did not fulfill one of these criteria for the other effect.

In **Fig.3** and **Tab.S3**, groups of genes identified by previous analysis were included in an input list for the MGSA algorithm (using the `mgsa` function from the `mgsa` package (7)). The model assumes that some gene sets are active and that all gene members of active sets are themselves active. Fitting the model amounts to inferring the probability of every set to be active given the input list (i.e., scores reported for each gene set are not P values and the closer to 1, the better). The approach was applied to Gene Ontology terms (from the Biological Process tree). Only sets with at least 10 genes and a maximum of 1000 genes were considered.

In **Fig.4**, a heatmap for gene expression was used to illustrate how the expression of a set of differentially expressed genes involved in the allergen response differed from that involved in the irritant response. The most notable criteria for gene selection were a $F_c > 2$ and a $FDR < 10^{-6}$. Gene clustering was performed using the complete agglomerative method, passing the Euclidean distance between uncentered and scaled probe set signals to function `hclust` from package `stats`. To compensate for donor-induced variability, the gene expression level of the control sample of each donor was subtracted from that of the corresponding treated sample(s) of the same donor.

In **Fig.5**, to determine the correlation between gene expression levels and the clinical response, the average expression level ($\log_2 F_c$) of selected genes pertaining to the allergen or irritant core signatures were calculated for each sample after correction for the donor effect.

In Fig.S1, linear regression model was used to study the relationship between the expression of individual gene associated to the allergen and irritant core signatures and the intensity of the patch-test reactions.

qRT-PCR

Total RNA samples were also used for quantitative RT-PCR analysis. qRT-PCR investigations were performed using a StepOnePlus PCR system (ThermoFisher, Villebon-sur-Yvette, France), and primers from Qiagen (Courtaboeuf, France) for CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL20, CD69 and GNLY: QuantiTect Primer Assays; or produced by Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France) for CD8a, CD4, IFNG, GZMB, Actin, GAPDH – designed using the publicly Universal Probe Library Assay Design

Center (https://lifescience.roche.com/en_fr/brands/universal-probe-library.html#assaydesign-center). All the primers used are listed in **Tab.S4**.

Analysis of qRT-PCR data

Expression values for each mRNA transcript were normalized to values obtained for housekeeping genes (actin and GAPDH), and results from patch-tested samples were presented as the Fc in the test samples versus that in control skin.

Statistical analysis of qRT-PCR data

In **Fig.6**, the mRNA expression data were analyzed using the Kolmogorov–Smirnov test to determine if they followed a Gaussian distribution. If yes, statistical significance was determined using the two-tailed Student’s t test. When the values did not assume a Gaussian distribution, the Mann–Whitney test was used. $P < 0.05$ was considered as statistically significant: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

Biomarker discovery

A supervised machine-learning–based approach was used to identify biomarkers, whose gene expression profile can correctly predict/classify whether a given sample is an « allergen » or an « irritant » sample.

First, the Boruta algorithm (8) and the Random Forest classification algorithm (9) (using the permutation based importance measure of Random Forest) were successively run to select the genes, or the combination of genes, susceptible to provide the best classifications. At final, 15 biomarkers were selected among 694 relevant probe set genes, which represented 4943 different biomarker combinations including 1 to 5 genes.

We next employed a standard Random Forest-based classifier approach to assess the classification performances of each biomarker combination (referred to as “classifier”). To this end, classifiers were tested by repeated (50 times) 5-fold cross-validations in order to simulate different training sets and next evaluated these classifiers on unseen data. The classification performances were evaluated by creating a confusion matrix from the different classification tests (a confusion matrix summarizes the counts of true positive, true negative, false positive and false negative classifications in predicted versus actual classes (here “allergens” and irritant”). Several classification metrics were derived from the confusion matrix, such as the overall accuracy, as well as four class metrics: precision, recall, F1-score, and the area under curve (AUC) value of the ROC (Receiver Operator Characteristic) curve. The AUC of the ROC curve was calculated to account for variations in the decision threshold, that is the value at which the classifier considered that a prediction belongs to a specific class.

Tab.2 reports the list of the 30 best classifiers (selected on overall accuracy) calculated from the 50 runs of 5-fold cross-validation.

The performance of the trained classifiers were also tested on external datasets, derived from one previously published omics study, including 11 allergen and 6 irritant independent samples (data available from EBI ArrayExpress under accession no. E-MTAB-8945), as well as on unpublished study, including 8 allergen independent samples (data available from Gene Expression Omnibus under accession no. GSE169573). Results are reported in **Tab.3** and **Fig.S2**.

In **Fig.S2**, the ROC curve was created by plotting the sensitivity (here, Recall Allergen) against the specificity (here Recall Irritant) of HLA-DRA / IGFL3 classifier, at various threshold settings.

Data Availability

Expression microarray data have been deposited in Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) under accession no. GSE168735.

Supplemental references

1. Johansen JD, Aalto-Korte K, Agner T, Andersen KE, Bircher A, Bruze M et al. European Society of Contact Dermatitis guideline for diagnostic patch testing - recommendations on best practice. *Contact Derm* 2015;**73**:195–221.
2. Huber W, von Heydebreck A, Sültmann H, Poustka A, Vingron M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* 2002;**18 Suppl 1**:S96-104.
3. Talloen W, Clevert D-A, Hochreiter S, Amaratunga D, Bijmans L, Kass S et al. I/NI-calls for the exclusion of non-informative genes: a highly effective filtering tool for microarray data. *Bioinformatics* 2007;**23**:2897–2902.
4. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003;**4**:249–264.
5. Pinheiro JC, Bates DJ, DebRoy S, Sakar D. *The Nlme Package: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models, R Version 3*. 2012
6. Lenth RV. Least-Squares Means: The R Package **lsmeans**. *J Stat Soft* 2016;**69**. doi:10.18637/jss.v069.i01
7. Bauer S, Gagneur J, Robinson PN. GOing Bayesian: model-based gene set analysis of genome-scale data. *Nucleic Acids Res* 2010;**38**:3523–3532.
8. Kursa MB, Rudnicki WR. Feature Selection with the Boruta Package. *Journal of Statistical Software* 2010;**36**:1–13.
9. Breiman L. Random Forests. *Machine Learning* 2001;**45**:5–32.

Supplemental tables

Table S1: Differentially expressed genes in the allergen group.

| | Fc | Adj- p | Symbol | Description |
|-----------|-----------|---------------|---------------|--|
| 1 | x 16.1 | 5.04e-14 | SERPINB4 | serpin family B member 4 |
| 2 | x 13.6 | 8.38e-20 | MMP12 | matrix metalloproteinase 12 |
| 3 | x 9.56 | 1.18e-12 | MMP1 | matrix metalloproteinase 1 |
| 4 | x 8.97 | 2.28e-19 | GZMB | granzyme B |
| 5 | x 8.09 | 3.51e-10 | CXCL10 | C-X-C motif chemokine ligand 10 |
| 6 | x 8.08 | 8.28e-22 | SELE | selectin E |
| 7 | / 8.04 | 1.92e-14 | LCE5A | late cornified envelope 5A |
| 8 | x 7.9 | 2.6e-19 | SELL | selectin L |
| 9 | x 7.81 | 3.12e-13 | KRT6C | keratin 6C |
| 10 | x 7.8 | 1.09e-12 | S100A7A | S100 calcium-binding protein A7A |
| 11 | x 7.6 | 2.4e-11 | CXCL9 | C-X-C motif chemokine ligand 9 |
| 12 | x 6.9 | 5.43e-20 | CCL19 | C-C motif chemokine ligand 19 |
| 13 | x 6.74 | 5.89e-12 | S100A9 | S100 calcium binding protein A9 |
| 14 | x 6.69 | 5.3e-21 | CD69 | CD69 molecule |
| 15 | x 6.38 | 6.81e-20 | LTB | lymphotoxin beta |
| 16 | x 5.94 | 2.6e-15 | CCL18 | C-C motif chemokine ligand 18 |
| 17 | x 5.64 | 4.92e-22 | CD3D | CD3d molecule |
| 18 | x 5.62 | 1.61e-11 | KRT6A | keratin 6A |
| 19 | x 5.6 | 5.91e-15 | LTF | lactotransferrin |
| 20 | x 5.57 | 1.24e-17 | PLAC8 | placenta specific 8 |
| 21 | / 5.14 | 1.47e-13 | IL37 | Interleukin-37 |
| 22 | x 4.94 | 1.68e-08 | PI3 | peptidase inhibitor 3 |
| 23 | x 4.93 | 6.11e-20 | CD3E | CD3e molecule |
| 24 | x 4.9 | 5.91e-10 | CXCL11 | C-X-C motif chemokine ligand 11 |
| 25 | x 4.88 | 1.65e-22 | SRGN | serglycin |
| 26 | x 4.84 | 4.96e-17 | PLA2G2A | phospholipase A2 group IIA |
| 27 | x 4.79 | 3.11e-24 | SAMSN1 | SAM domain, SH3 domain and nuclear localization |
| 28 | x 4.78 | 8.03e-25 | GPR | 1880 G protein-coupled receptor 183 |
| 29 | x 4.68 | 5.47e-21 | CD48 | CD48 molecule |
| 30 | x 4.68 | 4.31e-09 | SAA2 | serum amyloid A2 |
| 31 | x 4.67 | 7.64e-21 | RGS1 | regulator of G-protein signaling 1 |
| 32 | x 4.66 | 5.11e-17 | FCGR3A | Fc fragment of IgG receptor IIIa |
| 33 | / 4.66 | 2.4e-14 | KRT77 | keratin 77 |
| 34 | x 4.64 | 5.32e-18 | UBD | ubiquitin D |
| 35 | x 4.57 | 5.22e-16 | EPSTI1 | epithelial stromal interaction 1 |
| 36 | / 4.57 | 5.83e-16 | C5orf46 | chromosome 5 open reading frame 46 |
| 37 | x 4.49 | 2.54e-15 | FAM26F | family with sequence similarity 26 member F |
| 38 | / 4.4 | 9 1.52e-9 | LOR | loricrin |
| 39 | x 4.44 | 1.05e-11 | LCE3D | late cornified envelope 3D |
| 40 | / 4.41 | 8.5e-16 | CHP2 | calcineurin-like EF-hand protein 2 |
| 41 | x 4.26 | 1.46e-18 | CCR7 | C-C motif chemokine receptor 7 |
| 42 | / 4.23 | 2e-10 | FLG2 | filaggrin family member 2 |
| 43 | x 4.23 | 1.86e-10 | S100A8 | S100 calcium binding protein A8 |
| 44 | x 4.23 | 1.8e-19 | GPR171 | G protein-coupled receptor 171 |
| 45 | x 4.22 | 4.92e-22 | IFI30 | IFI30, lysosomal thiol reductase |
| 46 | x 4.22 | 5.6e-18 | TYMP | thymidine phosphorylase |
| 47 | x 4.19 | 5.43e-11 | S100A7A | S100 calcium binding protein A7A |
| 48 | x 4.19 | 1.59e-22 | CD53 | CD53 molecule |
| 49 | x 4.19 | 3.86e-23 | COTL1 | coactosin-like F-actin binding protein 1 |
| 50 | x 4.17 | 9.28e-21 | ADAM19 | ADAM metalloproteinase domain 19 |
| 51 | x 4.16 | 1.19e-13 | GBP5 | guanylate binding protein 5 |
| 52 | x 4.13 | 2.92e-20 | CXCR4 | C-X-C motif chemokine receptor 4 |
| 53 | x 4.12 | 4.33e-13 | AKR1B10P1 | aldo-keto reductase family 1 member B10 pseudogene 1 |
| 54 | x 4.11 | 2.1e-13 | GBP1 | guanylate binding protein 1 |

| | | | | |
|-----|--------|----------|-----------|--|
| 55 | x 4.09 | 4.92e-22 | PTPRC | protein tyrosine phosphatase, receptor type C |
| 56 | x 4.08 | 9.81e-22 | CD52 | CD52 molecule |
| 57 | x 4.07 | 7.3e-20 | CD2 | CD2 molecule |
| 58 | / 4 | 3.69e-11 | FLG | filaggrin |
| 59 | / 3.98 | 2.54e-10 | LCE2B | late cornified envelope 2B |
| 60 | x 3.97 | 6.89e-18 | CCL4 | C-C motif chemokine ligand 4 |
| 61 | x 3.87 | 5.71e-07 | SPRR2A | small proline-rich protein 2A |
| 62 | x 3.86 | 2e-13 | ISG20 | interferon stimulated exonuclease gene 20 |
| 63 | x 3.84 | 1.36e-21 | C1orf162 | chromosome 1 open reading frame 162 |
| 64 | x 3.81 | 2.59e-20 | JAK3 | Janus kinase 3 |
| 65 | x 3.8 | 1.48e-13 | TNC | tenascin C |
| 66 | x 3.78 | 4.85e-18 | CLEC4A | C-type lectin domain family 4 member A |
| 67 | x 3.76 | 1.42e-18 | SERPINA1 | serpin family A member 1 |
| 68 | x 3.76 | 1.38e-18 | GZMA | granzyme A |
| 69 | / 3.74 | 4.48e-10 | C1orf68 | chromosome 1 open reading frame 68 |
| 70 | x 3.74 | 3.33e-10 | SERPINB3 | serpin family B member 3 |
| 71 | x 3.72 | 9.59e-14 | HAS3 | hyaluronan synthase 3 |
| 72 | x 3.72 | 1.73e-16 | FPR1 | formyl peptide receptor 1 |
| 73 | x 3.67 | 4.38e-19 | TRAF3IP3 | TRAF3 interacting protein 3 |
| 74 | x 3.66 | 2.92e-16 | MMP9 | matrix metalloproteinase 9 |
| 75 | x 3.62 | 4.79e-16 | BCL2A1 | BCL2-related protein A1 |
| 76 | x 3.6 | 5.92e-19 | LGALS2 | galectin 2 |
| 77 | x 3.58 | 7.95e-21 | RAC2 | ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 |
| 78 | x 3.57 | 2.99e-18 | LYZ | lysozyme |
| 79 | / 3.57 | 1.91e-12 | ELMOD1 | ELMO domain containing 1 |
| 80 | x 3.54 | 4.97e-15 | GNLY | granulysin |
| 81 | x 3.53 | 2.7e-15 | CCL2 | C-C motif chemokine ligand 2 |
| 82 | x 3.53 | 5.49e-19 | P2RY8 | purinergic receptor P2Y8 |
| 83 | x 3.51 | 1.78e-20 | CLEC10A | C-type lectin domain containing 10A |
| 84 | x 3.51 | 3.08e-15 | LAMP3 | lysosomal associated membrane protein 3 |
| 85 | x 3.5 | 1.27e-10 | CCL8 | C-C motif chemokine ligand 8 |
| 86 | / 3.5 | 2.02e-10 | LCE1C | late cornified envelope 1C |
| 87 | x 3.5 | 4.8e-20 | TRAC | T-cell receptor alpha constant |
| 88 | / 3.49 | 3.05e-13 | KRT15 | keratin 15 |
| 89 | x 3.49 | 3.91e-19 | IL4I1 | Interleukin-4 induced 1 |
| 90 | / 3.48 | 2.79e-12 | TSPAN8 | tetraspanin 8 |
| 91 | / 3.48 | 2.17e-11 | SERPINA12 | serpin family A member 12 |
| 92 | x 3.48 | 8.27e-19 | CTLA4 | cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 |
| 93 | x 3.48 | 1.52e-16 | CH25H | cholesterol 25-hydroxylase |
| 94 | / 3.48 | 7.72e-10 | LCE2C | late cornified envelope 2C |
| 95 | x 3.47 | 7.52e-20 | FYB | FYN binding protein |
| 96 | / 3.45 | 8.02e-11 | DCT | dopachrome tautomerase |
| 97 | x 3.45 | 7.06e-15 | CD1B | CD1b molecule |
| 98 | / 3.44 | 1.88e-13 | CDHR1 | cadherin related family member 1 |
| 99 | x 3.43 | 1.23e-20 | LCP2 | lymphocyte cytosolic protein 2 |
| 100 | x 3.41 | 3.6e-11 | CMPK2 | cytidine/uridine monophosphate kinase 2 |
| 101 | x 3.39 | 5.05e-13 | ALOX15 | arachidonate 15-lipoxygenase |
| 102 | x 3.39 | 8.74e-18 | GZMK | granzyme K |
| 103 | x 3.37 | 3.02e-12 | CHI3L2 | chitinase 3-like 2 |
| 104 | x 3.36 | 2.29e-18 | LCK | LCK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase |
| 105 | x 3.36 | 2.18e-13 | CCL17 | C-C motif chemokine ligand 17 |
| 106 | x 3.35 | 7.14e-15 | TMPRSS4 | transmembrane protease, serine 4 |
| 107 | x 3.33 | 2.59e-20 | TRAT1 | T-cell receptor-associated transmembrane adaptator |
| 108 | x 3.33 | 6.71e-11 | FPR2 | formyl peptide receptor 2 |
| 109 | x 3.33 | 3.03e-09 | IDO1 | indoleamine 2,3-dioxygenase 1 |
| 110 | x 3.32 | 1.21e-17 | CORO1A | coronin 1A |
| 111 | x 3.32 | 7.05e-22 | CSF2RB | colony stimulating factor 2 receptor beta |
| 112 | / 3.3 | 2.08e-09 | LCE2D | late cornified envelope 2D |
| 113 | x 3.29 | 6.86e-19 | TESPA1 | thymocyte expressed, positive selection associated 1 |
| 114 | x 3.28 | 6e-17 | BIRC3 | baculoviral IAP repeat-containing 3 |

| | | | | |
|------------|--------|----------|-----------|---|
| 115 | x 3.27 | 6.05e-18 | LILRB2 | leukocyte immunoglobulin-like receptor B2 |
| 116 | x 3.26 | 2.26e-09 | ISG15 | ubiquitin-like modifier |
| 117 | x 3.25 | 2.07e-20 | KYNU | kynureninase |
| 118 | x 3.25 | 3.11e-24 | PLEK | pleckstrin |
| 119 | x 3.23 | 1.87e-11 | COL6A6 | collagen type VI alpha 6 chain |
| 120 | x 3.23 | 8.06e-18 | FCMR | Fc fragment of IgM receptor |
| 121 | x 3.23 | 4.22e-18 | IL7R 3575 | Interleukin-7 receptor |
| 122 | / 3.19 | 8.77e-11 | MSMB | microseminoprotein beta |
| 123 | x 3.19 | 7.28e-17 | TCF7 | transcription factor 7 |
| 124 | x 3.17 | 1.3e-13 | WARS | tryptophanyl-tRNA synthetase |
| 125 | x 3.17 | 1.61e-11 | CXCL1 | C-X-C motif chemokine ligand 1 |
| 126 | x 3.17 | 3.94e-18 | CD83 | CD83 molecule |
| 127 | x 3.16 | 3.5e-16 | SELL | selectin L |
| 128 | x 3.15 | 1.41e-09 | MX1 | MX dynamin-like GTPase 1 |
| 129 | x 3.15 | 8.5e-19 | TRBC1 | T-cell receptor beta constant 1 |
| 130 | / 3.13 | 1.05e-10 | KPRP | keratinocyte proline-rich protein |
| 131 | x 3.12 | 3.87e-18 | PLSCR1 | phospholipid scramblase 1 |
| 132 | x 3.12 | 6.32e-15 | SOD2 | superoxide dismutase 2 |
| 133 | / 3.12 | 5.52e-13 | AADACL2 | arylacetamide deacetylase-like 2 |
| 134 | x 3.12 | 1.88e-21 | LCP1 | lymphocyte cytosolic protein 1 |
| 135 | x 3.12 | 2.36e-18 | CTSC | cathepsin C |
| 136 | x 3.11 | 2.27e-21 | ITGB2 | integrin subunit beta 2 |
| 137 | x 3.1 | 3.55e-16 | PVRIG | poliovirus receptor-related immunoglobulin |
| 138 | x 3.1 | 2.29e-20 | KLRB1 | killer cell lectin-like receptor B1 |
| 139 | / 3.1 | 2.42e-12 | WISP2 | WNT1-inducible signaling pathway protein 2 |
| 140 | x 3.1 | 8.17e-20 | HCLS1 | hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1 |

Average expression levels of each gene from the allergen samples were compared to controls and expressed as the mean fold change (Fc). The Fc criteria were set at > 1.41 or $< 1/1.41$ and the false discovery rate (FDR) at < 0.05 . The statistical value of differences in expression levels was also calculated and expressed as an adjusted P value (adj-p).

The 140 highest differentially expressed genes are shown.

Gene symbols and gene descriptions are also indicated.

Table S2: Differentially expressed genes in the irritant group.

| | Fc | Adj- p | Symbol | Description |
|-----------|-----------|---------------|---------------|--|
| 1 | / 5.77 | 2.6e-08 | LCE5A | late cornified envelope 5A |
| 2 | x 5.49 | 1.7e-05 | ERPINB4 | serpin family B member 4 |
| 3 | x 5.03 | 8.67e-11 | RRM2 | ribonucleotide reductase regulatory subunit M2 |
| 4 | x 4.53 | 1.31e-10 | PCLAF | PCNA clamp-associated factor |
| 5 | x 4.51 | 6.67e-08 | SERPINB3 | serpin family B member 3 |
| 6 | x 4.45 | 2.72e-06 | S100A9 | S100 calcium binding protein A9 |
| 7 | / 4.28 | 2.51e-08 | IL37 | interleukin 37 |
| 8 | x 4.16 | 1.31e-10 | CCNB1 | cyclin B1 |
| 9 | x 4.06 | 5.19e-10 | KIF20A | kinesin family member 20A |
| 10 | x 3.86 | 4.85e-11 | CDKN3 | cyclin-dependent kinase inhibitor 3 |
| 11 | x 3.75 | 2.31e-11 | CKS2 1164 | CDC28 protein kinase regulatory subunit 2 |
| 12 | x 3.73 | 1e-09 | UBE2C | ubiquitin-conjugating enzyme E2 C |
| 13 | x 3.68 | 4.97e-10 | DLGAP5 9787 | DLG-associated protein 5 |
| 14 | x 3.62 | 1.02e-10 | TYMS 7298 | thymidylate synthetase |
| 15 | x 3.6 | 5.45e-09 | TOP2A 7153 | topoisomerase (DNA) II alpha |
| 16 | x 3.56 | 2.31e-11 | ZWINT | ZW10-interacting kinetochore protein |
| 17 | x 3.56 | 1.57e-10 | NCAPG | non-SMC condensin I complex subunit G |
| 18 | x 3.55 | 7.79e-11 | CEP55 | centrosomal protein 55 |
| 19 | x 3.48 | 3.73e-11 | TTK | TTK protein kinase |
| 20 | x 3.47 | 0.000318 | PI3 | peptidase inhibitor 3 |
| 21 | x 3.45 | 3.33e-10 | PTTG1 | pituitary tumor-transforming 1 |
| 22 | x 3.4 | 4.07e-06 | SPRR1A | small proline-rich protein 1A |
| 23 | x 3.39 | 1.44e-08 | S100A2 | S100 calcium-binding protein A2 |
| 24 | x 3.37 | 0.000374 | SPRR2A | small proline-rich protein 2A |
| 25 | / 3.36 | 6.82e-08 | FCGBP | Fc fragment of IgG-binding protein |
| 26 | x 3.35 | 4.8e-10 | CDK1 | cyclin dependent kinase 1 |
| 27 | x 3.34 | 2.05e-09 | ANLN | anillin actin-binding protein |
| 28 | x 3.33 | 4.66e-07 | SPRR1B | small proline-rich protein 1B |
| 29 | x 3.33 | 3.35e-06 | LCE3D | late cornified envelope 3D |
| 30 | x 3.31 | 9.05e-10 | ASPM | abnormal spindle microtubule assembly |
| 31 | x 3.25 | 6.58e-10 | PBK | PDZ-binding kinase |
| 32 | / 3.2 | 1.99e-07 | CD207 | CD207 molecule |
| 33 | x 3.19 | 5.97e-05 | KRT6A | keratin 6A |
| 34 | x 3.19 | 1.89e-10 | DEPDC1B | DEP domain-containing 1B |
| 35 | x 3.19 | 5.12e-10 | CCNB2 | cyclin B2 |
| 36 | / 3.17 | 9.37e-06 | C1orf68 | chromosome 1 open reading frame 68 |
| 37 | x 3.16 | 4.93e-10 | PRC1 9055 | protein regulator of cytokinesis 1 |
| 38 | x 3.15 | 0.000119 | KRT6C | keratin 6C |
| 39 | x 3.15 | 3.52e-09 | TOP2A | topoisomerase (DNA) II alpha |
| 40 | x 3.03 | 7.82e-10 | NDC80 | NDC80, kinetochore complex component |
| 41 | / 3.02 | 8e-07 | MSMB | microseminoprotein beta |
| 42 | x 3.02 | 5.19e-10 | SPC25 | SPC25, NDC80 kinetochore complex component |
| 43 | x 3 | 5.28e-09 | NUSAP1 | nucleolar and spindle-associated protein 1 |
| 44 | x 3 | 5.4e-07 | FGFBP1 | fibroblast growth factor-binding protein 1 |
| 45 | x 2.93 | 1e-09 | TPX2 | TPX2, microtubule nucleation factor |
| 46 | x 2.92 | 1.83e-09 | BUB1B | BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase |
| 47 | x 2.9 | 1.51e-06 | AKR1B10P1 | aldo-keto reductase family 1 member B10 pseudogene 1 |
| 48 | x 2.9 | 4.8e-10 | CCNA2 | cyclin A2 |
| 49 | x 2.88 | 1.59e-10 | TK1 | thymidine kinase 1 |
| 50 | x 2.87 | 5.66e-05 | S100A8 | S100 calcium-binding protein A8 |
| 51 | / 2.85 | 5.78e-05 | LCE2B | late cornified envelope 2B |
| 52 | / 2.84 | 2.31e-11 | UGT3A2 | UDP glycosyltransferase family 3 member A2 |
| 53 | x 2.81 | 0.00227 | SPRR2B | small proline-rich protein 2B |
| 54 | x 2.81 | 5.81e-10 | KIF23 | kinesin family member 23 |
| 55 | x 2.78 | 2.31e-11 | H2AFX | H2A histone family member X |

| | | | | |
|-----|--------|----------|-----------|--|
| 56 | x 2.78 | 6.24e-10 | BUB1 | BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase |
| 57 | x 2.76 | 1.26e-10 | CDCA5 | cell division cycle associated 5 |
| 58 | x 2.75 | 1.64e-09 | ESCO2 | establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 2 |
| 59 | x 2.74 | 1.46e-05 | SPP1 | secreted phosphoprotein 1 |
| 60 | x 2.72 | 2.31e-11 | GIN52 | GIN5 complex subunit 2 |
| 61 | x 2.72 | 1.61e-10 | AURKA | aurora kinase A |
| 62 | x 2.71 | 1.65e-10 | PCLAF | PCNA clamp associated factor |
| 63 | x 2.7 | 9.09e-10 | KNL1 | kinetochore scaffold 1 |
| 64 | x 2.69 | 5.73e-09 | APOBEC3B | apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3B |
| 65 | x 2.69 | 1.58e-11 | CDC6 | cell division cycle 6 |
| 66 | x 2.65 | 7.64e-10 | MAD2L1 | mitotic arrest deficient 2 like 1 |
| 67 | x 2.63 | 7.79e-11 | TRIP13 | thyroid hormone receptor interactor 13 |
| 68 | x 2.59 | 6.22e-10 | HMMR | hyaluronan mediated motility receptor |
| 69 | x 2.57 | 4.41e-10 | UBE2CP1 | ubiquitin conjugating enzyme E2 C pseudogene 1 |
| 70 | x 2.57 | 1.93e-06 | IGFL1 | IGF-like family member 1 |
| 71 | / 2.54 | 1.76e-05 | WIF1 | WNT inhibitory factor 1 |
| 72 | x 2.54 | 2.44e-10 | MND1 | meiotic nuclear divisions 1 |
| 73 | / 2.54 | 1.99e-07 | HSD11B1 | hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1 |
| 74 | / 2.51 | 3.16e-09 | LRP4 | LDL receptor-related protein 4 |
| 75 | x 2.5 | 7.79e-11 | UBE2T | ubiquitin-conjugating enzyme E2 T |
| 76 | x 2.5 | 3.16e-09 | CDC20 | cell division cycle 20 |
| 77 | / 2.49 | 1.12e-06 | CDHR1 | cadherin-related family member 1 |
| 78 | x 2.49 | 7.37e-05 | LCE3E | late cornified envelope 3E |
| 79 | x 2.48 | 1.89e-10 | CCNE2 | cyclin E2 |
| 80 | x 2.48 | 9.87e-09 | CENPA | centromere protein A |
| 81 | x 2.47 | 1.17e-07 | HPSE | heparanase |
| 82 | x 2.47 | 4.8e-10 | MELK | maternal embryonic leucine zipper kinase |
| 83 | x 2.46 | 1.93e-09 | NUF2 | NUF2, NDC80 kinetochore complex component |
| 84 | x 2.45 | 3.76e-10 | SKA1 | spindle and kinetochore associated complex subunit 1 |
| 85 | / 2.39 | 0.000411 | LCE2C | late cornified envelope 2C |
| 86 | x 2.39 | 0.000102 | S100A7 | S100 calcium-binding protein A7 |
| 87 | x 2.38 | 1.93e-09 | KIF11 | kinesin family member 11 |
| 88 | x 2.38 | 1.56e-10 | CDKN3 | Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 |
| 89 | x 2.38 | 1.89e-10 | ZWINT | ZW10-interacting kinetochore protein |
| 90 | x 2.37 | 1.05e-09 | KIF2C | kinesin family member 2C |
| 91 | / 2.36 | 6.03e-05 | SERPINA12 | serpin family A member 12 |
| 92 | x 2.35 | 4.46e-11 | CENPW | centromere protein W |
| 93 | x 2.34 | 1.02e-10 | FAM111B | family with sequence similarity 111 member B |
| 94 | x 2.34 | 0.000588 | S100A7A | S100 calcium-binding protein A7A |
| 95 | x 2.32 | 6.55e-10 | OIP5 | Opa-interacting protein 5 |
| 96 | x 2.31 | 1.85e-10 | CENPK | centromere protein K |
| 97 | x 2.31 | 2.03e-09 | PIF1 | PIF1 5'-to-3' DNA helicase |
| 98 | / 2.29 | 0.000613 | LCE2D | late cornified envelope 2D |
| 99 | x 2.29 | 3.35e-06 | SELE | selectin E |
| 100 | x 2.28 | 6.09e-10 | HJURP | Holliday junction recognition protein |
| 101 | / 2.27 | 5.61e-09 | BTC | betacellulin |
| 102 | x 2.26 | 9.22e-10 | BIRC5 | baculoviral IAP repeat-containing 5 |
| 103 | / 2.26 | 0.00235 | FABP7 | fatty acid-binding protein 7 |
| 104 | x 2.25 | 2.18e-10 | FANCI | Fanconi anemia complementation group I |
| 105 | x 2.25 | 1.81e-12 | PCNA | proliferating cell nuclear antigen |
| 106 | x 2.25 | 2.63e-10 | AURKB | aurora kinase B |
| 107 | x 2.24 | 0.000115 | GJB2 | gap junction protein beta 2 |
| 108 | x 2.23 | 1.02e-10 | DTL | denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog |
| 109 | x 2.22 | 2.03e-09 | NEK2 | NIMA-related kinase 2 |
| 110 | x 2.21 | 0.00165 | SPRR2D | small proline-rich protein 2D |
| 111 | x 2.21 | 2.71e-09 | CENPF | centromere protein F |
| 112 | x 2.18 | 1.57e-10 | CDCA3 | cell division cycle associated 3 |
| 113 | / 2.17 | 0.000175 | KPRP | keratinocyte proline-rich protein |

| | | | | |
|-----|--------|----------|-----------|--|
| 114 | / 2.17 | 0.000106 | LCE2A | late cornified envelope 2A |
| 115 | x 2.17 | 2.07e-11 | HELLS | helicase, lymphoid-specific |
| 116 | x 2.15 | 1.27e-10 | GGCT | gamma-glutamylcyclotransferase |
| 117 | x 2.15 | 2.03e-09 | SMC4 | structural maintenance of chromosomes 4 |
| 118 | x 2.15 | 2.41e-10 | PCLAF | PCNA clamp-associated factor |
| 119 | x 2.13 | 0.0124 | S100A7A | S100 calcium-binding protein A7A |
| 120 | x 2.12 | 1.59e-07 | FCN1 | ficolin 1 |
| 121 | / 2.11 | 0.000974 | LCE1C | late cornified envelope 1C |
| 122 | x 2.11 | 4.8e-10 | CENPE | centromere protein E |
| 123 | / 2.11 | 6.75e-06 | CD1A | CD1a molecule |
| 124 | / 2.11 | 0.00704 | KRT2 | keratin 2 |
| 125 | x 2.1 | 1.6e-06 | CH25H | cholesterol 25-hydroxylase |
| 126 | / 2.1 | 0.000123 | LCE6A | late cornified envelope 6A |
| 127 | x 2.09 | 3.32e-09 | DEPDC1 | DEP domain-containing 1 |
| 128 | x 2.09 | 5.46e-11 | STIL | SCL/TAL1 interrupting locus |
| 129 | / 2.08 | 4.77e-09 | F3 | coagulation factor III, tissue factor |
| 130 | x 2.08 | 1.01e-09 | KIF15 | kinesin family member 15 |
| 131 | x 2.08 | 6.7e-07 | KRT78 | keratin 78 |
| 132 | / 2.07 | 5.54e-08 | CHL1 | cell adhesion molecule L1-like |
| 133 | x 2.07 | 0.00998 | CXCL8 | C-X-C motif chemokine ligand 8 |
| 134 | x 2.07 | 1.96e-09 | MKI67 | marker of proliferation Ki-67 |
| 135 | x 2.07 | 5.7e-09 | TIMP1 | TIMP metalloproteinase inhibitor 1 |
| 136 | x 2.06 | 5.66e-09 | SLC7A5 | solute carrier family 7 member 5 |
| 137 | x 2.06 | 9.34e-07 | TNFRSF12A | TNF receptor superfamily member 12A |
| 138 | x 2.05 | 6.19e-09 | PIMREG | PICALM-interacting mitotic regulator |
| 139 | x 2.05 | 1.13e-10 | MCM6 | minichromosome maintenance complex component 6 |
| 140 | x 2.05 | 9.6e-10 | LMNB1 | lamin B1 |

Average expression levels of each gene from the irritant samples were compared to controls and expressed as the mean fold change (Fc). The Fc criteria were set at > 1.41 or $< 1/1.41$ and the false discovery rate (FDR) at < 0.05 . The statistical value of differences in expression between the samples and controls was also calculated and expressed as an adjusted P value (adj-p).

The 140 highest differentially expressed genes are shown.

Gene symbols and gene descriptions are also indicated.

Table S3: Main signaling pathways in allergen and irritant patch test responses.

Common pathways

GO:0018149 peptide cross-linking (1) — 47 genes in gene set, 19 in common: LCE5A, PI3, LCE3D, SPRR2A, C1orf68, LCE2B, LCE2C, SPRR2B, LCE1C, LCE2D, SPRR1B, LCE3E, LCE2A, SPRR2D, KRT2, LCE1A, LCE1F, LCE1E, COL3A1

GO:0000819 sister chromatid segregation (0.99) — 204 genes in gene set, 34 in common: CCNB1, UBE2C, ZWINT, DLGAP5, TOP2A, NCAPG, TTK, NDC80, SPC25, PRC1, NUSAP1, BUB1, CDCA5, BUB1B, KIF23, CDC6, MAD2L1, KNL1, SKA1, CDC20, ...

GO:0085029 extracellular matrix assembly (0.81) — 20 genes in gene set, 5 in common: HAS3, MFAP4, MYH11, FBLN5, GAS6

GO:0051782 negative regulation of cell division (0.78) — 12 genes in gene set, 6 in common: BLM, SUSD2, ORC6, C10orf99, CHMP4C, TXNIP

GO:0046605 regulation of centrosome cycle (0.59) — 41 genes in gene set, 7 in common: AURKA, KIF11, STIL, NPM1, CHEK1, CHMP4C, RANBP1

GO:1901655 cellular response to ketone (0.58) — 28 genes in gene set, 7 in common: UGT3A2, SPP1, GNAI1, AQP1, POSTN, GAS6, ADCY2

GO:0046134 pyrimidine nucleoside biosynthetic process (0.52) — 20 genes in gene set, 5 in common: TYMP, TYMS, TK1, UPP1, CTPS1

GO:0071241 cellular response to inorganic substance (0.49) — 103 genes in gene set, 12 in common: CHP2, MMP9, TIGAR, ECT2, BLM, TIMELESS, MT2A, RYR3, AQP1, MT1G, MEF2A, CACNA1H

GO:0000083 regulation of transcription involved in G1/S transition of mitotic cell cycle (0.49) — 23 genes in gene set, 7 in common: RRM2, TYMS, CDK1, CDC6, PCNA, CDC45, FBXO5

GO:0070542 response to fatty acid (0.44) — 26 genes in gene set, 5 in common: CCL19, CCR7, DGAT2, TGFBR3, PDK4

GO:0042634 regulation of hair cycle (0.42) — 10 genes in gene set, 3 in common: CDH3, HPSE, PER1

GO:1901654 response to ketone (0.41) — 50 genes in gene set, 10 in common: CCL19, CCR7, UGT3A2, SPP1, GNAI1, AQP1, POSTN, TGFBR3, GAS6, ADCY2

GO:0051043 regulation of membrane protein ectodomain proteolysis (0.35) — 21 genes in gene set, 4 in common: TIMP1, TIMP3, APOE, TIMP2

GO:1905048 regulation of metallopeptidase activity (0.33) — 10 genes in gene set, 3 in common: TIMP1, TIMP3, TIMP2

GO:0033260 nuclear DNA replication (0.24) — 24 genes in gene set, 5 in common: GINS2, PCNA, BRCA2, CDC45, CDC7

GO:0000920 cell separation after cytokinesis (0.23) — 16 genes in gene set, 3 in common: KIF20A, CEP55, CHMP4C

GO:0045103 intermediate filament-based process; GO:0045104 intermediate filament cytoskeleton organization (0.23) — 29 genes in gene set, 4 in common: KRT6C, KRT6A, EPPK1, DES

Allergen pathways

GO:0043062 extracellular structure organization (1) — 238 genes in gene set, 67 in common: MMP12, MMP1, TNC, ITGB2, VCAM1, LCP1, ICAM1, CD47, HTRA1, SPOCK2, MMP3, COL4A5, ICAM3, CTSL, CTSS, LAMA2, ITGAM, COL14A1, CTSV, MMP2, ...

GO:0006954 inflammatory response (1) — 376 genes in gene set, 126 in common: CXCL10, CXCL9, CXCL11, CXCR4, GBP5, CCL4, JAK3, FPR1, CCL2, CCL8, ALOX15, FPR2, BIRC3, PLSCR1, CXCL1, ITGB2, CCL13, CCL5, CCL26, HCK, ...

GO:0045321 leukocyte activation (0.98) — 897 genes in gene set, 274 in common: LTF, GPR183, FLG2, CD53, CD2, PTPRC, JAK3, SERPINA1, FPR1, TRAC, CTLA4, CCL2, LCK, CORO1A, LILRB2, TESPA1, FPR2, TRBC1, SELL, GMFG, ...

GO:0050776 regulation of immune response (0.93) — 732 genes in gene set, 224 in common: LTF, GBP5, PTPRC, GBP1, JAK3, CLEC4A, FPR1, TRAC, CTLA4, FYB, LCK, LCP2, CD1B, TRAT1, ALOX15, LILRB2, TESPA1, FPR2, BIRC3, TRBC1, ...

GO:0050900 leukocyte migration (0.91) — 319 genes in gene set, 113 in common: MMP1, CXCL10, CXCL9, CXCL11, GPR183, CD2, CXCR4, CCL4, FPR1, RAC2, CCL2, CCL8, LCK, FPR2, SELL, CXCL1, ITGB2, VCAM1, CCL13, CCL5, ...

GO:0009615 response to virus (0.86) — 218 genes in gene set, 76 in common: CXCR4, PTPRC, ISG20, CCL4, ISG15, CCL8, LCK, MX1, BIRC3, PLSCR1, APOBEC3A, CCL5, IRF1, BATF3, DOCK2, HCK, APOBEC3G, CD247, MX2, RSAD2, ...

GO:2001236 regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway (0.77) — 108 genes in gene set, 28 in common: ICAM1, CYLD, IL1B, TNFAIP3, MCL1, TNFSF10, THBS1, FAS, BID, GPX1, TRAF1, TCF7L2, PML, TNF, CFLAR, TNFRSF10A, SCG2, IGF1, FASLG, ATF3, ...

GO:0070268 cornification (0.77) — 107 genes in gene set, 28 in common: LOR, FLG, KRT15, DSC1, SPRR2F, KLK5, KRT80, KRT31, KRT19, KRT17, KRT23, DSG1, PKP1, CDSN, KRT6B, TGM5, SPRR2G, PPL, KRT1, CAPNS1, ...

GO:0045926 negative regulation of growth (0.7) — 147 genes in gene set, 28 in common: MT1M, SFRP2, BST2, RERG, FHL1, FRZB, SLIT3, MT1F, PML, BBS2, FGFR3, SMAD4, ALOX15B, GJA1, MT1E, ACVR1B, PPT1, TGFB1, RBP4, MT1A, ...

GO:0030155 regulation of cell adhesion (0.63) — 450 genes in gene set, 150 in common: CD2, PTPRC, GBP1, JAK3, RAC2, TRAC, CTLA4, CCL2, LCK, ALOX15, LILRB2, TESPA1, TRBC1, VCAM1, CCL5, ICOS, IRF1, ARHGDI1B, CD47, HLA-DQA1, ...

GO:0098754 detoxification (0.58) — 22 genes in gene set, 10 in common: SOD2, BMP7, SESN1, GCH1, GSTM3, TNF, ATP7A, MARC2, MARC1, PRDX2

GO:0045861 negative regulation of proteolysis (0.48) — 150 genes in gene set, 36 in common: LTF, LAMP3, BIRC3, SERPINB9, SPOCK2, PLAUR, CTSZ, SERPINE2, IFI16, THBS1, RECK, TFAP2B, GPX1, LEF1, PML, AQP1, CR1, BEX3, SPOCK1, GAS1, ...

GO:0034340 response to type I interferon (0.41) — 77 genes in gene set, 34 in common: ISG20, ISG15, MX1, IRF1, IRF8, STAT1, IFI35, MX2, RSAD2, IRF7, XAF1, BST2, IFIT3, IFITM1, SAMHD1, OAS2, PSMB8, OAS1, IFITM3, IFITM2, ...

GO:0051216 cartilage development (0.41) — 77 genes in gene set, 20 in common: OSR2, SOX6, FGFR3, LRP6, RUNX3, RUNX2, SCIN, BARX2, GPLD1, TGFB1, MGP, ATP7A, PKD1, OSR1, RUNX1, NFIB, CHADL, TRPS1, SULF1, CD44

GO:0006575 cellular modified amino acid metabolic process (0.39) — 129 genes in gene set, 24 in common: PLSCR1, ETHE1, MTHFD1L, GSTA4, GPX1, GSTM3, GSTM5, GATM, GHR, PCYOX1, CRYM, PLA2G12A, GSTA3, SLC5A6, CKMT2, STAT5A, FASN, PLA1A, VNN2, SHMT1, ...

GO:0097164 ammonium ion metabolic process (0.38) — 154 genes in gene set, 32 in common: RARRES3, ACER1, BCHE, SLC44A5, GCH1, AKR1C2, LDLR, ODC1, APOC1, AKR1C3, PLA2G12A, MBOAT2, LPCAT1, SPTLC3, PLA2G3, GPLD1, HPRT1, BBOX1, ENPP2, ATP7A, ...

GO:0018149 peptide cross-linking (0.38) — 47 genes in gene set, 15 in common: LOR, FLG, SPRR2F, SPRR4, LCE1B, THBS1, LCE3A, LCE1D, COL3A1, F13A1, KRT1, ANXA1, LCE4A, KRT10, EVPL

GO:0051897 positive regulation of protein kinase B signaling (0.34) — 60 genes in gene set, 19 in common: HCLS1, CCL3, PIK3R5, CCL21, THBS1, IL18, TCF7L2, EGFR, AKR1C2, AKR1C3, PINK1, F10, TGFB1, INSR, C1QBP, SPRY2, PIK3CG, ADAM8, MYDGF

GO:1900077 negative regulation of cellular response to insulin stimulus (0.3) — 25 genes in gene set, 13 in common: CISH, SOCS1, PRKCQ, IL1B, PTPRE, KANK1, PTPN2, IRS1, SOCS3, PID1, SOCS2, GRB14, MZB1 D18346_SIV_JFN — Follow-up of project D14205_JFN_MV CONFIDENTIAL 9.1 Effect by Class of Compound 85 of 536

GO:0042590 antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I (0.29) — 72 genes in gene set, 20 in common: PSMB10, FCER1G, CYBA, PSMB9, TAP2, TAP1, NCF2, CYBB, PSMB8, TAPBP, ITGB5, PSMA5, HLA-F, PSMA3, PSMD12, PSME1, NCF4, PSMB3, CALR, PSMA4

Irritant pathways

GO:0006260 DNA replication (1) — 235 genes in gene set, 33 in common: PIF1, PCLAF, RNASEH2A, MCM10, CENPS, POLQ, RFC4, MCM2, E2F8, GINS4, BRCA1, CDC25C, EXO1, MCM4, CDT1, RAD51, CDC25A, GINS1, RFC3, ORC1, ...

GO:0007067 mitotic nuclear division (0.84) — 266 genes in gene set, 35 in common: AURKB, NEK2, CENPF, CENPE, MKI67, KIF15, PRC1, KIFC1, CDCA8, KIF14, SMC4, RCC1, KIF4A, STMN1, SKA3, SPAG5, KNTC1, CDC25C, KIF18A, NCAPD2, ...

GO:0009262 deoxyribonucleotide metabolic process (0.74) — 25 genes in gene set, 4 in common: DTYMK, NUDT1, RRM1, NUDT15

GO:0034724 DNA replication-independent nucleosome organization (0.62) — 50 genes in gene set, 13 in common: CENPA, CENPW, OIP5, CENPS, ASF1B, CENPU, CENPH, RUVBL1, CENPL, NASP, CENPM, HIST1H4C, MIS18A

GO:0046148 pigment biosynthetic process (0.28) — 33 genes in gene set, 4 in common: TYRP1, TYR, MTHFD1, PAICS

GO:0000732 strand displacement (0.17) — 26 genes in gene set, 7 in common: RAD51AP1, BRCA1, EXO1, RAD51, RMI2, BRIP1, RAD51C

Gene Ontology terms (from the Biological Process tree) most associated with each group, according to the MGSA algorithm. The number in parentheses after each gene set name is the estimated frequency of activation (from 0 to 1). It is followed by the most differentially expressed genes associated with this term.

Table S4: Primer sequences, primer ID and detected transcripts for qRT-PCR analysis.

| Gene name | Primer sequences | Amplicon length (bp) |
|------------------|--|-----------------------------|
| <i>CD8A</i> | Forward: CAGGAACCGAAGACGTGTTTGC Reverse: AGTGGCTGTTGCACAGGGTTAG | 103 |
| <i>CD4</i> | Forward: CTAGTTTCCAGAGGCTTAATCACACC Reverse: AGGGTCAGAGAGAAATAATGAGAGAAGG | 90 |
| <i>GZMB</i> | Forward: CTTCTCCAACGACATCATGC Reverse: ACAGCTCTGGTCCGCTTG | 60 |
| <i>IFNG</i> | Forward: TGACCAGAGCATCCAAAAGAGTG Reverse: TTGCTTTGCGTTGGACATTCAAG | 143 |
| <i>Actin</i> | Forward: CCAACCGCGAGAAGATGA Reverse: CCAGAGGCGTACAGGGATAG | 97 |
| <i>GAPDH</i> | Forward: CACCCACTCCTCCACCTTTG AC Reverse: GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG | 112 |

| Gene name | Primer ID | Detected transcript(s) | Amplicon length (bp) |
|------------------|------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| <i>CCL2</i> | Hs_CCL2_1_SG | NM_002982 | 60 |
| <i>CCL20</i> | Hs_CCL20_1_SG | NM_004591 | 102 |
| <i>CXCL10</i> | Hs_CXCL10_1_SG | NM_001565 | 129 |
| <i>CD69</i> | Hs_CD69_1_SG | NM_001781, NR_026671, NR_026672 | 90 |
| <i>GNLY</i> | Hs_GRN_1_SG | NM_002087, XM_005257253 | 140 |

Supplemental figures

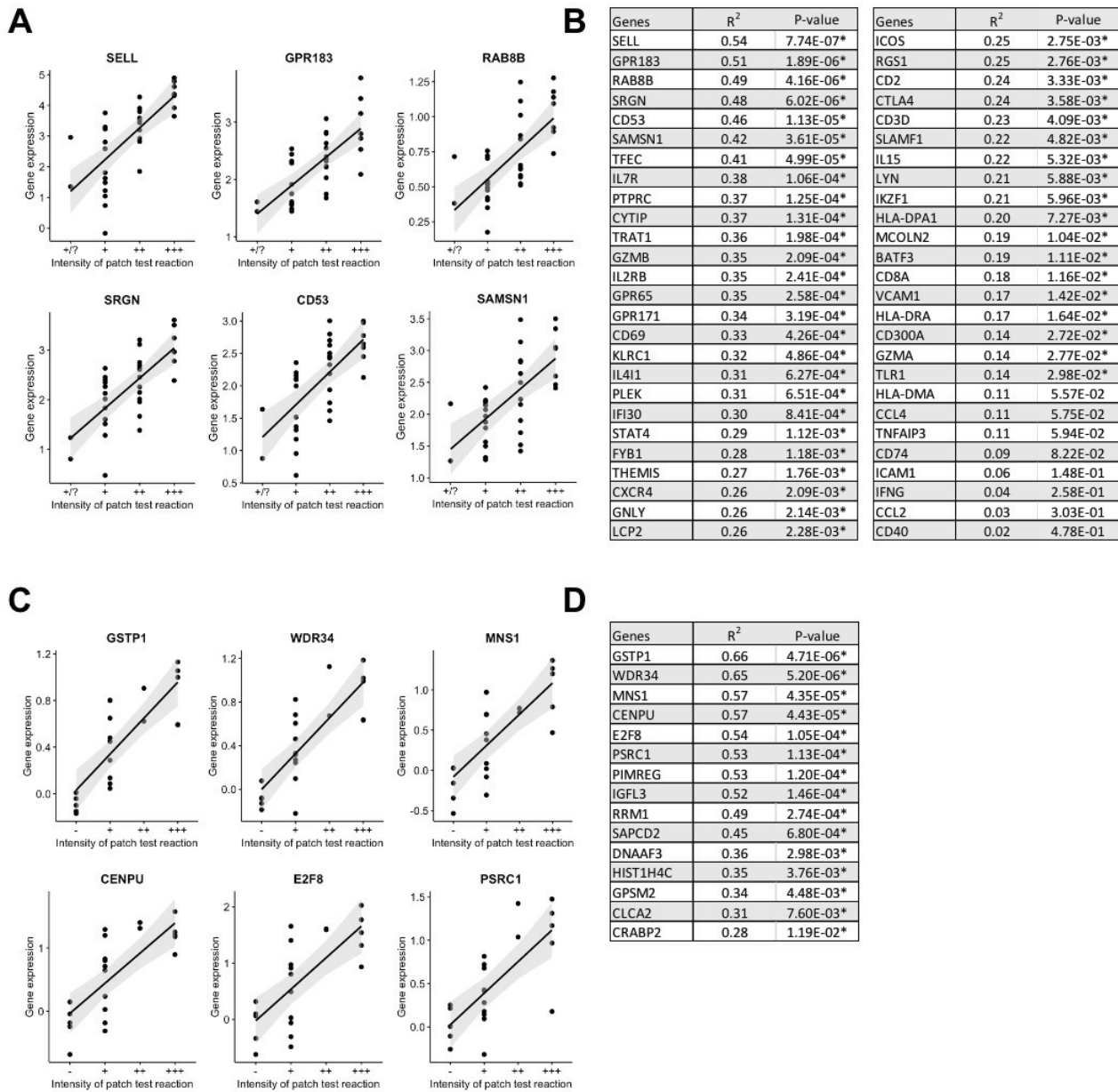


Figure S1: Individual gene expression correlates with the magnitude of the clinical response.

The correlation between the individual expression of gene associated to the allergen (A & B) and irritant (C & D) core signatures and the intensity of the patch-test reactions was investigated by simple linear regression analysis, and illustrate as scatter plots (A&C). The coefficients of determination (R²) and p-value are indicated (B&D).

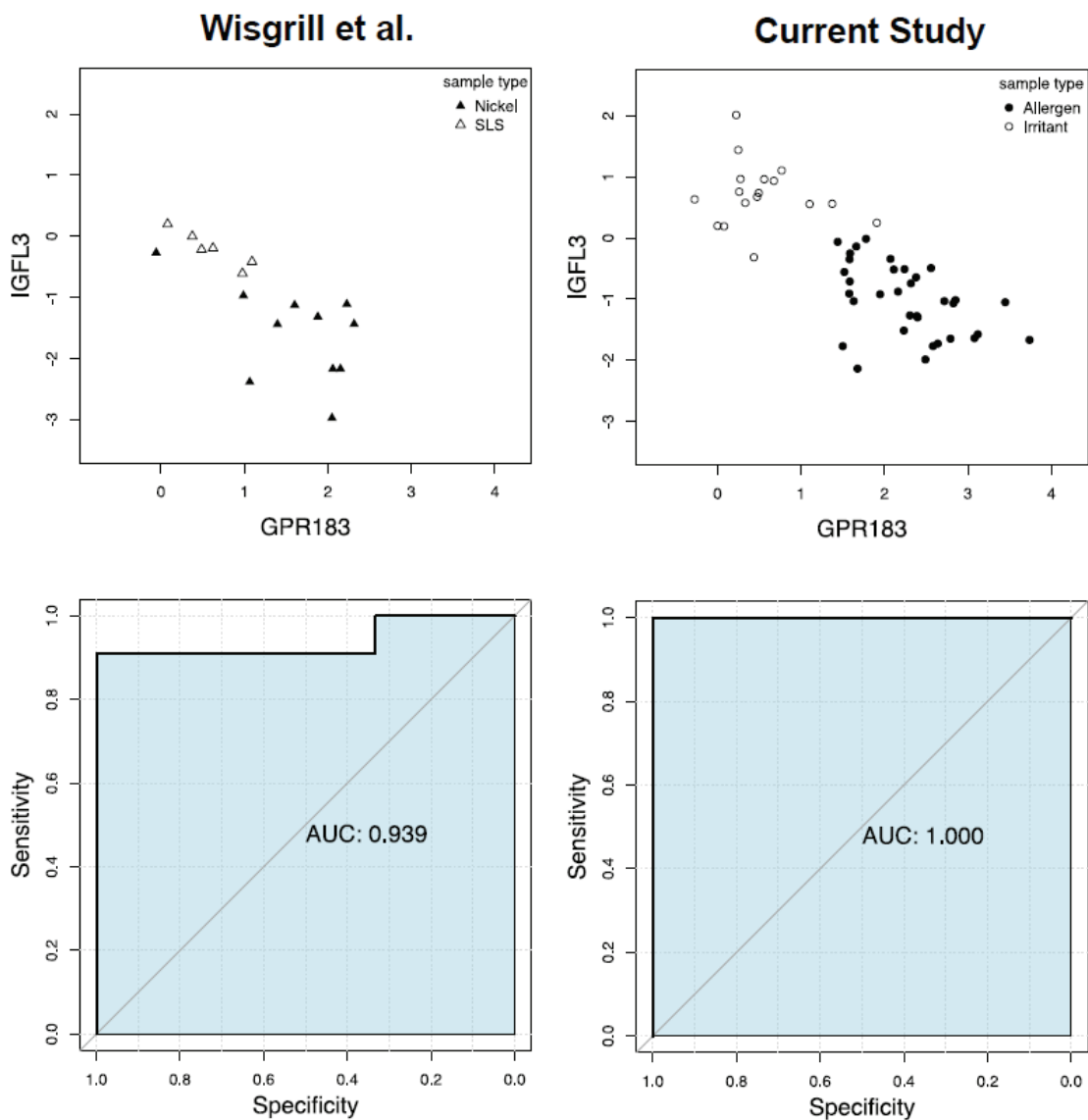


Figure S2: Validation of GPR183 / IGFL3 classifier using external gene array datasets.

GPR183 / IGFL3 classifier was validated on external gene array datasets, generated from biopsies of positive PT samples to nickel and SLS (access no. E-MTAB-8945).

The ability of GPR183 / IGFL3 classifier to discriminate between nickel and SLS samples is depicted, either as biplots representing differential gene expression (Fc, top) or as ROC curves (bottom). AUC is the area under the ROC curve.

Results obtained with the allergen and irritant samples of the current study are indicated for comparison.

Article 2 : Gene profiling reveals a contact allergy signature in most positive Amerchol L-101 patch-test reactions

La lanoline, ou graisse de laine, est une substance naturelle issue du suint de mouton, composée d'esters et polyesters d'alcool et d'acide gras. De par ses propriétés auto émulsionnables, elle est utilisée comme excipient dans de nombreux cosmétiques, émoullients et médicaments topiques. Plusieurs études ont rapporté des cas d'ECA à la lanoline, et la prévalence rapportée de sensibilisation à cet allergène varie de 1,2% à 6,9%.

L'Amerchol L-101 est un dérivé commercial provenant de l'hydrolyse de la graisse de laine et contenant 10% d'alcool de lanoline. Il est considéré comme un meilleur détecteur d'allergie à la lanoline au cours du processus du patch test. Néanmoins, les réactions cutanées sont souvent douteuses ou faiblement positives avec une pertinence clinique difficile à établir. Par ailleurs, des propriétés irritantes lui ont été attribuées du fait d'huiles minérales contenues dans sa composition. Ainsi, la pertinence clinique de l'allergie de contact est régulièrement en question.

Dans cette étude, menée en collaboration avec l'équipe de Cecilia Svedman (Service de Dermatologie, Université de Lund, Malmo, Suede), l'objectif initial était de caractériser l'inflammation cutanée induite par l'Amerchol L-101, par des approches d'analyse moléculaire similaires à la précédente étude, afin de déterminer la nature allergique ou irritative de ce produit chimique. En parallèle, cela nous a permis d'étudier la corrélation de la réponse moléculaire avec différents paramètres tels que l'intensité clinique des réactions et la dose de produit chimique appliqué, dans un objectif de validation de nos biomarqueurs.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons testé de nouveau des patients préalablement diagnostiqués avec une allergie de contact à l'Amerchol L-101, avec des patch tests contenant des concentrations croissantes de composé (10%, 30%, 50%, 100%). Des patients aux antécédents de patch test négatif pour ce même allergène ont également été retestés en contrôle. Il convient de noter que les séries de dilution ont été utilisées pour apporter un argument clinique complémentaire d'allergie de contact à l'Amerchol L-101. En effet, les réactions positives qui persistent (tout en diminuant progressivement) à des concentrations plus faibles d'allergènes confirment la nature allergique de la réaction alors qu'une réaction irritante faussement positive disparaît brusquement lorsque la concentration est abaissée (Johansen et al., 2015). Nous avons étudié les signatures moléculaires à partir des biopsies cutanées de patch tests à la fois par des techniques de puces microarrays et de qRT-PCR. Afin de caractériser la nature de l'inflammation induite par l'Amerchol nous avons comparé ces signatures à celles des allergènes et des irritants de notre première étude, nous

permettant d'identifier les gènes et les voies de signalisation communément ou différenciellement modulés parmi les 3 groupes. Enfin, des analyses individuelles nous ont permis de comparer les degrés d'expression des biomarqueurs entre les différents individus, mais également en fonction de la dose d'haptène appliquée ou encore de l'intensité clinique des réactions.

Cette étude a permis de :

- (i) Confirmer le manque de reproductibilité de certains résultats de patch tests à l'Amerchol L-101.
- (ii) Confirmer la nature allergique de l'Amerchol L-101. En effet, l'analyse transcriptomique globale des réactions positives aux test épicutanés a identifié des signatures moléculaires similaires à celles des allergènes chimiques de référence.
- (iii) Montrer/confirmer que l'expression des biomarqueurs d'allergie dépend de la dose et est en corrélation avec la réaction clinique.
- (iv) Enfin, l'analyse moléculaire individuelle des patch tests a montré que la majorité, mais pas la totalité, des réactions cutanées induites par l'Amerchol L-101 présentent une signature allergique, suggérant des résultats faussement positifs. Par ailleurs, cette observation est appuyée par la disparition brutale de la réaction lors des tests aux concentrations inférieures, corrélant ainsi avec nos résultats moléculaires.

Ces résultats indiquent donc que l'analyse moléculaire des lésions cutanées de patch tests questionnables pourrait permettre de délivrer aux patients suspectés d'allergie un diagnostic plus fiable. Elle permettrait en outre de simplifier la procédure actuelle visant à confirmer la pertinence clinique du test, et qui nécessite la réalisation de tests d'usage (procédure longue, et qui se révèle assez lourde pour le patient ; ainsi, elle est peu souvent pratiquée).

Cependant, il reste à démontrer que la présence ou l'absence des biomarqueurs d'allergie dans les lésions cutanées de patch tests sont effectivement prédictives de la réponse d'ECA chez les patients. Existe-t-il une corrélation directe entre ces signatures moléculaires et la réactivité des individus lorsqu'ils sont exposés aux composés allergisants en conditions d'usage ?

Par ailleurs, une autre question importante soulevée ici est l'existence de signatures moléculaires spécifiques en fonction de l'allergène ? Nos résultats ont montré que l'inflammation induite par l'amerchol était caractérisée par 214 DEG spécifiques qui n'étaient modulés ni par les haptènes ni les irritants étudiés dans la première étude, et certains auteurs ont déjà laissé supposer que différents allergènes pouvaient activer des voies de signalisation

distinctes. Serait-il donc possible d'identifier des biomarqueurs étiologiques permettant une identification précise du produit chimique ou de la famille de produit chimique responsable de la réaction d'EC ?

Gene profiling reveals a contact allergy signature in most positive Amerchol L-101 patch test reactions

Linda Ljungberg Silic¹ | Marine-Alexia Lefevre² | Ola Bergendorff¹ |
Simon De Bernard³ | Julien Nourikyan³ | Laurent Buffat³ |
Audrey Nosbaum² | Magnus Bruze¹ | Jean-François Nicolas² |
Cecilia Svedman¹ | Marc Vocanson²

¹Department of Occupational and Environmental Dermatology, Lund University, Skåne University Hospital, Malmö, Sweden

²CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, (Team Epidermal Immunity and Allergy); Univ Lyon; Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1; CNRS, UMR5308; ENS de Lyon, Lyon, France

³Altrabio, Lyon, France

Correspondence

Dr Marc Vocanson, CIRI-INSERM U1111, 21 avenue Tony Garnier 69007 Lyon, France.
Email: marc.vocanson@inserm.fr

Funding information

This work was supported by the Swedish organization Hudfonden for dermatological research.

Abstract

Background: Diagnosis of contact allergy (CA) to Amerchol L-101 (AL-101), a marker for lanolin allergy, is problematic. Positive patch test reactions are frequently doubtful or weakly positive and difficult to associate with clinical relevance.

Objective: To gain further insight on the allergic or irritant nature of skin reactions induced by AL-101 patch test.

Methods: We re-tested in a dose–response fashion, 10 subjects with AL-101 CA and performed comprehensive transcriptomic analysis (gene arrays, quantitative real-time polymerase chain reaction [qRT-PCR]) of samples of their skin reactions.

Results: Eight of the 10 CA subjects reacted positively upon re-test, whereas two did not react. Most of AL-101 positive patch tests expressed an allergy signature with strong activation of gene modules associated with adaptive immunity and down-regulation of cornification pathway genes. In addition, the breadth of gene modulation correlated with the magnitude of patch test reactions and the concentration of AL-101 applied. However, we observed that some of the positive patch test reactions to AL-101 expressed no/few allergy biomarkers, suggesting the induction of an irritant skin inflammation in these samples.

Conclusions: This study confirms that AL-101 is an allergen that can cause both contact allergy and contact irritation. Our results also highlight that molecular profiling might help to strengthen clinical diagnosis.

KEYWORDS

allergic contact dermatitis, Amerchol L-101, contact allergy, irritant contact dermatitis, irritant reaction, lanolin, patch testing, transcriptomic profiling

Abbreviations: AD, atopic dermatitis; AL-101, Amerchol L-101; ACD, allergic contact dermatitis; CA, contact allergy; CD, contact dermatitis; CTL, cytotoxic CD8+ T cell; DEG, differentially expressed gene; Fc, fold change; FDR, false discovery rate; GZMB, Granzyme B; GNLY, Granulysin; IFN- γ , Interferon gamma; PCA, Principal Component Analysis; Pet, petrolatum; PT, patch test.

Linda Ljungberg Silic, Marine-Alexia Lefevre, Cecilia Svedman, and Marc Vocanson contributed equally to this study.

Co-first authors can prioritize their names when adding this paper's reference to their resumes.

1 | INTRODUCTION

Lanolin, also called wool wax, is a natural substance derived from secretions of the sebaceous glands of sheep. It serves as a protective coating on sheep wool. Lanolin consists of a complex and variable mixture of alcohols, fatty acids, esters, and polyesters of high-molecular-weight alcohols.^{1–3} Because of its emollient and moisturizing properties, lanolin

is widely used in cosmetics, such as creams, powders, lipsticks, shampoos, soaps, and shaving creams. Lanolin is also found in ointment bases for topical medications. Other uses are in industrial applications, such as lubricants in ball bearings.^{3,4}

Lanolin is considered to be a weak sensitizer. The prevalence of lanolin sensitization in referred dermatitis patients was reported to range from 1.2% to 6.9%.⁵⁻⁸ Although lanolin contact allergy (CA) is uncommon on normal skin and with cosmetic use, several studies have reported that lanolin-containing products may cause allergic contact dermatitis (ACD) after repeated and prolonged topical exposure, or after exposure on compromised skin.^{3,9,10} The diagnosis of lanolin CA is routinely performed by patch testing, using lanolin alcohols and Amerchol L-101 (AL-101), two major derivatives of the sheep wool wax refining and purification process.¹¹ At the present time the sensitizer/s in lanolin are not identified. However, the alcohol fraction is considered to be the major sensitizing part of lanolin.³ The use of AL-101 in patch test procedures has been shown to provide additional diagnostic value.¹¹

However, the existence of lanolin allergy has long been a subject of debate. Clinicians often experience difficulties when performing patch tests with lanolin derivatives. Positive patch test reactions are often doubtful, and the morphologically weak positive reactions are rarely found to have any clinical relevance.¹¹ In addition, various studies have shown a significant lack of reproducibility in the results of AL-101 and lanolin alcohol patch tests.¹¹ A compound such as AL-101 has irritant properties, attributable to the mineral oil it contains, which, although resulting in a morphologically positive patch test, might in fact be a false-positive one.^{5,12,13} Therefore, a diagnosis of CA to lanolin based on a positive AL-101 patchtest is regularly questioned.

We recently conducted an extensive analysis of the transcriptomic signatures of positive patch test reactions to several reference chemical allergens (also referred to as haptens) and irritants.¹⁴ Our results identified the core signature of chemical allergen-induced reactions providing mainly a framework to improve CA diagnosis, and eventually also ACD.

Using a similar approach, we searched in this study to gain further insight into the nature of skin inflammation induced in patients with clear positive patch test reactions to AL-101.

2 | METHODS

2.1 | Study population

Ten subjects (A1-A10; including seven women and three men, range 31 years to 74 years, mean age 56.9 years) previously diagnosed with CA in response to AL-101 at the Department of Occupational and Environmental Dermatology (DOED), Skåne University Hospital, Malmö, were enrolled in the study. Only subjects with previous weak positive (+: A1, A3, A5, and A10) and strong positive (+: A2, A4, A6-A9) reactions (read at 72 h) to AL-101 [100%] were recruited. In addition, five controls (referred to as control C1-C5, including four women and one man; age range 48 years to 74 years, mean age

56.4 years) not diagnosed with CA to AL-101 when previously patch tested because of a suspected ACD, were also included.

Exclusion criteria were subjects undergoing treatment with oral corticosteroids or other systemic treatment, ongoing eczema on the back, phototherapy or topical corticosteroids used on the back 2 weeks before the study, and known or suspected pregnancy.

2.2 | Patch test procedure and skin samples

All participants were re-tested with a dilution series of AL-101 (Chemotechnique Diagnostics, Vellinge, Sweden) (3% w/w petrolatum [pet.], 10% w/w pet., 30% w/w pet., 50% w/w pet., and 100%), as well as with petrolatum (Vaselin, APL, Stockholm, Sweden) as a control. Solutions from Chemotechnique Diagnostics were used for AL-101 [100%] (Delivery-on Request) and 50% w/w pet. (commercially available), and a serial dilution was then performed at the DOED based on AL-101 "as is" and further diluted to: 30%, 10%, 3% w/w in pet. Patch testing was performed with 8-mm Finn Chambers (SmartPractice, Phoenix, Arizona, USA) and covered with Scanpor tape (Norgesplaster A/S, Vennessla, Norway). Twenty milligrams (40 mg/cm²) of test preparation was applied in the test chambers. Patch test positions (on lower back) were randomized and tests were removed at 48 h and read by experienced dermatologists at 72 h, in a blinded fashion (both for patient assignment and test concentrations). Test reactions were scored according to the classification of the International contact dermatitis research group (ICDRG) and European Society of Contact Dermatitis (ESCD).^{15,16} Skin reactions were clinically graded as negative (–), doubtful (+/?), weak positive (+), strong positive (++) or extreme positive (+++) reactions (Table 1).

Punch biopsies (3 mm) were collected after test readings from areas tested with AL-101 (100%, 50%, 30%, and 10% pet; 3% pet patch test areas were not biopsied) and pet. for subjects A1 to A10. Control subjects C1 to C5 were biopsied only from AL-101 [100%] and areas patch tested with pet.

2.3 | Gene arrays

Affymetrix PrimeView Human Gene Expression arrays (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA) were used for the gene array study. They allowed the analysis of more than 36 000 transcripts, ~22 000 genes and unigenes.

Sample preparation for the array hybridization was carried out as described in the Affymetrix GeneChip 3' IVT Express Kit user manual. In brief, total RNA was extracted from skin biopsies using the Qiagen RNeasy Mini Kit (Courtaboeuf, France) and contaminating DNA was removed using the DNA-Free DNA Removal kit (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The RNA was then reverse-transcribed into double-stranded copy DNA (cDNA), and then underwent *in vitro* transcription to generate biotin-labeled amplified RNA (aRNA). Purified aRNA was hybridized to the Affymetrix GeneChip Human PrimeView arrays for 16 h at 45°C in a GeneChip hybridization oven. Hybridized arrays

TABLE 1 Subjects' demographics, clinical history, and patch test results

| Patients | | | Patch tests occlusion time: 48 h Reading: 72 h | | Previous patch tests occlusion time: 48 h Reading: 72 h | | Investigators interpretation based on patch test and gene profiling results |
|----------|------------|------------------------------------|--|---------|---|--|---|
| Number | Gender/age | Clinical history | Dose of AL-101 | Results | Results | | |
| A1 | M/64 | Dermatitis | 100% | – | + | No contact allergy | |
| | | | 50% | – | NT | | |
| | | | 30% | – | NT | | |
| | | | 10% | – | NT | | |
| | | | 3% | – | NT | | |
| | | | Pet. | – | NT | | |
| | | | | | | | <i>Suggesting possible</i> |
| | | | | | | | <i>Contact irritation</i> |
| | | | | | | | <i>In previous patch tests</i> |
| A2 | F/62 | Contact dermatitis | 100% | – | ++ | No contact allergy | |
| | | | 50% | – | – | | |
| | | | 30% | – | NT | | |
| | | | 10% | – | NT | | |
| | | | 3% | – | NT | | |
| | | | Pet. | – | NT | | |
| | | | | | | | <i>Suggesting possible</i> |
| | | | | | | | <i>Contact irritation</i> |
| | | | | | | | <i>In previous patch tests</i> |
| A3 | F/54 | Hand dermatitis | 100% | + | + | No contact allergy suggesting contact irritation | |
| | | | 50% | – | NT | | |
| | | | 30% | – | NT | | |
| | | | 10% | – | NT | | |
| | | | 3% | – | NT | | |
| | | | Pet. | – | NT | | |
| A4 | F/36 | Atopic and contact dermatitis | 100% | + | ++ | Contact allergy | |
| | | | 50% | ?/+ | – | | |
| | | | 30% | – | NT | | |
| | | | 10% | – | NT | | |
| | | | 3% | – | NT | | |
| | | | Pet. | – | NT | | |
| A5 | F/56 | Leg dermatitis | 100% | + | + | Contact allergy | |
| | | | 50% | ?/+ | NT | | |
| | | | 30% | – | NT | | |
| | | | 10% | – | NT | | |
| | | | 3% | – | NT | | |
| | | | Pet. | – | NT | | |
| A6 | F/61 | Eyelid dermatitis | 100% | + | ++ | Contact allergy | |
| | | | 50% | ?/+ | ++ | | |
| | | | 30% | ?/+ | NT | | |
| | | | 10% | – | NT | | |
| | | | 3% | – | NT | | |
| | | | Pet. | – | NT | | |
| A7 | M/68 | Atopic dermatitis, hand dermatitis | 100% | + | ++ | Contact allergy | |
| | | | 50% | ?/+ | + | | |
| | | | 30% | ?/+ | NT | | |
| | | | 10% | ?/+ | NT | | |

TABLE 1 (Continued)

| Patients | | | Patch tests occlusion time: 48 h Reading: 72 h | | Previous patch tests occlusion time: 48 h Reading: 72 h | Investigators interpretation based on patch test and gene profiling results |
|----------|------------|-------------------------|--|---------|---|---|
| Number | Gender/age | Clinical history | Dose of AL-101 | Results | Results | |
| | | | 3% | – | NT | |
| | | | Pet. | – | NT | |
| A8 | F/31 | Hand and lip dermatitis | 100% | + | ++ | Contact allergy |
| | | | 50% | ?/+ | NT | |
| | | | 30% | ?/+ | NT | |
| | | | 10% | ?/+ | NT | |
| | | | 3% | – | NT | |
| | | | Pet. | – | NT | |
| A9 | F/53 | Dermatitis | 100% | ++ | ++ | Contact allergy |
| | | | 50% | + | NT | |
| | | | 30% | + | NT | |
| | | | 10% | ?/+ | NT | |
| | | | 3% | – | NT | |
| | | | Pet. | – | NT | |
| A10 | M/74 | Hand dermatitis | 100% | ++ | + | Contact allergy |
| | | | 50% | + | NT | |
| | | | 30% | + | NT | |
| | | | 10% | + | NT | |
| | | | 3% | + | NT | |
| | | | Pet. | – | NT | |
| C1 | F/50 | Hand dermatitis | 100% | – | – | Negative |
| | | | 50% | – | NT | |
| | | | 30% | – | NT | |
| | | | 10% | – | NT | |
| | | | 3% | – | NT | |
| | | | Pet. | – | NT | |
| C2 | M/74 | Atopic dermatitis | 100% | – | – | Negative |
| | | | 50% | – | NT | |
| | | | 30% | – | NT | |
| | | | 10% | – | NT | |
| | | | 3% | – | NT | |
| | | | Pet. | – | NT | |
| C3 | F/48 | Hand dermatitis | 100% | – | – | Negative |
| | | | 50% | – | NT | |
| | | | 30% | – | NT | |
| | | | 10% | – | NT | |
| | | | 3% | – | NT | |
| | | | Pet. | – | NT | |
| C4 | F/54 | – | 100% | – | – | Negative |
| | | | 50% | – | NT | |
| | | | 30% | – | NT | |
| | | | 10% | – | NT | |

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

| Patients | | | Patch tests occlusion time: 48 h Reading: 72 h | | Previous patch tests occlusion time: 48 h Reading: 72 h | Investigators interpretation based on patch test and gene profiling results |
|----------|------------|------------------|--|---------|---|---|
| Number | Gender/age | Clinical history | Dose of AL-101 | Results | Results | |
| | | | 3% | – | NT | |
| | | | Pet. | – | NT | |
| C5 | F/56 | Hand dermatitis | 100% | ?/+ | – | No contact allergy but questionable results |
| | | | 50% | ?/+ | NT | |
| | | | 30% | ?/+ | NT | |
| | | | 10% | – | NT | |
| | | | 3% | – | NT | |
| | | | Pet. | – | NT | |

Abbreviations: AL-101, Amerchol L-101; F, Female; M, Male; NT: not tested; Pet., petrolatum.

were washed and stained in an Affymetrix Fluidics Station FS450, and the fluorescent signals were measured with an Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G. Fluidics and scan functions were controlled by the Affymetrix GeneChip Command Console v4.1.3 software.

2.4 | Bioinformatics and statistical analysis of gene array data

Quality control of the gene arrays was carried out using standard QC metrics and R package quality control. Data were preprocessed (background correction and normalization) by applying (1) function *backgroundCorrect* from the *limma* package on the perfect match (PM) signals, (2) the variance stabilizing transformation algorithm (function *justvsn* from the *vsu* package¹⁷), and (3) a quantile normalization (function *normalize* from the *affy* package with parameter method = “quantiles”).

To filter probe sets, they were marked as informative or non-informative based on the result of the I/NI method.¹⁸ Non-informative probe sets were excluded from unsupervised analyses. All sets were included when the statistical models were applied, but only the informative sets were considered when correcting for multiple testing.

Single values for the probe signals for each probe set of each sample were obtained using the summarization step of the Robust Multichip Average (RMA¹⁹) approach (function *rmaPLM* from the *affyPLM* package, with parameters background = FALSE and normalize = FALSE). *rmaPLM* also returned standard error estimates for each estimated expression level: these were used to incorporate weight inputs into the linear regression models.

The gene array data set generated in this study was also compared to previous data sets obtained from skin biopsies of positive patch test reactions induced by reference chemical allergens and irritants.¹⁴

Expression values were modeled using different mixed linear regression models, with the group of chemicals for the previous data

set (chemical allergens, irritants, controls) and the treatment condition for the new samples (AL-101 [100%], [50%], [30%], [10%], controls AL-101 [100%], petrolatum) as fixed factor and a random effect for each patient. Mixed linear regression models were applied using function *lme* from the *nlme* package.²⁰ Comparisons of interest were then analyzed through statistical contrasts, using the *emmeans* package.²¹ *P*-values from paired *t*-tests were adjusted for multiple hypotheses using the Benjamini and Hochberg false discovery rate (FDR) controlling procedure (function *p.adjust* from package *stats* with parameter method = “BH”).

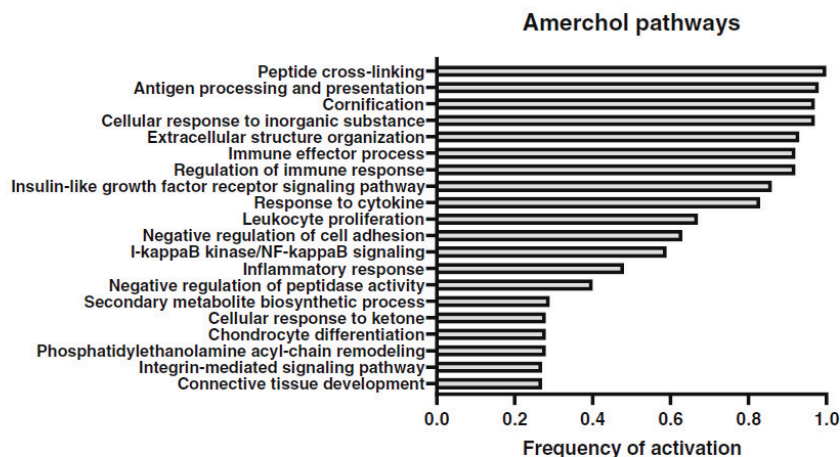
Multiple analyses were performed on the gene array data to determine whether global gene expression levels differed between the different treatment conditions (AL-101 [100%], [50%], [30%], [10%] and controls) and to identify genes and pathways preferentially/specifically induced. Comparisons were also performed to investigate the nature of Amerchol-induced response vs those induced by reference chemical allergens and irritants.

In Table S1, to determine the effect of AL-101 [100%], the statistical model used was $signal \sim -1 + Condition$ where *Condition* represents the treatment condition. To account for the paired design, an additional random effect was included ($\sim 1|Donor$). The model estimated the average gene expression level in AL-101100% condition after correction for the donor effect.

Results from Table S1 report fold-change (*Fc*), the FDR adjusted *P*-values, and information for each identified gene (Symbol and Description).

In Figure 1 and Table S2, differentially expressed genes (DEGs) identified in AL-101 [100%] samples were included in an input list for the MGSA algorithm (using the *mgsa* function from the *mgsa* package²²). The model assumed that some gene sets were active and that all gene members of active sets were themselves active. Fitting the model amounts to inferring the probability of every set to be active given the input list (ie, scores reported for each gene set are not *P*-values and the closer to 1, the better). The approach was applied to Gene Ontology terms (from the Biological Process tree). Only sets

FIGURE 1 Signaling pathway analysis of Amerchol patch test responses. Shown are the most significant hits for the gene ontology (GO) terms “biological process” for genes predominantly regulated in AL-101 [100%] patch test reactions. The bar size indicates the level of the estimated frequency for the activation of the respective pathway (from 0 to 1)



with at least 10 genes and a maximum of 1000 genes were considered.

In Figure 2A, the principal component analysis (PCA) of differential expression was performed with probe set Fc neither centered nor scaled, using function `prcomp` from package `stats`. To investigate the type of the response to Amerchol, the inductions for the new samples were projected onto the PCA of the inductions of the previous chemical allergen and irritant samples.

In Figure 2B, the Venn diagrams (created with `eulerr` package in R) include the number of DEGs (adjusted $P < .05$, fold-change >1.41 or $<1/1.41$) in each group (allergens, irritants and AL-101 [100%]) and the intersection represents the DEGs that are positively correlated for two or all the groups. Table S3 reports DEGs specific to the AL-101-induced skin inflammation.

In Figure 3, a heatmap was used to illustrate individual variations of 52 allergy DEGs (selected from Lefevre et al.¹⁴) in the different Amerchol-treated samples.

Gene clustering was performed using the complete agglomerative method, passing the Euclidean distance between scaled probe set signals to function `hclust` from package `stats`.

In Figure 4, to determine correlations existing between the magnitude of the allergy signature and the applied Amerchol dose, the value of each gene induction ($\text{Log}_2(\text{Fc})$) was added to obtain an average level for the 52 allergy DEGs.

In Figure S1, a similar approach was used to establish correlations between the magnitude of the allergy signature and the intensity of the patch test reactions.

2.5 | qRT-PCR

Total RNA samples were also used for quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis. qRT-PCR investigations were performed using a StepOnePlus PCR system (ThermoFisher, Villebon-sur-Yvette, France). CD69 and granulysin (GNLY) primers (QuantiTect Primer Assays) were from Qiagen (Courtaboeuf, France). CD8A, interferon gamma (IFNG), granzyme B (GZMB), and glyceraldehyde

3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were designed using the publicly Universal Probe Library Assay Design Center (https://lifescience.roche.com/en_fr/brands/universal-probe-library.html#assaydesign-center) and produced by Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France).

Primers are listed in Table S4.

2.6 | Analysis of qRT-PCR data

In Figure S2, expression values for each mRNA transcript in each sample were normalized to values obtained for the housekeeping gene (GAPDH), and results were presented as Fc vs controls.

In Figure 5, to determine correlations existing between the magnitude of the allergy signature and the applied Amerchol dose, the value of each gene induction ($\text{Log}_2(\text{Fc})$) was added to obtain an average level for the five allergy DEGs.

2.7 | Data availability

Expression microarray data have been deposited in Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) under accession no. GSE169573.

2.8 | Study approval

The study was approved by the Regional Ethical Review Board, Lund University, Sweden (Dnr-2017/197), and written informed consent was obtained from each participant prior to inclusion.

3 | RESULTS

3.1 | AL-101 PT results

Ten subjects with previously documented CA to AL-101, and five non-allergic control subjects, were re-tested with AL-101 before

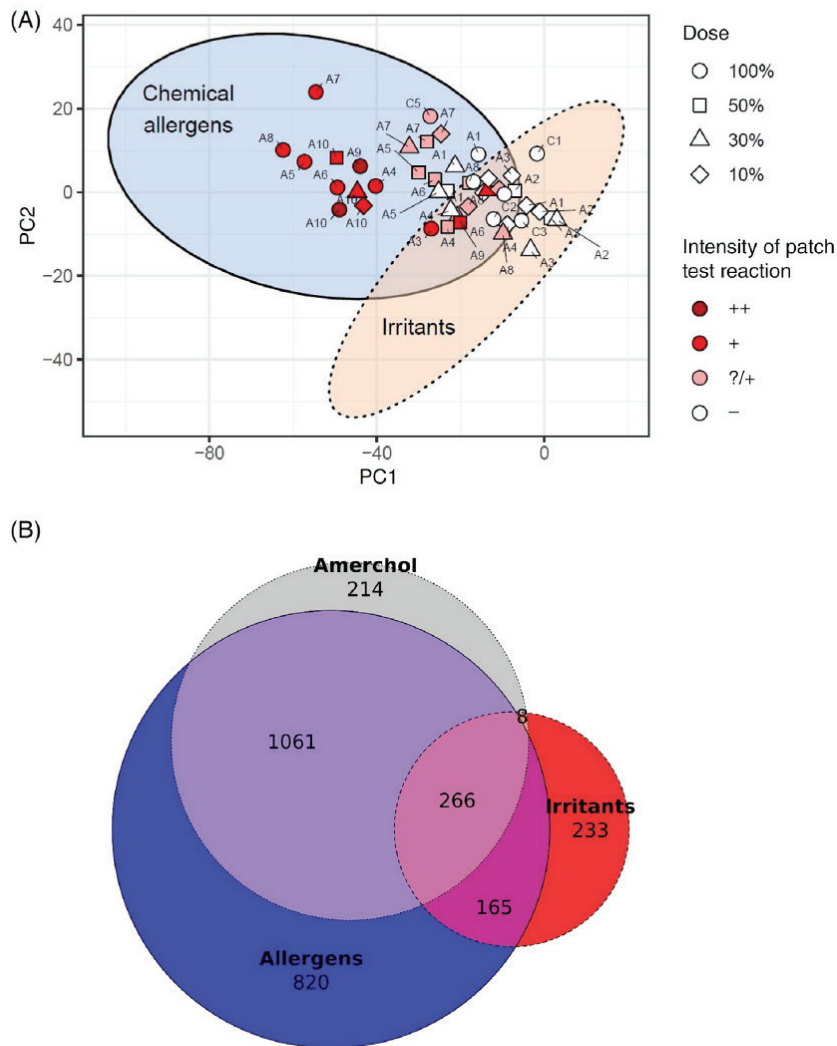


FIGURE 2 Comparison of Amerchol effects with existing data sets from allergen and irritant patch test reactions. (A) Principal component analysis (PCA) performed on the full set of genes measured on the arrays. Gene inductions in Amerchol samples were projected onto a previous PCA obtained from induction comparisons between allergen and irritant patch test reactions. In this PCA, the gene expression level of the control sample of each subject is subtracted from the corresponding treated sample from the same subject to compensate for donor-induced variability. Results depict sample location in the first two components (PCs), with the controls at coordinate 0. Together, the first two components represented ~65% of the variance. Subject numbers are reported above each sample. (B) Venn diagram representing common and unique DEGs in AL-101 [100%] and allergens and irritant patch test samples. Blue circle indicates genes ($n = 2312$) predominantly modulated in the allergen samples. Red circle indicates genes ($n = 672$) predominantly modulated in the irritant samples. Gray circle indicates genes ($n = 1549$) predominantly modulated in the AL-101 [100%] samples. Intersections represent the common DEGs

being biopsied for extensive genomic and molecular profiling of their patch tested skin.

Eight subjects (subjects A3-A10) reacted positively upon re-testing, with weak (+, $n = 6$) and strong positive (++ , $n = 2$) reactions at the maximum AL-101 dose [100%]. Two subjects (subjects A1 & A2) did not react. One subject from the control group (C5) showed a doubtful reaction (+/?), whereas the four others (C1-C4) had negative reactions.

CA subjects were tested with several AL-101 dilutions (50% pet., 30% pet., 10% pet. and 3% pet.). A progressive decrease in the intensity of the patch test reactions was observed with dilutions, but with a clear difference between subjects. Four of the eight positive patch test subjects (subjects A7-A10) were still positive with doubtful or weak reactions at AL-101 [10%], whereas subject A3 was negative at the first dilution [50%].

In total, more doubtful ($n = 11$) and weak ($n = 12$) reactions were observed, and no extreme (+++) reactions were noted (Table 1). Of note, we observed mostly doubtful ($n = 5$) and weak reactions ($n = 2$)

to the commercially available dose of AL-101 [50%, pet.], which is used by most clinicians.

3.2 | Main signaling pathways activated by AL-101 are comparable to that of reference contact allergens

We next searched to define the genes and the signaling pathways activated in Amerchol-induced skin inflammation. We first evaluated the number of differentially expressed genes (DEG) in AL-101 biopsy samples from CA subjects, when compared to their respective controls (biopsy samples collected from the Pet.-applied skin of the same subject). A total of 1510 DEGs, including 873 upregulated and 637 downregulated genes, were found to be modulated consistently among the 10 AL-101 [100%] samples (Table S1). By comparison, no statistically significant DEGs were detected in samples from the five control subjects (data not shown).

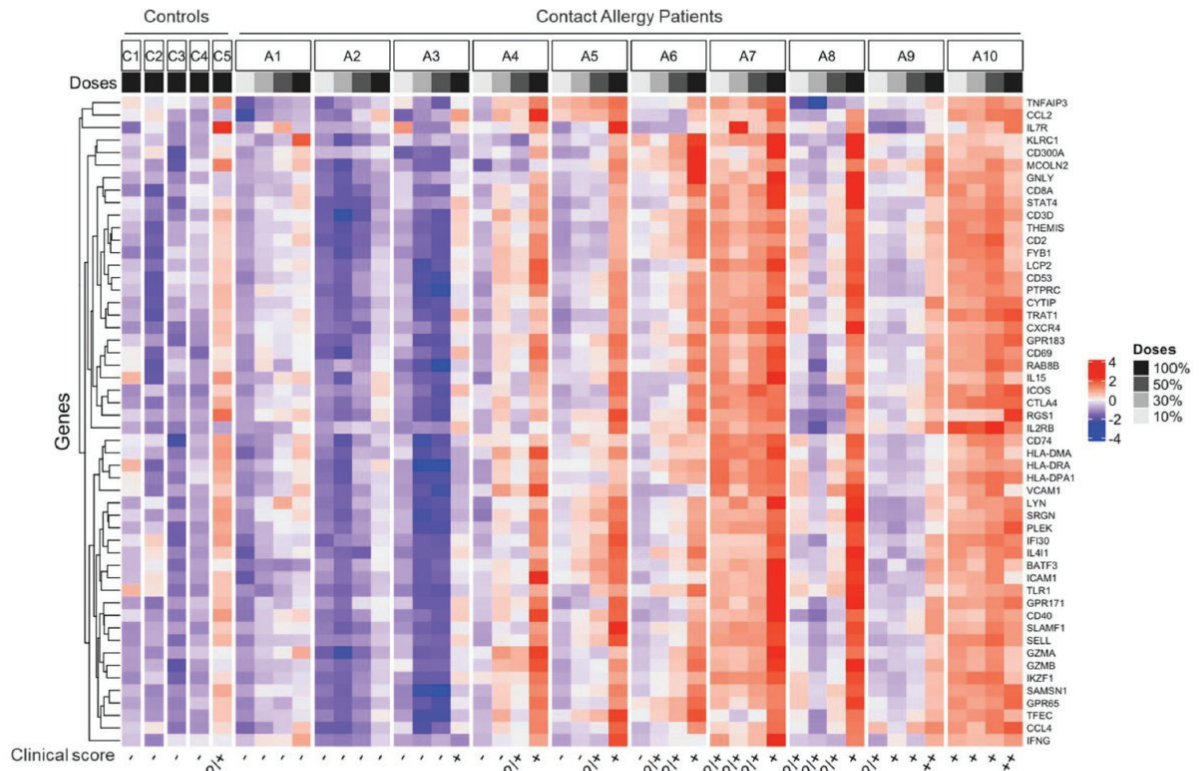
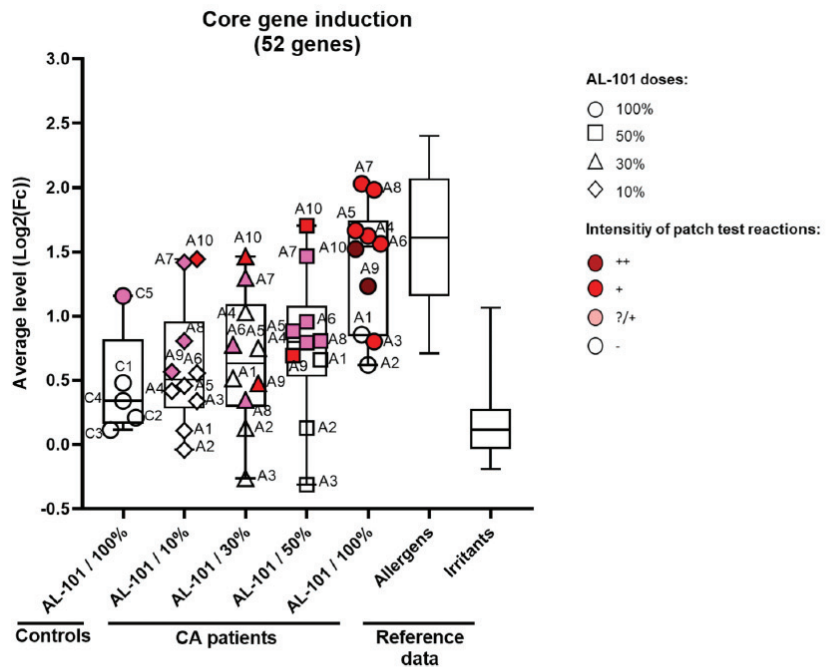


FIGURE 3 Allergy signature in Amerchol samples. A set of 52 DEGs illustrating the core transcriptome of reference chemical allergens was used to analyze AL-101-induced reactions. Results are depicted as a heatmap, in which samples are grouped by subject and arranged by AL-101 doses, from 10% to 100%. Blue, white, and red colors represent, respectively, low, moderate, and high signal intensity

FIGURE 4 Correlations between allergy DEG inductions and applied Amerchol doses and the magnitude of patch test reactions. Box-and-whisker plots depict the distribution of the average levels of the 52 allergy DEG inductions (Log₂(Fold change)) in samples applied with different AL-101 concentrations. Each symbol represents a sample. Results from previous allergen and irritant reference data sets are shown for comparison



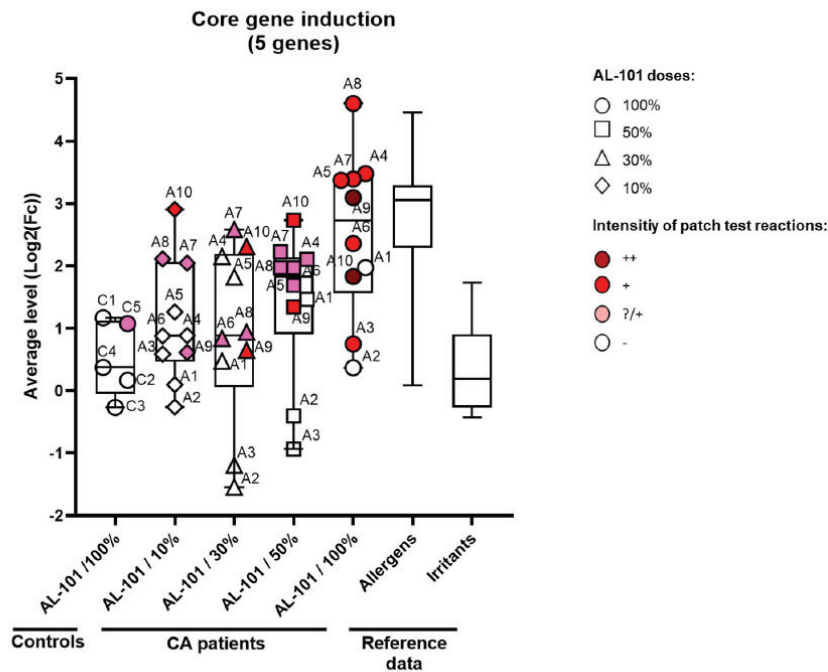


FIGURE 5 Validation of small set of segregating allergy biomarkers by qRT-PCR. Box-and-whisker plots depict the distribution of the average levels of variations in CD8A, GNLY, GZMB, CD69, and IFNG gene inductions (Log₂(Fold change)) as assessed by qRT-PCR, in samples applied with different AL-101 doses. Each symbol represents a sample. Results from previous allergen and irritant reference data sets are shown for comparison

Gene ontology (GO) annotations revealed several upregulated pathways in Amerchol-inflamed skin, mainly related to immune pathways (including “antigen processing and presentation,” “immune effector process,” “response to cytokine,” “leukocyte activation,” and “inflammatory response”), epidermal compartment (“peptide cross-linking”) and metabolism (“cellular response to ketone”). In contrast, a significant downregulation of genes associated with the “cornification” pathway was observed (Figure 1 and Table S2).

We then compared gene profiling of Amerchol-inflamed skin with the transcriptomic signatures of positive patch test reactions to several reference chemical allergens (nickel, methylisothiazolinone, linalool hydroperoxide) and irritants (SLS, nonanoic acid, and cantharidin), evaluated in a previous study from our group.¹⁴ To this end, we executed a hypothesis-free PCA of data from the full set of genes measured on the arrays for each AL-101 sample. To compensate for donor-induced variability, the gene expression level of the control sample (pet.) of each donor was subtracted from the corresponding-treated samples of the same donor. Projecting the resulting data on previous PCA comparing gene expression in chemical allergen (also called hapten) and irritant samples,¹⁴ we found that the gene inductions for positive AL-101 samples (+/?, + and ++) overlapped for the most part with the inductions recorded for hapten but not irritant samples, typifying an allergen-like response to Amerchol (Figure 2A, colored symbols).

To further characterize the Amerchol-induced skin inflammation, we next analyzed common and unique DEGs in AL-101, hapten, and irritant skin samples. As represented in the Venn diagram depicted in Figure 2B, we identified 266 DEGs commonly regulated by the three groups, 1061 DEGs regulated by both AL-101 and haptens, and only

8 DEGs regulated by both AL-101 and irritants (Figure 2B). We also found 214 DEGs specific to the AL-101-induced skin inflammation, including CD36 and FOXO1 transcripts, which are associated with energy metabolism, or IGFBP3, IGFBP4, and GIGYF2 transcripts, associated with insulin-like growth factor receptor signaling pathway (Table S3).

Collectively, these results therefore demonstrate that molecular signatures of positive patch test reactions to AL-101 are highly similar to those of reference chemical allergens but not of irritants.

3.3 | The majority of the AL-101-induced PT reactions display an allergy signature

We have previously identified and selected 52 DEGs as the basis of a hapten core signature. The latter mainly consisted of several T cell- and cytotoxic-related transcripts,¹⁴ which are upregulated within the 72 hours following hapten re-test. We then analyzed the induction of these 52 DEGs in the different AL-101-treated skin samples. Illustrated as a heatmap representing individual gene expression variations (Figure 3), or as box and whisker plots representing the average level of the 52 DEG inductions, results showed a clear gene induction-dose-response effect in the 10 CA subjects (Figure 4A). In contrast, very low gene induction was observed in the four controls, C1 to C4, who reacted negatively to AL-101 [100%], and a substantial transcript upregulation was detected for several of the 52 DEGs in the fifth subject (C5) who developed a doubtful reaction (Figures 3 and 4).

We also observed that the average level of the 52 DEG inductions increased with the intensity of the patch test reactions

(Figure S1). However, when individual data were taken into account, a substantial degree of variability was recorded between subjects. Hence, subjects A1 and A2, who developed negative patch test reactions upon re-testing, but also subject A3, showed no/weak baseline gene inductions for each of the AL-101 doses tested (Figures 4 and S1). Comparative analysis demonstrated that gene inductions for these three subjects were in the same range as the data obtained from the skin lesions of patients with “positive” patch test reactions to reference irritants (Figure 4). On the other hand, strong inductions were detected in subjects A4, A5, A6, A8, and A9 at the maximal dose of AL-101, and in subjects A7 and A10 at all doses tested (Figure 4). Subjects A5, A6, A8, and A9 developed weak or doubtful positive patch test response when tested with AL-101 50%, but a weak allergy core gene signature was observed in their skin biopsies (Figures 4 and S1).

In aggregate, results thus demonstrate that the majority (7/10), but not all, of AL-101-induced skin reactions (mainly at the maximal AL-101 dose) display a contact allergy signature (Table 1), which is dose dependent and correlates with the intensity of the patch test response.

3.4 | A small set of biomarkers allows for robust detection of AL-101-induced allergy

Finally, we aimed to validate our gene array results by confirming the expression of a small set of allergy biomarkers by qRT-PCR. We selected five genes present in our core allergen signature based on their relevance for ACD pathophysiology, and then explored their expression in the respective AL-101 samples. Our results demonstrated that there was an excellent correlation between gene array data and qRT-PCR results for these five genes (data not shown). They confirmed the strong upregulation of CD8A, CD69, Granzyme B (GZMB), Granulysin (GNLY), and IFNG mRNA transcripts in the different samples tested with AL-101 [100%], comparatively to the data obtained from positive patch test reactions to reference irritants (Figures 5 and S2). No gene induction was detected in subjects A2 and A3 and the five control subjects. A weak gene induction was detected this time with subject A1 (Figures 5 and S2).

Results therefore suggest that there is an infiltration of activated cytotoxic CD8 + T lymphocytes in a majority of the subjects with positive AL-101 patch test reactions.

4 | DISCUSSION

The main objective of our study was to better understand the nature of patch test reactions induced by the lanolin derivative, AL-101. Our gene-profiling study univocally demonstrated that AL-101 is a contact allergen. Indeed, most of the positive patch test reactions induced by this chemical displayed a robust allergy signature. In addition, our results confirmed that the use of AL-101 for the diagnosis of CA from lanolin can lead to questionable results. Positive patch test results to AL-101 were not reproduced in some subjects upon re-testing, and

our transcriptomic study highlighted a lack of allergic response in a subject (subject A3) with a positive patch test reaction. Of interest, dilution series experiments demonstrated a significant correlation between the concentration of AL-101 applied, the magnitude of positive patch test reactions, and the breadth of gene modulation induced after patch testing, suggesting that molecular profiling approaches could be of major value for monitoring the development of patch test reactions, and help clinicians refine their diagnoses.

4.1 | Test reactivity to AL-101

AL-101 is routinely used as a representative marker for lanolin allergy. This commercial product is manufactured by the hydrolysis of wool fat, and consists of lanolin alcohols, cholesterol, and sterols,³ with the addition of mineral oil. Analogous to lanolin, the sensitizers in AL-101 are not identified, but are certainly comprised in the alcoholic fraction.^{7,23}

In this study, re-testing with AL-101 induced positive patch tests in 8 of 10 CA subjects. We also observed significant variations in the strength of the patch test reactions between the initial response at diagnosis and the present investigation, with only two subjects (instead of six) developing a strong positive (++) patch test reaction at the highest AL-101 concentration. Such findings are not unexpected, as several studies have already reported variability in patch test results to AL-101 or lanolin alcohol.^{3,11,24} This phenomenon has also been described for other contact allergens like metal salts—gold, cobalt, aluminium, palladium, and nickel^{25–28}—but also non-metals such as formaldehyde, fragrance mixes, and eugenol.^{29–33} Multiple methodological reasons are available to explain differences in test reactivity over time for the same preparation: (1) differential skin adherence of the patch test, (2) different amounts or distribution of the substance in the chamber,¹⁶ (3) differences in test reading (here, readings were performed on day [D]3 only), and also (4) seasonal factors.³⁴ Alternatively, (5) variation in individual skin sensitivity²⁵ or (6) the presence of high concentrations of mineral oils or contaminants (such as detergent) in AL-101 mixture may have caused irritancy, leading to false-positive patch test reactions during the initial test explorations.^{5,12,35,36}

To diagnose individuals with true allergic reactions, we then re-tested subjects with dilution series. Serial dilution patch testing is often recommended when the diagnosis of CA is problematic.¹⁶ Hence, it is considered that the strength of allergic reactions gradually reduces with decreasing concentration, whereas a false-positive irritant reaction disappears abruptly when the concentration is lowered. Here, we observed significant variations in patch test reactivity during serial dilutions, with one subject (A3) reacting negatively to all dilutions of AL-101 below 100%, whereas four of the subjects (A7–A10) reacted even to the low AL-101 [10%] concentration, supporting the finding of AL-101 as a true hapten in the latter (15).

Of note, the commercially available test preparation for AL-101 is classically [50% pet]. Increasing the maximal AL-101 concentration to 100% in dilution series allowed us to confirm patch test positivity in

five subjects (A4, A5, A6, A7, and A8) who developed doubtful reactions at 50% pet., and also to detect reactivity (albeit false positive) in subject A3. Thus, increasing the AL-101 concentration from 50% pet. to 100% (40 mg/cm²) increases patch test sensitivity, but with the risk of producing a false-positive reaction, as described in our transcriptomic study. The decision on optimal patch test concentration (actually dose in mg/cm²) is tricky because considerations have to be taken on the significance of a false-negative reaction due to a too low test dose vs a false-positive reaction due to a too high test dose. Knowledge on the clinical relevance of a positive reaction at patch testing with 100% and negative at 50%, would help the decision-making concerning test concentration for AL-101. This knowledge is presently missing.

4.2 | The molecular signatures of Amerchol-induced reactions

Our gene profiling study demonstrated that the molecular pathways that are activated in response to Amerchol application largely overlapped with the pathways found in the skin of allergic individuals patch tested with reference allergens, such as nickel, methylisothiazolinone, linalool hydroperoxide,¹⁴ or para-phenylenediamine and epoxy resin-bisphenol-A.³⁷ Recently, Dhingra et al. suggested that molecule-dependent profiles could exist between contact allergens, and they reported that a significant T_H2 bias with T_H22 polarization characterized the responses induced by molecules such as fragrances, whereas type-1/type-17 phenotypes predominated for molecules like nickel.³⁸ Although we detected several DEGs that were most prominently modulated in the Amerchol-induced response, none of these DEGs was related to a specific inflammatory pathway susceptible to typify the Amerchol inflammation. In contrast, several of the pathways and biomarkers common to Amerchol and other reference allergens were linked to the activation of the adaptive immunity and cytotoxic CD8+ T cells (CTLs), suggesting that AL-101-induced inflammation is also characterized by the infiltration of activated cytotoxic CD8+ T lymphocytes in a majority of the patch tested subjects. Hapten-specific CTLs have long been considered to be the primary effector cells responsible for the formation and recurrences of ACD lesions.

4.3 | The interest of gene profiling to strengthen clinical diagnosis

Beyond an in-depth characterization of Amerchol-induced inflammation, our results also illustrated the value of gene profiling to help to strengthen clinical diagnosis. Indeed, we observed a significant correlation between the magnitude of patch test reactivity and the induction (differential gene expression) of our set of core allergy biomarkers. Similar correlations were also noted with the applied dose. Hence, several of the doubtful (+/-) reactions induced in the AL-101 dilution series (notably for subject A7) expressed a clear allergy signature, but with a low intensity (Figures 3-5 and S1-S2). This indicates that doubtful and weakly positive patch test reactions to

Amerchol, which are much more prevalent in the clinic than the stronger (++) reactions,^{8,39} should not be overlooked by clinicians and considered nonallergic, because they can be infiltrated by low numbers of hapten-specific effector T cells.

On the other hand, we detected a clear positive (+) patch test to AL-101 [100%] in subject A3, but with no/very mild allergy signature in subject biopsy. We detected a weak increase in T cell transcripts, such as CD3D, TRAT1, THEMIS, CD2, or CD69, but no upregulation for markers associated with cytotoxicity (Granzyme B, Granzyme A, Granulysin, IFNG) (Figure 3). In contrast, in this subject, inflammation may have been induced by the activation of innate immunity, as we detected a significant upregulation of several DEGs associated with the GO term "inflammatory pathways," including DEGs coding for the chemokines IL-8, CCL17, CCL19, and CCL20; the matrix metalloproteinase MMP9; or the S100 family proteins S100A7, S100A7A, S100A8, and S100A9 (Table S2). Coupled with the fact that this subject failed to react to dilution series, this suggests that subject A3 is probably not sensitized to AL-101, but she developed irritancy to AL-101 during patch testing, which translated into a + (yet false-positive) patch test reaction.

4.4 | The complexity of the diagnosis of lanolin allergy

Uldahl et al. recently conducted a repeated-open application test (ROAT) study with three different lanolin-containing creams to assess the clinical relevance of Amerchol-induced PT reactions.⁴⁰ Twelve of the 15 subjects analyzed here (with the exception of subjects A2, A4, and A7) participated in the ROAT study. Confirming previous works,^{3,11,24} it was observed that none of the participants with positive patch test to AL-101 had any skin reactions during ROAT. It is always difficult to determine whether the lanolin markers used for patch testing, such as AL-101, are representative of the lanolin derivatives encountered in daily-life products. Therefore, it would be interesting in a future study to characterize and compare the molecular signatures of contact dermatitis lesions induced by repeated or prolonged topical exposure to lanolin-containing products, with those of AL-101- or lanolin-induced PT reactions. The identification of a CA signature in active lesions could help clinicians to better understand the nature and the clinical relevance of the lanolin-induced inflammation, particularly in subjects with atopic dermatitis (AD), where the differential diagnosis is complicated by the presence of an underlying disease. Recent promising gene profiling works have shown that CA signatures to reference allergens such as nickel segregate from those of other types of dermatoses, such as AD or psoriasis.^{37,41}

4.5 | Limitations of the study

Despite well-matched recruitment, this study included only a limited number of subjects: 10 subjects with previous positive patch test reactions to AL-101 and 5 control subjects. Thus, it will be interesting to extend our results to a larger cohort.

Another important limitation of our study is related to the use of molecular profiling for the diagnosis of CA, which is still in its infancy. Hence, to date, no clinical studies have accurately determined the performance (ie, sensitivity and specificity) of these approaches. As our study shows, the mean induction of the 52 core allergy genes is sometimes only slightly different from the data obtained from the skin lesions of patients with “positive” patch test reactions to reference irritants, as illustrated in subject C5 in Figure 4. For this subject, a substantial transcript upregulation was detected for several of the 52 DEGs (Figure 3). However, it was difficult to state with certainty, based on the mean gene induction level, whether the molecular response was an allergic reaction or not (Figure 4 and Table 1). Of note, the five genes selected for qRT-PCR validation, and that are relevant for ACD pathophysiology, were negative for this subject (Figures 5 and S2). Thus it will be crucial to determine in future studies the gene induction thresholds that accurately discriminate weak allergic reactions from false-positive responses. This will require combined assays of patch tests and ROATs performed with the same culprit molecule(s), as well as in-depth molecular profiling.

5 | CONCLUSION

In conclusion, this study confirms that AL-101 is an allergen that can cause both CA and contact irritation. In addition, our results also highlight that molecular profiling could open important avenues to guide the development of future diagnostic approaches to improve the diagnosis of lanolin allergy.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Inese Hauksson and Nils Hamnerius for their skillful assistance.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Linda Ljungberg Silic: Formal analysis (lead); investigation (lead); methodology (equal). **Marine-Alexia Lefevre:** Formal analysis (lead); investigation (lead); methodology (equal). **Ola Bergendorff:** Investigation (equal); writing – review and editing (equal). **Simon De Bernard:** Formal analysis (equal); methodology (equal); software (equal). **Julien Nourikyan:** Formal analysis (equal); methodology (equal); software (equal). **Laurent Buffat:** Formal analysis (equal); methodology (equal); software (equal). **Audrey Nosbaum:** Investigation (equal). **Magnus Bruze:** Investigation (equal); writing – review and editing (equal). **Jean-François Nicolas:** Conceptualization (equal); supervision (equal); writing – review and editing (equal). **Cecilia Svedman:** Conceptualization (lead); investigation (equal); project administration (equal); supervision (lead). **Marc Vocanson:** Conceptualization (lead); formal analysis (equal); project administration (equal); supervision (lead).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are openly available in Gene Expression Omnibus at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, reference number GSE169573.

ORCID

Linda Ljungberg Silic  <https://orcid.org/0000-0001-5401-2435>
Marine-Alexia Lefevre  <https://orcid.org/0000-0003-1257-2578>
Simon De Bernard  <https://orcid.org/0000-0002-3390-0924>
Julien Nourikyan  <https://orcid.org/0000-0001-9943-1326>
Laurent Buffat  <https://orcid.org/0000-0002-8906-1445>
Audrey Nosbaum  <https://orcid.org/0000-0003-2281-9052>
Magnus Bruze  <https://orcid.org/0000-0002-2919-3227>
Jean-François Nicolas  <https://orcid.org/0000-0003-4204-803X>
Cecilia Svedman  <https://orcid.org/0000-0003-4797-0269>
Marc Vocanson  <https://orcid.org/0000-0002-0181-8862>

REFERENCES

- Schlossman ML, McCarthy JP. Lanolin and derivatives chemistry: relationship to allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1979;5(2):65-72. doi:10.1111/j.1600-0536.1979.tb04801.x
- Matthieu L, Dockx P. Discrepancy in patch test results with wool wax alcohols and Amerchol L-101. *Contact Dermatitis*. 1997;36(3):150-151. doi:10.1111/j.1600-0536.1997.tb00398.x
- Lee B, Warshaw E. Lanolin allergy: history, epidemiology, responsible allergens, and management. *Dermatitis*. 2008;19(2):63-72.
- Loden M, Maibach HI. *Dry Skin and Moisturizers: Chemistry and Function*. CRC Press; 1999.
- Wakelin SH, Smith H, White IR, Rycroft RJ, McFadden JP. A retrospective analysis of contact allergy to lanolin. *Br J Dermatol*. 2001;145(1):28-31. doi:10.1046/j.1365-2133.2001.04277.x
- Warshaw EM, Nelsen DD, Maibach HI, et al. Positive patch test reactions to lanolin: cross-sectional data from the north american contact dermatitis group, 1994 to 2006. *Dermatitis*. 2009;20(2):79-88.
- Miest RYN, Yiannias JA, Chang YHH, Singh N. Diagnosis and prevalence of lanolin allergy. *Dermatitis*. 2013;24(3):119-123. doi:10.1097/DER.0b013e3182937aa4
- Fransen M, Overgaard LEK, Johansen JD, Thyssen JP. Contact allergy to lanolin: temporal changes in prevalence and association with atopic dermatitis. *Contact Dermatitis*. 2018;78(1):70-75. doi:10.1111/cod.12872
- Kligman AM. Lanolin allergy: crisis or comedy. *Contact Dermatitis*. 1983;9(2):99-107. doi:10.1111/j.1600-0536.1983.tb04314.x
- Matiz C, Jacob SE. The lanolin paradox revisited. *J Am Acad Dermatol*. 2011;64(1):197. doi:10.1016/j.jaad.2010.07.047
- Knijp J, Bruynzeel DP, Rustemeyer T. Diagnosing lanolin contact allergy with lanolin alcohol and Amerchol L101. *Contact Dermatitis*. 2019;80(5):298-303. doi:10.1111/cod.13210
- Geier J, Uter W, Pirker C, Frosch PJ. Patch testing with the irritant sodium lauryl sulfate (SLS) is useful in interpreting weak reactions to contact allergens as allergic or irritant. *Contact Dermatitis*. 2003;48(2):99-107. doi:10.1034/j.1600-0536.2003.480209.x
- Geier J, Uter W, Lessmann H, Schnuch A. The positivity ratio—another parameter to assess the diagnostic quality of a patch test preparation. *Contact Dermatitis*. 2003;48(5):280-282. doi:10.1034/j.1600-0536.2003.00033.x
- Lefevre MA, Nosbaum A, Rozieres A, et al. Unique molecular signatures typify skin inflammation induced by chemical allergens and irritants. *Allergy*. 2021;76(12):3697-3712. doi:10.1111/all.14989
- Fregert S, Fregert S. *Manual of Contact Dermatitis*. 2nd ed. Munksgaard, Copenhagen: Year Book Medical Publishers, Inc;

1981. Chapter 10, Patch Testing; pp. 71–81. Accessed June 16, 2021. google scholar
16. Johansen JD, Aalto-Korte K, Agner T, et al. European Society of Contact Dermatitis guideline for diagnostic patch testing - recommendations on best practice. *Contact Dermatitis*. 2015;73(4):195-221. doi:10.1111/cod.12432
 17. Huber W, von Heydebreck A, Sültmann H, Poustka A, Vingron M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics*. 2002;18(Suppl 1):S96-S104. doi:10.1093/bioinformatics/18.suppl_1.s96
 18. Talloen W, Clevert DA, Hochreiter S, et al. l/NI-calls for the exclusion of non-informative genes: a highly effective filtering tool for microarray data. *Bioinformatics*. 2007;23(21):2897-2902. doi:10.1093/bioinformatics/btm478
 19. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4(2):249-264. doi:10.1093/biostatistics/4.2.249
 20. Pinheiro JC, Bates DJ, DebRoy S, Sakar D. *The nlme Package: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models, R Version 3 Vol 6*; CRAN. R-project; 2012.
 21. Lenth RV. Least-squares means: the R package lsmeans. *J Stat Soft*. 2016;69(1):1-33. doi:10.18637/jss.v069.i01
 22. Bauer S, Gagneur J, Robinson PN. GOing Bayesian: model-based gene set analysis of genome-scale data. *Nucl Acids Res*. 2010;38(11):3523-3532. doi:10.1093/nar/gkq045
 23. Fregert S, Dahlquist I, Trulsson L. An attempt to isolate and identify allergens in lanolin. *Contact Dermatitis*. 1984;10(1):16-19. doi:10.1111/j.1600-0536.1984.tb00054.x
 24. Gollhausen R, Przybilla B, Ring J. Reproducibility of patch tests. *J Am Acad Dermatol*. 1989;21(6):1196-1202. doi:10.1016/s0190-9622(89)70329-7
 25. Hindsén M, Bruze M, Christensen OB. Individual variation in nickel patch test reactivity. *Am J Contact Dermat*. 1999;10(2):62-67. doi:10.1016/s1046-199x(99)90001-5
 26. Masjedi K, Bruze M, Hindsén M, Minang J, Ahlborg N. Is the variability of nickel patch test reactivity over time associated with fluctuations in the systemic T-cell reactivity to nickel? *Br J Dermatol*. 2009;161(1):102-109. doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09182.x
 27. Rosholm Comstedt L, Engfeldt M, Svedman C, Åkesson A, Hindsén M, Bruze M. Variation and covariation in patch test reactivity to palladium and nickel salts. *Eur J Dermatol*. 2018;28(5):668-676. doi:10.1684/ejd.2018.3423
 28. Siemund I, Mowitz M, Zimerson E, Bruze M, Hindsén M. Variation in aluminium patch test reactivity over time. *Contact Dermatitis*. 2017;77(5):288-296. doi:10.1111/cod.12836
 29. Engfeldt M, Tillman C, Hindsén M, Bruze M. Variability in patch test reactivity over time, falsely indicating patch test sensitization, in a patient tested with palladium salts. *Contact Dermatitis*. 2012;67(2):109-111. doi:10.1111/j.1600-0536.2012.02086.x
 30. Svedman C, Engfeldt M, Api AM, et al. A pilot study aimed at finding a suitable eugenol concentration for a leave-on product for use in a repeated open application test. *Contact Dermatitis*. 2012;66(3):137-139. doi:10.1111/j.1600-0536.2011.02041.x
 31. Hauksson I, Pontén A, Gruvberger B, Isaksson M, Engfeldt M, Bruze M. Skincare products containing low concentrations of formaldehyde detected by the chromotropic acid method cannot be safely used in formaldehyde-allergic patients. *Br J Dermatol*. 2016;174(2):371-379. doi:10.1111/bjd.14241
 32. Bruze M, Engfeldt M, Ofenloch R, et al. Validation of a questionnaire algorithm based on repeated open application testing with the constituents of fragrance mix I. *Br J Dermatol*. 2020;182(4):955-964. doi:10.1111/bjd.18224
 33. Bruze M, Engfeldt M, Elsner P, et al. Validation of questionnaire algorithm based on repeated open application testing with the constituents of fragrance mix II: the EDEN fragrance study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2021;35(8):1692-1701. doi:10.1111/jdv.17315
 34. Bruze M. Seasonal influence on routine patch test results. *Contact Dermatitis*. 1986;14(3):184. doi:10.1111/j.1600-0536.1986.tb01206.x
 35. Carmichael AJ, Foulds IS, Bransbury DS. Loss of lanolin patch test positivity. *Br J Dermatol*. 1991;125(6):573-576. doi:10.1111/j.1365-2133.1991.tb14797.x
 36. Edman B, Möller H. Testing a purified lanolin preparation by a randomized procedure. *Contact Dermatitis*. 1989;20(4):287-290. doi:10.1111/j.1600-0536.1989.tb03147.x
 37. Fortino V, Wisgrill L, Werner P, et al. Machine-learning-driven biomarker discovery for the discrimination between allergic and irritant contact dermatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(52):33474-33485. doi:10.1073/pnas.2009192117
 38. Dhingra N, Shemer A, Correa da Rosa J, et al. Molecular profiling of contact dermatitis skin identifies allergen-dependent differences in immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(2):362-372. doi:10.1016/j.jaci.2014.03.009
 39. Löffler H, Becker D, Brasch J, Geier J. German contact dermatitis research group (DKG). Simultaneous sodium lauryl sulphate testing improves the diagnostic validity of allergic patch tests. Results from a prospective multicentre study of the German contact dermatitis research group (deutsche Kontaktallergie-Gruppe, DKG). *Br J Dermatol*. 2005;152(4):709-719. doi:10.1111/j.1365-2133.2004.06465.x
 40. Uldahl A, Engfeldt M, Svedman C. Clinical relevance of positive patch test reactions to lanolin- a ROAT study. *Contact Dermatitis*. 2021;84(1):41-49. doi:10.1111/cod.13689
 41. Quaranta M, Knapp B, Garzorz N, et al. Intraindividual genome expression analysis reveals a specific molecular signature of psoriasis and eczema. *Sci Transl Med*. 2014;6(244):244ra90. doi:10.1126/scitranslmed.3008946

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Ljungberg Silic L, Lefevre M-A, Bergendorff O, et al. Gene profiling reveals a contact allergy signature in most positive Amerchol L-101 patch test reactions. *Contact Dermatitis*. 2022;87(1):40-52. doi:10.1111/cod.14077

Article 3 : Detection of skin allergy biomarkers for point of care diagnosis of contact dermatitis

Les deux études précédentes ont permis d'identifier des biomarqueurs moléculaires d'allergie et d'irritation à partir de réactions positives à des patch tests pour des allergènes et irritants de référence. Néanmoins, cela reste un modèle clinique expérimental qui ne tient pas compte des potentiels variabilités en fonction de la cinétique de la réaction clinique. Une molécule exprimée à 72h du début de l'inflammation ne le sera peut-être plus une fois ce délai dépassé ? Ainsi, ces résultats sont-ils transposables à l'analyse de lésions cliniques d'EC ?

L'objectif de cette 3^e étude était donc de comparer les signatures moléculaires des lésions actives d'eczéma de contact à celles identifiées dans les réactions positives de patch test afin de déterminer si le même profil de biomarqueurs était exprimé. Cela nous a par ailleurs permis d'étudier le caractère prédictif de ces biomarqueurs, dans un but de validation clinique.

Pour cela, nous avons étudié l'expression de 12 biomarqueurs, validés dans la première étude, par qRT-PCR dans les lésions d'eczéma de 25 patients adressés pour bilan étiologique devant une suspicion d'eczéma de contact. Le diagnostic d'ECA a ensuite été établi sur la base des résultats des tests épicutanés et de l'analyse de leur pertinence (évaluation des expositions environnementales +/- ROAT test). Les signatures moléculaires des lésions actives ont été comparées à celles des allergènes et des irritants de référence. En cas de patch test positif pertinent chez ces patients, nous avons également étudié la signature moléculaire de la réaction afin de la mettre en parallèle avec celle de la lésion active correspondante.

Nos résultats ont montré que :

- (i) Les lésions actives et celles des patch tests des patients atteints d'ECA présentent le même profil de biomarqueurs d'allergie et les mêmes niveaux d'induction génique.
- (ii) 100 % des patients pour qui le diagnostic d'ECA a été confirmé présentaient une signature d'allergie dans leurs lésions actives.
- (iii) Certains patients montrant une signature d'allergie dans leurs lésions actives ont présenté un bilan allergologique négatif.
- (iv) La majorité des patients pour qui le diagnostic d'ECA n'a pas été retenu ne présentaient aucune signature d'allergie dans leurs lésions cliniques initiales.

Ainsi, l'étude des signatures moléculaires dans les lésions actives pourraient ainsi renforcer le diagnostic d'ECA, et ouvre la voie au développement de nouveaux outils diagnostiques. Cela permettrait en outre de modifier les pratiques actuelles de processus diagnostique en sélectionnant les patients à adresser en centre spécialisé pour la réalisation de bilan de contact.

Cette dernière étude soulève néanmoins plusieurs questions de faisabilité : 1) quel type de test de diagnostic rapide est-il possible de développer ? 2) Quelle technologie utilisée ? 3) Quelle méthode de prélèvement privilégier ?

Par ailleurs, la détection d'une signature d'allergie robuste chez des patients ayant présenté un bilan allergologique négatif dans les suites pose également quelques questions : 4) L'allergène responsable des lésions a-t-il été raté au cours du processus diagnostique par patch tests ? 5) Ces patients présentent ils d'autres dermatoses inflammatoires sous-jacentes ayant conduit à une interprétation faussement positive ?

L'ensemble de ces questions restent donc à aborder dans des études cliniques futures avant de pouvoir envisager une mise en pratique courante de ce type de test.

Detection of skin allergy biomarkers for point of care diagnosis of contact dermatitis

Marine-Alexia LEFEVRE MD¹, Audrey NOSBAUM MD/PhD¹⁻², Amandine MOSNIER MSc¹, Vanina LENIEF MSc¹, Samuel SALQUE MSc¹, Florence HACARD MD², Fanny BOISLEVE PharmD/PhD³, Michelle ELBAZ PharmD³, Jean-François NICOLAS MD/PhD¹⁻², Marc VOCANSON PhD¹

Affiliations:

¹ CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, (Team Epidermal Immunity and Allergy); INSERM, U1111; Univ Lyon; Université de Lyon 1; Ecole Normale Supérieure de Lyon; CNRS, UMR 5308, Lyon, France.

² Department of Allergy and Clinical Immunology, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Benite, France.

³ Chanel, Neuilly-sur-Seine, France.

Corresponding author:

Marc Vocanson, CIRI-INSERM U1111, 21 avenue Tony Garnier 69007 Lyon, France
Tel: +33 437 28 23 48; e-mail address: marc.vocanson@inserm.fr

Running title: Molecular diagnosis of allergic contact dermatitis

Funding statement: Grant was obtained from Chanel (Neuilly-sur-Seine, France) to help the realization of this work.

Disclosure statement: The authors declare no competing financial interests.

Word count= 3470 words

Figure count= 3 figures

Table count= 1 table

Abstract

Background: Contact Dermatitis (CD) is a one of the most common inflammatory skin diseases. Distinguishing the different types of CD, especially allergic CD (ACD) versus non-allergic forms, including irritant CD (ICD) is often challenging and requires additional investigations based on patch-testing. Early detection of relevant allergy biomarkers in active CD lesions could help to refine and simplify the management of CD patients.

Objective: To characterize the molecular signatures of active CD lesions.

Methods: We studied the expression of 12 allergy biomarkers (identified in a recent transcriptomic study) by qRT-PCR in eczema lesions of 25 CD patients. ACD diagnosis was established on patch-test (PT) results and through exposure assessment. Molecular signatures of active lesions, as well as positive patch test reactions, were compared to those of reference chemical allergens and irritants.

Results: 12 of the 25 CD patients reacted positively upon patch-testing and exposure assessment confirmed ACD diagnosis for 10 of them. The remaining 13 patients did not react to any of the allergens tested. Gene profiling of active CD lesions revealed two distinct molecular patterns: patients harboring signatures similar to reference allergens (n=16), or to irritants (n=9). Among the 16 patients with an “allergy signature”, we found the 10 patients with confirmed ACD, and 6 other subjects for whom it was not possible to identify the culprit allergen. In contrast, the 9 other patients had negative PT, suggesting that these patients developed non-allergic CD reactions.

Conclusions: Molecular signatures from active lesions could help to stratify patients and open new avenues for the development of a future point care diagnosis of CD.

Keywords: Allergic contact dermatitis, irritant contact dermatitis, molecular signature, transcriptomic profiling, biomarkers, point of care diagnosis

Abbreviations

ACD: Allergic contact dermatitis

CD: Contact dermatitis

Fc: Fold change

EBS: European Baseline Serie

GZMB: Granzyme B

GNLY: Granulysin

ICD: Irritant contact dermatitis

IFNG: Interferon gamma

IGFL-3: Insulin-like growth family member 3

PCA: Principal Component Analysis

PLEK: Pleckstrin

PT: Patch test

qRT-PCR: Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

Introduction

Contact Dermatitis (CD) is one of the most common inflammatory skin diseases (1,2) and ranks first among occupational diseases in many European countries (3). CD is induced by repeated contact of individuals with environmental chemicals and includes allergic (ACD) and irritant (ICD) forms, depending on the immunological mechanism involved. ICD is a nonspecific inflammatory dermatitis caused by the pro-inflammatory properties of chemicals that trigger activation of the innate immune system (4), whereas ACD is characterized by a delayed type IV hypersensitivity response mediated by allergen-specific T cells in sensitized individuals (5). Although ICD and ACD involve different pathophysiologic mechanisms (6,7), their clinical presentation is similar, and distinguishing between both types of CD is often challenging and requires additional investigations (8).

Diagnosis relies on clinical examination, exposure assessment and patch testing, which is the gold standard for identifying contact allergens in ACD. ICD is a diagnosis of exclusion. Patch testing is a time-consuming process and requires adequate training to correctly read and interpret the results. Patch testing is only performed by a limited number of expert centres across Europe. This limits the accessibility of suspected ACD patients to diagnosis. Therefore, there is now an urgent need for new *ex vivo/in vitro* tools based on the modern understanding of the immune mechanisms of ACD to enhance the diagnostic procedure.

We recently performed an extensive analysis of the transcriptomic signatures of positive patch test (PT) reactions to several reference chemical allergens and irritants (9). This work allowed us to identify a small panel of skin biomarkers (CD8A, CD4, GLNY, GZMB, CD69, INFG, CXCL10, HLA-DRA, GPR183, PLEK, IL-15 and IGFL3) which accurately discriminates between allergen- and irritant-induced contact dermatitis (9). We observed that the detection level of the biomarkers in the positive PT lesions of patients sensitized to different chemical allergens correlated very well with the intensity of the skin reaction, as well as with the amount of molecule applied to the skin (9,10). More importantly, this gene profiling approach allowed us to identify patients with false positive PT reactions, i.e. patients whose PT reactions did not show any “allergy signature” (9,10). Gene profiling of skin lesions may therefore be of great support to improve the sensitive and reliable diagnosis of skin allergy.

Alternatively, we still don't know whether this panel of allergy biomarkers is expressed in the active lesions of patients with ACD. Currently, it is estimated that only 20% of patients referred for allergology workups suffer from true skin allergy, whereas ICD accounts for 80% of cases of CD. Therefore, the detection of ACD biomarkers in active eczema lesions could provide clinicians with major information to accelerate their clinical diagnosis and select only

those patients with the ACD signature to be sent toward expert PT centers for identification of the culprit allergen(s).

In this study, we enrolled 25 CD patients. All the patients were sent for patch-testing (PT) before we compared gene profiling responses in active and positive PT lesions. Our results showed that 100% of patients with confirmed ACD, i.e. developing clinically relevant positive PTs, exhibited a strong “allergy signature” in their active lesions.

Methods

Patients and diagnosis procedure

25 patients with active lesion of contact dermatitis (CD) were enrolled in the study after being referred to the Allergology and Clinical Immunology Department, University Hospital Lyon-Sud (France), or the Dermatology and Allergology Department, University Hospital St Etienne (France) for routine diagnosis of CD.

ACD and non-ACD diagnosis was made based on clinical examination, exposure assessment and allergological tests (patch-tests).

Patch testing

Patch testing was performed using IQ Ultra chambers (Chemotechnique Diagnostics, Grasse, France). Patch tests were removed at 48h and test reactions were scored at 72 hours in accordance with International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) criteria and European Society of Contact Dermatitis (ESCD) guidance: - negative reaction; +/- doubtful reaction (erythema only, no infiltration); 1+ weak positive reaction (redness, induration, and possibly papules); 2+ positive reaction (erythema, induration, papules, and vesicles); 3+ strong positive reaction (intense erythema, induration, and coalescing vesicles).

Patients were all patch tested with the European Baseline Serie (Chemotechnique Diagnostics, Grasse, France) that consists of 40 allergens formulated in petrolatum; excepted for 7 allergens which are formulated in an aqueous vehicle. Vehicle (petrolatum and saline solution) patch tests were also applied as control. For some patients, based on clinical history, personal products and several other series were patch-tested (including cosmetic, epoxy, fragrance, hairdressing, acrylate, adhesive, plastic, glue, shoes and gloves series (Chemotechnique Diagnostics, Grasse, France)).

Skin samples

Biopsies (3x3 mm) were collected from lesional skin (active lesion of CD), as well as from control areas (nonlesional skin). In case of positive skin patch-test, new biopsies were collected from positive patch-tests and control area (vehicle-treated skin).

qRT-PCR

Total RNA was extracted from skin biopsies using the Qiagen RNeasy Mini Kit (Courtaboeuf, France), and contaminating DNA was removed using the DNA-Free™ DNA Removal kit

(Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The RNA was reverse-transcribed into double-stranded copy DNA (cDNA) and qRT-PCR investigations were performed using a StepOnePlus PCR system (ThermoFisher, Villebon-sur-Yvette, France) and primers from Qiagen (Courtaboeuf, France) for CXCL10, CD69 and GNLY: QuantiTect Primer Assays; or produced by Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France) for CD8A, CD4, IFNG, GZMB, HLADRA, GPR183, PLEK, IL15, IGFL3, ACTIN, GAPDH – designed using the publicly Universal Probe Library Assay Design Center (https://lifescience.roche.com/en_fr/brands/universal-probe-library.html#assaydesign-center). All the primers used are listed in **Tab.E1**.

Analysis of qRT-PCR data

Expression values for each mRNA transcript were normalized to values obtained for housekeeping genes (ACTIN and GAPDH), and results from active lesions and positive PT samples were presented as fold-change (Fc) versus nonlesional skin and vehicle-treated skin respectively.

Statistical analysis of qRT-PCR data

Statistical analyses were performed using the R software version 4.0.4.

In Fig.2, mRNA expression data were analyzed for each biomarker and each sample. Results were expressed as fold change (Fc) expression data with median. Wilcoxon test and Kruskal-Wallis one-way analysis were then used for multiple comparisons between group levels.

$P < 0.05$ was considered as statistically significant.

In Fig.3, PCA of differential expression was performed with CD8A, CD4, GNLY, GZMB, CD69, IFNG, CXCL10, HLA-DRA, GPR183, PLEK, IL-15 and IGFL3 Fc data neither centered nor scaled, using function `prcomp` from package `stats`. To investigate the nature of the CD response, Fc data were projected in a PCA generated using coordinates from previous study (9).

Study approval

Local ethical committee approved the study. Written informed consents were obtained from each participant.

Results

ACD diagnosis in CD patients

25 patients (13 females and 12 males; aged 20–84 years, median 32 years) consulting for routine CD diagnosis were enrolled in this study. After a thorough interview to determine clinical history and exposure assessment, active lesions were photographed and biopsied, and patients were referred to an expert center for comprehensive allergy work-ups using series of reference allergens and personal products. The diagnosis of ACD or non-ACD was established on the basis of PT results and clinical relevance to exposure assessment. Only relevant 72 hour-positive skin tests were further photographed and biopsied.

Clinical characteristics of the patients and PT results are detailed in **Tab.1**, and representative pictures of active and positive PT lesions are shown in **Fig.1**.

A wide range of skin lesion locations was observed, with lesions affecting the hands (n=12), arms (n=3), faces (n=3), axillaries (n=2), as well as the chest, back, ankle or scalp (all, n=1). 7 of these CD reactions were associated with a history of atopy (including 2 hand reactions).

Overall, 12 patients of the 25 CD patients developed positive PT reactions and clinical history and exposure assessment confirmed ACD diagnosis for 10 of them (P1, P2, P3, P14, P20, P26, P28, P39, P41 and P43). The nature of culprit allergens was very diverse including fragrances (cinnamyl alcohol, fragrance mix 1), cosmetics (propolis cream), dyes (paraphenylenediamine, n=2), preservatives (methylisothiazolinone), metals (nickel), resins (epoxy resin), drugs (betamethazone) and an unidentified allergen contained in leather shoes. Note that 2 patients (P4 and P24) had positive PT to lanoline and budesonide, but we could not associate any clinical relevance to these 2 molecules.

The remaining 13 patients did not react to any of the allergens tested, suggesting no allergic etiology for their skin lesions.

Therefore, clinicians concluded that 15 patients were negative for ACD diagnosis, and 10 patients suffered from ACD.

The biopsies collected in respective patients were then categorized into three groups: (i) active ACD lesion (ACD), (ii) positive PT lesion from ACD patients (PT+) and (iii) active lesion from negative PT patient (No ACD).

Active and PT lesions of ACD patients showed the same profile of allergy biomarkers and the same levels of gene induction

We next studied the expression of 12 allergy biomarkers (IGFL3, HLA-DRA, GPR183, PLEK, IL-15, CD69, CD8, GZMB, GNLN, CD4, IFNG and CXCL10) identified in a previous study by our group (9), in each lesional sample by qRT-PCR. Gene inductions were compared with those in control skin (including non-lesional and petrolatum patch-tested areas), and the results were expressed as fold-change (Fc, defined as the ratio of gene expression in lesional to control skin) to compensate for donor-induced variability.

As expected, despite substantial variations between patients, we observed a strong induction ($Fc > 2$) of the different allergy genes in the lesional skin of almost all PT samples, with the exception of IGFL3, which is classically down-regulated, and CD4 whose induction was relatively low compared with controls (**Fig.2**).

Gene expressions were also significantly up-regulated (or down-regulated for IGFL3), in the active lesions of the 10 patients diagnosed for ACD, with the exception of CD4, CD8, IFNG, CXCL10, CD69, IL15 genes up-regulated in approximately 50% of patient samples. Hence, no statistical differences were detected when we compared the “ACD” and “PT” groups of samples (**Fig.2**).

In contrast, no or low gene inductions were detected in a majority of the active lesions of the 15 patients with negative PTs, with the exceptions of the samples of patients P4, P9, P11, P13 or P18, in which some genes were substantially up-regulated (**Fig.2**). This time, all biomarker inductions statistically discriminated between the “No ACD” and “PT+” groups, with the exception of IFNG (**Fig.2**). In addition, expression of IGFL3, HLA-DRA, GPR183, PLEK, GNLN, CD4 and at less extend CD8 ($p=0.062$) and GZMB ($p=0.091$), both at the limit of statistical significance, but not IL15, CD69, CXCL10 and IFNG, discriminated between the “ACD” and the “No ACD” groups (**Fig.2**).

Altogether, these results indicated that active and PT lesion samples from ACD patients express the same profile of allergy biomarkers and the same levels of gene induction. They also demonstrated that patients, for whom no diagnosis of ACD was firmly established by clinicians, generally had no or low biomarker induction in their active lesions. However, substantial variations were reported in a few samples, which raised questions about the nature of the skin reaction in these patients.

All patients with confirmed ACD showed a strong “allergy signature” in their active skin lesion

To go further, we then investigated whether by combining the expression of the 12 biomarkers it was possible to stratify the different active lesion samples. More than the

induction of a single gene, the yield of the expression of the 12 Fc biomarkers defines the “allergy signature” of each patient. The latter were compared with signatures obtained from reference chemical allergens and irritants (9). For this purpose, we generated a principal component analysis (PCA) using the Fc data from a previous study, in which we compared the qRT-PCR signatures of positive PT reactions to reference chemical allergens and irritants (9). The PCA is characterized by two distinct areas, which discriminate signatures corresponding to chemical allergens (blue confidence ellipse) and those from irritants (red confidence ellipse), with an overlapping section. The Fc data from the three groups of samples were then projected in this PCA (**Fig.3 and Fig.E1**).

The projections of the samples from the active and PT lesions of the 10 ACD patients fell into the chemical allergen and not into the irritant ellipse (**Fig.E1**). Interestingly, we observed that active and PT samples from each ACD patient had relatively closed PCA coordinates, except for patients P14 and P20.

We next examined the projections of the active lesion samples of the 15 patients with negative PTs, that were defined as “no ACD”. Compared with their “ACD” counterparts, the projections of 9 of them (patients P5, P7, P15, P16, P19, P21, P25, P34, P37) fell into the irritant ellipse, 4 into the overlapping section (patients P9, P13, P18 and P24), and 2 into the chemical allergen ellipse (patients P4 and P11, **Fig.3**).

These results thus confirm that the active and PT lesions of all the ACD patients were characterized by a comparable “allergy signature”. Furthermore, they indicate that, while the majority (9/15, i.e. 60%) of the ACD-negative patients did not show any allergy features in their active skin lesions, 40% (6/15) of them had a weak (4/15, 27%) or a strong (2/15, 13%) “allergy signature”. This suggests that these patients have ACD but we failed to identify the culprit allergen.

Discussion

The main objective of our study was to characterize the molecular responses induced in the active lesions of patients suspected for ACD; and to determine whether the gene expression level of specific set of allergy biomarkers in these lesions can be used to predict for the allergy status of these patients. Our results demonstrated that active as well as PT lesions of ACD patients displayed a comparable “allergy signature”, with a strong induction of different biomarkers such as HLA-DRA, GPR183, PLEK, IL-15, CD69, CD8, GZMB, GLNY, CXCL10, INFG, and at less extent CD4, whose induction was relatively low compared to controls, as well as down-regulation of IGFL3. In contrast, no biomarker induction was detected in a majority (60%) of the active lesions of the PT negative patients, thus confirming the allergy workup results. Importantly, we noted that 40% of these negative PT patients were potentially misdiagnosed, as we detected a robust “allergy signature” in their active lesions.

The pattern of allergy biomarkers expressed in active and PT lesions of ACD patients

The pathophysiology of ACD has been studied extensively over the past few decades, both in humans and in models (11–13). Several studies have demonstrated that the infiltration and the activation in the skin of cytotoxic CD8⁺ T cells represent a major hallmark of the ACD response (5). By killing haptenized keratinocytes, CD8⁺ T cells initiate the formation of the eczematous lesion, and induce the subsequent infiltration/activation of neutrophils, inflammatory monocytes/macrophages, $\gamma\delta$ T cells, ect (13). Here, by tracking CD8, CD69, GZMB, GLNY, INFG and indirectly PLEK and GPR183 (which respectively encodes for pleckstrin, a protein involved in the regulation of actin cytoskeleton organization of CD8⁺ T cells, and for the oxysterol EBI2 receptor involved in T, B and dendritic cell movements and interactions) (14,15), we searched for the presence of activated cytotoxic CD8⁺ T cells in the lesional skin of patients suspected of developing an ACD reaction. A strong induction of the different markers was detected in both PT and active lesions of the 10 ACD patients confirming their infiltration/activation during the skin reactions. Gene inductions were slightly lower in active lesions, especially for patients P2, P3, P14, P39 or P43, which may be explained by (i) variations in biopsy collection kinetics, i.e. at 72h after the application of patches, versus one to several days after initiation of active lesions; or (ii) due to underlying topical corticosteroid treatment.

In parallel with the induction of CD8⁺ T cell biomarkers, we also tracked for antigen presenting cell markers: HLA-DR, CXCL-10 and IL-15, which are essential in the activation,

proliferation and/or survival of CD8⁺ T cells. HLA-DRA, which encodes for the invariant alpha subunit of HLA-DR protein, and CXCL-10 are expressed or produced primarily by dendritic cells and mononuclear phagocytes, but also by keratinocytes and skin fibroblasts when stimulated by IFN- γ (16,17). Alternatively, IL-15 is produced by multiple skin cells including keratinocyte subsets from the infundibulum and isthmus at the homeostasis to promote residency features in skin CD8⁺ T cells (18). Finally, if we used CD4 marker to document for the infiltration of CD4⁺ T cells, another key cell in ACD development (13), we also studied the expression of IGFL3. IGFL3 encodes for the member 3 of the insulin-like growth factor protein family, and was reported to play critical role in cellular energy metabolism and in growth (19). So far, the nature of IGFL3-positive skin cells remains unknown, as well as the reasons for its strong down-regulation in response to allergens, but not irritants.

Negative PT patients with active lesion allergy signature: ACD misdiagnosis or hidden atopic dermatitis

A striking finding of this study is certainly the identification of patients presenting negative PT results, but with obvious signatures of skin allergy in their active lesions. Among the 6 patients with negative allergy work-ups, two of them (patients P4 and P24) developed positive PTs (to bunesonide and lanolin), but without relevance after a thorough evaluation of exposure and clinical history (**Tab.1**). The remaining 4 patients (P9, P11, P13 and P18) were negative to all EBS compounds and to specific series of cosmetics, acrylates, plastics and glues, as well as to their personal products. There are several reasons for the discrepancies between the clinical and gene profiling results. The simplest explanation is that the active lesions were initiated by molecules not tested in the respective series, and that clinicians missed culprit allergen during their investigations. Alternatively, it is possible that the gene profiling results reflect the presence of a different disease, such as atopic dermatitis (20) or protein contact dermatitis (21), instead of an ACD reaction. While only patient P9 had face symptoms and a clinical history consistent with atopic dermatitis, therein he proved negative to atopy PTs, 3 of them (patients P4, P11 and P24) had chronic hand eczema (22). The ethiopathogenesis of chronic hand eczema is complex and can be induced by extrinsic (including exposure to chemical or protein allergens) and intrinsic factors. Therefore, the infiltration and the activation of CD8⁺ and/or CD4⁺ T cells in the active skin of these 6 patients may have been induced by an increased reactivity against different food or environmental protein antigens. Recent studies suggest that dysbiotic flora may also induce and/or exaggerate atopic dermatitis inflammation by stimulating specific resident memory T cells. Finally, certain patients suffer from intrinsic

form of atopic dermatitis, for which no culprit allergen has ever been identified, and, which may be triggered by self-antigen-reactive T cells (20).

Gene profiling in active lesions, a major tool for refining the diagnosis of ACD

Another promising finding from our study is the demonstration that gene profiling of active lesions could help to refine the diagnostic process of ACD. Indeed, our results showed that 100% of patients with confirmed ACD, i.e. developing clinically relevant positive PTs, exhibited a strong “allergy signature” in their active lesions. Besides, 9 of the 15 patients with negative allergy work-up also had negative gene profiling results in their active lesions. Hence, by analyzing the presence of this set of allergy biomarkers in the active lesion of patients arriving for the first time to the dermatologist or the practitioner, it could be possible to prevent many patients suspected for ACD, from being referred for a lengthy and costly allergy workup. This could also help to greatly improve the socio-economy of ACD (23). Here, 30% of the patients enrolled in the study could have been spared for unnecessary workup. This figure is probably greatly underestimated, because the majority of the patients in the study had a clinical history with strong arguments for possible ACD, which is not always the case for all patients with CD.

Nevertheless, it should be noted that several investigational studies will be required before gene profiling can be used in routine point-of-care ACD diagnosis. It will be crucial to develop an easy-to-use, rapid and low-cost diagnostic test, which can track the differential expression of the 12 allergy biomarkers within minutes. Recent developments in the field have demonstrated that it is possible to extract and isothermally amplify by RT-LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) low copies of RNA material using a simple and portable device. The detection then takes 20 minutes to 1 hour (24). Another major advance used a new CRISPR diagnostics approach, integrated with a portable reader device based on a mobile phone, to detect for the presence of different SARS-CoV-2 RNA in nasal swab in less than 30 min (25). Finally, another bottleneck to overcome will consist in developing minimally invasive skin biopsy collection methods, in absence of any anesthetic injection, which can be readily accepted by a large majority of CD patients.

In conclusion, our study demonstrated that by analyzing the molecular signatures of active CD lesions, it is possible to stratify the patients and predict those that suffer from true ACD. This study provides the basis for the development of a future point care diagnostic test to refine and simplify the management of CD patients.

Author contributions

MAL, VL, AM and SS carried out the experiments and analysed the data.

MAL, AN, FH, FB, ME and CS and JFN managed the clinical study, performed sample collections, obtained consents and/or participated in the interpretation of the data.

JFN and MV designed the experiments and supervised this study.

MAL, JFN and MV wrote the manuscript.

All authors approved the final submitted and published version.

Acknowledgements

We thank C. Graveriau, P. Zukervar, AL. Breton, for their help to include patients.

References

1. Svensson A, Ofenloch RF, Bruze M, Naldi L, Cazzaniga S, Elsner P, et al. Prevalence of skin disease in a population-based sample of adults from five European countries. *Br J Dermatol*. 2018;178(5):1111–8.
2. Diepgen TL, Ofenloch RF, Bruze M, Bertuccio P, Cazzaniga S, Coenraads PJ, et al. Prevalence of contact allergy in the general population in different European regions. *Br J Dermatol*. 2016 Feb;174(2):319–29.
3. Ring J. Occupational skin disease - a major health problem in Europe. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017 Jun;31(6):919–20.
4. Chew AL, Maibach HI. Occupational issues of irritant contact dermatitis. *Int Arch Occup Environ Health*. 2003 Jun;76(5):339–46.
5. Vocanson M, Hennino A, Rozières A, Poyet G, Nicolas JF. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*. 2009 Dec;64(12):1699–714.
6. Nosbaum A, Vocanson M, Rozieres A, Hennino A, Nicolas JF. Allergic and irritant contact dermatitis. *Eur J Dermatol*. 2009 Aug;19(4):325–32.
7. Leonard A, Guttman-Yassky E. The Unique Molecular Signatures of Contact Dermatitis and Implications for Treatment. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019 Feb;56(1):1–8.
8. Johansen JD, Aalto-Korte K, Agner T, Andersen KE, Bircher A, Bruze M, et al. European Society of Contact Dermatitis guideline for diagnostic patch testing - recommendations on best practice. *Contact Derm*. 2015 Oct;73(4):195–221.
9. Lefevre MA, Nosbaum A, Rozieres A, Lenief V, Mosnier A, Cortial A, et al. Unique molecular signatures typify skin inflammation induced by chemical allergens and irritants. *Allergy*. 2021 Dec;76(12):3697–712.
10. Ljungberg Silic L, Lefevre MA, Bergendorff O, De Bernard S, Nourikyan J, Buffat L, et al. Gene profiling reveals a contact allergy signature in most positive Amerchol L-101 patch test reactions. *Contact Dermatitis*. 2022 Jul;87(1):40–52.
11. Kaplan DH, Igyártó BZ, Gaspari AA. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol*. 2012 Jan 13;12(2):114–24.
12. Honda T, Egawa G, Grabbe S, Kabashima K. Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2013 Feb;133(2):303–15.
13. Scheinman PL, Vocanson M, Thyssen JP, Johansen JD, Nixon RL, Dear K, et al. Contact dermatitis. *Nat Rev Dis Primers*. 2021 May 27;7(1):38.
14. Wang G, Zhou Q, Xu Y, Zhao B. Emerging Roles of Pleckstrin-2 Beyond Cell Spreading. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:768238.
15. Guillemot-Legris O, Muccioli GG. The oxysterome and its receptors as pharmacological targets in inflammatory diseases. *Br J Pharmacol*. 2021 Apr 5;
16. Klunker S, Trautmann A, Akdis M, Verhagen J, Schmid-Grendelmeier P, Blaser K, et al. A second step of chemotaxis after transendothelial migration: keratinocytes undergoing apoptosis release IFN-gamma-inducible protein 10, monokine induced by IFN-gamma, and IFN-gamma-inducible alpha-chemoattractant for T cell chemotaxis toward epidermis in atopic dermatitis. *J Immunol*. 2003 Jul 15;171(2):1078–84.
17. Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G. Interferon-gamma-stimulated human keratinocytes express the genes necessary for the production of peptide-loaded MHC class II molecules. *J Invest Dermatol*. 1998 Feb;110(2):138–42.
18. Adachi T, Kobayashi T, Sugihara E, Yamada T, Ikuta K, Pittaluga S, et al. Hair follicle-derived IL-7 and IL-15 mediate skin-resident memory T cell homeostasis and lymphoma. *Nat Med*. 2015 Nov;21(11):1272–9.

19. Lobito AA, Ramani SR, Tom I, Bazan JF, Luis E, Fairbrother WJ, et al. Murine insulin growth factor-like (IGFL) and human IGFL1 proteins are induced in inflammatory skin conditions and bind to a novel tumor necrosis factor receptor family member, IGFLR1. *J Biol Chem*. 2011 May 27;286(21):18969–81.
20. Langan SM, Irvine AD, Weidinger S. Atopic dermatitis. *Lancet*. 2020 Aug 1;396(10247):345–60.
21. Barbaud A. Mechanism and diagnosis of protein contact dermatitis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2020 Apr;20(2):117–21.
22. Elsner P, Agner T. Hand eczema: treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020 Jan;34 Suppl 1:13–21.
23. Sartorelli P, Kezic S, Larese Filon F, John SM. Prevention of occupational dermatitis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011 Mar;24(1 Suppl):89S-93S.
24. Garneret P, Coz E, Martin E, Manuguerra JC, Brient-Litzler E, Enouf V, et al. Performing point-of-care molecular testing for SARS-CoV-2 with RNA extraction and isothermal amplification. *PLoS One*. 2021;16(1):e0243712.
25. Fozouni P, Son S, Díaz de León Derby M, Knott GJ, Gray CN, D'Ambrosio MV, et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell*. 2021 Jan 21;184(2):323-333.e9.

Table legends.

Table 1: Patients' demographics, clinical features and patch-tests results.

Patch test reactions were scored at 72 hours in accordance with International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) criteria and European Society of Contact Dermatitis (ESCD) guidance.

Figure legends

Figure 1: Representative pictures of acute lesions and positive patch tests

A- Patients with positive patch test reactions.

B- Patients with negative patch test reactions.

Figure 2: Gene induction in active and positive PT lesion samples

Gene expression of CD8A, CD4, GLNY, GZMB, CD69, INFG, CXCL10, HLA-DRA, GPR183, PLEK, IL-15 and IGFL3 mRNA transcripts in active lesion and positive PT reaction samples was analyzed by qRT-PCR. Samples are categorized according to 3 groups on the basis of PT results and clinical relevance to exposure assessment: samples from (i) active ACD lesions (ACD), from (ii) positive PT lesions in ACD patients (PT+), and from (iii) active lesions in negative PT patients (No ACD). Results are expressed as fold changes versus control skin. Patient numbers are reported above each sample. Wilcoxon test and Kruskal-Wallis were used to compare means of two or multiple groups respectively.

Figure 3: Intra-individual comparison of gene expression in lesional skin of active lesion samples

Principal component analysis performed on CD8A, CD4, GLNY, GZMB, CD69, INFG, CXCL10, HLA-DRA, GPR183, PLEK, IL-15 and IGFL3 expression levels measured by qRT-PCR. Combined gene inductions in active lesions were projected onto a previous PCA obtained from induction comparisons between reference allergen (blue confidence ellipse) and irritant (red confidence ellipse) patch test signatures. To compensate for donor-induced variability, the gene expression level of the control sample of each donor was subtracted from that of the corresponding lesional skin sample from the same donor. Results depict the sample location (dots) in the first two principal components (PCs). Together, the first two components represented approximately 86% of the variance. Patient numbers are reported above each sample. Green and purple dots represent patients with negative or positive ACD diagnosis (by combining patch-test results and exposure assessment) respectively, as determined after correlation with allergology work-up results.

Table

Table 1

| Patients | | Clinic | | Patch-testing | | | | Final diagnosis |
|----------------|------------|------------------|--|--|---|--|---|-----------------|
| Patient number | Gender/age | History of atopy | Location of active lesions | Series and personal products | Positive Patch-tests | Scoring | Relevance | Diagnosis |
| 1 | F/26 | No | Ankles | European Baseline Serie Shoes Serie Personal shoes | Personal shoes <i>Linalool hydroperoxyde</i> <i>Hydroquinone monobenzylether</i> | + ++ +/? | Yes No No | ACD |
| 2 | F/81 | No | Left arm (after application of propolis cream) | European Baseline Serie Cosmetic Serie Personal propolis cream | Personal propolis cream <i>Propolis</i> <i>Colophan</i> <i>Peru balm</i> <i>Linalool hydroperoxyde</i> <i>Limonene hydroperoxyde</i> | +++ +++ ++ + + + | Yes Yes Yes Yes Yes Yes | ACD |
| 3 | M/27 | No | Axillary (after use of deodorant) | European Baseline Serie Excipient and emulsifier Serie Personal deodorant | Personal deodorant <i>Propylène glycol</i> <i>Fragrance mix 1</i> | +++ +++ ++ | Yes Yes Yes | ACD |
| 4 | F/67 | Yes | Arm, wrists | European Baseline Serie Corticosteroid Serie | <i>Budesonide</i> | + + | No No | No ACD |
| 5 | F/65 | No | Hands, wrists | European Baseline Serie | | | | No ACD |
| 7 | F/38 | No | Hands, wrists | European Baseline Serie Gloves Serie Personal products | | | | No ACD |
| 9 | M/23 | Yes | Face | European Baseline Serie Atopy patch tests | | | | No ACD |
| 11 | M/24 | Yes | Hands | European Baseline Serie | | | | No ACD |
| 13 | M/46 | No | Nicotine patch application area | European Baseline Serie (Meth)Acrylate Serie Plastic and glues Serie | | | | No ACD |
| 14 | F/24 | No | Hands | European Baseline Serie Hairdressing serie | <i>PPD</i> <i>Textile dye mix</i> | ++ + | Yes Yes | ACD |
| 15 | M/42 | Yes | Hands | European Baseline Serie Industrial oil serie Gloves serie | | | | No ACD |
| 16 | M/39 | Yes | Diffuse | European Baseline Serie | | | | No ACD |
| 18 | F/72 | No | Face | European Baseline Serie Cosmetic Serie Personal cream | | | | No ACD |
| 19 | M/20 | No | Hands, arms | European Baseline Serie Atiseptics and conservatives serie Personal products | | | | No ACD |
| 20 | M/30 | No | Hands | European Baseline Serie Epoxy serie Isocyanate Serie (Meth)Acrylate Serie Personal product | Epoxy resin, Bisphenol A <i>Stratilac EL durcisseur</i> <i>Epoxy resin, Bisphenol F</i> <i>Etanprin SHV resin</i> <i>Etanprin SHV durcisseur</i> | +++ +++ +++ +++ + | Yes Yes Yes Yes Yes | ACD |
| 21 | F/30 | No | Axillary | European Baseline Serie Personal deodorant | | | | No ACD |
| 24 | F/33 | Yes | Hands | European Baseline Serie | <i>Lanoline</i> | + + | No No | No ACD |
| 25 | F/23 | No | Hands | European Baseline Serie Gloves Serie Personal products | | | | No ACD |
| 26 | F/24 | No | Scalp | European Baseline Serie Hairdressing serie | <i>Paraphenylenediamine</i> <i>4 aminophenol</i> <i>Textile dye mix</i> <i>2 nitroparaphénylène diamine</i> <i>Paraméthylaminophénol</i> <i>Hydroquinone</i> <i>Ammonium persulfate</i> | +++ +++ +++ +++ ++ + + | Yes Yes Yes Yes Yes No No | ACD |
| 28 | M/84 | Yes | Lower back (after application of tiger balm) | European Baseline Serie Fragrance Serie | <i>Cinnamyl alcohol</i> <i>Cinnamal</i> <i>Fragrance mix 1</i> | + +/? + | Yes Yes Yes | ACD |
| 34 | M/30 | No | Hands, arms | European Baseline Serie Cutting Oil Serie | | | | No ACD |
| 37 | M/35 | No | Face and neck (after application of tiger balm) | European Baseline Serie Personal tiger balm | | | | No ACD |
| 39 | F/22 | No | Ombilical | European Baseline Serie | <i>Nickel</i> | ++ ++ | Yes Yes | ACD |
| 41 | M/55 | No | Hands, arms | European Baseline Serie Cutting Oil Serie Personal cutting oil | <i>Methylisothiazolinone</i> <i>Personal cutting oil</i> <i>Benzisothiazolinone</i> | +++ + ++ | Yes Yes Yes | ACD |
| 43 | F/32 | No | Arm (after application of enstilar) | European Baseline Serie Corticosteroid Serie | <i>Bethametasone</i> <i>Enstilar</i> | + ++ | Yes Yes | ACD |

+/? : doubtful reaction (erythema only, no infiltration)

+ : weak positive reaction (redness, induration, and possibly papules)

+: positive reaction (erythema, induration, papules, and vesicles)

++: strong positive reaction (intense erythema, induration, and coalescing vesicles)

F=Female

M=Male

ACD=Allergic contact dermatitis

Figures

Figure 1

A Patients with positive patch test reactions



B. Patients with negative patch test reactions

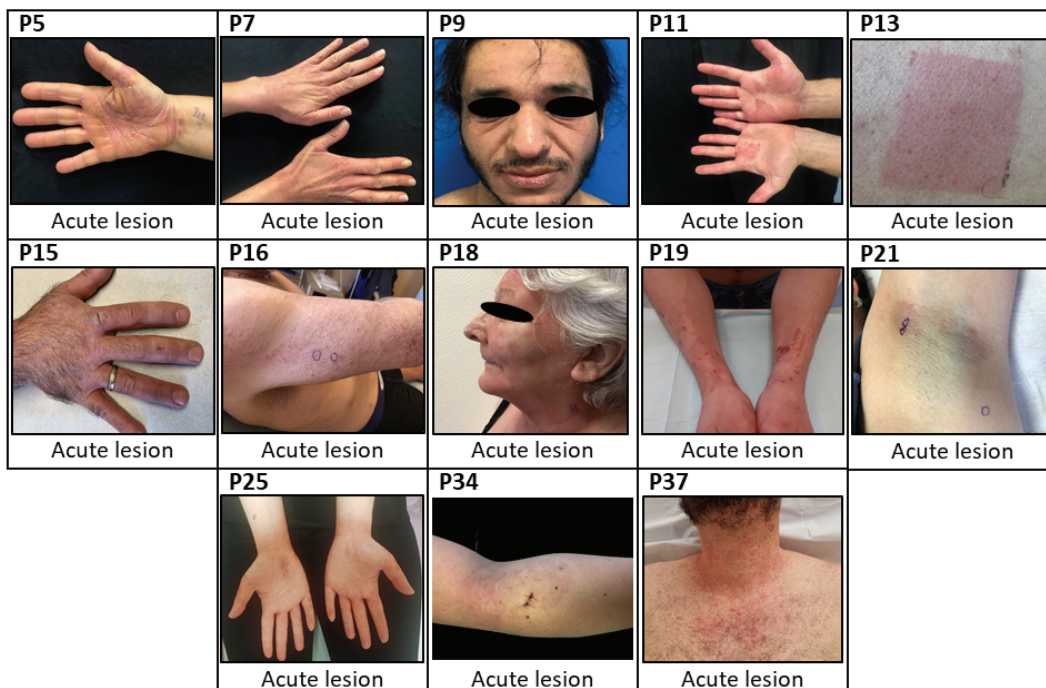


Figure 2

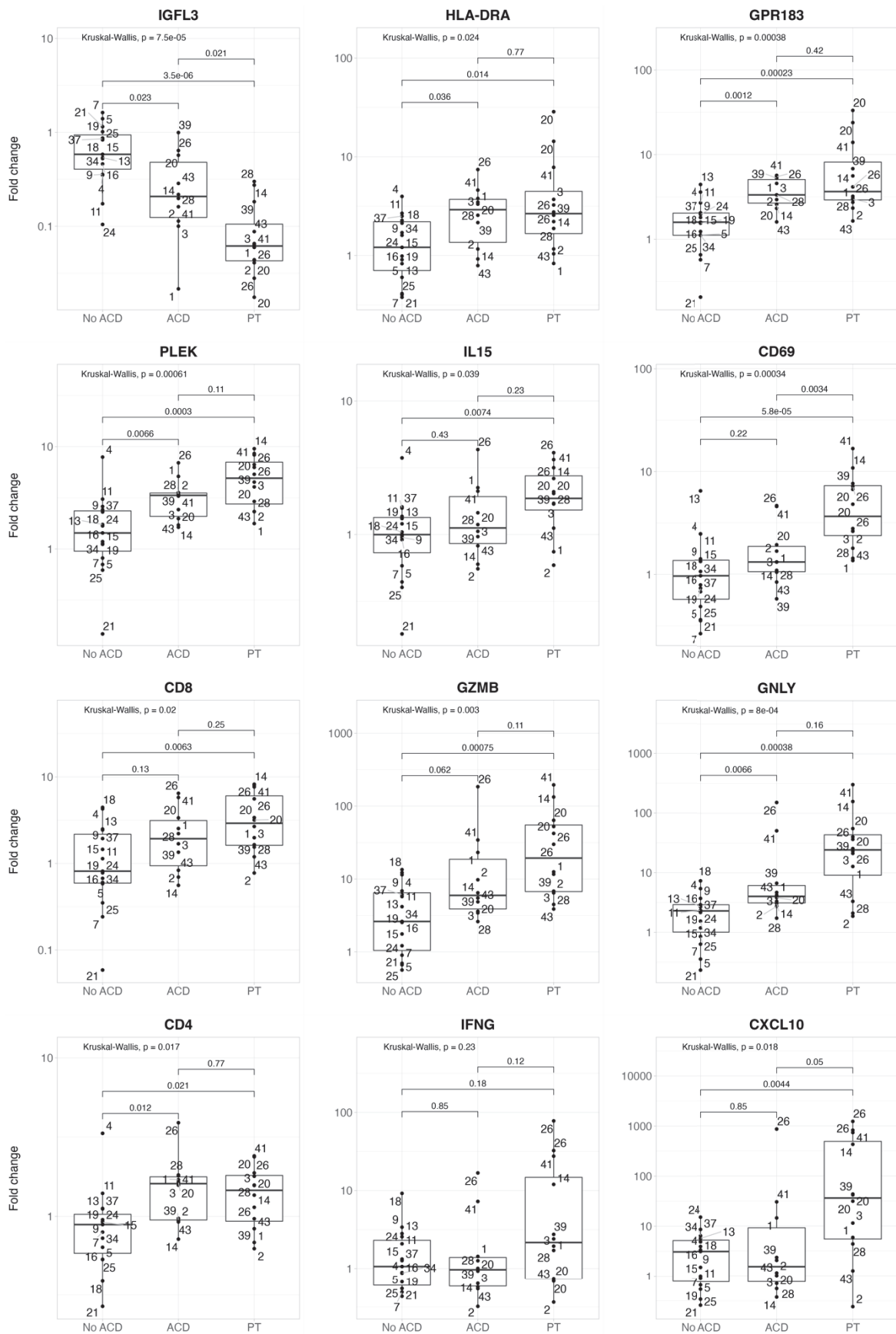
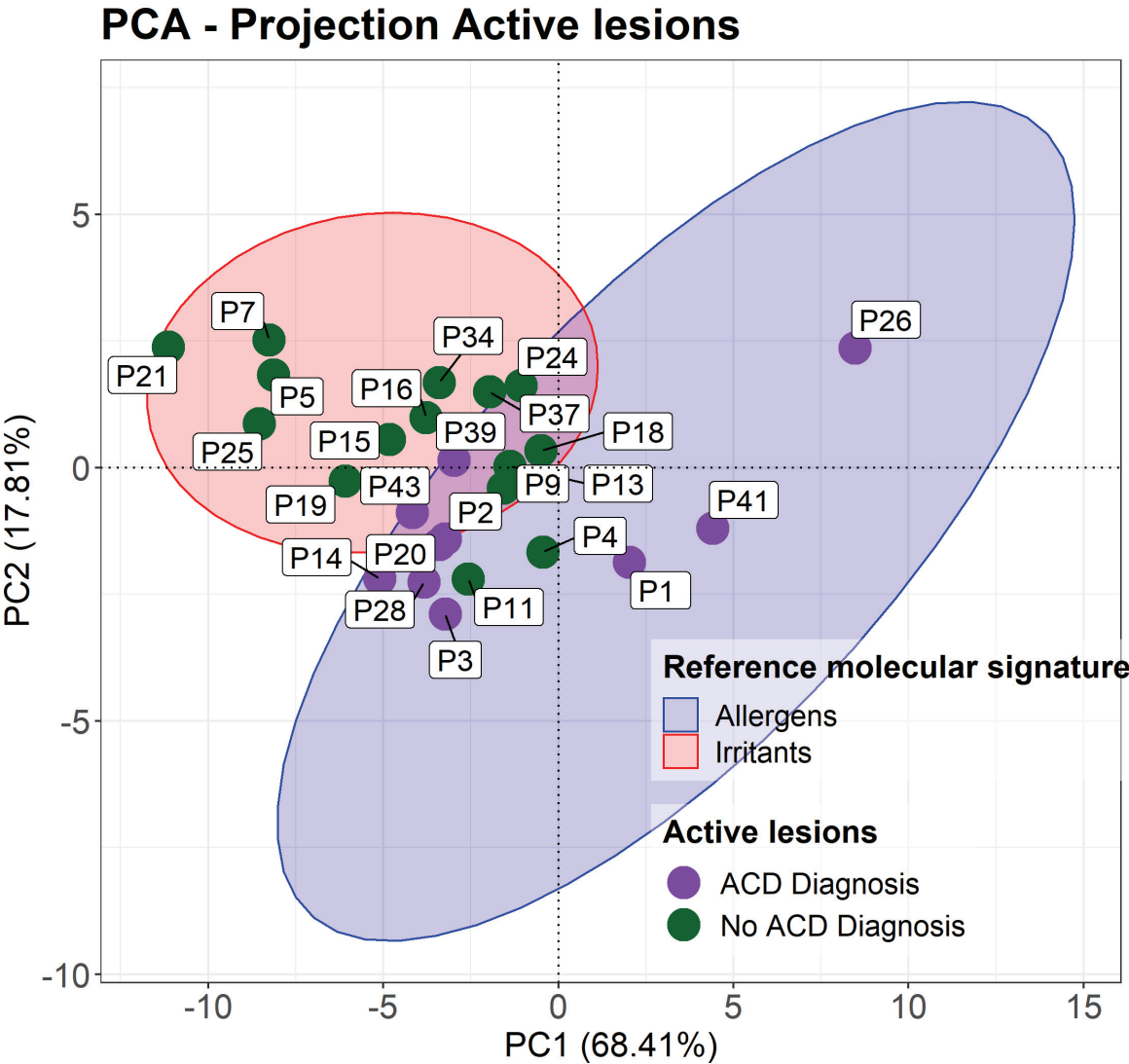


Figure 3



Supplementary materials

Supplementary Methods

Statistical analysis of qRT-PCR data

In **Fig.E1**, PCA of differential expression was performed with CD8A, CD4, GLNY, GZMB, CD69, INFG, CXCL10, HLA-DRA, GPR183, PLEK, IL-15 and IGFL3 Fc neither centered nor scaled, using function `prcomp` from package `stats`. To investigate the type of the response, the inductions for active lesions and positive patch test reactions of the 10 patients diagnosed with ACD were projected onto the PCA of the inductions of previous chemical allergen and irritant samples (9).

Supplemental figure legend

Figure E1: Intra-individual comparison of gene expression in lesional skin and PT reactions samples of patients diagnosed with ACD

Principal component analysis performed on CD8A, CD4, GLNY, GZMB, CD69, INFG, CXCL10, HLA-DRA, GPR183, PLEK, IL-15 and IGFL3 expression measured by qRT-PCR. Combined gene inductions in active and positive PT lesion samples of patients diagnosed with ACD were projected onto a previous PCA obtained from induction comparisons between reference allergen (blue confidence ellipse) and irritant (red confidence ellipse) patch test signatures. To compensate for donor-induced variability, the gene expression level of the control sample of each donor was subtracted from that of the corresponding lesional skin sample from the same donor. Results depict the sample location (dots) in the first two principal components (PCs). Together, the first two components represented approximately 86% of the variance. Type of samples (AL=active lesions and PT=Positive patch test reaction) are reported above each sample. Color dots represent each patient with ACD diagnosis, as determined after correlation with allergology work-up results.

Supplemental table

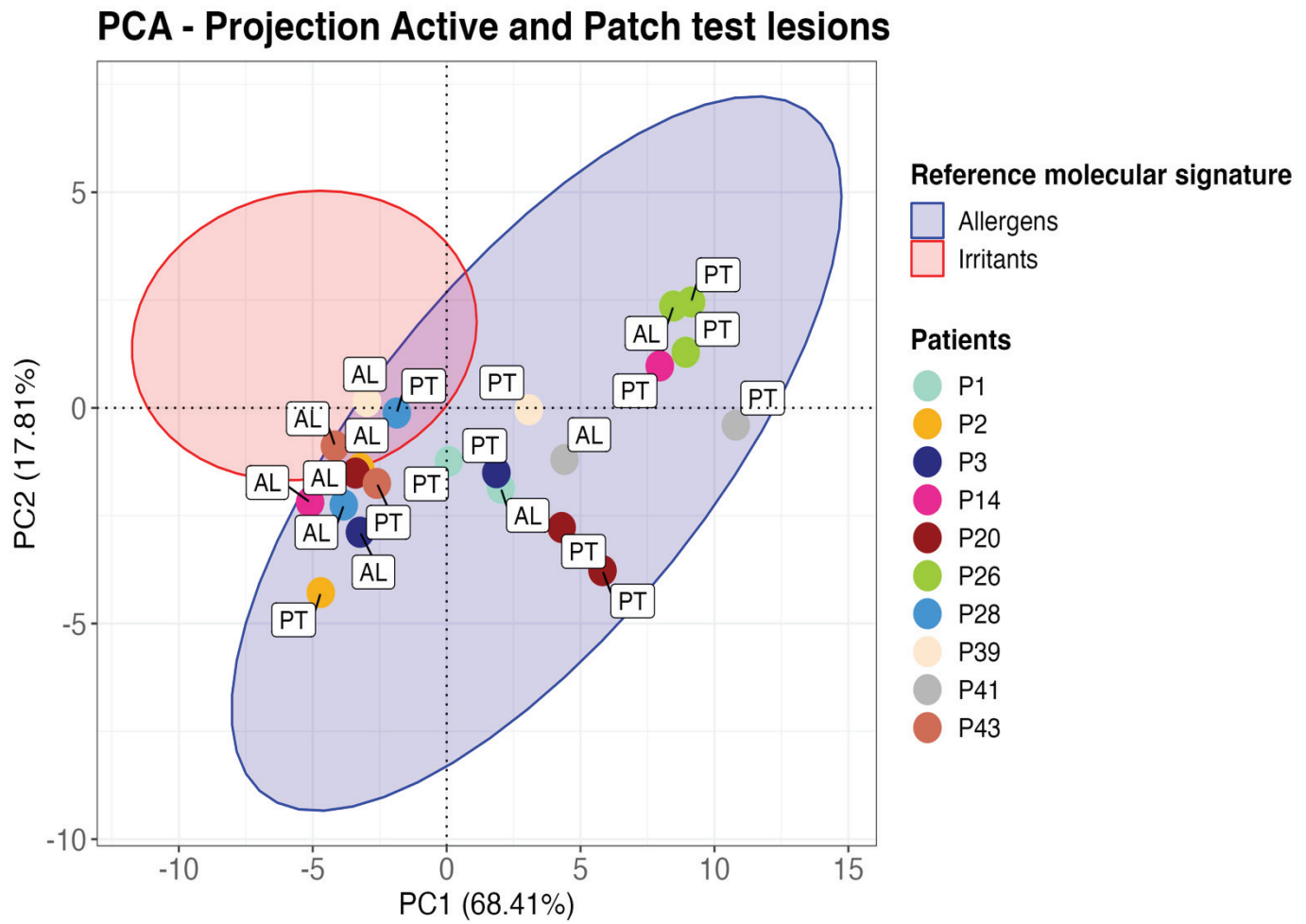
Table E1: Primer sequences, primer ID and detected transcripts for qRT-PCR analysis.

| Gene name | Primer sequences | Amplicon length (bp) |
|----------------|--|----------------------|
| <i>CD8A</i> | Forward: CAGGAACCGAAGACGTGTTTGC Reverse: AGTGGCTGTTGCACAGGGTTAG | 103 |
| <i>CD4</i> | Forward: CTAGTTTCCAGAGGCTTAATCACACC Reverse: AGGGTCAGAGAGAAATAATGAGAGAAGG | 90 |
| <i>GZMB</i> | Forward: CTTCTCCAACGACATCATGC Reverse: ACAGCTCTGGTCCGCTTG | 60 |
| <i>IFNG</i> | Forward: TGACCAGAGCATCCAAAAGAGTG Reverse: TTGCTTTGCGTTGGACATTCAAG | 143 |
| <i>HLA-DRA</i> | Forward: CCATCTTCATCATCAAGGGATT Reverse: TTCTCTCTAAGAAACACCATCACCT | 96 |
| <i>GPR183</i> | Forward: GACCCGAACGAGTCACTGAT Reverse: TTCCCTGAGGAGTTGCAGAG | 95 |
| <i>PLEK</i> | Forward: ACTCACCATGTGGTGTGCAA Reverse: GCTTGGGGGTCATGGATAGG | 80 |
| <i>IL-15</i> | Forward: ACATCACTCTGCTGCTTAGACA Reverse: AGAGTTCATCTGATCCAAGGTCT | 108 |
| <i>IGFL3</i> | Forward: GCATCTTTGGAAGCATGAGG Reverse: CCAACAGGAGCGTCTGTAGTT | 106 |
| <i>Actin</i> | Forward: CCAACCGCGAGAAGATGA Reverse: CCAGAGGCGTACAGGGATAG | 97 |
| <i>GAPDH</i> | Forward: CACCCACTCCTCCACCTTTG AC Reverse: GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG | 112 |

| Gene name | Primer ID | Detected transcript(s) | Amplicon length (bp) |
|---------------|----------------|---------------------------------|----------------------|
| <i>CXCL10</i> | Hs_CXCL10_1_SG | NM_001565 | 129 |
| <i>CD69</i> | Hs_CD69_1_SG | NM_001781, NR_026671, NR_026672 | 90 |
| <i>GNLY</i> | Hs_GRN_1_SG | NM_002087, XM_005257253 | 140 |

Supplemental figure

Figure E1:



DISCUSSION & PERSPECTIVES

Jusqu'à présent, très peu d'études se sont intéressées à la recherche de biomarqueurs moléculaires cutanés permettant de discriminer les ECA des ECI. Par ailleurs, la plupart n'ont évalué qu'un nombre limité de marqueurs, se concentrant sur des cytokines et chimiokines (Corsini & Galli, 1998; Meller et al., 2007). Par la suite, le développement de techniques, telles que les puces à ADN et le séquençage de l'ARN, a permis d'établir des profils moléculaires plus étendus, ce qui a donné lieu à des études qui ont approfondi notre compréhension des mécanismes et identifié d'autres biomarqueurs potentiels. Clemmensen et ses collaborateurs ont ainsi étudié les profils d'expression génique induits par l'application cutanée d'irritants, et Dhingra et ses collaborateurs ont quant à eux mené une étude transcriptomique afin d'identifier les signatures moléculaires de l'inflammation générée par différents haptènes (Clemmensen et al., 2010; Dhingra et al., 2014).

Finalement, une seule étude récente menée en parallèle de la nôtre s'est spécifiquement intéressée à l'identification de biomarqueurs permettant de distinguer spécifiquement les inflammations cutanées induites par les irritants et les allergènes de contact, à partir du modèle du patch test (Fortino et al., 2020). Dans cette étude, Fortino et ses collaborateurs ont montré que les analyses bio-informatiques de données transcriptomiques offrent des pistes prometteuses pour la découverte de biomarqueurs dans le but de distinguer les ECA des ECI. Les auteurs ont ainsi identifié plusieurs combinaisons de gènes permettant de catégoriser les inflammations allergiques, irritantes et les peaux non lésionnelles avec une précision comprise entre 86 et 94%. Néanmoins, ces résultats se sont limités à des réactions inflammatoires induites expérimentalement et n'ont pas été validés sur des lésions cliniques d'EC, de même les performances et les champs d'application des « classifieurs » développés n'ont été que partiellement explorés.

Grâce aux résultats de ce travail, nous avons confirmé l'intérêt d'étudier le transcriptome cutané pour découvrir des biomarqueurs diagnostiques de l'EC. Les divers produits chimiques sensibilisants testés partagent un nombre important de gènes communs, qui sont distincts de ceux modulés par les irritants. Cette observation nous a non seulement permis de mettre en évidence des voies de signalisations activées ou inhibées en fonction du type d'inflammation mais également d'identifier un petit ensemble de biomarqueurs permettant de discriminer allergie et irritation avec une excellente sensibilité-spécificité. De manière intéressante, ces mêmes biomarqueurs ont permis de caractériser l'inflammation induite par un large éventail d'agents sensibilisants, y compris des produits chimiques (tels que l'amerchol, la PPD, la propolis...) qui ne faisaient pas partie du processus initial d'identification des marqueurs moléculaires.

Par ailleurs, nous avons étendu nos recherches aux lésions cliniques d'eczéma, et avons ainsi démontré que le même panel de biomarqueurs est exprimé à la fois dans les lésions d'ECA et dans les réactions positives et pertinentes de patch test.

Enfin, la mise en place de différentes stratégies de validation indique que les biomarqueurs sélectionnés (i) corréleront avec divers paramètres cliniques, (ii) seraient prédictifs du diagnostic des patients et (iii) pourraient également permettre de distinguer les réactions de patch tests faussement positives.

L'ensemble de ces résultats de thèse offre de nouvelles perspectives dans la prise en charge des patients atteint d'eczémas de contact et ouvre la voie au développement de nouveaux outils de diagnostic moléculaire innovants. En parallèle, ils permettent également de progresser dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les EC.

Néanmoins, l'identification de biomarqueurs dans les EC n'en est qu'à ses prémices, et de nombreuses questions subsistent avant de pouvoir espérer leur utilisation généralisée à la pratique clinique.

Pour rappel, le processus de recherche et développement des biomarqueurs comprend de nombreuses étapes souvent longues et complexes :

- (i) La découverte des candidats biomarqueurs, qui dépend des stratégies employées et qui doit tenir compte de nombreux facteurs confondants.
- (ii) Le développement d'un test, véritable challenge technologique.
- (iii) Les étapes de validation, à la fois analytique et clinique.

L'utilité clinique du test diagnostique est également d'une importance capitale puisque cela définira ses conditions d'utilisation et d'application. L'ensemble de ces points sera donc discuté dans ce manuscrit, ainsi que l'impact de nos résultats sur les connaissances des mécanismes physiopathologiques des EC.

1. Vers le développement d'une approche de diagnostic moléculaire de l'ECA

1.1 Quels avantages et inconvénients dans le choix du modèle clinique pour l'identification de biomarqueurs des EC ?

Les réactions d'ECA peuvent être provoquées par une application épicutanée maîtrisée d'allergènes chez les patients sensibilisés. C'est le principe du patch test. De la même manière, l'application sous occlusion d'irritants forts dénués de tout pouvoir allergisant permet de générer expérimentalement une réaction d'ECI. Cette induction iatrogène offre donc la possibilité de contrôler la localisation et la cinétique de la réaction d'eczéma et permet ainsi de standardiser les procédures expérimentales. A l'instar de la plupart des études (Dhingra et al., 2014; Fortino et al., 2020; Meller et al., 2007; Quaranta, Knapp, et al., 2014; Wisgrill et al., 2020), il nous a donc paru évident de sélectionner ce modèle dans un premier temps pour l'étape d'identification/découverte des biomarqueurs.

Cependant, les écueils sont nombreux. Tout d'abord, les produits chimiques peuvent affecter la peau de différentes manières et la réponse moléculaire induite par une molécule ne peut être généralisée à une autre. Ceci est vrai à la fois pour les allergènes (Dhingra et al., 2014) et les irritants (Clemmensen et al., 2010), et peut donc expliquer les divergences de résultats entre les études. Pour exemple, Fortino et ses collaborateurs ont mis en évidence l'expression de plusieurs marqueurs associés aux cellules NK, tels que KLRD1 ou ITGAL, dans les lésions d'ECA contrairement à celles d'ECI, alors que dans notre étude ces mêmes marqueurs ne permettaient pas de discriminer les deux types de réactions (Fortino et al., 2020; Lefevre et al., 2021). Cela s'explique probablement par le fait que la cantharidine, un produit irritant testé dans nos travaux, a également activé des voies de signalisation associées à l'immunité médiée par les cellules NK. Or, cette molécule n'avait pas été inclus dans l'analyse menée par Fortino. Par conséquent, il est évident que seule l'étude de nombreux allergènes et irritants permettra de prendre en compte la diversité des signatures moléculaires induites par les différents produits chimiques et faciliter l'identification de biomarqueurs robustes et valides. Ainsi, le nombre croissant des molécules sensibilisantes (environ 4900 aujourd'hui (de Groot, 2018)) représente un défi majeur.

Par ailleurs, si nous sommes sûrs de contrôler la nature de la réaction après application d'irritants de référence, il n'en est malheureusement pas de même avec les allergènes. En effet, appliqués sous occlusion, les haptènes peuvent entraîner des réactions irritantes faussement positives. Comme discuté dans l'article 1, malheureusement nous ne disposons

pas d'éléments nécessaires pour évaluer de façon certaine la pertinence clinique des patch tests positifs pour les allergènes.

Un autre aspect à prendre en compte est l'évolution dans le temps des réactions. L'identification d'un set de biomarqueurs, ou tout du moins leur niveau d'expression, dépend de façon évidente du moment auquel les échantillons cutanés sont prélevés. Par exemple, Wisgrill et al ont identifié deux fois plus de gènes modulés par l'application de nickel à 96 heures par rapport à 48h. Néanmoins, il est intéressant de constater que les gènes modulés aux deux temps étaient pour la plupart identiques dans cette étude (Wisgrill et al., 2020). Des études de cinétique seraient donc importantes pour identifier les biomarqueurs communs à un même produit chimique aux différents temps de prélèvements. Par ailleurs, il convient de noter que la détection d'une différence éventuelle entre l'ECA et l'ECI basée sur l'analyse de réactions induites par la méthode du patch test, reste également limitée à une fenêtre temporelle étroite. Comme illustré dans l'article 1, nous avons identifié peu de gènes associés aux « voies de l'inflammation » dans la signature irritante, ce qui pourrait s'expliquer par un temps tardif de prélèvement par rapport à l'induction de la réaction.

Ainsi, si le modèle du patch test nous a permis d'identifier de nombreux biomarqueurs des EC, ceux-ci sont spécifiques aux caractéristiques de ce protocole expérimental, et il se peut qu'ils ne soient donc pas forcément les plus adéquats.

L'analyse des biomarqueurs exprimés directement dans les lésions actives d'EC permettrait de pallier les limites présentées ci-dessus.

Malheureusement, le principal défi de cette stratégie réside dans l'attribution d'un diagnostic étiologique de certitude en amont. En effet, il n'est pas rare que les lésions d'EC (en particulier les mains) présentent une étiologie mixte (Sølberg et al., 2022). Cela signifie que la dermatite est provoquée et aggravée par plusieurs facteurs (eau, savon, utilisation de gants, exposition aux produits chimiques) susceptibles de provoquer à la fois une allergie et une irritation de contact. Cette observation est particulièrement vraie en cas d'EC professionnel. Par ailleurs, les antécédents de DA sont fréquents chez les patients atteints d'ECI et ECA, ce qui pourrait également entraîner un biais de confusion dans l'interprétation des résultats comme discuté dans l'article 3 et la synthèse bibliographique.

Un autre aspect à prendre en compte est le potentiel impact des traitements concomitants sur les signatures moléculaires. Pour exemple, des travaux menés au sein de notre équipe ont montré que l'application de corticostéroïdes topiques modulait fortement le transcriptome des cellules T résidentes mémoires dans l'épiderme chez la souris, en inhibant de manière significative l'expression de gènes impliqués dans les réponses de cytotoxicité cellulaire,

comme les gènes IFNG, GRANZYME A ou GRANZYME B (Ono E. manuscrit en préparation). Par ailleurs, dans notre dernière étude, il est intéressant de noter que le patient 43 développant un ECA à la bétaméthasone (corticoïde) présentait une signature moléculaire d'allergie plus faible que les autres patients, suggérant une modulation de l'expression de nos biomarqueurs par l'action anti-inflammatoire des corticostéroïdes. Il serait également intéressant d'étudier l'impact des thérapies ciblées comme le dupilumab sur les signatures moléculaires, car bien qu'il ait été montré que ce traitement n'interfère avec les résultats des patch tests (Raffi, Suresh, et al., 2020), il est fort probable qu'il entraîne des modifications du transcriptome associé aux réponses inflammatoires.

Ainsi, si les lésions actives d'eczéma représentent de façon évidente le modèle idéal pour identifier les biomarqueurs diagnostiques les plus pertinents, l'hétérogénéité de l'inflammation présente chez les patients peut s'avérer un véritable frein à leur découverte. La sélection et l'inclusion de patients présentant ou non de multiples comorbidités très diverses, ainsi que la réalisation d'études cliniques de grande envergure, permettra d'affiner ces explorations.

Le modèle du patch test, en testant plus de produits chimiques et en effectuant des prélèvements à différents temps, reste donc à ce jour une alternative très crédible. À noter que nos résultats tendent à confirmer la pertinence de ce modèle, puisque nous avons observé que les mêmes biomarqueurs étaient retrouvés à la fois dans les lésions cliniques et les patch tests positifs pertinents chez les patients atteints d'ECA. Cependant, à ce jour, nous n'avons analysé qu'un nombre limité de biomarqueurs (n=12) dans les lésions actives.

Enfin, un aspect très important dans l'identification de biomarqueurs réside dans leur sensibilité mais encore plus dans leur spécificité. Idéalement, un biomarqueur devrait être uniquement spécifique de la maladie à laquelle il est associé. Mais il est évident qu'un marqueur moléculaire n'est généralement pas confiné à une seule fonction dans une seule maladie précise, et la combinaison de l'expression d'un ensemble de biomarqueurs permet alors d'augmenter leur efficacité diagnostique par rapport à ces mêmes marqueurs pris individuellement. Aussi, il semble primordial de confronter nos résultats à ceux d'autres dermatoses inflammatoires comme la DA et le psoriasis dont le diagnostic différentiel avec les EC n'est pas toujours évident par ailleurs. L'accessibilité à des bases de données publiques pourrait nous permettre d'effectuer ces analyses à moindre coût et renforcer le potentiel diagnostique de nos signatures.

1.2 Quels sont les verrous technologiques à lever pour le développement d'un test diagnostique dans les EC ?

Nos résultats démontrent que l'analyse de marqueurs moléculaires dans des échantillons cutanés améliore l'interprétation des résultats du bilan allergologique et donc la précision du diagnostic de l'ECA. Néanmoins le prélèvement systématique de tissu cutané par biopsies invasives est irréaliste en pratique courante et peu acceptable par les patients. Cette procédure nécessite la réalisation d'une anesthésie locale et de sutures et ne peut donc être pratiquée que par un personnel qualifié. Elle prend en générale une quinzaine de minutes ce qui n'est pas compatible avec le temps alloué pour une consultation médicale en libéral par exemple. Ainsi, il devient nécessaire de développer des outils de prélèvement peu/très peu invasifs.

Les prélèvements par tape stripping ont été utilisés dans plusieurs études mais cette technique n'a jusqu'alors pas démontré une sensibilité suffisante pour identifier des biomarqueurs fiables de l'ECA (Tam et al., 2021). Les échantillons se limitent à la couche superficielle de l'épiderme (stratum corneum essentiellement) et ne permettent probablement pas d'accéder aux zones cutanées où les principales cellules immunitaires (lymphocytes T, neutrophiles, monocytes/macrophages inflammatoires) exercent leur activité.

L'utilisation de micro-biopsies pourrait donc être un compromis acceptable. Au cours de mon travail de thèse, nous avons effectué des analyses complémentaires afin de comparer les signatures moléculaires identifiées à partir de biopsies de 1, 2 ou 3 mm de diamètres. Nos résultats montrent une sensibilité de détection excellente avec des résultats comparables entre les différents échantillons pour nos 12 biomarqueurs (**Figure 33**). Il convient de noter que la réalisation de biopsies de 1mm ne nécessite aucun point de suture pour la cicatrisation, et on peut penser que l'application d'anesthésiques locaux serait suffisante pour prévenir toute douleur potentielle.

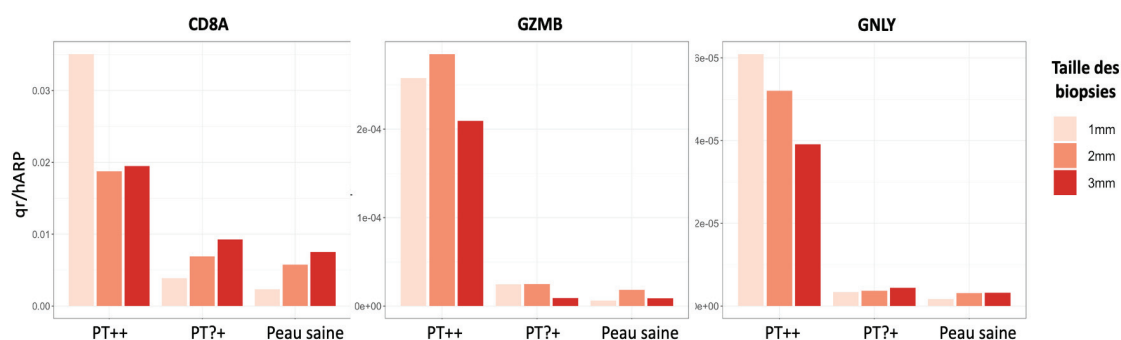


Figure 33. Sensibilité de détection des biomarqueurs en fonction des tailles de biopsies

Expression des biomarqueurs CD8A, GZMB et GNLY analysée par qRT PCR dans des échantillons cutanés de patch test positif (PT++), douteux (PT?+), et de peau saine. Les données d'expression (en quantité relative) sont comparées entre des biopsies de 1mm, 2mm et 3mm.

Il est intéressant de noter que certaines équipes ont développé et utilisé des dispositifs de biopsies cutanées submillimétriques (Lin et al., 2013; Tan et al., 2015; Tom et al., 2016) (**Figure 34**) , ou de patch contenant des micro-aiguilles (S. H. Kim et al., 2022; Kirstein et al., 2017). Ces approches ne demandent aucune compétence particulière puisqu'elles ne nécessitent ni anesthésie locale, ni suture, et les plaies induites par le prélèvement se referment en moins de 24h. Elles sont donc bien acceptées par les patients qui refusent les biopsies conventionnelles (Yamada et al., 2021). Ces techniques ont permis d'extraire assez de quantité d'ARN pour effectuer par la suite des analyses transcriptomiques (S. H. Kim et al., 2022; Tan et al., 2015; Tom et al., 2016).

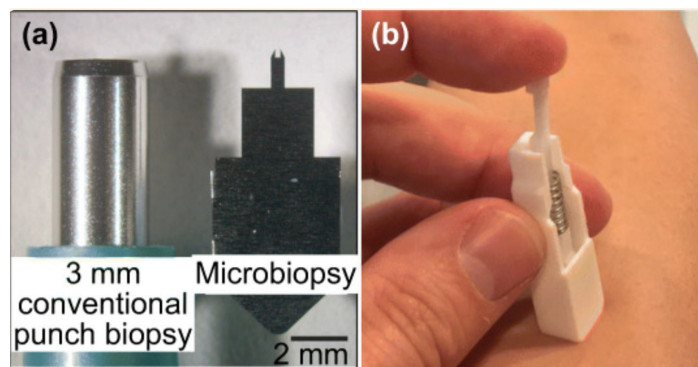


Figure 34. Dispositif de microbiopsie cutanée D'après (Lin et al., 2013; Tan et al., 2015; Kirstein et al., 2017)

- a) Comparaison d'un punch de biopsie conventionnelle de diamètre de 3 mm et de la microbiopsie. b) Applicateur à ressort utilisé pour les microbiopsies

La question du nombre et de la répétition de prélèvements à effectuer ne serait donc plus un problème. En effet, nos analyses ont nécessité la réalisation minimum de deux prélèvements par patient : une en peau lésionnelle et une en peau saine, puisque nous avons comparé les niveaux d'expression génique entre chaque biopsie (avec rendu des résultats en « fold change ») afin de limiter la variabilité inter-individuelle. A noter que nous avons également effectué une analyse complémentaire afin d'identifier des combinaisons de biomarqueurs permettant de discriminer allergie et irritation en se basant uniquement sur les données d'expression de la peau lésionnelle. Les biomarqueurs identifiés comme les plus discriminants différaient selon les deux approches à l'exception de GPR183 et IGFL3. Nous avons ainsi développé de nouveaux modèles de classification et montré que certaines combinaisons ont également permis de distinguer les deux types d'inflammation avec de très bonnes performances, bien qu'il y ait eu plus de variabilité.

En plus des méthodes de prélèvements, le véritable challenge dans un futur proche sera l'élaboration d'un dispositif de test diagnostique, rapide, peu coûteux, et simple d'utilisation. Cette réflexion s'appuiera forcément sur l'utilisation clinique que nous souhaiterons faire des biomarqueurs (dont nous discuterons plus bas).

La technique de transcription inverse et de PCR quantitative, nécessitant une expertise technique et un certain temps d'exécution, pourrait restreindre le diagnostic aux laboratoires hospitaliers, ce qui limiterait la faisabilité d'un suivi des biomarqueurs moléculaires en routine. De ce fait, des techniques plus rapides, ne nécessitant pas d'étape d'amplification et ayant une sensibilité similaire à la RT qPCR doivent être mises au point. Comme discuté dans l'article 3, avec la pandémie de Covid 19, plusieurs technologies simples d'utilisation ont ainsi été développées afin de mesurer plusieurs transcrits simultanément et obtenir des résultats relativement rapides (entre 20 minutes et une heure). Ces approches basées sur une lecture visuelle colorimétrique des résultats ont permis l'utilisation directe d'échantillons salivaires, naso- ou oro-pharangés sans nécessiter d'étape supplémentaire d'extraction d'ARN. Des méthodes de rétro-transcription et d'amplification isotherme ont également été développées et certains dispositifs intègrent même des systèmes CRISPR pour la détection des biomarqueurs cibles (Alafeef et al., 2021; Azmi et al., 2021; Bhatt et al., 2022; Odiwuor et al., 2022). Ces techniques s'affranchissent donc de toutes les limites de la RT-PCR quantitative, et des obstacles qu'elles représentent pour la généralisation d'outils diagnostiques en pratique clinique. La démocratisation de ces nouvelles technologies permettrait de faciliter l'utilisation des biomarqueurs moléculaires. Néanmoins un des défis majeurs dans notre contexte reste de développer une technique d'extraction facile et rapide. En effet, si les fluides corporels peuvent être utilisés directement pour la détection de transcrits, il n'en est pas de même avec les échantillons cutanés.

Enfin, un autre aspect fondamental sera la détermination de la valeur seuil des biomarqueurs, c'est-à-dire une valeur optimale au-delà de laquelle le diagnostic pourra être considéré comme fiable, dans le but de minimiser le taux de faux positif et de faux négatif. En effet, les valeurs moyennes ou médianes des biomarqueurs sont largement utilisées comme seuil du biomarqueur sans véritable justification. L'utilisation des courbes ROC et de l'indice de Youden est une méthode classique pour définir le seuil optimal afin d'obtenir le meilleur couple sensibilité-spécificité. Néanmoins, dans notre contexte, il est souhaitable d'identifier l'ensemble des patients « vrais positifs » afin de ne pas passer à côté du diagnostic d'un véritable ECA, ce qui pourrait avoir des conséquences majeures pour le patient. Ainsi, il sera utile de calibrer les modèles de prédiction afin de définir un seuil optimal dans cet objectif. Par ailleurs, l'association des valeurs de biomarqueurs couplées à des données cliniques dans les

modèles afin d'élaborer des scores clinico-biologiques composites pourrait potentiellement permettre de renforcer le diagnostic.

Bien que les méthodes d'apprentissage automatique puissent être considérées par certains comme des méthodes insondables de type boîte noire, elles ont tout de même l'avantage de simplifier les processus diagnostiques et de réduire le biais humain associé. De plus, elles sont reconnues pour leur capacité à traiter simultanément de nombreuses variables et à gérer facilement des relations complexes et non linéaires avec succès. Mais leur interprétation est un aspect important et semble aujourd'hui freiner leur adoption par la communauté scientifique et médicale. Dans la perspective de l'utilisation de nouveaux biomarqueurs en pratique courante, il sera donc indispensable de sensibiliser les professionnels de santé aux bénéfices apportés par ces techniques mais également de les éduquer aux technologies disponibles pour la réalisation et la prescription de ces futurs tests.

1.3 Quelles perspectives pour la validation clinique des biomarqueurs ?

Malgré la masse énorme de marqueurs potentiels identifiés dans diverses pathologies, la liste de ceux utilisés en pratique clinique reste courte, notamment à cause d'un manque de validation clinique. Ainsi, le prochain défi consistera à évaluer et valider rigoureusement les biomarqueurs candidats identifiés dans ces travaux, c'est-à-dire démontrer leur capacité à délivrer le message biologique pour lequel il est proposé de l'utiliser.

Ainsi, la réplication de nos résultats dans des échantillons indépendants est importante. Dans l'article 1, nous avons utilisé des données disponibles publiquement afin de valider plusieurs combinaisons de biomarqueurs avec des performances acceptables. Par ailleurs, avec les données complémentaires issues de l'article 3, nous avons pu construire de nouveaux modèles de classification, intégrant cette fois-ci à la fois des réactions de patch test et des lésions cliniques d'eczéma dans les phases d'entraînement. Les « classifieurs » ainsi générés ont ensuite pu identifier les patients avec un diagnostic d'ECA avec une sensibilité de 100% et une valeur prédictive positive de 91% (données non publiées).

Néanmoins, de futures études cliniques prospectives à partir de grandes cohortes de patients seront nécessaires pour démontrer l'applicabilité de notre méthode et le potentiel diagnostique de nos biomarqueurs. Comme discuté précédemment, il faudra inclure des patients présentant des allergies de contact pour un large éventail de produits chimiques différents, mais également vérifier que nos modèles ne permettent pas de classer des patients présentant la même symptomatologie mais d'étiologie différente comme la DA ou le psoriasis (Fortino et al., 2020). Ces stratégies nous permettront ainsi d'évaluer la robustesse, la spécificité et la

généralisation de ces signatures avec le moins de biais possible. Il faudra ensuite répondre à deux questions essentielles :

1) est-ce que le test apporte une information supplémentaire par rapport aux processus de diagnostic classique ?

2) est-ce que les patients qui ont bénéficié du test ont une meilleure prise en charge que ceux qui n'ont pas eu le test ?

La première question nécessite donc d'intégrer le test dans la démarche habituelle diagnostique et de comparer la classification des patients en utilisant soit des modèles prédictifs diagnostiques soit des tables de reclassification afin de connaître l'apport diagnostique réel du test sur la classification des patients par rapport à leur prise en charge habituelle (Cook & Ridker, 2009; Pencina et al., 2008). La deuxième question nécessite de réaliser une étude interventionnelle avec un suivi prospectif au long cours afin de savoir ce que le nouveau test va apporter dans le processus de prise en charge et de suivi des patients (Lord et al., 2006).

En outre, des études fonctionnelles seront nécessaires pour démontrer la spécificité de l'expression des biomarqueurs à la pathologie. La validation d'un biomarqueur passe donc en partie par l'évaluation de sa vraisemblance biologique, c'est-à-dire la compréhension du rôle éventuel de cette molécule dans la pathogénèse de la maladie. Un marqueur caractéristique de la maladie sera ainsi directement lié à son évolution. A l'inverse, les biomarqueurs supposés qui ne sont pas intégrés dans les processus pathologiques sont moins susceptibles d'avoir un impact prédictif ou pronostique. Les données biologiques ne peuvent cependant pas substituer une validation des candidats biomarqueurs par le biais d'études cliniques et statistiques, et les deux sont donc complémentaires.

2. Utilité du diagnostic moléculaire de l'ECA pour une meilleure prise en charge des patients

L'intérêt principal d'identifier des biomarqueurs demeure dans l'amélioration de la prise en charge des patients. Dans cette optique, les besoins dans l'EC concernent en priorité le diagnostic.

Comme exposé dans la synthèse bibliographie, le processus diagnostique actuel reposant sur la clinique, l'anamnèse, la réalisation de patch tests et l'étude de leur pertinence présente de nombreuses limites. La clinique n'est pas assez spécifique pour discriminer les différents

sous types d'eczéma et peut même être superposable à celle d'autres dermatoses comme le psoriasis. L'interrogatoire et l'évaluation des expositions sont souvent bien trop subjectifs pour apporter des arguments cliniques robustes. Enfin la méthode du patch test a montré de nombreuses faiblesses. C'est un processus diagnostique parfois coûteux en termes de temps, car il peut conduire à des tests répétés et supplémentaires. L'interprétation de la pertinence clinique des tests reste subjective, nécessitant un personnel qualifié, et peut donner lieu à des résultats non concluants entraînant des problèmes dans la prise en charge de la maladie. Les problèmes de sensibilité et spécificité des tests ont été soulevés par plusieurs auteurs. Par exemple, l'interprétation des tests soulève des problèmes chez des individus qui possèdent une peau dite « hypersensible » et qui présentent des réponses positives à la fois aux allergènes de référence et à des doses non inflammatoires d'irritants appliqués en témoins. En outre, une analyse rétrospective conduite sur les 20 dernières années a montré que 30% des résultats de patch tests positifs ne peuvent être reproduits lorsque les mêmes patients sont re-testés avec la même molécule plusieurs semaines/mois après (Brasch et al., 1994b; Dittmar & Schuttelaar, 2019b). Une étude très récente a permis de confirmer ces observations. Bennike NH et al. ont rapporté que seuls 4 patients sur 24, ayant déclenché antérieurement une réaction douteuse ou faiblement positive pour l'hydroperoxyde de limonène, un allergène contenu dans de nombreux parfums, présentaient une réaction positive lors de nouveaux tests (c'est à dire après ré-application de patches, ou réalisation de tests d'usage) (Bennike et al., 2019b). Par ailleurs, les tests épicutanés ne sont pratiqués que par un nombre limité de centres experts en Europe, limitant ainsi l'accès au diagnostic pour les patients. L'ensemble de ces éléments entraîne inévitablement des coûts élevés pour les systèmes de santé.

Ainsi, un diagnostic basé sur des paramètres plus objectifs comme l'expression de biomarqueurs pourrait profondément modifier la prise en charge des patients atteints d'EC. Mais avant toute chose, il conviendra d'identifier les réels besoins cliniques afin de définir les conditions d'application d'un tel test diagnostique.

2.1 Un diagnostic de précision rapide sur lésions cliniques

Nos résultats ont démontré l'intérêt des signatures moléculaires pour identifier les patients présentant un ECA à partir de lésions cliniques, ouvrant ainsi des perspectives au développement de tests diagnostiques rapides (« point of care »). Cela pourrait ainsi permettre aux médecins non spécialistes d'avoir accès à un diagnostic de certitude et guider leur prise en charge. Pour exemple, les patients présentant une signature d'allergie pourraient alors être orientés directement et rapidement vers des centres experts afin de bénéficier d'un bilan allergologique de contact. A l'inverse, cela éviterait aux autres (plus d'un tiers des patients selon nos résultats) des investigations longues et inutiles, diminuant par conséquent les

dépenses de santé publique. Cette stratification des patients, permettrait donc de désengorger le système de santé et d'optimiser/accélérer le processus de diagnostic à la recherche d'un facteur étiologique pour ceux qui en ont réellement besoin.

La question est aujourd'hui de savoir si un tel outil devrait être utilisé chez les patients « tout venant » ou seulement dans des cas bien particuliers comme (i) les patients présentant des lésions d'eczéma réfractaires à un traitement bien conduit laissant suspecter un facteur de contact surajouté, ou dans (ii) le contexte d'EC professionnel où le diagnostic étiologique doit être posé rapidement, ou encore (iii) dans le cas des eczémas des mains dont l'étiopathogénie est souvent complexe.

Il faut noter que dans l'article 3, nous avons observé de manière très intéressante que 6 patients exprimant des signatures d'allergie dans leurs lésions d'eczéma présentaient un bilan allergologique négatif. Cependant pour l'ensemble de ces patients, une histoire clinique complexe laissait supposer une allergie de contact. Ainsi, les résultats moléculaires combinés à l'anamnèse soulèvent une question capitale : avons-nous « manquer » l'allergène coupable au cours de notre bilan ? Il serait donc très intéressant de convoquer de nouveau ces patients afin de poursuivre les investigations cliniques avec de nouvelles batteries de tests, ceci afin de déterminer si l'utilisation de notre approche de diagnostic moléculaire surpasse les performances diagnostiques d'une approche classique utilisant les patch tests.

2.2 Aide à l'interprétation des tests épicutanés

Une seconde utilité clinique de nos biomarqueurs pourrait être un support à l'interprétation des patch tests notamment dans les cas douteux.

Dans les articles 1 et 2, nous avons observé que certains patch tests positifs présentaient des signatures d'allergie faibles voir absentes. Malheureusement, dans la première étude, nous ne disposons pas des éléments nécessaires pour déterminer la pertinence clinique des réactions aux patch tests. Dans l'article 2, nous avons utilisé des séries de dilutions afin d'étayer notre argumentation clinique. De manière intéressante, le patient A3 présentant un patch test positif pour la plus forte concentration d'amerchol mais sans expression de biomarqueur d'allergie a montré une disparition brutale de la réaction cutanée lors des tests à des concentrations inférieures, laissant suggérer une réponse faussement positive due à une réaction d'irritation. Ces résultats présagent donc que l'analyse moléculaire des inflammations cutanées induites par les patchs tests pourraient permettre d'identifier les réactions faussement positives, et donc d'optimiser l'interprétation du bilan allergologique.

De plus, il convient de rappeler qu'une réaction positive à un allergène signifie que l'individu est sensibilisé vis-à-vis de cet allergène (on parle d'allergie de contact), mais cela ne

présage pas forcément qu'il développera une réaction d'ECA en exposition naturelle. Aussi, on peut se demander si la détection de biomarqueurs d'allergie dans une lésion induite après pose de patch tests permettrait de stratifier les patients, entre ceux d'une part qui souffrent simplement d'allergie de contact et ceux d'autre part qui souffrent d'un véritable ECA.

Pour répondre à ces questions, il reste à montrer que la présence ou l'absence des biomarqueurs d'allergie dans les lésions cutanées de patch tests sont effectivement prédictives de la réponse d'ECA chez ces patients. A ce titre, il nous faudra démontrer qu'il existe une corrélation directe entre les niveaux d'expression de nos 12 biomarqueurs d'allergie et la réactivité des individus lorsqu'ils sont exposés aux allergènes en conditions d'usage. A cet égard, nous sommes actuellement en train de monter une 4^e étude clinique dans laquelle nous incluons 60 patients présentant des patch tests positifs de différentes intensités pour 3 haptènes (nickel, hydroperoxydes de linalol et de limonène). Les patients réaliseront ensuite des ROAT tests avec les allergènes en question, et nous effectuerons des tests immunobiologiques (tests d'activation lymphocytaires, mesures de la production de médiateurs inflammatoires par ELISA) en parallèle. L'objectif sera de corréler les signatures moléculaires des réactions de patch tests avec les résultats des ROAT test ainsi que des tests biologiques, afin de démontrer la capacité des biomarqueurs identifiés dans les lésions de patch à discriminer de façon fiable entre :

- (i) les patients avec un diagnostic d'ECA (patch test positif, réaction cutanée au ROAT test et présence de LT circulants spécifiques d'allergène),
- (ii) les patients présentant une allergie de contact (patch test positif, pas de réaction cutanée au ROAT test et présence de LT circulants spécifiques d'allergène),
- (iii) les patients ayant présenté une réaction faussement positive (patch test positif, pas de réaction cutanée au ROAT test et absence de LT circulants spécifiques d'allergène).

Cette étude nous aidera à déterminer des seuils optimaux afin de classer correctement ces 3 groupes de patients. Elle nous aidera en outre à valider nos biomarqueurs.

2.3 De la précision diagnostic à la précision étiologique ?

Une des questions majeures qui émerge avec l'identification de biomarqueurs dans les ECA est de savoir s'il serait possible d'imaginer un test permettant d'identifier l'allergène responsable des lésions. Ainsi, pourrions-nous tout simplement remplacer le patch test avec ce type d'approche moléculaire ? A défaut d'un diagnostic étiologique précis, cette méthode permettrait-elle d'identifier des allergènes possédant un mode de réactivité sur les protéines

commun ? Ceci aiderait le clinicien à sélectionner plus objectivement les batteries à tester afin d'éviter de passer à côté du diagnostic étiologique au cours du bilan.

Dans cet objectif, en plus de l'identification de biomarqueurs communs à l'inflammation allergique, il devient également intéressant de rechercher des biomarqueurs associés à des expositions à des produits chimiques spécifiques. Dhingra et ses collaborateurs avait montré dès 2014 qu'il existait des signatures moléculaires uniques en fonction du type d'allergène (Dhingra et al., 2014). Bien que nos travaux n'aient pas été conduits en ce sens, nous avons pu observer au cours de nos analyses non supervisées que les différentes réactions induites par un même produit chimique appartenaient souvent à un seul et même cluster. En comparant chaque molécule par rapport à une autre nous avons ainsi pu mettre en évidence un certain nombre de gènes différentiellement exprimés et à l'instar de l'étude conduite par Dhingra nous avons observé des différences notables en termes de polarisation de l'inflammation. Nous avons confirmé que le nickel, mais également la méthylisothiazolinone, induisait une polarisation de type 1/17 préférentielle, alors que l'hydroperoxyde de linalol (allergène des parfums) induisait une réponse de type 2 plus marquée, avec une réponse de type 1 plus faible que celle retrouvée avec les autres allergènes.

Afin d'explorer ces pistes et caractériser les réponses moléculaires spécifiques, de futures recherches devront s'intéresser à la stratification des réactions en fonction des allergènes ; mais ces études nécessiteront un nombre d'échantillons extrêmement important étant donné la diversité des produits sensibilisants répertoriés à ce jour.

Néanmoins, les résultats qui en découleraient pourraient alors révolutionner les méthodes diagnostiques pour les patients souffrant d'ECA et avoir des implications importantes pour le développement de potentiel thérapies ciblées pour ces patients.

2.4 Y a-t-il un intérêt à développer des biomarqueurs « compagnons » dans les EC ?

Pour rappel, les biomarqueurs « compagnons » sont associés aux traitements de la maladie. En amont, ils permettent de sélectionner le traitement adéquat en identifiant les patients potentiellement répondeurs. Par la suite, ils permettent également de suivre l'efficacité thérapeutique.

Mes travaux de thèses ne se sont pas intéressés à ce type de biomarqueurs. Par ailleurs, avant de se lancer dans l'identification de biomarqueurs compagnons dans les EC, il faut déjà se poser la question de leur potentielle utilité.

En effet, le traitement des EC repose principalement sur l'éviction du facteur de contact et les traitements symptomatiques topiques en cas de poussées (voir chapitre 1.5). Ces

mesures peuvent être suffisantes dans la majorité des cas. Néanmoins, il existe des situations pour lesquelles l'éviction ne peut être réalisée comme (i) lorsque le facteur de contact n'a pu être clairement identifié, ou (ii) en cas d'allergène ubiquitaire ou (iii) aéroporté, ou encore (iv) dans un contexte professionnel. Dans ces cas bien particuliers, les traitements topiques ne suffisent plus et, en général, il est nécessaire de recourir à des thérapies systémiques. Malheureusement, aucun traitement systémique n'est aujourd'hui recommandé dans la prise en charge de l'ECA, et la majorité des thérapeutiques sont utilisés hors AMM. Ainsi il existe un besoin non satisfait de développer des traitements pour les ECA sévères persistants.

Au cours de nos travaux, de nombreux marqueurs identifiés représentent des caractéristiques clés de l'inflammation et de la réparation tissulaire au cours des EC. Ceux-ci pourraient donc, en plus de servir de biomarqueurs à des fins de diagnostic, s'avérer être des cibles thérapeutiques potentielles et servir d'indicateur pour le suivi de l'amélioration de la maladie. Par ailleurs, avec l'essor des thérapies ciblées et de la médecine personnalisée, le développement de biomarqueurs « compagnon » dans les EC pourrait prendre tout son intérêt. Ces derniers permettraient d'identifier les patients pour lesquels un traitement en particulier sera bénéfique et également de suivre l'efficacité clinique en se basant sur la caractérisation des réponses immunologiques dans les lésions.

3. Vers une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans les EC

Un des objectifs des analyses transcriptomiques est de suivre le changement de niveaux d'expression de transcrits en fonction de différentes conditions afin de mieux comprendre les processus physiologiques ou pathologiques. Par exemple, l'hypothèse ici est que les gènes dont l'expression varie, sont impliqués dans la pathogénèse des maladies étudiées.

L'interprétation des données repose donc sur deux grands types d'analyse : (i) la construction de profils d'expression de gènes d'une part, et (ii) l'étude des annotations fonctionnelles d'autre part. Ce deuxième type d'analyse sert ainsi à donner un sens au premier en associant une ou des fonctions biologiques aux gènes précédemment identifiés. Cette étape ouvre donc des perspectives pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques des conditions étudiées et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Néanmoins, l'ensemble de ces résultats doivent être validés par des études mécanistiques.

3.1 Que nous apporte l'analyse fonctionnelle des données sur la compréhension de la physiopathologie ?

Notre approche transcriptomique, appliquée au modèle du patch test nous a permis d'identifier de nombreux candidats biomarqueurs. Les principaux gènes associés aux réponses inflammatoires allergiques et irritantes ont été discutés dans l'article 1. Comme nous l'attendions de nombreux transcrits associés aux lymphocytes T (notamment TCD8+), à leur activation et leur cytotoxicité, ont été retrouvés fortement enrichis parmi les marqueurs de la signature allergique, alors qu'ils n'ont pas (ou très peu) été détectés dans la signature irritante. Concernant l'inflammation irritante nous avons retrouvé de nombreux marqueurs associés au remodelage tissulaire, signant d'un processus de renouvellement cutané intense. De façon surprenante, très peu de gènes associés à l'inflammation étaient exprimés, ce qui s'explique probablement par un temps trop tardif du prélèvement.

Par ailleurs, nous avons confirmé la forte expression de certains transcrits déjà rapportés dans l'inflammation allergique tels que CXCL9, CXCL10, CXCL11 (Meller et al., 2007) (Quaranta, Knapp, et al., 2014) ou encore OASL et ZBP1 (Ku et al., 2009). A l'inverse, nos résultats divergent avec ceux de Meller et ses collaborateurs, qui avaient rapporté une surexpression des chimiokines CCL17 et CCL19 dans l'inflammation allergique alors qu'elles étaient sous exprimées dans la réponse irritante à la fois chez l'homme et la souris ; dans notre étude, aucune différence significative n'a été observée entre les deux types d'inflammation. Mais il convient de noter que l'expression de ces marqueurs avait alors été analysée à 48h et non 72h dans l'étude de Meller. On peut également noter que la forte expression de CCL2 dans l'inflammation induite par l'application d'irritant chez la souris n'est pas retrouvée chez l'homme. Enfin, un travail récent s'intéressant à l'étude du transcriptome de l'eczéma des mains avaient mis en évidence 6 biomarqueurs permettant de discriminer les ECA des ECI (PD2D4, EPHA1, ACTN3, LLGL2, RNF220, WDR62) (Sølberg et al., 2022) ; mais nos analyses n'ont montré aucune différence significative entre allergie et irritation pour l'expression de ces gènes.

L'annotation fonctionnelle de nos données d'expression suivie par une analyse d'enrichissement a ensuite permis d'identifier plusieurs processus biologiques associés spécifiquement à chacun des deux types d'inflammation. Pour rappel, la réponse allergique était largement caractérisée par des gènes impliqués dans les réponses immunitaires ainsi que les processus de détoxification, alors que l'analyse de l'inflammation induite par les irritants a mise en lumière un nombre important de gènes associés aux processus du cycle cellulaire. De plus, même s'il existe des différences en termes de nombre de gènes significativement régulés en fonction du type d'allergène ou d'irritant testé, il convient de noter que les principales voies de signalisation modulées restent les mêmes.

Il serait par ailleurs intéressant d'identifier les types cellulaires exprimant ces marqueurs. Nous pourrions utiliser des méthodes d'immunophénotypage comme la cytométrie en flux, ou des analyses de séquençage ARN de cellule unique qui permettront alors de s'affranchir de l'effet « mélange de cellules » et ainsi obtenir une analyse plus fine de nos données.

Une des perspectives futures sera également d'intégrer ces résultats avec des données multi-omiques de différentes échelles afin d'étudier plus spécifiquement les réseaux biologiques et ainsi pouvoir déduire les potentielles interactions entre les molécules identifiées (e.g. régulation, activation...). Cela nous permettra ainsi de comprendre la dynamique des processus biologiques dans les EC et d'améliorer nos connaissances physiopathologiques.

3.2 L'intérêt des études mécanistiques : le chaînon manquant vers une médecine personnalisée ?

Parmi les 12 biomarqueurs diagnostiques que nous avons sélectionnés au cours de nos travaux, l'importance et les fonctions de plusieurs de ces marqueurs ont déjà largement été caractérisées et documentées au cours des études physiopathologiques (voir discussion article 3). Néanmoins, nous avons été surpris d'identifier certains marqueurs tels que PLEK, GPR183 ou encore IGFL3, qui n'avaient jusqu'à présent jamais été décrits dans cette pathologie. De façon intéressante, PLEK, qui code pour la plekstrine, une protéine impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine des leucocytes, a déjà été montré comme étant associé à la cytotoxicité des lymphocytes T (Klein-Hessling et al., 2017; Patil et al., 2018). Par ailleurs une surexpression de PLEK a également été documentée dans les lésions de DA (Hou et al., 2021). D'un autre côté, IGFL3 qui code pour un membre de la famille des facteurs de croissance analogue à l'insuline serait impliqué dans le métabolisme et la croissance cellulaire (Lobito et al., 2011). Très peu de données ont été rapportées sur ce facteur dans la littérature. Il a été signalé comme un des gènes les plus modulés au cours de processus de cicatrisation gingivale (Y. Wang & Tatakis, 2017), mais son expression était alors régulée à la baisse. Enfin, GPR183 est un récepteur couplé à une protéine G exprimé par plusieurs types de cellules immunitaires innées et adaptatives, telles que les DCs, les ILC, les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes T et B (Emgård et al., 2018; Hannedouche et al., 2011; C. Liu et al., 2011; K. Park & Scott, 2010; Preuss et al., 2014; Rosenkilde et al., 2006; Rutkowska et al., 2018; Yi et al., 2012). Ce récepteur est activé par des oxystérols, parmi lesquels, le 7 α ,25-dihydroxycholestérol (7 α ,25-OHC) a été rapporté comme le ligand endogène principal (Hannedouche et al., 2011; C. Liu et al., 2011). Celui-ci est synthétisé à partir du cholestérol suite à l'action de deux enzymes : la cholestérol 25-hydroxylase (CH25H) et l'oxystérol et stéroïde 7-alpha-hydroxylase (CYP7B1) (Yi et al., 2012), et de façon très intéressante l'expression de ces deux enzymes a été retrouvée régulée à la hausse dans notre étude 1. Le

gène CH25H fait partie en outre des biomarqueurs sélectionnés par Fortino et ses collaborateurs (Fortino et al., 2020). Par ailleurs, des études ont établi un lien entre GPR183 et diverses maladies humaines, et plusieurs auteurs ont rapportées un rôle de ce récepteur dans la migration, l'activation et la fonction des cellules T (Baptista et al., 2019; Benned-Jensen et al., 2011; Chalmin et al., 2015; Emgård et al., 2018; Gatto et al., 2013; J. Li et al., 2016; Niss Arfelt et al., 2017; Rutkowska et al., 2017, 2018). Néanmoins aucun lien entre celui-ci et l'ECA n'est rapportée dans la littérature.

Ainsi, des études mécanistiques sont donc nécessaires, pour comprendre le rôle de ces biomarqueurs dans la pathogénèse de l'ECA.

Dans cette perspective, nous avons réalisé des travaux complémentaires, présentés en **Annexe 3**, afin de mieux comprendre l'implication fonctionnelle du candidat biomarqueur GPR183 chez les patients atteints d'allergie de contact, ainsi que dans un modèle murin d'ECA (encore appelé hypersensibilité retardée de contact). Ce type de modèle comprend une phase de sensibilisation suite à l'application topique d'un allergène chimique (le DNFB), suivi d'une phase de révélation de la maladie, après application (challenge) du même allergène 5 jours plus tard au niveau de l'oreille (Saint-Mezard, Rosieres, et al., 2004). Ce modèle est bien caractérisé et utilisé depuis des décennies pour les études physiopathologiques des ECA.

Brièvement, nous avons confirmé une surexpression des transcrits GPR183, CH25H et CYP7B1 dans nos modèles d'ECA par rapport à la peau saine, à la fois chez l'homme et la souris. Nous avons également observé que la majorité des lymphocytes T CD8+ infiltrant les lésions d'eczéma exprimaient fortement le récepteur GPR183, sans que celui-ci ne semble favoriser leur migration *in vitro*. Nos expériences ont par ailleurs montré que le récepteur GPR183 serait impliqué dans la réactivation et la sécrétion cytokinique (notamment d'IFN- γ) des cellules T CD8+ spécifiques d'allergènes. Enfin, nous avons cherché à mettre en place un modèle *in vivo* d'inhibition de ce récepteur chez la souris. Des résultats préliminaires ont montré que le blocage de GPR183 limite l'inflammation cutanée induite par le DNFB chez la souris sensibilisée, confirmant ainsi un rôle de ce récepteur dans la réponse d'allergie. L'ensemble de ces observations restent tout de même à confirmer, et des investigations complémentaires sont en cours, avant d'envisager GPR183 comme une cible thérapeutique potentielle dans cette maladie.

En conclusion, il nous reste donc d'importants efforts à fournir afin de caractériser la fonction des biomarqueurs identifiés dans l'ECA. L'objectif sera double : une validation de la vraisemblance biologique de nos biomarqueurs pour confirmer leur spécificité pour la maladie pour laquelle ils ont été développés, mais également l'identification de cibles thérapeutiques potentielles.

CONCLUSION

La démarche actuelle pour diagnostiquer les EC et discriminer les formes allergique et irritante soulève de nombreux problèmes. Le raisonnement repose principalement sur la clinique et il n'est pas toujours évident d'identifier les patients à adresser pour la réalisation de tests épicutanés. Par ailleurs, l'interprétation des résultats du bilan allergologique peut parfois s'avérer difficile, entraînant une errance et une impasse diagnostique pour un certain nombre de patients. Ce travail de thèse apporte de nouvelles perspectives pour optimiser la procédure standard de diagnostic des EC.

La caractérisation de l'inflammation induite par l'exposition à des produits chimiques de différentes natures, à la fois dans les réactions de patch tests et dans les lésions actives des patients, nous a d'abord permis d'identifier des signatures moléculaires uniques, propres à chaque sous type d'EC. A partir de ces résultats, et par l'utilisation d'outils de bio-informatique, nous avons pu mettre en évidence différentes combinaisons de biomarqueurs et avons développé des algorithmes diagnostiques basés sur l'expression de ces derniers.

La validation des biomarqueurs a ensuite été effectuée à différents niveaux, à la fois technique et clinique. En effet, les différents biomarqueurs ont été validés par qRT PCR, confirmant les niveaux d'expressions identifiés dans les puces à ADN. Nous avons également observé que les réponses moléculaires corrélaient avec l'intensité clinique des réactions et la dose de produit chimique appliquée. De plus, nos modèles de prédiction ont démontré des performances diagnostiques excellentes pour discriminer allergie et irritation. Ces résultats ont été confirmés sur un ensemble de données externes, démontrant le potentiel de cette approche.

Enfin, au travers de nos différents travaux, nous avons pu aussi évaluer l'utilité clinique de notre test diagnostique. L'implémentation de cette méthode dans la pratique courante permet d'apporter une valeur ajoutée dans la prise en charge des patients à différents niveaux.

- (i) L'analyse moléculaire des lésions actives permet de stratifier les patients en fonction de leur niveau d'expression de biomarqueurs, et ce dès la première consultation, afin de mieux sélectionner ceux nécessitant la réalisation d'un bilan allergologique.
- (ii) Des résultats préliminaires indiquent également que l'utilisation de ce test aide à optimiser l'interprétation de ce bilan, en distinguant les réactions de patch tests faussement positives.
- (iii) Par ailleurs, au travers des résultats présentés dans l'article 2, les signatures moléculaires apportent aussi une aide précieuse afin de caractériser les réponses induites par des composés chimiques dotés de propriétés allergisantes mais également fortement irritants.

- (iv) Enfin, l'ensemble de ces résultats offre des perspectives pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les ECA et ECI.

Ce travail de thèse ouvre également la voie au développement de tests de diagnostic rapide qui devront être peu coûteux, transportables, pour pouvoir être utilisés par les laboratoires ou les médecins de ville.

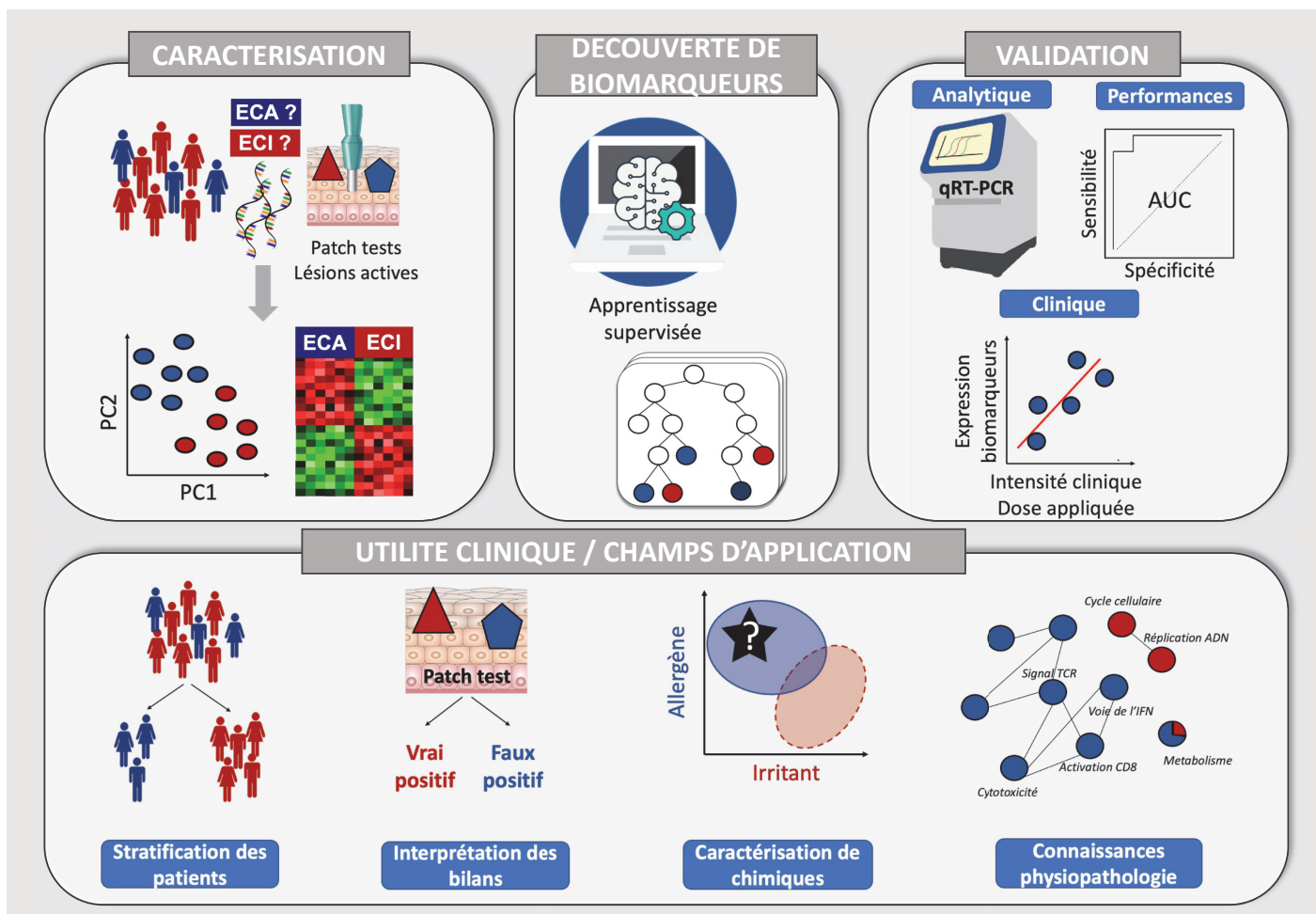


Figure 35. Les différentes étapes ayant conduit à l'identification et la validation de nouveaux biomarqueurs moléculaires pour le diagnostic des eczemas de contact (schéma de synthèse)

Mes travaux de thèse avaient pour objectif de développer des biomarqueurs diagnostiques des EC afin de raffiner la prise en charge actuelle des patients. Ce processus de recherche et développement de biomarqueurs a été réalisé en plusieurs étapes :

- (i) La **caractérisation** de l'inflammation induite par des produits chimiques de différentes natures (allergènes et irritants), à l'aide d'analyses transcriptomiques, nous a permis de mettre en évidence des signatures moléculaires uniques propres à chaque sous-type d'eczéma de contact. Le modèle du patch test a été utilisé pour cette première étape et les résultats ont ensuite été validés dans les lésions cliniques d'EC.
- (ii) Des outils de bio-informatique et de machine learning ont été utilisés pour la **découverte** et l'identification de combinaisons de biomarqueurs, ainsi que le développement d'algorithmes de prédiction diagnostique.
- (iii) La **validation** des biomarqueurs a été effectuée à différents niveaux : **analytique** (validation des biomarqueurs candidats par RT-PCR quantitative), **clinique** (corrélations avec différents paramètres tels que la sévérité des réactions ou la dose de produit chimique appliquée). Les performances diagnostiques des biomarqueurs ont également été validées.
- (iv) Enfin, nous avons évalué les différents **champs d'application** possible de nos biomarqueurs afin de définir leur **utilité clinique** pour la prise en charge des patients atteints d'ECA. Leur utilisation a notamment permis de stratifier les patients sur la base de l'expression de ces biomarqueurs dans les lésions cliniques, d'optimiser l'interprétation du bilan allergologique (i.e. la lecture des patch tests), de caractériser la nature de produits chimiques questionnables, et d'améliorer les connaissances sur la physiopathologie des eczemas.

VALORISATION SCIENTIFIQUE

Ces travaux ont fait l'objet de nombreuses communications (orales ou affichées) dans des congrès nationaux ou internationaux.

COMMUNICATION ORALES

2022

- Congrès du **GERDA** (Groupe d'études et de recherches en dermato-allergologie)
- Congrès de l'**ESCD** ("European society of Contact Dermatitis")
- Congrès de l'**EAACI** ("European Academy of Allergy and Clinical Immunology")
- **CFA** (Congrès Francophone d'Allergologie)

2021

- Congrès de la **SFI** (Société Française d'Immunologie)
- Congrès de l'**ERGECD** ("European Research Group on Experimental Contact Dermatitis")
- **CARD** (Congrès Annuel de Recherche Dermatologique) : prix de la meilleure communication orale

2020

- Congrès du **GERDA** (Groupe d'études et de recherches en dermato-allergologie)

2019

- **WAC** ("World Allergy Congress")
- Congrès de l'**ESDR** ("European Society for Dermatological Research")

2018

- Congrès de l'**ERGECD** ("European Research Group on Experimental Contact Dermatitis")

POSTERS

2021

- Congrès de la **SFI** (Société Française d'Immunologie)
- Congrès de l'**ESDR** ("European Society for Dermatological Research")
- Congrès de l'**ECI** ("European immunology community")

2020

- Congrès du **GERDA** (Groupe d'études et de recherches en dermato-allergologie)
- **JDP** (Journées Dermatologiques de Paris)
- Congrès de l'**EAACI** ("European Academy of Allergy and Clinical Immunology")

2019

- Congrès du **GERDA** (Groupe d'études et de recherches en dermato-allergologie)

- **JDP** (Journées Dermatologiques de Paris)
- Congrès de l'**EAACI** ("European Academy of Allergy and Clinical Immunology")

2018

- Congrès du **GERDA** (Groupe d'études et de recherches en dermato-allergologie)
- **CARD** (Congrès Annuel de Recherche Dermatologique)

ANNEXES

Annexe 1 : Revue “Role of tissue-resident memory T cells in the pathophysiology of allergic contact dermatitis”

Au début de mes années de thèse, j’ai effectué un travail bibliographique sur le rôle des LT résidents mémoires dans les eczémas de contact allergiques. Cet article a été publié en 2021 dans la revue *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*.



Role of tissue-resident memory T cells in the pathophysiology of allergic contact dermatitis

Marine-Alexia Lefevre^a, Marc Vocanson^a, and Audrey Nosbaum^{a,b}

Purpose of review

We bring updated knowledge on tissue-resident memory T cells (T_{RM}), underlining their major role in the recurrence and the severity of allergic contact dermatitis (ACD).

Recent findings

ACD is a frequently encountered skin disease. It is defined as a delayed-type hypersensitivity reaction initiated by the recruitment of antigen-specific T cells into the skin of sensitized patients. ACD lesions tend to develop on already-exposed areas and worsen over time. That clinical observation has raised questions on the contribution of T_{RM} to ACD recurrence and severity. T_{RM} are memory T cells that persist in peripheral tissues, such as the skin, without recirculating through the blood. These cells provide effective immune memory against pathogens, but they may also participate in the development or exacerbation of numerous inflammatory diseases, including skin allergies. Recent works have demonstrated a major role for T_{RM} in ACD pathophysiology.

Summary

In ACD, T_{RM} accumulate preferentially at the allergen contact site during the sensitization phase. Thereafter, these cells cause a rapid and intense response to any new allergen exposure. They also play a key role in flare-ups of ACD and the chronicity and severity of the disease. These aspects suggest that T_{RM} may have an interest as therapeutic targets.

Keywords

allergic contact dermatitis, pathophysiology, tissue-resident memory T cells

INTRODUCTION

Allergic contact dermatitis (ACD) is a T-cell-mediated skin disease [1]. ACD manifests as eczema flare-ups following cutaneous exposure to an allergen. Exacerbations usually occur at the same sites and tend to worsen over time [2]. Studies inspired by that clinical observation have demonstrated a key role for tissue-resident memory T cells (T_{RM}) in ACD recurrence and severity [3]. With this review, we first provide an overview on the pathophysiology of ACD and thereafter describe the general characteristics of T_{RM} and their contribution to ACD flare-ups. Finally, we will discuss the diagnostic and therapeutic vistas opened by the discovery of the roles of these cells in ACD.

ALLERGIC CONTACT DERMATITIS PATHOPHYSIOLOGY

ACD is a delayed-type hypersensitivity (i.e., a type IV reaction as defined by Gell and Coombs), characterized by the recruitment and activation of allergen-specific effector (Teff) and memory (Tmem)

T cells into the skin of previously sensitized patients. ACD follows three distinct phases:

Sensitization: Teff and Tmem differentiation

The sensitization phase is clinically silent but results in the development of specific Teff upon antigen presentation by dendritic cells (DC) [4]. The penetration and accumulation of the allergen in the skin activate innate immunity and the release of pro-inflammatory mediators, such as interleukin (IL)-1 β

^aCIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie (Team Epidermal Immunity and Allergy), INSERM, U1111, Univ Lyon, Université de Lyon 1, Ecole Normale Supérieure de Lyon, CNRS, UMR 5308, Lyon and ^bUniversité de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Service d'Allergologie et d'Immunologie Clinique, Pierre-Benite, France

Correspondence to Marine-Alexia Lefevre, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), 21 Avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France. Tel: +33 4 37 28 23 43; e-mail: marine-alexia.lefevre@inserm.fr

Curr Opin Allergy Clin Immunol 2021, 21:355–360

DOI:10.1097/ACI.0000000000000763

KEY POINTS

- T_{RM} play fundamental roles in ACD chronicity, severity, and flare-ups.
- Antigen-specific T_{RM} accumulate into the skin in parallel with the number of allergen exposures and the intensity of clinical reaction.
- Targeting pathological T_{RM} by depletion, modification of their residency capacities, or limiting their activation should be investigated as a promising option for the treatment of ACD.

or IL-18 by keratinocytes [5,6]. Inflammation is a prerequisite for the activation and migration of DC to the draining lymph nodes, where they present the antigen to naive CD8+ and CD4+ T cells *via* major histocompatibility complex class I or class II molecules respectively, or CD1 molecules [7–9]. Antigen-specific-T cells are then activated, proliferate, and differentiate into Teff and Tmem, able to recirculate into the skin. [10,11]. A new encounter with the antigen will activate these Teff and Tmem and result in skin inflammation.

Elicitation: activation of Teff

Elicitation occurs in sensitized patients 24–48 h after a renewed contact with the antigen. After cutaneous barrier penetration, the antigen is captured by the DC and presented to the antigen-specific T cells generated during the sensitization phase. These latter induce a rapid and effective inflammatory response and contribute to the recruitment of other circulating T cells [4]. Several studies highlighted the role of cytotoxic CD8+ T cells [12]. Their activation results in keratinocyte apoptosis and is accompanied by the release of pro-inflammatory cytokines that amplify skin inflammation [13,14]. Furthermore, unconventional lymphocytes, monocytes/macrophages, neutrophils, eosinophils, or mast cells, accumulate in ACD lesions, further worsening the inflammatory process [15–18].

This leads to the establishment of the ACD lesion.

Resolution: establishment of Tmem in the skin

The duration of the inflammatory reaction depends on the allergen persistence in the skin and involves regulatory processes. ACD lesion remission involves regulatory T cells (Treg) and the IL-10 they produce [19–21], increased

expression of co-inhibitory molecules by resident immune cells [22], and the release of anti-inflammatory cytokines.

During the resolution phase, Teff are progressively replaced by a large population of Tmem, which enable a faster and more effective immune response upon allergen reexposure [23]. Although the various Tmem share certain characteristics, they are not a homogenous population. Indeed, a number of subsets, distinguishable by their circulatory and functional properties, have been identified.

- (1) Central memory T cells (T_{CM}) circulate in the lymphoid organs. They have no direct effector activity, but rather the ability to proliferate and differentiate rapidly into effector cells in response to a secondary antigen challenge [24–26].
- (2) Effector memory T cells (T_{EM}) circulate in the blood and peripheral tissues. Upon antigen recognition, they rapidly acquire effector capacities, with limited proliferation [24–26].
- (3) More recently, a third population was identified, i.e., tissue-resident memory T cells (T_{RM}). These cells survive for several months within the peripheral tissues (notably epithelial barriers) of the organism without recirculating after the resolution of inflammation and are able to provide an extremely rapid response after new antigen exposure. [3,27,28].

TISSUE-RESIDENT MEMORY T CELLS (T_{RM})

T_{RM} were first described in cutaneous infection models. They are a heterogeneous group of T lymphocytes that, in contrast to T_{CM} and T_{EM} , do not migrate or recirculate outside of their resident tissues [29]. They thus provide rapid and durable immune responses against pathogenic agents in peripheral tissues (skin, lung, gut, nerves, etc.). T_{RM} comprise CD8+ and CD4+ T cells that differ phenotypically and functionally from their circulating counterparts [30].

Immunological characteristics of skin- T_{RM}

Because of their tissue residency and distinct functions, T_{RM} have specific characteristics. Transcriptionally, such factors as Hobit, Blimp-1, Runx3, Notch, and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) are strongly upregulated in T_{RM} and mediate their differentiation and survival [31–33]. In contrast, the EOMES, TCF1, and T-box transcription factors are downregulated in T_{RM} , compared to circulating Tmem [34].

Two phenotype markers, CD69 and CD103, are conventionally used to differentiate T_{RM} from other circulating T cells [35]. These two surface proteins play a key role in T_{RM} biology by favoring their retention and survival within the concerned tissue. CD49 is another important marker for T_{RM} , expressed upon IL-15 stimulation, and associated with T_{RM} cytotoxic function [production of granzyme B (GrB), perforin, and interferon gamma ($IFN\gamma$)] [36].

The molecular mechanisms behind T_{RM} differentiation have not been completely elucidated. There are three important steps in the development of these cells:

- (1) Penetration into cutaneous tissue – The ability of T_{eff} to penetrate and accumulate in the skin via the expression of the chemokine receptor CXCR3 is a prerequisite for the later establishment of memory cells [30].
- (2) Local retention – Preventing T cells from recirculating into the blood is a key factor in the development of T_{RM} . Egress can be hampered by the reduction of the molecules needed for it, such as CCR7 [37] or S1PR1, which is dependent on CD69 expression [38]. CD103 also appears to play a role by facilitating T_{RM} adhesion to epithelial cells via the E-cadherin ligand [30].
- (3) Micro-environmental signal responses – $TGF\beta$, $TNF\alpha$, IL-33, IL-7, and IL-15 contribute to the environmental signals favoring T_{RM} differentiation [30,39,40].

Other mechanisms that may contribute to T_{RM} survival are currently being explored, for example, the upregulation of BCL2 (an apoptosis regulator) [41] or AhR [33]. Finally, the expression of fatty acid-binding protein 4 (FABP4) and 5 (FABP5), which ease the absorption of cutaneous lipids needed for T_{RM} metabolism, also appear vital for their survival [42].

Immunosurveillance and skin protection

Peripheral tissues like skin are in direct contact with the environment and thus constantly exposed to pathogenic organisms. Because of their strategic position within the peripheral tissues where they can initiate a rapid immune response, T_{RM} provide a first-line barrier against infections. T_{RM} act as a detection and alarm system able to rapidly recruit immune effectors by secreting cytokines and chemokines like $IFN\gamma$, IL-2, IL-17, and $TNF\alpha$. By secreting GrB and perforin, they also provide direct cytotoxic activity against targeted pathogens [43]. Several studies have shown that T_{RM} induce

an immune response to infections superior to that of circulating T cells [44]. The T_{RM} resulting from a skin infection are not only local; they also disseminate throughout the skin [45]. T_{RM} thus favor organism-wide immunosurveillance. However, authors have reported more rapid viral control at infection-nonnaive vs infection-naive sites, suggesting that T_{RM} develop preferentially at the site of initial infection [44]. Thus, there does appear to be a clear correlation between local T_{RM} density at a particular site and the specific level of protection therein [46].

Beyond the immunosurveillance they provide, T_{RM} are also able to tame excessive responses to avoid tissue damage. These regulatory mechanisms involve co-inhibitory molecules (e.g., PD-1, LAG-3, TIM-3 and 2B4) [30] and anti-inflammatory cytokines (e.g., IL-10 and $TGF\beta$) that stimulate Treg [47].

Thus, under normal conditions, T_{RM} play an essential role as a sentinel within cutaneous tissue. They contribute to immune stimulation and favor rapid and effective responses to re-encountered pathogens while preserving tissue integrity.

T_{RM} pathogenesis

However, certain T_{RM} can become pathological and participate in the development of autoimmune or allergic inflammatory disease. That role was first identified in the setting of fixed drug eruptions (FDE), an allergic reaction that reoccurs in a same location each time the allergenic drug is administered. Studies revealed that $CD8+CD69+CD103+$ T cells in FDE lesions were able to secrete $IFN\gamma$ very rapidly upon renewed drug challenge [48]. This suggested that T_{RM} are the main effector cells driving the pathology.

T_{RM} involvement has furthermore been demonstrated in psoriasis [49–51], vitiligo [52], mycosis fungoides [53], and atopic dermatitis [54]. Clinical characteristics of these pathologies reflect T_{RM} biology:

- (1) Because T_{RM} do not recirculate, the inflammatory lesions they induce tend to be clearly circumscribed and highly persistent. The lesions may disappear under efficacious anti-inflammatory treatments, but will often reoccur at the same site when the treatment is stopped and/or an antigen is reencountered.
- (2) Furthermore, T_{RM} -mediated inflammation is extremely rapid upon antigen reexposure.
- (3) Finally, the progressive accumulation of T_{RM} in skin repeatedly exposed to antigens can result in progressive worsening of inflammation over time.

T_{RM} IN ALLERGIC CONTACT DERMATITIS: PATHOPHYSIOLOGY AND CLINICAL IMPLICATIONS

Several studies have shown that T_{RM} are involved in the pathophysiology of ACD. Most underline a major role for CD8+ T_{RM} [3,55,56[■],57[■]] and a recent study highlighted an important role for CD4+ T_{RM} in delayed hypersensitivity mouse model [59].

During the sensitization phase, antigen-specific T_{RM} and T_{CM} are generated in equal number from a shared precursor cell; they share the same receptor repertoire and recognize the same antigen [55]. T_{RM} domicile in the skin tissue under the influence of TGFβ and IL-15, and furnish a rapid (<24 h) and intense immune response. In contrast, the response furnished by circulating T_{CM} is more delayed (>48–72 h) and attenuated. T_{RM} gather preferentially at the site of contact and their activation is dependent on the allergen's presence [56[■]]. They release IFNγ and IL-17, leading to increased production of IL-1β, a key cytokine in ACD lesion development, by keratinocytes [3]. How long T_{RM} persists in skin tissue in the absence of antigen stimulation is currently unknown, although some studies have suggested that they diminish progressively over at least one year [56[■],58[■]].

Allergen reexposure causes a more severe ACD flare-up at antigen-nonaive compared to antigen-naive sites. This response has been observed in both preclinical dinitrofluorobenzene-induced ACD murine models and in patch-test studies in sensitized patients [3,55,56[■],57[■],58[■]]. The tendency of T_{RM} to accumulate in tissues exposed repeatedly to antigens may explain why ACD worsens over time, with more severe lesions appearing more rapidly with each exposure. Indeed, Schmidt *et al.* showed that clinical response correlated with epidermal T_{RM} levels, and IFNγ and IL-17 expression [3]. Similarly, Gadsboll *et al.* demonstrated a clinical correlation between reaction intensity and epidermal CD8+ T_{RM}, and a correlation of this latter with the applied allergen dose and the number of exposures [57[■]].

These observations may explain, for example, why one skin zone is affected but not another in nickel allergy, or why traces of highly allergenic compounds like paraphenylenediamine reactivate eczema at zones where T_{RM} may have accumulated. T_{RM} abundancy varies from one zone to another and in proportion to the frequency of allergen exposure. This contrasts with T_{CM}, the abundancy of which appears unaffected by exposure frequency [55].

A recent study showed that allergens can persist within the skin for more than a month after contact [56[■]], which favors the formation and accumulation of T_{RM} at the exposure site, even after the lesion has healed. Persistent T_{RM} are hyporeactive due to

the expression of co-inhibitory molecules, including PD1, TIM3, and 2B4. This attenuates their activation and prevents excessive recurrences at low-dose allergen exposure. Indeed, the use of PD1 and TIM3 antagonists exacerbates the inflammatory reaction with increased production of IFNγ and GrB [56[■]]. Thus, the presence of these strong regulatory mechanisms may be explained by the persistence of the allergen in the skin, which contributes to maintaining the expression of inhibitory receptors.

Consequently, T_{RM} appear to be key players in ACD recurrence.

Diagnostic insights

As compared to the roles of T_{EM} and T_{CM} in the pathophysiology of ACD, that of T_{RM} could explain why epicutaneous tests performed on the back, usually far from the sensitization site, show delayed and often low-intensity responses and why trace antigen reactions can be symptomatic only at previously exposed sites. These observations suggest the possibility of false-negative skin tests due to too-low concentrations of the considered antigen, and especially a possible interest for performing skin tests on the previously affected areas, as is done currently for FDE.

Also, the identification of qualitative and/or quantitative biomarkers of T_{RM} could prove useful for patient stratification, improve clinical management of the disease, and empower a personalized medicine approach to it. Finally, novel technological tools need to be developed to enable the detection of T_{RM} in routine clinical practice.

Therapeutic perspectives

For decades now, skin T_{RM} have been targeted fortuitously by topical corticosteroids. These latter bring lesions under control efficaciously and rapidly but do not prevent recurrences once they are discontinued. Recent work of our team suggests that topical corticosteroids temporarily modulate T_{RM} activation, but do not deplete them, which may explain a very rapid relapse after treatment discontinuation.

T_{RM} depend on numerous cytokines and chemokines for their development, survival, and activation, and thus potential therapies targeting these factors, or the markers expressed by T_{RM} are currently being explored. For example, targeting IL-15 with anti-CD122 (a subunit of IL-15 receptor) monoclonal antibodies has been shown to be effective in murine model of vitiligo [59]. Short-term treatment with anti-CD122 inhibits T_{RM} production of IFNγ, and long-term treatment depletes T_{RM} from skin lesions. [59].

Gamradt *et al.* showed that the expression of inhibitory checkpoint receptors by T_{RM} controls their reactivation and limits ACD flare-ups during low-concentration allergen exposure. They also reported that the long-term persistence of the allergen in the epidermis appeared to play a role in the modulation and expression of these co-inhibitory molecules [56^{***}]. The molecular network favoring the acquisition and expression of these inhibitory receptors by T_{RM} remains to be explored. Studying the capacities of PD1, TIM3 or 2B4 antagonists for the prevention of T_{RM} reactivation would appear particularly pertinent. Also, desensitization protocols using very low antigen doses may be useful. The development of new therapeutic strategies to prevent the reactivation of T_{RM} via their inhibitory receptors could help restore tolerance in allergic patients.

T_{RM} survival and function also depends on the absorption of exogenous lipids and their oxidative metabolism. Thus, pharmacological agents blocking lipid metabolisms, such as etomoxir or trimetazidine, strongly reduce T_{RM} survival [42]. The T_{RM} in ACD are also influenced by the mTOR pathway [60], and targeting it may enable the alteration of T_{RM} production and provide therapeutic benefit [61]. Thus, targeting T_{RM} metabolic or activation pathways would appear to be a therapeutic strategy worth exploring in ACD.

Finally, T_{RM} are essential for infection prevention and crucial components of the adaptive immune response. It appears thus vital to be able to distinguish protective T_{RM} from their pathological counterparts and to carefully study any adverse effects of treatments aimed at these latter. Respecting these precautions, approaches aimed at eliminating pathological T_{RM} (by depletion or modification of residency capacities) or preventing or limiting their activation hold great promise for the treatment of ACD.

CONCLUSION

The discovery of T_{RM} in the pathophysiology of ACD has contributed important knowledge on the natural history of the disease. T_{RM} play fundamental role in ACD chronicity, severity and flare-ups. A better understanding of their nature will empower the ability to target T_{RM} , which may ultimately enrich the armamentarium against ACD. The challenge is to target specifically the pathological T_{RM} while preserving the individual's immunological balance.

Acknowledgements

The authors would like to thank Kevin Erwin for editing.

Financial support and sponsorship

None.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- ■ of outstanding interest

1. Saint-Mezard P, Rosieres A, Krasteva M, *et al.* Allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 2004; 14:284–295.
2. Nosbaum A, Vocanson M, Rozières A, *et al.* Allergic and irritant contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 2009; 19:325–332.
3. Schmidt JD, Ahlström MG, Johansen JD, *et al.* Rapid allergen-induced interleukin-17 and interferon- γ secretion by skin-resident memory CD8(+) T cells. *Contact Derm* 2017; 76:218–227.
4. Vocanson M, Hennino A, Rozières A, *et al.* Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy* 2009; 64:1699–1714.
5. Klekotka PA, Yang L, Yokoyama WM. Contrasting roles of the IL-1 and IL-18 receptors in MyD88-dependent contact hypersensitivity. *J Investig Dermatol* 2010; 130:184–191.
6. Yasukawa S, Miyazaki Y, Yoshii C, *et al.* An ITAM-Syk-CARD9 signalling axis triggers contact hypersensitivity by stimulating IL-1 production in dendritic cells. *Nat Commun* 2014; 5:3755.
7. Cyster JG. Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *J Exp Med* 1999; 189:447–450.
8. Weltzien HU, Moulon C, Martin S, *et al.* T cell immune responses to haptens. Structural models for allergic and autoimmune reactions. *Toxicology* 1996; 107:141–151.
9. Betts RJ, Perkovic A, Mahapatra S, *et al.* Contact sensitizers trigger human CD1-autoreactive T-cell responses. *Eur J Immunol* 2017; 47:1171–1180.
10. Vocanson M, Hennino A, Chavagnac C, *et al.* Contribution of CD4(+) and CD8(+) T-cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Expert Rev Clin Immunol* 2005; 1:75–86.
11. Mora JR, von Andrian UH. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol* 2006; 27:235–243.
12. Vocanson M, Hennino A, Cluzel-Tailhardat M, *et al.* CD8+ T cells are effector cells of contact dermatitis to common skin allergens in mice. *J Investig Dermatol* 2006; 126:815–820.
13. Trautmann A, Akdis M, Kleemann D, *et al.* T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J Clin Investig* 2000; 106:25–35.
14. Akiba H, Kehren J, Ducluzeau M-T, *et al.* Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8+ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *J Immunol* 2002; 168:3079–3087.
15. Meixiong J, Anderson M, Limjunyawong N, *et al.* Activation of mast-cell-expressed mas-related G-protein-coupled receptors drives nonhistaminergic itch. *Immunity* 2019; 50:1163–1171. e5.
16. Tamoutounour S, Guilliams M, Montanana Sanchis F, *et al.* Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 2013; 39:925–938.
17. Gober MD, Fischelevich R, Zhao Y, *et al.* Human natural killer T cells infiltrate into the skin at elicitation sites of allergic contact dermatitis. *J Investig Dermatol* 2008; 128:1460–1469.
18. Rafei-Shamsabadi DA, van de Poel S, Dorn B, *et al.* Lack of Type 2 innate lymphoid cells promotes a type I-driven enhanced immune response in contact hypersensitivity. *J Investig Dermatol* 2018; 138:1962–1972.
19. Vocanson M, Rozières A, Hennino A, *et al.* Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:280–289. 289.e1-7.
20. Honda T, Otsuka A, Tanizaki H, *et al.* Enhanced murine contact hypersensitivity by depletion of endogenous regulatory T cells in the sensitization phase. *J Dermatol Sci* 2011; 61:144–147.
21. Ikebuchi R, Teraguchi S, Vandenberg A, *et al.* A rare subset of skin-tropic regulatory T cells expressing Il10/Gzmb inhibits the cutaneous immune response. *Sci Rep* 2016; 6:35002.
22. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 2010; 236:219–242.
23. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2012; 12:749–761.
24. Sallusto F, Lenig D, Förster R, *et al.* Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401:708–712.

25. Tussey L, Speller S, Gallimore A, Vessey R. Functionally distinct CD8+ memory T cell subsets in persistent EBV infection are differentiated by migratory receptor expression. *Eur J Immunol* 2000; 30:1823–1829.
26. von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000; 343:1020–1034.
27. Schenkel JM, Masopust D. Tissue-resident memory T cells. *Immunity* 2014; 41:886–897.
28. Mueller SN, Mackay LK. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nat Rev Immunol* 2016; 16:79–89.
29. Mami-Chouaib F, Tartour E. Editorial: tissue resident memory T cells. *Front Immunol* 2019; 10:1018.
30. Mackay LK, Rahimpour A, Ma JZ, et al. The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol* 2013; 14:1294–1301.
31. Mackay LK, Minnich M, Kragten NAM, et al. Hobit and Blimp1 instruct a universal transcriptional program of tissue residency in lymphocytes. *Science* 2016; 352:459–463.
32. Milner JJ, Toma C, Yu B, et al. Runx3 programs CD8+ T cell residency in nonlymphoid tissues and tumours. *Nature* 2017; 552:253–257.
33. Zaid A, Mackay LK, Rahimpour A, et al. Persistence of skin-resident memory T cells within an epidermal niche. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111:5307–5312.
34. Mackay LK, Wynne-Jones E, Freestone D, et al. T-box transcription factors combine with the cytokines TGF- β and IL-15 to control tissue-resident memory T cell fate. *Immunity* 2015; 43:1101–1111.
35. Watanabe R, Gehad A, Yang C, et al. Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells. *Sci Transl Med* 2015; 7:279a3.
36. Cheuk S, Schlums H, Gallais S  r  zal I, et al. CD49a expression defines tissue-resident CD8+ T cells poised for cytotoxic function in human skin. *Immunity* 2017; 46:287–300.
37. Bromley SK, Thomas SY, Luster AD. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat Immunol* 2005; 6:895–901.
38. Skon CN, Lee J-Y, Anderson KG, et al. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2013; 14:1285–1293.
39. Zhang N, Bevan MJ. Transforming growth factor- β signaling controls the formation and maintenance of gut-resident memory T cells by regulating migration and retention. *Immunity* 2013; 39:687–696.
40. Hirai T, Yang Y, Zenke Y, et al. Competition for active TGF- β cytokine allows for selective retention of antigen-specific tissue-resident memory T cells in the epidermal niche. *Immunity* 2021; 54:84–98. e5.
- This study showed that the source of TGF- β supporting T_{RM} cells was autocrine and that interclonal competition for transactivation of autocrine TGF- β preferentially enriches for antigen-specific T_{RM} at the skin barrier.
41. Wojciechowski S, Tripathi P, Bourdeau T, et al. Bim/Bcl-2 balance is critical for maintaining naive and memory T cell homeostasis. *J Exp Med* 2007; 204:1665–1675.
42. Pan Y, Tian T, Park CO, et al. Survival of tissue-resident memory T cells requires exogenous lipid uptake and metabolism. *Nature* 2017; 543:252–256.
43. Schenkel JM, Fraser KA, Beura LK, et al. T cell memory. Resident memory CD8T cells trigger protective innate and adaptive immune responses. *Science* 2014; 346:98–101.
44. Mackay LK, Stock AT, Ma JZ, et al. Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:7037–7042.
45. Jiang X, Clark RA, Liu L, et al. Skin infection generates nonmigratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature* 2012; 483:227–231.
46. Park SL, Zaid A, Hor JL, et al. Local proliferation maintains a stable pool of tissue-resident memory T cells after antiviral recall responses. *Nat Immunol* 2018; 19:183–191.
47. Zhong H, Liu Y, Xu Z, et al. TGF- β -induced CD8+CD103+ regulatory T cells show potent therapeutic effect on chronic graft-versus-host disease lupus by suppressing B cells. *Front Immunol* 2018; 9:35.
48. Shiohara T, Mizukawa Y, Teraki Y. Pathophysiology of fixed drug eruption: the role of skin-resident T cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2:317–323.
49. Boyman O, Hefti HP, Conrad C, et al. Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Exp Med* 2004; 199:731–736.
50. Cheuk S, Wik  n M, Blomqvist L, et al. Epidermal Th22 and Tc17 cells form a localized disease memory in clinically healed psoriasis. *J Immunol* 2014; 192:3111–3120.
51. Sagi L, Trau H. The Koebner phenomenon. *Clin Dermatol* 2011; 29:231–236.
52. Richmond JM, Strassner JP, Rashighi M, et al. Resident memory and recirculating memory T cells cooperate to maintain disease in a mouse model of Vitiligo. *J Investig Dermatol* 2019; 139:769–778.
53. Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, Kupper TS. Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood* 2010; 116:767–771.
54. Brunner PM, Emerson RO, Tipton C, et al. Nonlesional atopic dermatitis skin shares similar T-cell clones with lesional tissues. *Allergy* 2017; 72:2017–2025.
55. Gaide O, Emerson RO, Jiang X, et al. Common clonal origin of central and resident memory T cells following skin immunization. *Nat Med* 2015; 21:647–653.
56. Gamradt P, Laoufi L, Nosbaum A, et al. Inhibitory checkpoint receptors control CD8+ resident memory T cells to prevent skin allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2019; 143:2147–2157. e9.
- In experimental model of allergic contact dermatitis, Gamradt et al. showed that CD8+ T_{RM} remained in the epidermis for several weeks and mediated the eczema exacerbations. Furthermore, these cells expressed a specific set of inhibitory checkpoint receptors (PD-1 and TIM-3) that constrained their excessive reactivation. Importantly, they showed that the allergen persists in the epidermis for at least one month and this is responsible for both the development and maintenance of T_{RM}, as well as their expression of inhibitory checkpoint receptors.
57. Gadsb  ll A-S  , Jee MH, Funch AB, et al. Pathogenic CD8+ epidermis-resident memory T cells displace dendritic epidermal T cells in allergic dermatitis. *J Investig Dermatol* 2020; 140:806–815. e5.
- In ACD murine model, accumulation of T_{RM} results in a displacement of the normally occurring dendritic epidermal T cells (DETC) that could be explained by higher spare respiratory capacity of T_{RM}. The authors also demonstrated that the magnitude of the clinical reaction correlated with the number of CD8+ epidermal T_{RM}, which again correlated with allergen dose and number of allergen exposures.
58. Murata A, Hayashi S-I. CD4+ resident memory T cells mediate long-term local skin immune memory of contact hypersensitivity in BALB/c Mice. *Front Immunol* 2020; 11:775.
- Using a BALB/c mice model of contact hypersensitivity, the authors suggest an important role of CD4+ T_{RM} in mediated local skin memory.
59. Richmond JM, Strassner JP, Zapata L, et al. Antibody blockade of IL-15 signaling has the potential to durably reverse vitiligo. *Sci Transl Med* 2018; 10:.
60. Balato A, Lembo S, Ayala F, et al. Mechanistic target of rapamycin complex 1 is involved in psoriasis and regulated by anti-TNF- α treatment. *Exp Dermatol* 2017; 26:325–327.
61. Buerger C. Epidermal mTORC1 signaling contributes to the pathogenesis of psoriasis and could serve as a therapeutic target. *Front Immunol* 2018; 9:2786.

Annexe 2 : Revue « Médecine personnalisée dans la dermatite atopique »

En 2020, j'ai écrit une revue de la littérature sur la thématique de la « médecine personnalisée dans la DA ». Ce travail s'est principalement intéressé à décrire les différents endotypes de DA ainsi que les thérapies émergentes pour cette maladie, et a été publié dans la *Revue Française d'Allergologie*.



Disponible en ligne sur

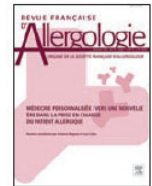
ScienceDirect

www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte

www.em-consulte.com



Revue générale

Médecine personnalisée dans la dermatite atopique

Personalized medicine in atopic dermatitis

M.-A. Lefevre^{a,*}, C. Braun^a, M. Vocanson^a, A. Nosbaum^{a,b}

^aCIRI, Centre international de recherche en infectiologie, (Équipe « Immunologie de l'allergie cutanée et vaccination »), 21, avenue Tony-Garnier, 69007 Lyon ; INSERM, U1111 ; université de Lyon 1 ; École normale supérieure de Lyon ; CNRS, UMR 5308, Lyon, France

^bHospices civils de Lyon, Centre hospitalier Lyon-Sud, service d'allergologie et immunologie clinique, Pierre-Bénite, France

R É S U M É

Mots clés :

Dermatite atopique
Médecine personnalisée
Endotypes
Thérapie ciblée
Biomarqueurs

La meilleure compréhension de la pathogenèse de la dermatite atopique (DA) combinée au besoin d'améliorer sa prise en charge a créé un environnement favorisant le développement de nouveaux traitements ciblés. En effet, la génomique et la transcriptomique ont apporté la preuve que des endotypes distincts existaient dans la DA, liés à l'implication de différentes voies inflammatoires. À ce titre, le dupilumab, un anticorps monoclonal ciblant le récepteur de l'interleukine (IL)-4 et de l'IL-13, est la première biothérapie à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché dans la DA. Plusieurs thérapies spécifiques sont également à des stades avancés de développement, ciblant les cytokines de l'inflammation innée (TSLP) ou de type 2 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-31), ou encore les voies de signalisation JAK/STAT. Au-delà de l'amélioration thérapeutique, la médecine personnalisée s'appuie aussi sur des données génétiques et transcriptomiques qui pourront très certainement être utilisées comme des biomarqueurs diagnostiques et pronostiques de la DA, mais aussi de survenue des autres comorbidités atopiques. Cette revue se propose donc de faire un panorama des avancées qui permettront de déployer une médecine personnalisée dans la DA.

© 2020 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

A B S T R A C T

Keywords:

Atopic dermatitis
Personalized medicine
Endotypes
Targeted therapy
Biomarkers

A better understanding of the pathogenesis of atopic dermatitis (AD) combined with the need to improve its management has created an environment that favours the development of new targeted treatments. Indeed, genomics and transcriptomics have provided evidence that distinct endotypes exist in AD, linked to the involvement of different inflammatory pathways. As such, dupilumab, a monoclonal antibody targeting the interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor, is the first biotherapy to have obtained marketing authorisation in AD. Several specific therapies are also in advanced stages of development, targeting cytokines of innate inflammation (TSLP) or type 2 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-31), or JAK/STAT signalling pathways. In addition to therapeutic improvement, personalized medicine also relies on genetic and transcriptomic data which can most certainly be used as diagnostic and prognostic biomarkers of AD, but also of the occurrence of other atopic co-morbidities. This review therefore aims to provide an overview of the advances that will make it possible to deploy personalized medicine in AD.

© 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : marine-alexia.lefevre@inserm.fr (M.-A. Lefevre).

1. Introduction

La dermatite atopique (DA) est la seconde dermatose inflammatoire la plus fréquente en France, après l'acné. Elle touche 10 % des enfants et 4 % des adultes [1]. Il s'agit d'une pathologie complexe, d'origine multifactorielle, mêlant facteurs immunologiques, génétiques et environnementaux. Cliniquement, elle se traduit par des lésions récurrentes d'eczéma et un prurit intense. La DA a un retentissement considérable sur la qualité de vie des patients et représente un enjeu majeur de santé publique. En effet, une étude néerlandaise a récemment montré qu'une DA non contrôlée avait un coût direct et indirect moyen de 20 695 €/patient/an [2,3].

Pour la majorité des patients, l'application régulière d'émollients associée à l'utilisation de traitements topiques anti-inflammatoires (dermocorticoïdes ou inhibiteurs de la calcineurine) est généralement suffisante. Cependant, environ 10 % des patients souffrant de DA modérée à sévère nécessitent un traitement anti-inflammatoire systémique. Les immunosuppresseurs conventionnels (ciclosporine, méthotrexate, azathioprine, acide mycophénolate) sont actuellement utilisés, mais avec des niveaux de preuves variables et un risque d'effets secondaires non négligeable [4]. Au cours des dernières années, des avancées spectaculaires dans la compréhension de la pathogénie de la DA et de son hétérogénéité se sont traduites par l'émergence de nouveaux traitements ciblant des voies immunologiques spécifiques, associées à la description d'endotypes distincts de DA [5]. Ainsi, le dupilumab, un anticorps (Ac) monoclonal dirigé contre la sous-unité α du récepteur de l'IL-4, a ouvert la voie à la médecine personnalisée dans la DA [6].

L'idée de la médecine personnalisée est de basculer d'une approche « valable pour tous » vers une stratégie thérapeutique qui cible « le bon patient avec le bon médicament à la bonne dose au bon moment », basée sur les caractéristiques individuelles de la maladie. La recherche de biomarqueurs permettant de stratifier les patients selon les chances d'efficacité de l'un ou l'autre traitement ciblé semble donc être un prérequis essentiel à une approche thérapeutique plus personnalisée dans la DA [7].

Après un rappel de la physiopathologie de la DA, cette revue se propose de décrire les endotypes distincts de DA, puis de recenser les thérapies ciblées en cours de développement, et enfin de discuter l'intérêt de l'identification de biomarqueurs afin de faire progresser la prise en charge de la DA à l'ère de la médecine personnalisée.

2. Physiopathologie de la DA

La physiopathologie de la DA implique des facteurs génétiques et environnementaux déterminant des anomalies de la barrière cutanée et des anomalies de l'immunité, tant innée qu'adaptative.

2.1. Altération de la barrière épidermique

Une caractéristique majeure de la DA est l'altération de la barrière cutanée épidermique. Situé à l'interface avec l'environnement, l'épiderme joue un rôle dans la protection vis-à-vis des pathogènes, allergènes et agressions physico-chimiques. La barrière cutanée participe également au maintien de l'homéostasie en régulant les pertes insensibles en eau (PIE) et les variations de température corporelle [8]. L'altération de la barrière cutanée dans la DA résulte d'un déficit en protéines de structures épidermiques (filaggrine, loricrine, desmogléine), qui peut être à la fois constitutionnel (anomalies génétiques) ou acquis (interactions de la barrière avec le microbiote cutané et le système immunitaire) [9,10]. Par exemple, en 2006, une étude a montré la présence de mutations inactivatrices hétérozygotes du gène codant pour la filaggrine, responsables d'une altération de la barrière épidermique, augmentant ainsi de façon majeure le risque de développer une DA [11]. Ces anomalies de la filaggrine n'expliquent cependant pas l'ensemble des mécanismes de la DA, car elles n'existent que chez un tiers des sujets atteints, et 60 % des personnes porteuses des mutations n'auront jamais

de DA [12]. Outre les anomalies d'origine génétique responsables d'une rupture de la barrière, l'environnement et la réponse inflammatoire influencent également l'intégrité de la barrière. En effet, la DA est associée à une réduction d'expression des peptides antimicrobiens et une anomalie du microbiote cutané, favorisant les infections cutanées chez les patients [13,14]. De plus, cette dysbiose au profit de *S. aureus* est responsable de l'altération de la barrière cutanée directement à travers des activités protéolytiques ou indirectement par l'initiation de réponse inflammatoire [15]. L'activation du système immunitaire et la production de cytokines pro-inflammatoires altèrent à leur tour la différenciation kératinocytaire et la production des protéines de structures épidermiques nécessaires à la fonction barrière.

2.2. Anomalies de l'immunité innée et adaptative

La pénétration dans la peau d'allergènes, de pathogènes ou de facteurs irritants chimiques, dont le passage transcutané est rendu possible par le défaut de barrière cité précédemment, est responsable de l'initiation de la réponse inflammatoire innée avec production de nombreux signaux dits « de danger ». Ces signaux activent des récepteurs innés (*toll-like receptors*) retrouvés à la surface des kératinocytes et des cellules dendritiques telles que les cellules de Langerhans, entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires comme *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP), IL-31, IL-33 ou IL-25 [16]. Ces cytokines activent notamment les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2), cellules de l'immunité innée identifiées comme des productrices majeures des cytokines de type 2 dans la DA [17], et les cellules dendritiques qui font le lien entre immunité innée et immunité adaptative, induisant la prolifération et la différenciation lymphocytaire. Les lymphocytes T (LT) (LT helper CD4⁺ et LT CD8⁺ cytotoxiques) infiltrent la peau de DA et participent à l'établissement de la lésion d'eczéma [18,19].

La réponse inflammatoire au cours de la DA, bien que largement décrite comme une inflammation de type 2 (associé à la production d'IL-4, 5, 9, 13, 31) [20,21] et 22 (associé à la production d'IL-22) [22], est en fait une inflammation mixte, présentant également des degrés variables de réponses de type 1 (associé à la production d'IFN γ , *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* [GM-CSF], IL-12) et 17 (associé à la production d'IL1-7A) [23,24]. Parmi les cytokines de type 2, l'IL-4 et l'IL-13 sont des éléments clés de la physiopathologie de la DA [25]. Ces cytokines ont une action synergique sur leur récepteur commun, composé des sous-unités IL-4R α et IL-13R α 1 [26]. Elles initient une cascade de signalisations (*Janus kinase/signal transducers and activators of transcription* [JAK/STAT]) puis la production de GATA3, un des régulateurs principaux des réponses immunitaires de type 2 [27]. L'IL-4 et l'IL-13 participent à l'altération de la barrière cutanée en inhibant la production des protéines de structure épidermique telles que la filaggrine, la loricrine, l'involutrine [28], et jouent un rôle dans le recrutement des éosinophiles, des basophiles et des LT et lymphocytes B [25]. Elles semblent également impliquées dans le prurit cutané [29]. De plus, ce profil de différenciation de type 2 conduit à la production d'IgE spécifiques d'allergènes, expliquant le développement d'autres maladies atopiques chez les individus prédisposés. L'IL-22 de son côté est responsable d'une anomalie de la différenciation kératinocytaire et de la barrière cutanée, et favorise la colonisation bactérienne par le *Staphylococcus aureus* [30]. Le taux d'IL-22 dans les lésions cutanées de DA serait corrélé à la sévérité de la maladie [31]. L'IFN γ , une cytokine de type 1, est principalement retrouvée dans la peau de DA à la phase chronique de la maladie [22], mais son rôle dans la DA reste à ce jour méconnu. Chez certains patients, on retrouve une polarisation lymphocytaire de type 17. L'IL-17A ainsi produite agit en synergie avec l'IL-22, induisant l'expression d'un sous-ensemble de gènes de différenciation terminale de la famille S100A. Cette cytokine est principalement surexprimée dans la peau de patients d'origine asiatique, qui présentent des lésions proches de celles du psoriasis [24]. L'ensemble de ces mécanismes

concourent à l'apparition des lésions cutanées et à un prurit féroce, symptôme majeur dans la DA. Il a également été montré que les fibres nerveuses responsables du prurit sont altérées dans la DA et sont sensibles aux facteurs pro-inflammatoires comme l'IL-31 ou TSLP, et aux facteurs microbiens [32]. Ainsi, les profils cytokiniques peuvent varier d'un patient à l'autre. On distingue alors plusieurs profils inflammatoires, encore appelés « endotypes ».

3. Une pathologie hétérogène se traduisant par différents endotypes

Contrairement aux phénotypes descriptifs utilisés de longue date pour grouper les patients d'après des caractéristiques observables, les endotypes désignent un sous-groupe de la maladie défini par la génétique ou un mécanisme moléculaire lié aux phénotypes de cette maladie. Ils font référence à des mécanismes physiopathologiques distincts susceptibles d'être pris pour cibles. Même s'il ne fait que commencer, le recensement d'endotypes de la DA progresse grâce aux récentes études transcriptomiques et protéomiques. Des études d'associations pangénomiques ont de plus permis d'identifier différents profils moléculaires [20]. Les endotypes les mieux caractérisés sont les endotypes de DA aiguë vs chronique [22], et extrinsèque vs intrinsèque [33]. D'autres endotypes de la maladie peuvent être distingués en termes d'âge (DA de l'enfant vs adulte), d'origine ethnique (populations européennes vs afro-américaines et asiatiques, etc.) et de présence ou d'absence de mutation de la filaggrine [24,34].

3.1. DA aiguë vs chronique

Historiquement, la DA était considérée comme une maladie biphasique, avec une réponse inflammatoire de type 2 dans la maladie aiguë, puis un passage à une réponse de type 1 dans la maladie chronique [35]. Des études récentes ont montré que dans sa phase aiguë, la DA est caractérisée par une forte activation inflammatoire de type 2 et type 22 avec une intensification de ces voies au cours de la maladie chronique, où une composante type 1 apparaît [22]. Il n'y a donc pas de véritable déviation immunitaire vers une polarisation type 1 exclusive au cours de la phase chronique de la maladie. L'inflammation de type 17, présente à des degrés variables en fonction des patients, ne semble pas particulièrement varier au cours de la progression de la maladie [22].

3.2. DA extrinsèque vs intrinsèque

Dans la DA, le terme « intrinsèque » s'oppose à celui d'« extrinsèque » et signifie « sans intervention de facteur extérieur ». Ainsi, un taux élevé d'IgE, une hyperéosinophilie plasmatique, un terrain personnel ou familial d'atopie, et la présence d'IgE spécifiques d'allergènes (aliments ou pneumallergènes) caractérisent la DA extrinsèque. À l'inverse, les formes intrinsèques présentent des taux d'IgE et d'éosinophiles plasmatiques bas, sans terrain atopique [36,37]. On observe également un taux de mutation de la filaggrine moins important dans les formes intrinsèques. Les formes de DA extrinsèque et intrinsèque partagent des caractéristiques cliniques identiques et représentent respectivement 80 % et 20 % des patients. En se basant sur l'analyse immunohistochimique et moléculaire de biopsies cutanées, Suárez-Fariñas et al. ont montré une implication similaire de la voie inflammatoire de type 2 dans les deux formes, suggérant que ce biais n'est pas la seule cause d'un taux élevé d'IgE, mais que d'autres facteurs jouent un rôle dans l'augmentation de ce dernier. Par ailleurs, les auteurs retrouvaient une surexpression significative des voies type 22 (IL-22) et type 17/IL-23 (IL-17A, IL-12/IL-23p40, elafin, CCL20, S100As) dans les lésions de DA intrinsèque [33].

3.3. DA pédiatrique vs adulte

Récemment, Brunner et al. ont rapporté des différences significatives en termes de polarisation lymphocytaire entre la peau des

enfants et celle des adultes atteints de DA [34]. Si l'inflammation de type 2 est activée à la fois dans les deux populations, les auteurs ont mis en évidence une surexpression des voies type 17 et type 22 dans les lésions de DA chez les enfants, tandis que l'axe de type 1 est régulé à la hausse dans les lésions de DA adulte. Des différences d'expression de gènes du complexe de différenciation épidermique ont également été mises en évidence avec notamment une diminution de leur expression dans la population adulte par rapport à la population pédiatrique. Le défaut de barrière cutanée chez les enfants semble être dû quant à lui à une diminution d'expression des gènes codants pour les protéines des jonctions serrées et des lipides épidermiques [34].

3.4. Variations basées sur l'origine ethnique

Pendant longtemps, on a considéré que les tableaux de DA étaient identiques, indépendamment de l'origine géographique et ethnique. Récemment, un travail portant sur le profil moléculaire des lésions de DA des patients caucasiens comparées à celles des patients d'origine asiatique a suggéré qu'il pourrait y avoir des différences dans le profil des cytokines responsables de l'inflammation chronique [24]. En plus du profil type 2 attendu, les lésions cutanées des patients asiatiques présentent une forte expression de molécules inflammatoires de type 17. Cette observation corrèle avec certains changements histologiques montrant une hyperplasie épidermique plus prononcée chez ces patients. De plus, des différences ont également été observées entre les populations caucasiennes et afro-américaines atteintes de DA [38]. Par exemple, les patients afro-américains montrent une activation plus importante de la voie de type 22 et ne présentent aucune mutation du gène codant pour la filaggrine, comme on peut l'observer chez les Européens [39].

La présence ou l'absence de mutation pour le gène codant pour la filaggrine permet également de distinguer deux derniers endotypes [40].

4. Émergence de thérapies ciblées dans la DA

Contrairement aux médicaments immunosuppresseurs classiquement utilisés, les nouvelles thérapies actuellement à l'étude ont l'ambition de moduler des voies inflammatoires spécifiques associées à des endotypes distincts de DA. Ce ciblage peut être abordé : (i) au niveau extracellulaire, soit en ciblant une/des cytokine(s), soit son/leur récepteur par des Ac monoclonaux (ou d'autres produits biologiques/biosimilaires) ; ou (ii) au niveau intracellulaire, en bloquant une/des voie(s) de signalisation en aval des récepteurs cytokiniques. Ce second ciblage est rendu possible par le développement de molécules chimiques de petit poids moléculaire, appelées « petites molécules », capables de pénétrer à travers les cellules. Les principales thérapies émergentes et leur cible sont répertoriées dans le [tableau 1](#).

4.1. Les thérapies biologiques

Étant donné le rôle prépondérant de l'inflammation de type 2 dans la physiopathologie de la DA, plusieurs produits biologiques ciblant cette voie sont en cours de développement.

Le dupilumab, un Ac monoclonal recombinant humain de type IgG4 qui inhibe la signalisation de l'IL-4 et l'IL-13 en se liant spécifiquement à l'IL-4R α [41,42], est la première biothérapie approuvée dans le traitement de la DA. Il est aujourd'hui indiqué chez les patients adultes qui présentent une contre-indication, une intolérance, ou qui sont en échec de la ciclosporine [41]. Le dupilumab réduit l'inflammation et le prurit, restaure la production des protéines de structure de l'épiderme et réduit la colonisation à *S. aureus* [43,44]. Les études ont montré une amélioration clinique considérable chez les patients avec un bon profil de tolérance. Seules des réactions au site d'injection et des conjonctivites

Tableau 1
Principales thérapies ciblées émergentes dans la DA par voie systémique.

| Nom | Cible | Voies inflammatoires ciblées | Phase de développement |
|--------------|----------------|---------------------------------------|------------------------|
| Dupilumab | IL-4R α | Type 2 | AMM |
| Tralokinumab | IL-13 | Type 2 | III |
| Lebrikinumab | IL-13 | Type 2 | III |
| Nemolizumab | IL-31R | Type 2 | III |
| BMS-981164 | IL-31 | Type 2 | Ib |
| Tezepelumab | TSLP | Type 2, Type 17 | Ila |
| GBR 830 | OX40 | Type 2 | II |
| Fezakinumab | IL-22 | Type 22, Type 17 | II |
| Secukinumab | IL-17A | Type 17, IL-22 | II |
| Ustekinumab | IL-22/23p40 | Type 17, Type 1, Type 22 | II |
| Ligelizumab | IgE | Allergic sensitization | II |
| Baricitinib | JAK1/2 | Type 1, Type 2, Type 22, IFN α | AMM |
| Upadacitinib | JAK1 | Type 1, Type 2, Type 22, IFN α | III |
| Abrocitinib | JAK1 | Type 1, Type 2, Type 22, IFN α | III |
| Feviprant | CRTH2 | Type 2 | II |

IL-4R α : sous-unité α du récepteur à l'IL-4 ; IL-31R : récepteur de l'IL-31 ; TSLP : *Thymic Stromal Lymphopoietin* ; PDE4 : phosphodiesterase 4 ; JAK : *Janus kinase* ; CRTH2 : récepteur des prostaglandines D2 ; AMM : autorisation de mise sur le marché.

inflammatoires non infectieuses sont significativement plus fréquentes sous dupilumab [45]. Le dosage recommandé est d'une dose initiale de 600 mg, suivie de 300 mg administrés toutes les 2 semaines en injections sous-cutanées.

D'autres Ac ciblant la voie type 2 sont en cours de développement. Le tralokinumab [46] et le lebrikizumab [47], se fixant sur des épitopes de l'IL-13 soluble, laissent présager une bonne efficacité dans la DA. Le nemolizumab et le BMS-981164 ciblent respectivement le récepteur A de l'IL-31 et l'IL-31 soluble et semblent démontrer une diminution significative du prurit et des troubles du sommeil [48,49]. Des Ac monoclonaux antagonistes de la TSLP (tezepelumab) et antagonistes de l'OX40 (GBR 830) sont également en cours d'investigation. Pour rappel, la TSLP stimule l'expression d'OX40 par les cellules dendritiques myéloïdes qui interagissent avec l'OX-40 ligand des LT et favorise la déviation vers une réponse type 2.

La réponse inflammatoire au cours de la DA étant d'origine mixte et pouvant ainsi varier d'un patient à l'autre, des traitements inhibant les cytokines type 17 et type 22 sont également en cours d'étude. Pour exemple, le fezakinumab (ILV-094) bloquant l'IL-22 [50] ou le secukinumab et l'ustekinumab [51] ciblant la voie type 17 pourraient être des pistes thérapeutiques prometteuses pour certains endotypes.

Comme vu précédemment, le taux d'IgE totales est un des critères permettant de différencier la DA intrinsèque de celle extrinsèque. C'est pourquoi les chercheurs ont décidé d'étudier l'effet de l'omalizumab et du ligelizumab, deux Ac anti-IgE de haute affinité, dans le traitement de la DA [52]. Ces derniers n'ont pas encore démontré leur efficacité, mais il faut souligner que les patients inclus n'étaient pas sélectionnés sur leur taux plasmatique d'IgE totales.

4.2. Les petites molécules

En dehors des biothérapies qui ont une action ciblée sur une/des cytokine(s), des petites molécules possédant une action inhibitrice plus large sont en cours de développement dans le traitement de

la DA. Certaines sont formulées pour des applications topiques, d'autres pour une administration orale.

Le crisaborole, un inhibiteur topique de la phosphodiesterase 4 (PDE4), est homologué par la FDA depuis 2016 [53]. La PDE4 est une enzyme produite par de nombreuses cellules effectrices telles que les LT, les mastocytes, les éosinophiles, et est impliquée dans la production de cytokines pro-inflammatoires.

La majorité des cytokines impliquées dans l'inflammation chronique de la DA (IL-4, IL-13, IL-22, IL-31, IL-5) utilise la voie de signalisation Janus kinase (JAK) et les activateurs de transcription JAK/STAT pour stimuler l'expression de chémokines épidermiques, de cytokines pro-inflammatoires et diminuer la production de protéines de structure épidermique, telles que la filaggrine. La famille des JAK comprend 5 membres : JAK1, JAK2, JAK3, ainsi que TYK1 et TYK2. De nombreuses molécules ciblant les JAK 1 à 3 sont déjà homologuées pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et sont en cours d'évaluation dans la DA [54]. Parmi les plus prometteuses, on peut citer : le baricitinib et le ruxolitinib, inhibiteurs des JAK1 et JAK2, l'upadacitinib, l'abrocitinib et le delgocitinib, inhibiteurs de JAK1 [54]. La majorité de ces molécules est disponible par voie orale, sauf le ruxolitinib et le delgocitinib disponibles en topiques.

Enfin, d'autres petites molécules ciblant la cascade pro-inflammatoire ou pro-prurit sont en cours de développement. Il s'agit notamment des antagonistes des CRTH2 (récepteurs exprimés par les cellules type 2), des activateurs de SIHP (qui inhibe naturellement la voie de PI3kinase impliquée dans l'activation et la mobilisation des cellules inflammatoires), des inhibiteurs des récepteurs Kappa opioïde (KOR), des inhibiteurs du récepteur 1 à la neurokinine (NK1R) (impliqué dans la libération de la substance P et associée à une augmentation du prurit), des antagonistes du récepteur de l'histamine 4 (H4R) (exprimé sur les cellules Th2 et dont l'activation conduit à la synthèse de l'IL-31), des inhibiteurs du TRPV1 (sigle anglais pour *Transient Receptor Potential Vanilloïde 1*, exprimé sur les extrémités nerveuses et impliqué dans le prurit), ou encore des agonistes des récepteurs d'hydrocarbure aryle (AhR) [55].

L'introduction de ces nouvelles thérapies ciblées, se basant sur une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la DA, devrait ouvrir une nouvelle ère prometteuse pour le traitement personnalisé de la DA.

5. Autres applications de la médecine personnalisée dans la DA

En raison du caractère hétérogène de la DA, il est peu probable que tous les patients répondent de la même manière à ces médicaments nouvellement testés. Pour exemple, seuls environ 50 % des patients DA traités par dupilumab, ciblant la voie type 2, atteignent 75 % d'amélioration après 16 semaines de traitement [56]. Choisir le bon traitement pour le bon patient implique donc d'identifier l'endotype auquel appartient le patient en se basant sur le dosage de biomarqueurs spécifiques, ceci dans une logique également médico-économique.

Selon le National Institutes of Health, un biomarqueur se définit comme « une caractéristique biologique mesurée de façon objective et évaluée comme un indicateur soit de processus biologiques normaux ou pathologiques, soit de réponses pharmacologiques résultant d'une intervention thérapeutique » [57]. On peut ainsi distinguer (i) les biomarqueurs physiopathologiques et diagnostiques, qui ont pour but d'identifier des cibles thérapeutiques en permettant l'approfondissement de la connaissance des mécanismes physiopathologiques et le diagnostic de la maladie ; (ii) les biomarqueurs pronostiques, permettant de déterminer l'évolution prévisible de la pathologie ; (iii) les biomarqueurs prédictifs de l'effet thérapeutique, permettant d'identifier les patients les plus à même de répondre à un traitement ; et (iv) les biomarqueurs de réponse à ce traitement.

L'identification de tels biomarqueurs dans la DA (sériques ou tissulaires) fait actuellement l'objet de nombreuses recherches [58].

Des travaux récents menés par Thijs et al. ont identifié 4 clusters/endotypes distincts basés sur l'analyse d'un panel de biomarqueurs sériques [7,59]. Pour exemple, deux de ces endotypes étaient caractérisés par un profil de biomarqueurs associés à l'inflammation de type 2, suggérant que les patients de ces groupes seraient des candidats idéaux pour les thérapies inhibant la voie type 2. La stratification basée sur un biomarqueur sérique s'est déjà avérée utile dans le traitement de l'asthme, où il a été constaté que les patients souffrant d'asthme avec des taux élevés de périostine présentaient une meilleure réponse au lebrikizumab (anti-IL-13) par rapport aux patients avec une faible périostine [60].

De même, les études basées sur l'analyse transcriptomique, effectuée à partir de biopsies cutanées, sont une source d'information cruciale, permettant la caractérisation de différents profils d'expression génique [61,62]. Pour exemple, l'identification d'une forte expression du gène de l'IL-17A dans les lésions de DA chez les patients asiatiques laisse présager d'une éventuelle réponse aux anti-IL-17 chez ces patients [63]. Ainsi, la validation de biomarqueurs dans la DA permettra une prise en charge personnalisée, minimisant le risque d'échec thérapeutique et le coût des traitements. À cet égard, l'identification de biomarqueurs robustes devrait être au cœur des recherches futures dans la DA.

6. Conclusion

La médecine personnalisée de la DA, par rapport à d'autres maladies, est encore à un stade très précoce. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques a conduit au développement de nouveaux agents thérapeutiques. Les connaissances accrues générées ces dernières années sur la base moléculaire de la DA devraient contribuer à l'identification de biomarqueurs spécifiques ou d'un groupe de biomarqueurs qui caractérisent les endotypes hétérogènes de cette maladie. Une approche thérapeutique par endotype est nécessaire dans une perspective de médecine personnalisée dans la DA.

Il y a peu de doute que la médecine personnalisée apportera une révolution conceptuelle dans notre pratique clinique. Les cliniciens seront amenés à aller au-delà de l'histoire médicale, de l'examen physique et des analyses de laboratoire, et à aborder l'analyse des gènes et du transcriptome du patient pour leur prise de décision et la sélection de la thérapie, qui sera adaptée aux caractéristiques individuelles de la maladie. Il est à espérer que cette approche ciblée contribue à limiter l'errance diagnostique, la répétition d'examen et les traitements inadéquats.

Déclaration de lien d'intérêts

A. Nosbaum : Investigateur : Abbvie, Leo Pharma, Eli Lilly, Incyte, Novartis, Pierre Fabre, Galderma, Sanofi-Regeneron ; consultant : Abbvie, Leo Pharma, Eli Lilly, Novartis, Pfizer, Sanofi, Medac, Celgene ; orateur : Abbvie, Janssen, Eli Lilly, Novartis, Pfizer, Sanofi, Medac.

Les autres auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Cet article fait partie du numéro supplément *Médecine personnalisée : vers une nouvelle ère dans la prise en charge du patient allergique* réalisé avec le soutien institutionnel de Stallergenes Greer.

Remerciements

Société Française d'Allergologie.

Références

- [1] Barbarot S, Auziere S, Gadkari A, Girolomoni G, Puig L, Simpson EL, et al. Epidemiology of atopic dermatitis in adults: Results from an international survey. *Allergy* 2018;73:1284–93. <https://doi.org/10.1111/all.13401>.

- [2] Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet* 2016;387:1109–22. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00149-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00149-X).
- [3] Ariens LFM, van Nimwegen KJM, Shams M, de Bruin DT, van der Schaft J, van Os-Medendorp H, et al. Economic Burden of Adult Patients with Moderate to Severe Atopic Dermatitis Indicated for Systemic Treatment. *Acta Derm Venereol* 2019;99:762–8. <https://doi.org/10.2340/00015555-3212>.
- [4] Schmitt J, Schmitt NM, Kirch W, Meurer M. Outpatient care and medical treatment of children and adults with atopic eczema. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009;7:345–51. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2008.06967.x>.
- [5] Czarnowicki T, He H, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Atopic dermatitis endotypes and implications for targeted therapeutics. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2019;143:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.10.032>.
- [6] Hamilton JD, Suárez-Fariñas M, Dhingra N, Cardinale I, Li X, Kostic A, et al. Dupilumab improves the molecular signature in skin of patients with moderate-to-severe atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:1293–300. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.10.013>.
- [7] Bakker DS, Nierkens S, Knol EF, Giovannone B, Delemarre EM, van der Schaft J, et al. Confirmation of multiple endotypes in atopic dermatitis based on serum biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.062>.
- [8] Quaresma JAS. Organization of the Skin Immune System and Compartmentalized Immune Responses in Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 2019;32. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-18>.
- [9] Thyssen JP, Kezic S. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2014;134:792–9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.06.014>.
- [10] Cabanillas B, Novak N. Atopic dermatitis and filaggrin. *Current Opinion in Immunology* 2016;42:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.05.002>.
- [11] Palmer CNA, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006;38:441–6. <https://doi.org/10.1038/ng1767>.
- [12] Irvine AD, McLean WHI, Leung DYM. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med* 2011;365:1315–27. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1011040>.
- [13] Kezic S, O'Regan GM, Yau N, Sandilands A, Chen H, Campbell LE, et al. Levels of filaggrin degradation products are influenced by both filaggrin genotype and atopic dermatitis severity. *Allergy* 2011;66:934–40. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02540.x>.
- [14] Guzik TJ, Bzowska M, Kasprócz A, Czerniawska-Mysik G, Wójcik K, Szymid D, et al. Persistent skin colonization with *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: relationship to clinical and immunological parameters. *Clin Exp Allergy* 2005;35:448–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2005.02210.x>.
- [15] Leung DYM. The microbiome and allergic diseases: A struggle between good and bad microbes. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2019;122:231–2. <https://doi.org/10.1016/j.anaai.2019.01.003>.
- [16] Divekar R, Kita H. Recent advances in epithelium-derived cytokines (IL-33, IL-25 and TSLP) and allergic inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2015;15:98–103. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000133>.
- [17] Salimi M, Barlow JL, Saunders SP, Xue L, Gutowska-Owsiak D, Wang X, et al. A role for IL-25 and IL-13 – driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med* 2013;210:2939–50. <https://doi.org/10.1084/jem.20130351>.
- [18] Hennino A, Vocanson M, Toussaint Y, Rodet K, Benetière J, Schmitt AM, et al. Skin-Infiltrating CD8+ T Cells Initiate Atopic Dermatitis Lesions. *J Immunol* 2007;178:5571–7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.9.5571>.
- [19] Brunner PM, Emerson RO, Tipton C, Garcet S, Khattri S, Coats I, et al. Nonlesional atopic dermatitis skin shares similar T-cell clones with lesional tissues. *Allergy* 2017;72:2017–25. <https://doi.org/10.1111/all.13223>.
- [20] Mansouri Y, Guttman-Yassky E. Immune Pathways in Atopic Dermatitis, and Definition of Biomarkers through Broad and Targeted Therapeutics. *J Clin Med* 2015;4:858–73. <https://doi.org/10.3390/jcm4050858>.
- [21] Roediger B, Kyle R, Yip KH, Sumaria N, Guy TV, Kim BS, et al. Cutaneous immunosurveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2013;14:564–73. <https://doi.org/10.1038/ni.2584>.
- [22] Gittler JK, Shemer A, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQF, et al. Progressive activation of TH2/TH22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:1344–54. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.012>.
- [23] Wang D, Beck LA. Immunologic Targets in Atopic Dermatitis and Emerging Therapies: An Update. *Am J Clin Dermatol* 2016;17:425–43. <https://doi.org/10.1007/s40257-016-0205-5>.
- [24] Noda S, Suárez-Fariñas M, Ungar B, Kim SJ, Strong C de G, Xu H, et al. The Asian atopic dermatitis phenotype combines features of atopic dermatitis and psoriasis with increased TH17 polarization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2015;136:1254–64. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.015>.
- [25] Bitton A, Avlas S, Reichman H, Itan M, Karo-Atar D, Azouz NP, et al. A key role for IL-13 signaling via the type 2 IL-4 receptor in experimental atopic dermatitis. *Science Immunology* 2020;5.
- [26] Andrews AL, Holloway JW, Holgate ST, Davies DE. IL-4 Receptor α Is an Important Modulator of IL-4 and IL-13 Receptor Binding: Implications for the Development of Therapeutic Targets. *The Journal of Immunology* 2006;176:7456–61. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.12.7456>.
- [27] Bao L, Zhang H, Chan LS. The involvement of the JAK-STAT signaling pathway in chronic inflammatory skin disease atopic dermatitis. *JAKSTAT* 2013;2:e24137. <https://doi.org/10.4161/jkst.24137>.
- [28] Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:R7–12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.012>.

- [29] Reich A, Szczęch J, Samotij D. Biologics for Itch: IL-4/IL-13, IL-31, IL-17, and IL-23 Antagonists. *Curr Derm Rep* 2017;6:263–72. <https://doi.org/10.1007/s13671-017-0204-7>.
- [30] Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 2009;119:3573–85. <https://doi.org/10.1172/JCI40202>.
- [31] Nograles KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, et al. IL-22-producing « T22 » T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1244–1252.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.03.041>.
- [32] Lee CH, Hong CH, Yu WT, Chuang HY, Huang SK, Chen GS, et al. Mechanistic correlations between two itch biomarkers, cytokine interleukin-31 and neuro-peptide β -endorphin, via STAT3/calcium axis in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2012;167:794–803. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.11047.x>.
- [33] Suárez-Fariñas M, Dhingra N, Gittler J, Shemer A, Cardinale I, de Guzman Strong C, et al. Intrinsic atopic dermatitis shows similar TH2 and higher TH17 immune activation compared with extrinsic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:361–70. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.04.046>.
- [34] Brunner PM, Israel A, Zhang N, Leonard A, Wen HC, Huynh T, et al. Early-onset pediatric atopic dermatitis is characterized by TH2/TH17/TH22-centered inflammation and lipid alterations. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141:2094–106. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.02.040>.
- [35] Grewe M, Walthers S, Gyułko K, Czech W, Schöpf E, Krutmann J. Analysis of the cytokine pattern expressed in situ in inhalant allergen patch test reactions of atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol* 1995;105:407–10. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12321078>.
- [36] Kabashima-Kubo R, Nakamura M, Sakabe J, Sugita K, Hino R, Mori T, et al. A group of atopic dermatitis without IgE elevation or barrier impairment shows a high Th1 frequency: possible immunological state of the intrinsic type. *J Dermatol Sci* 2012;67:37–43. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.04.004>.
- [37] Tokura Y. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 2010;58:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.02.008>.
- [38] Torrelo A. Atopic dermatitis in different skin types. What is to know? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014;28 Suppl 3:2–4. <https://doi.org/10.1111/jdv.12480>.
- [39] Thawer-Esmail F, Jakasa I, Todd G, Wen Y, Brown SJ, Kroboth K, et al. South African amaXhosa patients with atopic dermatitis have decreased levels of filaggrin breakdown products but no loss-of-function mutations in filaggrin. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:280–282.e1–2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.053>.
- [40] Carson CG, Rasmussen MA, Thyssen JP, Menné T, Bisgaard H. Clinical presentation of atopic dermatitis by filaggrin gene mutation status during the first 7 years of life in a prospective cohort study. *PLoS ONE* 2012;7:e48678. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048678>.
- [41] Seegräber M, Strouf J, Walter A, Knop M, Wollenberg A. Dupilumab for treatment of atopic dermatitis. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2018;11:467–74. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1449642>.
- [42] Awosika O, Kim L, Mazhar M, Rengifo-Pardo M, Ehrlich A. Profile of dupilumab and its potential in the treatment of inadequately controlled moderate-to-severe atopic dermatitis. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2018;11:41–9. <https://doi.org/10.2147/CCID.S123329>.
- [43] Guttman-Yassky E, Bissonnette R, Ungar B, Suárez-Fariñas M, Ardeleanu M, Esaki H, et al. Dupilumab progressively improves systemic and cutaneous abnormalities in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143:155–72. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.08.022>.
- [44] Callewaert C, Nakatsuiji T, Knight R, Kosciółek T, Vrbanac A, Kotol P, et al. IL-4R α Blockade by Dupilumab Decreases Staphylococcus aureus Colonization and Increases Microbial Diversity in Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol* 2020;140:191–202.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.05.024>.
- [45] Treister AD, Kraff-Cooper C, Lio PA. Risk Factors for Dupilumab-Associated Conjunctivitis in Patients With Atopic Dermatitis. *JAMA Dermatol* 2018;154:1208–11. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2018.2690>.
- [46] Wollenberg A, Howell MD, Guttman-Yassky E, Silverberg JL, Kell C, Ranade K, et al. Treatment of atopic dermatitis with tralokinumab, an anti-IL-13 mAb. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143:135–41. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.05.029>.
- [47] Simpson EL, Flohr C, Eichenfield LF, Bieber T, Sofen H, Taleb A, et al. Efficacy and safety of lebrikizumab (an anti-IL-13 monoclonal antibody) in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis inadequately controlled by topical corticosteroids: A randomized, placebo-controlled phase II trial (TREBLE). *J Am Acad Dermatol* 2018;78:863–871.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.01.017>.
- [48] Kabashima K, Furue M, Hanifin JM, Pulka G, Wollenberg A, Galus R, et al. Nemolizumab in patients with moderate-to-severe atopic dermatitis: Randomized, phase II, long-term extension study. *J Allergy Clin Immunol* 2018;142:1121–1130.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.03.018>.
- [49] Ruzicka T, Mihara R. Anti-Interleukin-31 Receptor A Antibody for Atopic Dermatitis. *N Engl J Med* 2017;376:2093. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1704013>.
- [50] Brunner PM, Pavel AB, Khattri S, Leonard A, Malik K, Rose S, et al. Baseline IL-22 expression in patients with atopic dermatitis stratifies tissue responses to fezakinumab. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143:142–54. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.07.028>.
- [51] Khattri S, Brunner PM, Garcet S, Finney R, Cohen SR, Oliva M, et al. Efficacy and safety of ustekinumab treatment in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 2017;26:28–35. <https://doi.org/10.1111/exd.13112>.
- [52] Kim DH, Park KY, Kim BJ, Kim MN, Mun SK. Anti-immunoglobulin E in the treatment of refractory atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 2013;38:496–500. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2012.04438.x>.
- [53] Paller AS, Tom WL, Lebwohl MG, Blumenthal RL, Boguniewicz M, Call RS, et al. Efficacy and safety of crisaborole ointment, a novel, nonsteroidal phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor for the topical treatment of atopic dermatitis (AD) in children and adults. *J Am Acad Dermatol* 2016;75:494–503.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.05.046>.
- [54] He H, Guttman-Yassky E. JAK Inhibitors for Atopic Dermatitis: An Update. *Am J Clin Dermatol* 2019;20:181–92. <https://doi.org/10.1007/s40257-018-0413-2>.
- [55] Vakharia PP, Silverberg JL. New therapies for atopic dermatitis: Additional treatment classes. *J Am Acad Dermatol* 2018;78:576–83. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2017.12.024>.
- [56] Simpson EL, Bieber T, Guttman-Yassky E, Beck LA, Blauvelt A, Cork MJ, et al. Two Phase 3 Trials of Dupilumab versus Placebo in Atopic Dermatitis. *N Engl J Med* 2016;375:2335–48. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1610020>.
- [57] Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89–95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>.
- [58] Muraro A, Lemanske RF, Helliöns PW, Akdis CA, Bieber T, Casale TB, et al. Precision medicine in patients with allergic diseases: Airway diseases and atopic dermatitis-PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:1347–58. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.010>.
- [59] Thijs JL, Strickland I, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Nierkens S, Giovannone B, Cosmor E, et al. Moving toward endotypes in atopic dermatitis: Identification of patient clusters based on serum biomarker analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:730–7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.03.023>.
- [60] Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsley MV, Arron JR, et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N Engl J Med* 2011;365:1088–98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1106469>.
- [61] Guttman-Yassky E, Ungar B, Malik K, Dickstein D, Suprun M, Estrada YD, et al. Molecular signatures order the potency of topically applied anti-inflammatory drugs in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:1032–1042.e13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.01.027>.
- [62] Noda S, Krueger JG, Guttman-Yassky E. The translational revolution and use of biologics in patients with inflammatory skin diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:324–36. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.015>.
- [63] Noda S, Suárez-Fariñas M, Ungar B, Kim SJ, de Guzman Strong C, Xu H, et al. The Asian atopic dermatitis phenotype combines features of atopic dermatitis and psoriasis with increased TH17 polarization. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:1254–64. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.015>.

Annexe 3 : Article “GPR183 promotes the reactivation of hapten specific CD8+ T cells in Allergic Contact Dermatitis”

Au cours de mes années de thèse, j’ai eu l’occasion d’encadrer un étudiant en Master 2 Biologie de la Peau (de janvier à juillet 2022). Nous avons monté un projet sur la caractérisation du rôle de GPR183 dans la physiopathologie des eczémas de contact. En effet, ce biomarqueur ayant été identifié comme l’un des plus discriminant entre les inflammations allergiques et irritantes chez l’homme, nous avons cherché à valider son rôle fonctionnel dans les eczémas. Pour ce faire nous avons utilisé à la fois des modèles pré-cliniques murins (modèle d’hypersensibilité retardée de contact chez la souris) et humains (modèle du patch test). Les résultats ont été brièvement discutés dans la discussion, et une reproduction du rapport final de stage est présenté en Annexe 3.

GPR183 promotes the reactivation of hapten specific CD8+ T cells in

Allergic Contact Dermatitis

Samuel SALQUE^{1,2}, Vanina LENIEF¹, Amandine MOSNIER¹, Jean-François NICOLAS^{1,3}, Marine-Alexia LEFEVRE^{1,4}, Marc VOCANSON¹

¹ CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, (Team Immunology of Skin Allergy and Vaccination); INSERM, U1111; Univ Lyon; Université de Lyon 1; Ecole Normale Supérieure de Lyon; CNRS, UMR 5308, Lyon, France.

² Master BMC – Biologie de la peau (2021 -2022), Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France.

³ Department of Allergy and Clinical Immunology, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Benite, France.

⁴ Dermatology and Allergy Department, St Etienne University Hospital, Saint-Priest-en-Jarez, France

Corresponding author:

Samuel SALQUE

CIRI (International Center for Infectiology Research)

21 Avenue Tony Garnier 69007 Lyon

samuel.salque@inserm.fr

+33-6-43-21-75-70

Funding: This work was supported by INSERM, U1111 CIRI (International Center for Infectiology Research) Team Immunology of Skin Allergy and Vaccination.

Disclosure of interest: None

Key words: allergic contact dermatitis, allergy, pathophysiology, lymphocytes, GPR183

Abbreviation:

7 α ,25-OHC = 7 α ,25-dihydroxycholesterol;

Ac: Acetone;

ACD = Allergic Contact Dermatitis;

AOO: Acetone/Olive Oil;

CHS: Contact Hypersensitivity;

CH25H = Cholesterol 25-Hydroxylase;

CYP7B1 = Cytochrome P450 Family 7

Subfamily B Member 1;

DC = Dendritic Cell;

DNFB = 2,4-dinitrofluorobenzene;

EBI2 = Epstein-Barr virus-induced molecule 2;

GPCR = G-protein-coupled receptor;

GPR183 = G-protein-coupled receptor 183;

IFN γ = Interferon gamma;

ILC =Innate lymphoid cells;

I.p. = Intraperitoneal;

Kc = Keratinocytes;

LTT = lymphocyte transformation test;

PT = Patch Test.;

PBMC = peripheral blood mononuclear cell;

Tcm = Central Memory T cells ;

Teff = Effector T cells ;

Tem = Effector memory T cells;

Tgd = Gamma delta T cells;

Trm = Tissue-resident memory T cells.

Running/Short title: GPR183 contributes to the development of Allergic Contact Dermatitis

Key messages:

- GPR183 is highly expressed by allergic contact dermatitis skin infiltrating T cells.
- GPR183 plays a role in the reactivation and proliferation of allergen-specific CD8⁺ T cells.
- The interest of GPR183 as a therapeutic target remains to be confirmed.

Capsule Summary:

G-protein–coupled receptor 183 (GPR183) is overexpressed in allergic contact dermatitis (ACD) skin lesions and plays a key role in proliferation and reactivation of hapten-specific CD8⁺ T cells. The use of GPR183 inhibitor results in a slight decrease in skin inflammation. These findings pave the way for identification of new therapeutic targets in ACD.

Abstract

Background: G-protein–coupled receptor 183 (GPR183) is expressed across several types of innate and adaptive immune cells and has been shown to regulate their migration, activation, and function. In a previous study, we identified GPR183 as one of the main genes overexpressed in allergic contact dermatitis (ACD) lesions, a common inflammatory skin disease.

Objectives: In this study, we sought to decipher the role of GPR183 in the development of ACD.

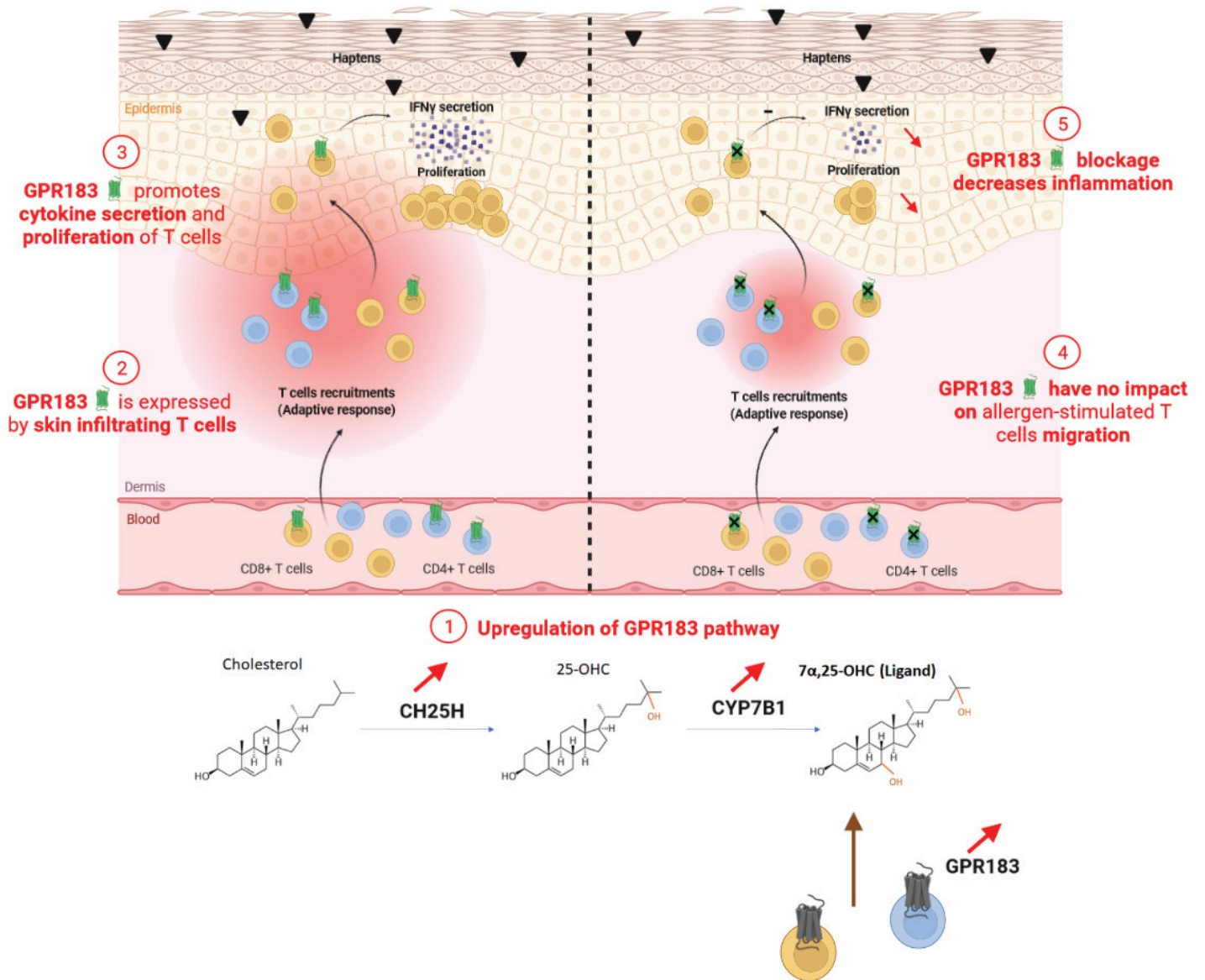
Methods: To this end, we capitalized on experimental models of ACD in mice and humans induced by topical application of referenced allergens, and used transcriptomic analyses (RT-qPCR, microarray, RNA-seq), flow cytometry, as well as proliferation, migration, and cytokine secretion assays.

Results: Our results confirmed that (i) GPR183 is overexpressed in allergic-induced skin inflammation and (ii) that skin infiltrating effector T-cells express high level of GPR183. We next demonstrated that this receptor plays a key role in the reactivation and proliferation of hapten-specific CD8⁺ T cells.

Finally, using a GPR183 antagonist *in vivo*, we observed a slight decrease of skin inflammation

Conclusions: Our results therefore demonstrate the contribution of GPR183 in the development of allergic skin inflammation and its role in the proliferation and secretion of cytokines by allergen-specific T cells. However, further investigations are needed to identify whether this receptor could be an interesting therapeutic target in ACD.

Graphical abstract



GPR183 contributes to the development of Allergic Contact Dermatitis

Introduction

Allergic contact dermatitis (ACD) is a common inflammatory skin disease affecting approximately 15% to 20% of the general population (1). ACD is the prototype of a IV delayed-type hypersensitivity reaction developing in individuals previously sensitized to chemical allergens (also called haptens) (2). It is mediated by the recruitment and reactivation of allergen-specific effector/memory T cells (Teff/mem) – key cells involved in the immune response to allergens and skin inflammation (2). Specifically, it has been shown that inflammation in ACD is primarily due to the infiltration of type 1 cytotoxic CD8⁺ T cells (2,3).

We have recently conducted an extensive analysis of the transcriptomic signatures of ACD lesions, and identified a large panel of skin biomarkers, which typified these reactions (4). Among these biomarkers, we identified G-protein–coupled receptor 183 (GPR183), also known as Epstein-Barr virus-induced molecule 2 (EBI2), as the most discriminating gene, highly expressed in allergic-induced skin inflammation (4).

GPR183 is a G-protein–coupled receptor (GPCR) expressed across several types of innate and adaptive immune cells such as dendritic cells (DCs), innate lymphoid cells 3 (ILC3s), macrophages, neutrophils and T and B lymphocytes, as well as by astrocytes (5–12).

GPR183 is activated by oxysterols, among which 7 α ,25-dihydroxycholesterol (7 α ,25-OHC) is the most potent endogenous ligand (6,9). 7 α ,25-OHC is an oxygenated derivative of cholesterol synthesized by the stepwise actions of two enzymes: cholesterol 25-hydroxylase (CH25H) and oxysterol and steroid 7-alpha-hydroxylase (CYP7B1), highly expressed by lymphoid stromal cells (10). Interestingly, it has also been showed that Toll-like receptors (TLR 2, 3, 4, and 9) activation promote the upregulation of CH25H in DCs and macrophages in a IFN- and STAT-1-manner (11). Then, the GPR183 signaling pathway appears to be a sensor of immune challenge.

GPR183 and 7 α ,25-OHC form a chemotactic system acting in fine-positioning of immune cells in homeostasis and inflammation (6,13). It has been firstly shown that GPR183 is crucial for the migration and positioning of B cells in lymphoid tissues to mediate T cell-dependent antibody responses (9,10,13). Additionally, GPR183-deficient mice showed lower frequency of CD4⁺ DCs in the spleen and lymph node resulting in defects in the activation of CD4⁺ T cells (14,15). GPR183 and its ligand

also promote the transmigration of T cells into the inflamed target organ (16,17). Subsequently published studies further demonstrated that GPR183 regulates not only migration but also activation and function of immune cells. Very interestingly, it has been shown that in the absence of GPR183, CD4⁺ T cells lose their location bias and are delayed in antigen recognition, proliferative expansion, differentiation and direct effector activity (8,12,14,16,18–22). Moreover, some authors demonstrated that GPR183 promotes cytokine secretion by ILC3 (8).

There are lot of published evidence linking GPR183 with human diseases, including autoimmune diseases, neurodegenerative diseases, cardiovascular diseases, metabolic diseases, as well as cancer (23). Therefore, GPR183 may represent a promising target for therapeutic interventions.

In this study, we examined the role of GPR183 in the development of ACD reactions both in human and mice, focusing on T cells and especially CD8⁺ T cells – key cells involved in the allergic response.

We confirmed the overexpression of GPR183, and the two 7 α ,25-OHC-synthezizing-enzyme in allergic induced skin inflammation and demonstrated that this receptor plays a key role in the *in vitro* reactivation and proliferation of hapten-specific CD8⁺ T cells.

Materials and methods

A brief description of the Material and Methods is provided below. See additional details in the Supplemental Materials and Methods section.

Chemicals:

The allergen 2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). The allergens nickel, methylisothiazolinone, linalool hydroperoxide as well as petrolatum were purchased from Chemotechnique Diagnostics, (Vellinge, Sweden). DNFB was freshly prepared in Acetone/Olive Oil (AOO) vehicle and Acetone (Ac) vehicle respectively. Diluted nickel, methylisothiazolinone, linalool hydroperoxide were provided in petrolatum. The GPR183 ligand 7 α ,25-dihydroxycholesterol (7 α ,25-OHC) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabama, USA) and dissolved in DMSO as a 2mM stock. The GPR183 antagonist NIBR189 was purchased from MedChemExpress (Sollentuna, Sweden) and dissolved in DMSO as a 23mM stock. For intraperitoneal (i.p.) injections, NIBR189 was diluted in corn oil purchased from MedChemExpress (Sollentuna, Sweden) to a concentration of 5mg/kg with 10% DMSO.

Mice:

C57BL/6 mice (6 to 11 weeks of age) were purchased from Charles Rivers Laboratories (L'Arbresle, France). All animals were maintained at the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (PBES; SFR Biosciences, UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL) under SPF conditions. All experimental procedures were in accordance with the guidelines on animal welfare of the local ethical committee (CECCAP, Lyon France).

CHS (ACD-like) mouse model and *in vivo* treatments:

Sensitization of mice was induced by application of 25 μ l of DNFB 0.5% on the shaved abdomen. Control mice were not sensitized. Five days later, sensitized, and non-sensitized control mice were anesthetized by i.p. injection of 1.25mg Ketamine (Imalgene®1000) and 0.25mg Xylasin (Rompun®2%; both Alcyon, Miribel – France) in 100 μ l phosphate-buffered saline (PBS 1X) and skin inflammation was induced on the left ear by application of 5 μ l DNFB 0.13% on each side of the ear for

the ACD-like model. AOO/Ac vehicle alone was applied on the contralateral ear. The induced inflammation was determined by the mouse ear swelling test (MEST) in which evaluation of the ear thickness was done before and each day after hapten application.

For *in vivo* model of GPR183 inhibition, mice were injected i.p. with NIBR189 5mg.kg⁻¹ 30 minutes before challenge and then at 3, 8, 24, 27 and 32 hours post challenge.

Patients, patch testing and skin biopsies:

For molecular analysis, twenty-four allergic patients were recruited in a previous study (4). Diagnosis of ACD was previously established by a clinical history interview and the application of patch-test (PT). The study was approved by a local ethical committee. All participants were patch tested either with the contact allergens: nickel, methylisothiazolinone, and linalool hydroperoxide, as well as with petrolatum alone for 48 hours and removed thereafter, followed by scoring according to the International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) and skin biopsy at 72 hours. Skin biopsies were used for transcriptomic analysis.

For flow cytometry analyses, one patient allergic to nickel was recruited and skin biopsies from positive nickel patch test as well as vehicle patch test were collected at 72 hours.

For proliferation, migration and cytokines assays, frozen peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of amoxicillin-allergic patients were used.

All subjects gave written and informed consent.

Results

GPR183, CYP7B1 and CH25H are upregulated in allergic-induced skin inflammation

To identify the role of GPR183 in allergic skin inflammation, we capitalized on experimental models of ACD in mice and human. To this end, naïve mice were subsequently sensitized (day-5) and challenged (day 0) with a strong hapten, 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), and individuals with reported ACD were patch-tested with the culprit allergens (here, nickel, methylisothiazolinone, and linalool hydroperoxide) (Figure 1A).

When DNFB-sensitized mice were challenged 5 days later with the hapten, they developed potent skin inflammation as measured by the increased ear thickness at day 2 post challenge ($445\mu\text{m}\pm 28.7\mu\text{m}$) compared to the vehicle exposed ears ($232.5\mu\text{m}\pm 7.5\mu\text{m}$) (Figure 1B). Similarly, allergic patients patch tested with the culprit chemicals developed positive reactions with vesicular erythema, infiltration, and papules at 72 hours. Of note, no clinical reactions were observed when the same patients were patch tested with the vehicle alone as control. Representative pictures are shown in Figure 1B.

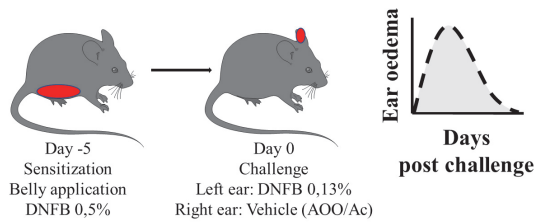
Mice ears and human skin biopsies were then collected at day 2 post DNFB challenge and at 72 hours after patch testing, respectively, and next processed for molecular analyses. We first sought to confirm that our models recapitulated allergic skin inflammation. To this end, we studied the expression of some key genes in the ACD pathophysiology such as those related to T-cell activation and cytotoxicity (CD8A, CD4, CD69, GZMB) as well as some cytokines and chemokines associated with type 1 inflammation (IFNG, CXCL10). Our results showed that all the mRNA transcripts were highly expressed in allergen-exposed skin compared to vehicle-exposed skin in both mice and humans (Figure 1C), thus confirming the allergic profile of the reaction.

We next examined and compared the molecular expression of GPR183 as well as CYP7B1 and CH25H, two genes encoding for oxysterol-synthesizing enzymes, in ACD skin inflammation versus healthy skin. Profound differences between inflammatory and non-inflammatory skin were observed in the human ACD model, with significant overexpression of GPR183, CYP7B1 and CH25H mRNA transcripts in lesional skin. Murine models of DNFB-induced inflammation demonstrated comparable results, but

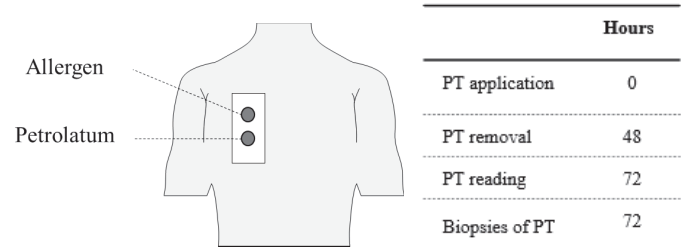
with greater variability in GPR183 expression.

Collectively, results confirm that robust T cell-immunity signature characterizes ACD lesions and that GPR183, CYP7B1 and CH25H are overexpressed in allergic-induced skin inflammation compared with normal skin.

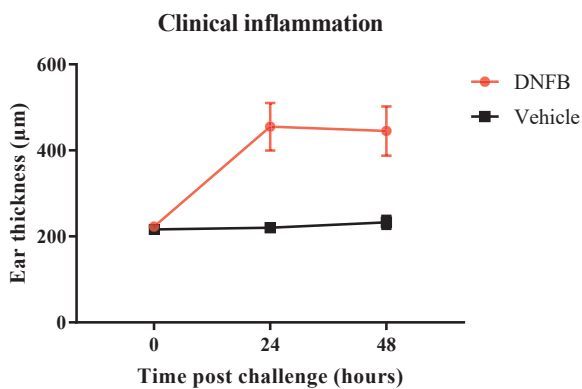
A1



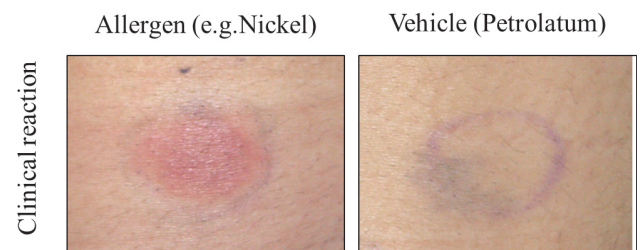
A2



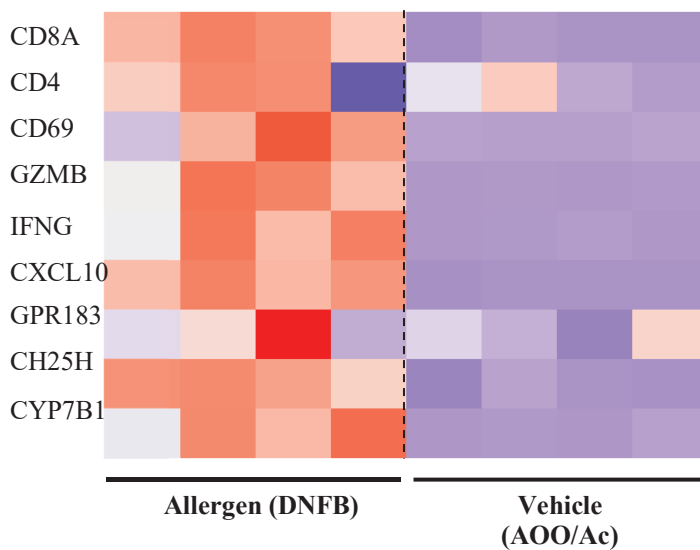
B1



B2



C1



C2

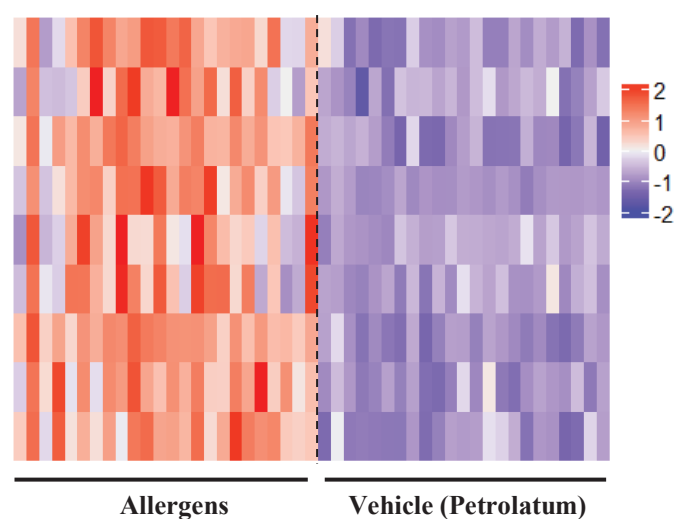


Figure 1: Molecular profiling of GPR183 pathway in ACD reactions in mice and humans

(A) ACD experimental models. (A1) CHS response to DNFB. C57BL/6 mice were sensitized with 0.5% DNFB on the belly at day-5 and challenged with 0.13% DNFB at day 0 on the left ear and vehicle (acetone/olive oil or AOO) on the right ear. CHS responses were determined by measuring ear swelling 24 and 48 hrs after challenge. (A2) Experimental model in human. Patch tests with reference allergens and petrolatum alone were applied for 48 hours and then removed, followed by scoring and skin biopsy 72 hours later. (B) CHS response to DNFB. (B1) Results are expressed as mean ear thickness(μm) for the indicated groups at 24 hours and 48 hours post challenge. (B2) Representative pictures of positive and negative patch test reactions in ACD patient. (C) Heatmaps representing the relative expression levels of selected mRNA transcripts in skin samples after application of allergen or vehicle only, in mice (C1) and humans (C2). Blue, white and red colors represent respectively low, moderate and high gene expression.

GPR183 is highly expressed by skin infiltrating T cells

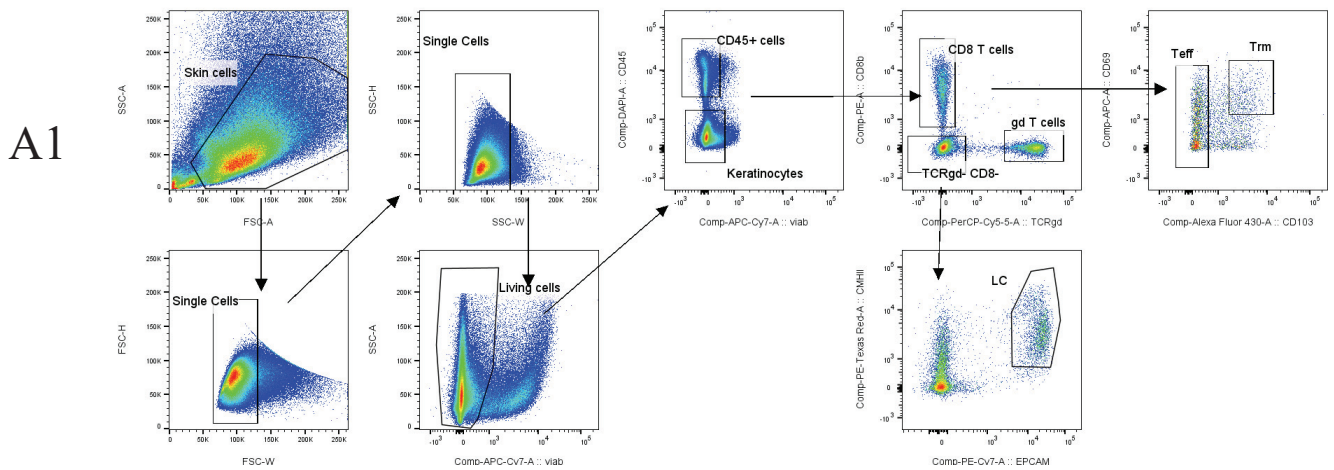
As mentioned in the introduction, several immune cells are known to express GPR183. Here we sought to characterize GPR183 expression on T cells and especially CD8⁺ T cells, as these are key cells involved in the ACD development.

To this end, murine CD8⁺ effector T cells (Teff) were sorted by Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) at days 2, 4, 8, 15 and 30 post DNFB challenge and amount of GPR183 mRNA transcripts was analysed by RNA sequencing, as no anti-GPR183 antibody was available for mice (Figure 2A). Other cell types such as keratinocytes (Kc), Langerhans cells (LC), gamma delta T cells (gdT) as well as resident memory T cells (Trm) were analysed as controls (Figure 2A). We found that GPR183 was expressed by effector CD8⁺ cells, as early as day 2 post challenge with a stable mRNA expression over time. Similarly, Trm and especially LC expressed high amount of GPR183. In contrast, we did not find any expression of this receptor by Kc or Tgd (Figure 2A).

In humans, skin biopsies of positive patch test and healthy skin were taken at 72 hours and FACS analyses were performed to investigate GPR183 expression on CD8⁺ and CD4⁺ T cells by FACS (Figure 2B). Our results confirmed that both T cell subsets expressed GPR183 at cell surface, with a higher fraction of CD4⁺ T cells expressing this receptor. In ACD skin lesions, we found that 12.88% of total CD8⁺ T cells and 23.12% of total CD4⁺ T cells expressed GPR183 (Figure 2B). The proportion of GPR183-expressing cells did not differ between the ACD skin lesion and healthy skin with 19.99% of GPR183⁺ CD4⁺ T cells and 10.18% of CD8⁺ T cells (Figure 2B). Of note, we detected the same expression profile of GPR183 on circulating T cells, among different types of immune cells in blood

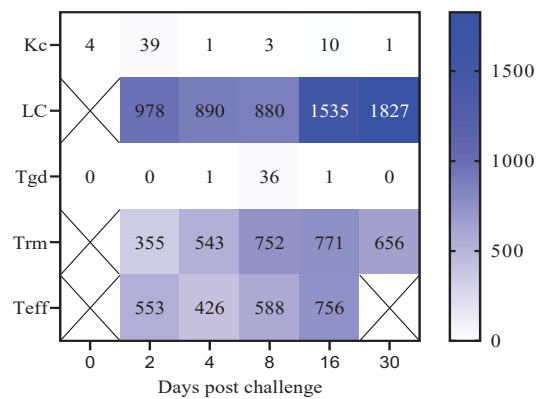
(Figure S1-S2).

Taken together, these results indicate that GPR183 is expressed by approximately 10-15% of CD8+ T cells infiltrating the ACD skin. However, the differences in molecular expression of GPR183 observed between allergic and healthy skin do not seem to be explained by an increase proportion of T cells expressing this receptor but rather by a substantial increase in the number of effector T cells recruited under inflammatory conditions.

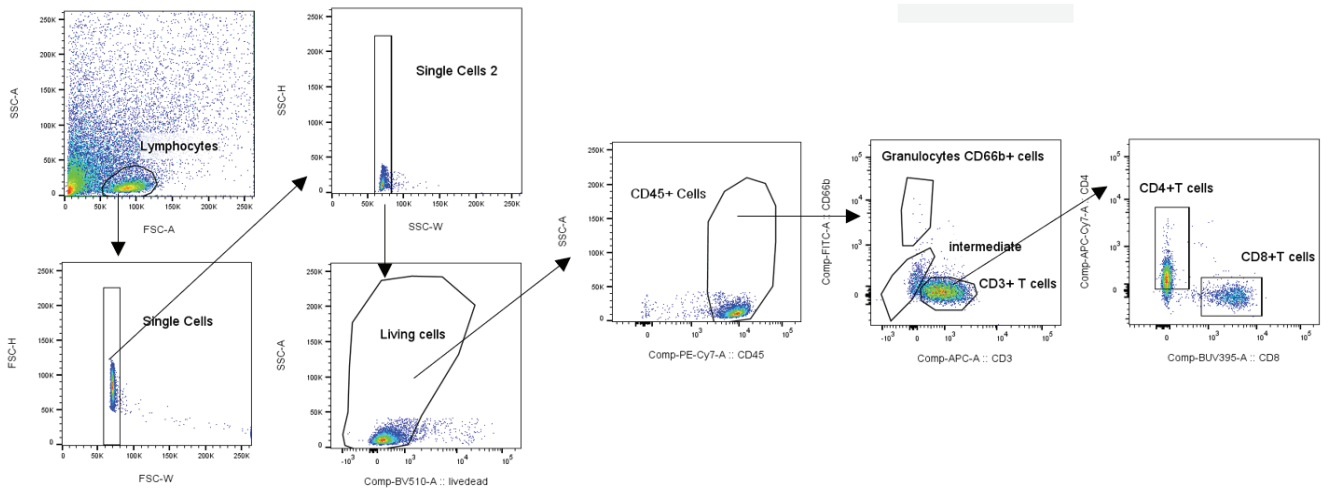


A2

**GPR183 mRNA expression
(Normalized counts)**



B1



B2

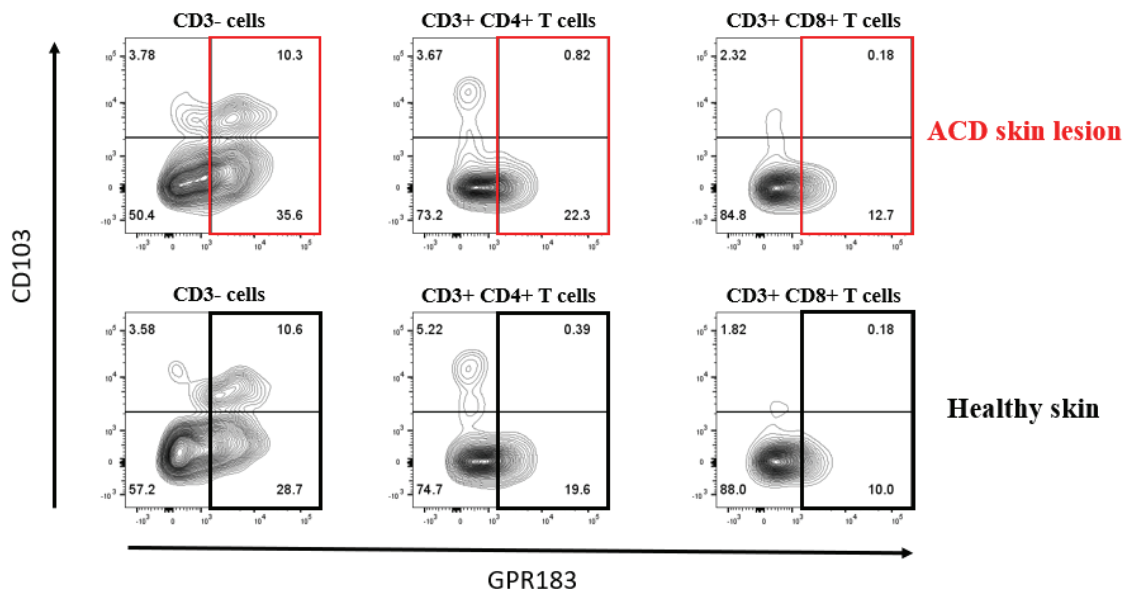


Figure 2: A majority of ACD skin infiltrating T cells express GPR183

(A1) Gating strategy to identify immune cells infiltrating the epidermis of DNFB-sensitized and challenged mice. Cells were isolated before and at day 2, 4, 6, 16 and 30 after ears challenged with DNFB. (A2) Heatmap illustrating the normalized counts of GPR183 transcripts in keratinocyte (Kc), Langerhans cells (LC), gamma delta T cells (Tgd), effector DC8+ T cells (Teff,) and resident memory T cells (Trm) as analyzed by RNA sequencing. Blue colors represent high count levels whereas white color indicate low counts. (B1) Gating strategy to identify immune cells infiltrating the skin of ACD patients with positive patch-tests. Cells were isolated at 72 hours after patch testing with nickel and healthy skin was analyzed in control. (B2) Flow cytometry analysis of GPR183 expression in CD4+ and CD8+ T cells isolated from ACD lesion (top panel) versus healthy skin (bottom panel). Plots are gated on CD4+ T cells, CD8+ T cells, as well as on CD3- skin cells to analyze GPR183 and CD103 marker expression. Numbers in quadrants indicate percent cells in each throughout. Red (skin ACD lesion) or black (healthy skin) frame indicate GPR183+ cells.

GPR183 expression does not affect the *in vitro* migration of activated allergen specific T-cells towards 7 α ,25-OHC

Several studies previously reported that GPR183 plays a key role in chemotaxis and positioning of several immune cells, including T cells. Here, we sought to determine whether this G-protein-coupled

receptor could be involved in the recruitment of effector T cells in the context of ACD.

To this end, T cells from DNFB sensitized mice were activated with haptenized DCs and human T cells from an amoxicillin-allergic patient were stimulated with the corresponding allergen (Figure S3). Then, transwell migration assays of CD8⁺ and CD4⁺ T cells were performed using increasing concentrations of 7 α ,25-OHC, as it has been identified as the most potent GPR183 ligand (6,9). Non-stimulated T cells were also used as controls. Of note, to determine the basal levels of cell migration, we added GPR183 ligand 7 α ,25-OHC in both transwell compartments to abrogate the 7 α ,25-OHC- dependent migration (Figure 3).

In control conditions, both mice and human T cell migrated toward 7 α ,25-OHC in a concentration-dependent manner. As previously described, CD4⁺ T cells migrated more efficiently than CD8⁺ T cells. In mice, 24.8% (+/-0.1%) of CD4⁺ T cells versus 14.1% (+/-0.8%) of CD8⁺ T cells migrate towards 7 α ,25-OHC (300nM). Similar results were observed in human model with 7.5%(+/-0.9%) of CD4⁺ T cells versus 3.0%(+/-0.1%) of CD8⁺ T cells migrating towards the ligand (Figure 3A&B, right panel). To test whether GPR183 blockade on T-cells would affect their migration, cells were pre-treated with increased concentration of the GPR183 inhibitor NIBR189. Antagonism of GPR183 inhibited the 7 α ,25-OHC-induced unstimulated T cells migration, with resulting migration rates similar to basal levels. (Figure 3A&B, right panel). Of note, these results were confirmed by analysis total human PBMCs (Figure S4). Surprisingly, activated specific T cells did not migrate in a 7 α ,25-OHC dependent manner both in mice and human models (Figure 3A&B, left panel). Furthermore, pretreatment of cells with NIBR189 did not interfere with their migration ability, especially in mice, as the percentage of migrating cells remained stable, around 18% (+/-3%) and 11% (+/-2%) for hapten-stimulated CD4⁺ and CD8⁺ T cells, respectively, in each tested condition (Figure 3A, left panel).

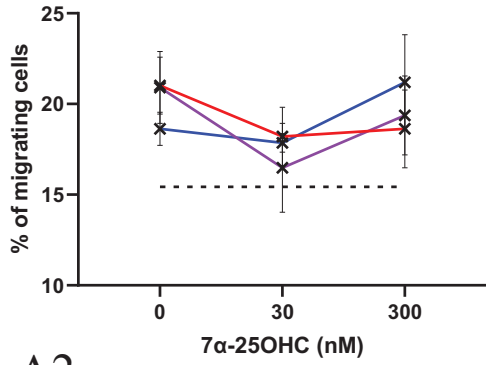
Collectively, our results thus suggest that GPR183 might not be responsible for the transmigration of activated effector T cells to the site of allergic skin inflammation.

A1

NIBR189

- x— 0 μ M
- x— 5 μ M
- x— 15 μ M
- + Ligand

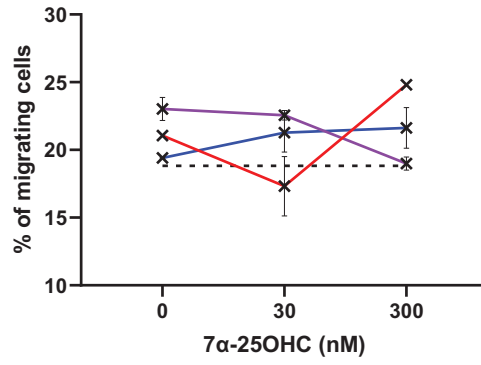
Hapten-stimulated mouse CD4+ T cells



NIBR189

- x— 0 μ M
- x— 5 μ M
- x— 15 μ M
- + Ligand

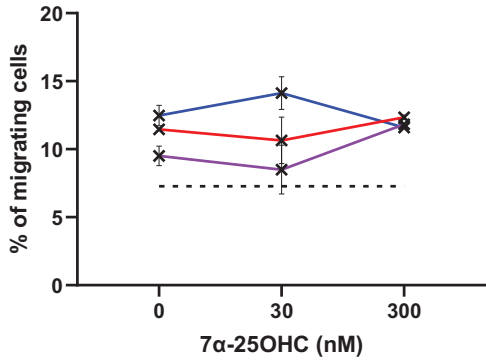
Unstimulated mouse CD4+ T cells



A2

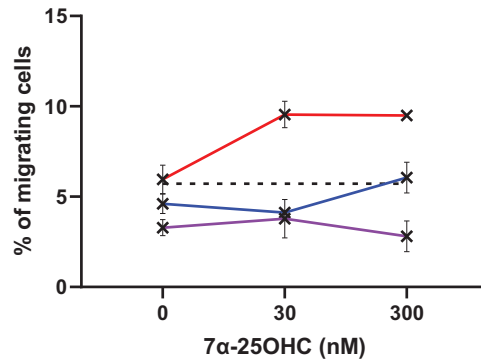
- x— 0 μ M
- x— 5 μ M
- x— 15 μ M
- + Ligand

Hapten-stimulated mouse CD8+ T cells



- x— 0 μ M
- x— 5 μ M
- x— 15 μ M
- + Ligand

Unstimulated mouse CD8+ T cells

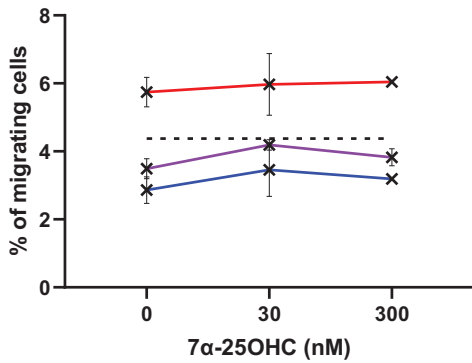


B1

NIBR189

- x— 0 μ M
- x— 5 μ M
- x— 15 μ M
- + Ligand

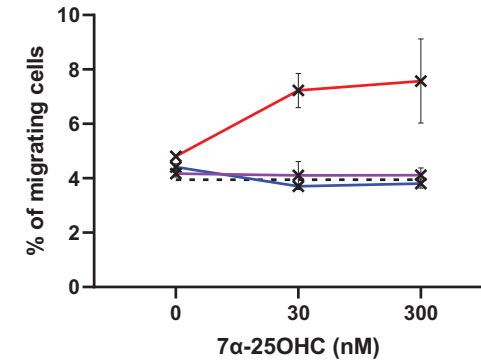
Allergen-stimulated human CD4+ T cells



NIBR189

- x— 0 μ M
- x— 5 μ M
- x— 15 μ M
- + Ligand

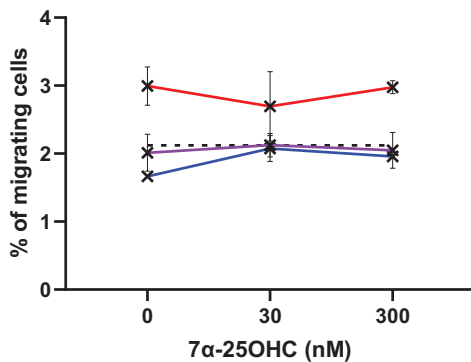
Unstimulated human CD4+ T cells



B2

- x— 0 μ M
- x— 5 μ M
- x— 15 μ M
- + Ligand

Allergen-stimulated human CD8+ T cells



- x— 0 μ M
- x— 5 μ M
- x— 15 μ M
- + Ligand

Unstimulated human CD8+ T cells

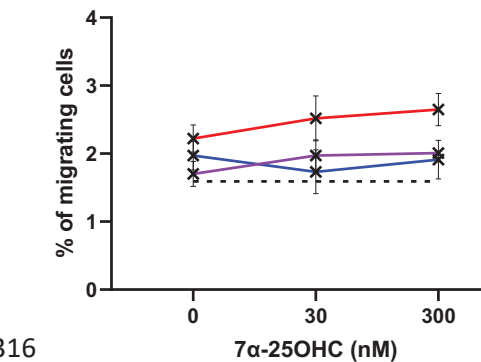


Figure 3: GPR183 does not play a role in the migration of activated allergen specific T-cells

In vitro migration of stimulated (left panel) and unstimulated (right panel) allergen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to increasing concentrations of 7 α ,25-OHC, as assessed by transwell migration assays in (A) mouse and (B) human model. To investigate the effect of GPR183 inhibition, cells were pre-treated without (red line) or with increased concentrations of GPR183 antagonist NIBR189 (5 μ M : purple line, or 15 μ M: blue line). Dotted black line represent basal level of migration. Resulting graphs depict means with SD of percentage of migrating cells of technical replicates.

GPR183 is involved in proliferation and cytokine secretion of allergen-specific T cells

As we previously showed that GPR183 does not play a role in the migration of activated allergen-specific T cells, we reasoned that it might rather influence the functions of effector T cells. To test our hypothesis, we sought to characterize the effect of GPR183 expression on the proliferation and cytokine secretion of allergen-specific CD8⁺ T cells.

To assess specific T cell proliferation, standard lymphocyte transformation tests (LTT) were performed (Figure 4A). As expected, we observed that PBMCs of an amoxicillin-allergic patient or mouse CD8⁺ T cells purified from the draining lymph nodes of DNFB-sensitized mice, proliferated vigorously when they are restimulated with the culprit allergen (DNFB and amoxicillin, respectively) compared to controls, with stimulation index at 5.5 in mice and 14.3 in human (Figure 4A). Alternatively, when cells were restimulated in the presence of increasing concentration of NIBR189, we observed a decrease in their proliferation, while no major effect was observed on the proliferative capacity of unstimulated cells, indicating that NIBR189 had no toxic effect on cultured cells (Figure 4B). This inhibition was even more evident in the human model. We observed a significant decrease in the stimulation index, from 14.3 to 8.2 at the lowest dose of NIBR189 (Figure 4B2). These results therefore point to an involvement of GPR183 in the secondary proliferation of allergen-specific T cells.

Next, as IFN γ is a key cytokine in the pathophysiology of ACD, we sought to investigate whether GPR183 stimulation could influence the production of this cytokine by T cells. To this end, secretion of IFN γ was assessed either by determining the number of IFN γ producing cells by ELISPOT in the mouse model, or by measuring by ELISA the concentration of this cytokine in the culture supernatants of our LTTs in the human model (Figure 4B). We first confirmed that CD8⁺ T cells when they are restimulated

with the allergen, they secreted high dose of IFN γ compared to unstimulated cells, and this both in mouse and human models. Interestingly, treatment with GPR183 antagonist dramatically decreased the secretion of IFN γ , with a 1,6-fold decrease in both models at the maximum doses of NIBR186 (Figure 4B).

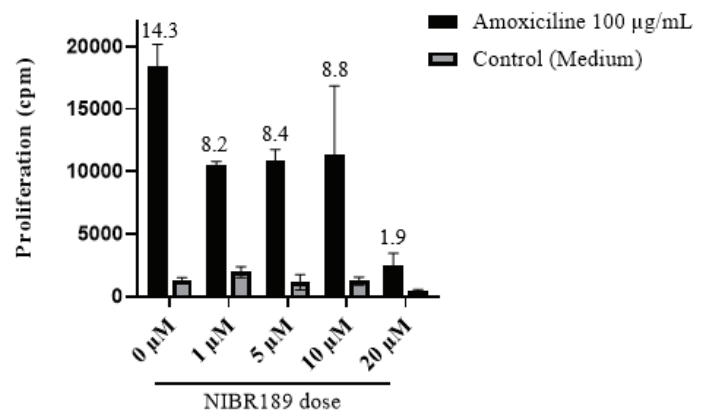
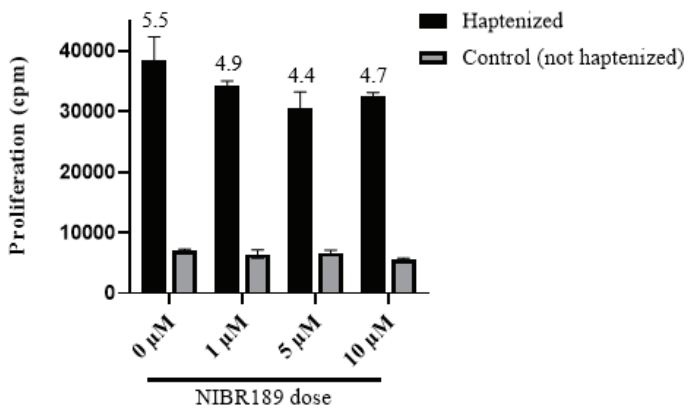
Taken together, these results suggest a major role of GPR183 in the proliferation and function by allergen-specific T cells. Thus, although this receptor is not involved in the migration of effector T cells in ACD, it nevertheless seems to play a role in their reactivation.

A1

A2

Specific proliferation on mouse cells (CD8+ T cells)

Specific proliferation on human cells (PBMCs)



B1

B2

IFN γ -producing mouse cells (CD8+ T cells)

IFN γ -producing human cells (PBMCs)

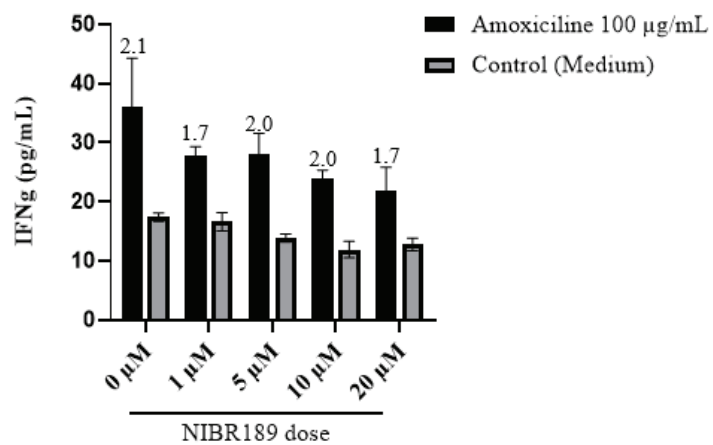
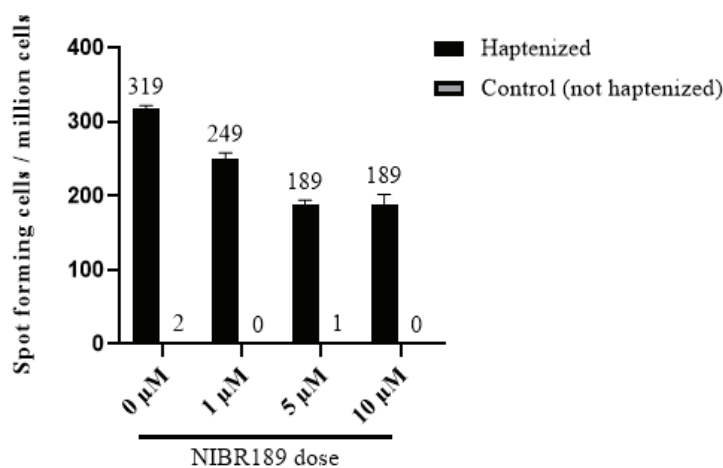


Figure 4: Role of GPR183 in the proliferation and functions of allergen specific T cells

(A) Secondary proliferative response of CD8⁺ T cells or PBMCs assessed by lymphocyte transformation tests in mouse (A1) and human (A2) models. The black color represents the results for cells cultured with the specific allergen and the grey color represents the results for cells cultured without allergen. Cells were cultured with and without increasing doses of NIBR189. The proliferation results are expressed as ³Hthymidine incorporation counts per minute and proliferation index is indicated above each bar graph. (B) Secretion of IFN γ by CD8⁺ T cells was assessed by (B1) ELISPOT in the mouse model or (B2) ELISA in the human model. The black color represents the results for cells cultured with the specific allergen and the grey color represents the results for cells cultured without allergen. Cells were cultured with and without increasing doses of NIBR189. The results are expressed as (B1) numbers of IFN γ spot forming cell/million of CD8⁺ T cells or as (B2) concentration of IFN γ (pg/ml) in culture supernatant. The numbers of IFN γ spot (B1) or the secretion index (B2) is indicated above each bar graph.

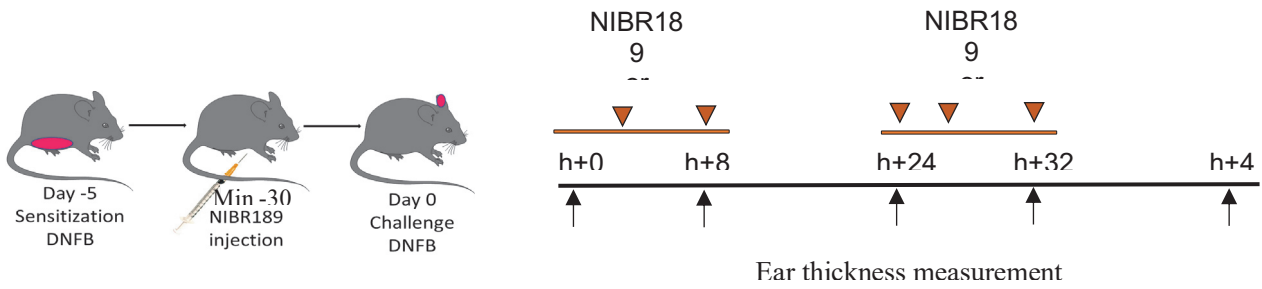
***In vivo* GPR183 blockade slightly decreases allergic skin inflammation in mice**

Finally, we investigated whether GPR183 blockade could abolish allergic-skin induced inflammation *in vivo*. We then capitalized on CHS murine model and used NIBR189 as a first attempt to explore this hypothesis. Intraperitoneal administrations of NIBR189 5mg.kg⁻¹ were performed 30 minutes before challenge, and 3, 8, 24, 27 and 32 hours post DNFB challenge. This dose was chosen based on previous literature using NIBR189 *in vivo* (24). Of note, to assess the irritant response of DNFB some mice were also challenged without previous sensitization. I.p. injections of vehicle only were also performed as control for each corresponding group. Resulting skin inflammation was then measured as ear oedema at different time points (Figure 5A).

DNFB-sensitized and -challenged mice exhibited 60 μ m \pm 8.5 μ m of ear oedema at the peak of inflammation at 48 hours. In comparison, we observed a 2-fold decrease in inflammation at the same time point in mice injected with NIBR189 (30 μ m \pm 14.6 μ m) (Figure 5B). Interestingly, this inflammation was comparable to the irritant response induced by DNFB as assessed by the area under the curve analysis of ear swelling (Figure 5C), suggesting that GPR183 blockade inhibits the allergic response to DNFB.

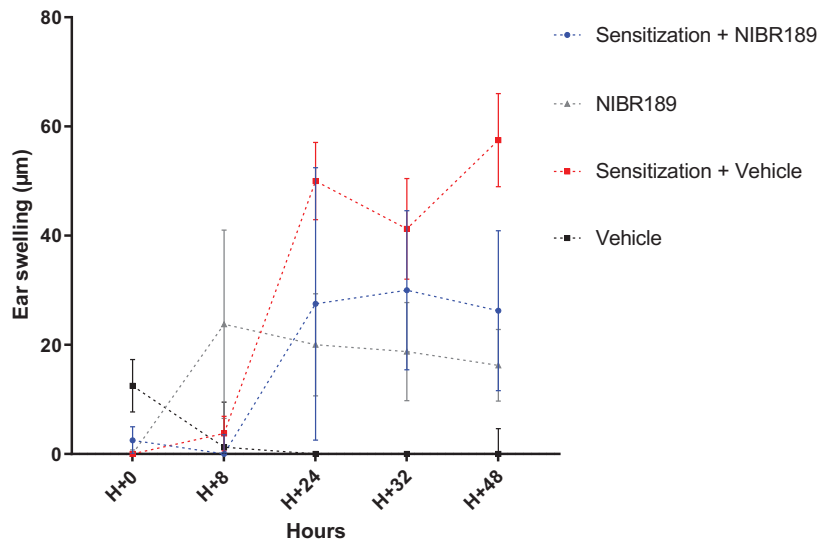
These preliminary data using contact hypersensitivity as a model for allergic contact dermatitis therefore suggest that GPR183 signaling is important for the development of the skin lesions. Nevertheless, these observations remain to be confirmed and further investigations are needed to validate GPR183 as a promising therapeutic target to treat CHS/ACD.

A



B

Role of GPR183 blockade in allergic-induced inflammation (Ear swelling)



C

Role of GPR183 blockade in allergic-induced inflammation (AUC)

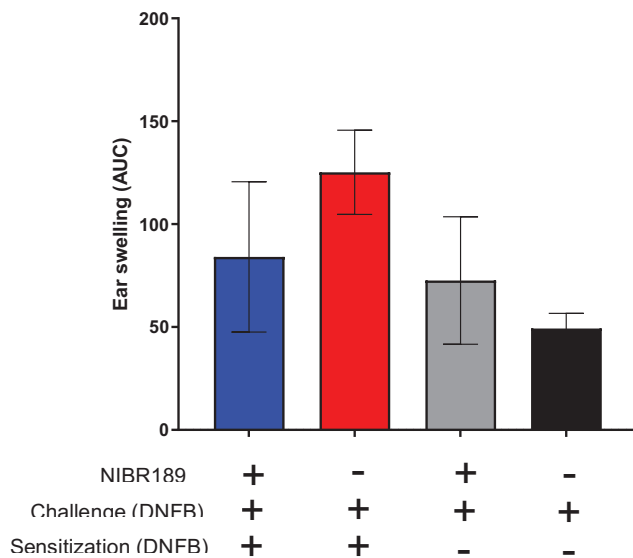


Figure 5: The injection of GPR183 inhibitor results in a slight decrease in DNFB-induced skin inflammation

(A) *In vivo* model of GPR183 inhibition. Sensitized and non-sensitized C57BL/6 mice were injected intraperitoneally with the GPR183 antagonist NIBR189, or the control vehicle only, 30 minutes before challenge and 3, 8, 24, 27 and 32 hours post DNFB application. Skin inflammation was measured before and at 8, 24, 32 and 48 hours post DNFB challenge for each group. (B) Results were expressed as the mean ear oedema ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$) for the indicated groups. (C) Area under the curve (AUC) was calculated for CHS response for each group.

Discussion

The main objective of this study was to characterize the role of GPR183 in the development of ACD reactions both in mice and humans, focusing on the major actors involved in the allergic response: T cells and especially CD8⁺ T cells. Our results first showed a distinct overexpression of GPR183, CYP7B1 and CH25H in humans and mice, associated to a typical molecular signature in their skin lesions, thus confirming the upregulation of the GPR183 pathway in allergic-induced skin inflammation. In addition, we demonstrated that majority of ACD skin infiltrating T cells highly express GPR183 receptor. We also assessed the capacity of T cells to migrate towards 7 α ,25-OHC gradient, the main ligand of GPR183, and established that GPR183 does not promote the migration of activated cells in our model. However, we observed that GPR183 signalling participated in the reactivation of CD8⁺ T cells and their capacity to produce IFN γ . Finally, GPR183 blockade was able to reduce skin inflammation in the DNFB model, thus confirming GPR183 role in the development of the disease.

The role of GPR183 receptor in immune cell migration has been proven to be important under different inflammatory conditions (6,8,9,12,14) and has mainly been highlighted in DCs, B cells and CD4⁺ T cells (19,25), as confirmed by our results (Figure S1&S2). However, his role in the migration of cytotoxic CD8⁺ T cells in ACD has not been described so far. A previous work by Preuss et al. (26) showed that GPR183 mRNA transcripts are upregulated in macrophages upon LPS challenge, bringing arguments for a potential role of GPR183 in the migration of immune cells at sites of inflammatory reactions. In this context, we hypothesized that GPR183 could play a role in the migration of cytotoxic CD8⁺ T cells to the sites of ACD inflammation. Regarding our *in vitro* migration assay results, it is unlikely that GPR183 participates in the recruitment of cytotoxic T cells since both human and mouse allergen-activated CD8⁺ T cells failed to migrate towards 7 α ,25-OHC gradient. However, as we confirmed the overexpression of GPR183 in ACD skin, it is possible that our *in vitro* results were impacted by the restimulation step we performed just before the migration assays. Tang et al. reported that when T cells are (re)stimulated, there is receptor internalization and desensitization of GPR183 by his ligand (27). Our data indicate that only cells that have not been restimulated migrated towards 7 α ,25-

OHC gradient. To clarify this point, it will be important to analyse the expression and the functionality of GPR183 receptor on recently activated CD8⁺ T cells. Cells that have been specifically activated could migrate towards another ligand. Indeed, these results could have been caused by the use of 7 α ,25-OHC as ligand, since GPR183⁺ cells can migrate to other oxysterols such as 7 α ,27-OHC (8). In light of this, it might be interesting to perform mass spectrometry to establish which oxysterols are present in the ACD skin lesion and determine which cells produce these oxysterols *in vivo*. Lastly, the modest but significant migration of CD4⁺ T cells observed here is supported by other studies(19,22,25). Our results on CD8⁺ T cells are also supported by several studies demonstrating that CD8⁺ T cells did not migrate towards 7 α ,25-OHC (19,22).

GPR183 is known to impact the reactivation of B cells and T follicular helper (20,28), and their capacity to secrete type-1 and type-17 cytokines (8,19). While several studies reported on the ability of GPR183 in promoting TH17 cytokines, a role in IFN- γ production has also been described in CD4⁺ T cells (19), thus supporting our findings in IFN- γ -producing cytotoxic CD8⁺GPR183⁺ T cells. Since we showed an overexpression of GPR183 in allergic skin and we were not able to detect any recruitment function on allergen-stimulated cells, we conjectured that the effect of the receptor in ACD might lie in the function of T cells, namely proliferation and cytokine secretion. This hypothesis is also supported by our *in vivo* inhibition model in mice, in which it will be interesting to confirm that GPR183 inhibitor block the production of IFN- γ by cytotoxic CD8⁺ T cells.

Our results thus suggest that GPR183 acts on T cells functions instead of T cells recruitments. These data imply that this receptor could play a role in the inflammation of the skin, when the T cells have already been recruited in the inflammation-activated tissue. In that regard, it might be interesting to define whether GPR183 blockade has the same effect in resident memory T cells than in effector T cells, and thus play a role in the local memory response of ACD. We have confirmed that GPR183 is highly expressed on skin T cells endowed resident memory phenotype, as well as on effector and central memory phenotype (Figure S1). Moreover, as ACD development requires the production of cytotoxic molecules, it could be worth to test whether GPR183 blockade inhibits the production of granzyme B and other key cytotoxic actors.

The results we obtained with our CHS inhibition model in mice showed a decrease in skin inflammation when mice are treated with NIBR189. Such experiment has been performed only 1 time, and it will be important to confirm these preliminary results. Besides, we must now perform transcripts analysis and FACS analysis to confirm that GPR183 is inhibited over time. In addition, our results suggest that the reduced inflammation might be caused by a deficiency on T cells function such as IFN- γ secretion and proliferation, instead of recruitment, as it is suggested by Chalmin et al. (19). The next step to understand the role of GPR183 will be to determine whether NIBR189 inhibits IFN- γ production. This will help us to confirm that NIBR189 inhibitory effects are due to its effect on cytokine secretion and not on the recruitment of CD8⁺ T cells in the skin.

Alternatively, to confirm and validate the importance of GPR183 pathway *in vivo*, we could imagine to use GPR183 KO mice, which were associated to decrease inflammation in several disease experimental models (12,18,27,29). We could also consider using an inhibitor of the GPR183 pathway by targeting CYP7B1 (9) or CH25H, both of the key enzymes metabolising cholesterol into 7 α ,25-OHC. Another relevant option would consist in the use of a more potent inhibitor, since NIBR189 has been found to not be the most efficient GPR183 inhibitor *in vivo* (29). In addition, to improve GPR183 inhibition in our model, we might start NIBR189 injections much before the challenge with DNFB. By doing that, we could observe more accurately the role of GPR183 on reactivation of CD8⁺ T cells and observe in details if we got a decreased inflammation or a retarded inflammation, as shown by Wanke et al (17).

Lastly, Rutkowska et al. (12) have highlighted an anti-inflammatory effect of GPR183 which is in direct contradiction with our *in vivo* data suggesting a pro-inflammatory role of GPR183. They also suggested that GPR183 role on inflammation might be shaped by the nature of agonist oxysterols. GPR183 pathway might have a crucial role in the balance between pro- and anti-inflammatory environment to maintain homeostasis depending on the metabolization of cholesterol into different oxysterols. In that regard, it can be interesting to test the effects of therapeutic oxysterols injections in murine model, as proposed by Braden et al. (29).

In conclusion, our study characterized the role of GPR183 in allergic contact dermatitis, which seems to be implicated in several key steps of the disease. Our findings provide the basis for a better comprehension of ACD and provides elements to consider GPR183 as a therapeutic target.

Acknowledgements

First of all, I would like to thank the entire team “Epidermal Immunity and Allergy” with whom it has been a pleasure to work and learn with throughout this internship, and a special thanks to Vanina Lenief, Amandine Mosnier and Aurélie Guironnet-Paquet. The experience and great mood of the engineers, the PhD students, and the researchers, made it an environment in which any intern student can grow at his fullest. Their time and patience were keystones in the outcome of this project. Secondly, I would like to thank my intern coworkers from the master, Charlotte, Victor, Alexis, and Altan, with whom the intense work rhythm became much more bearable. They are also the reason for which these six months flew by so fast. Thank you for your help, your advices, the laughs, and the late night support.

Now, I would like to say a huge thank you to Marc Vocanson for his expertise and his critical sense. Beside analyzing data alongside us, Marc drives us to think and interpret data in the deepest details. Not only he brought me knowledge in immunology and the laboratory techniques surrounding it, but he also provided me with the tools to think and criticize.

Finally, I would also like to say a huge thank you to Marine-Alexia Lefèvre. First of all, for its supervision throughout this internship. Secondly, for his help in the writing of this report. It takes a lot of energy and patience to supervise an intern student and it might not have been an easy and restful task, especially at the beginning. Fortunately, besides the time, Marine had both the will and the energy for it. Training a student and explaining concepts during an internship is a thing. Conveying the curiosity and enthusiasm for a project is another.

Bibliography

1. Diepgen TL, Ofenloch RF, Bruze M, Bertuccio P, Cazzaniga S, Coenraads PJ, et al. Prevalence of contact allergy in the general population in different European regions. *Br J Dermatol*. 2016 Feb;174(2):319–29.
2. Vocanson M, Hennino A, Rozières A, Poyet G, Nicolas JF. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*. 2009 Dec;64(12):1699–714.
3. Scheinman PL, Vocanson M, Thyssen JP, Johansen JD, Nixon RL, Dear K, et al. Contact dermatitis. *Nat Rev Dis Primers*. 2021 May 27;7(1):38.
4. Lefevre MA, Nosbaum A, Rozières A, Lenief V, Mosnier A, Cortial A, et al. Unique molecular signatures typify skin inflammation induced by chemical allergens and irritants. *Allergy*. 2021 Dec;76(12):3697–712.
5. Rosenkilde MM, Benned-Jensen T, Andersen H, Holst PJ, Kledal TN, Lüttichau HR, et al. Molecular pharmacological phenotyping of EBI2. An orphan seven-transmembrane receptor with constitutive activity. *J Biol Chem*. 2006 May 12;281(19):13199–208.
6. Hannedouche S, Zhang J, Yi T, Shen W, Nguyen D, Pereira JP, et al. Oxysterols direct immune cell migration via EBI2. *Nature*. 2011 Jul 27;475(7357):524–7.
7. Preuss I, Ludwig MG, Baumgarten B, Bassilana F, Gessier F, Seuwen K, et al. Transcriptional regulation and functional characterization of the oxysterol/EBI2 system in primary human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Apr 11;446(3):663–8.
8. Emgård J, Kammoun H, García-Cassani B, Chesné J, Parigi SM, Jacob JM, et al. Oxysterol Sensing through the Receptor GPR183 Promotes the Lymphoid-Tissue-Inducing Function of Innate Lymphoid Cells and Colonic Inflammation. *Immunity*. 2018 Jan 16;48(1):120–132.e8.
9. Liu C, Yang XV, Wu J, Kuei C, Mani NS, Zhang L, et al. Oxysterols direct B-cell migration through EBI2. *Nature*. 2011 Jul 27;475(7357):519–23.
10. Yi T, Wang X, Kelly LM, An J, Xu Y, Sailer AW, et al. Oxysterol gradient generation by lymphoid stromal cells guides activated B cell movement during humoral responses. *Immunity*. 2012 Sep 21;37(3):535–48.
11. Park K, Scott AL. Cholesterol 25-hydroxylase production by dendritic cells and macrophages is regulated by type I interferons. *J Leukoc Biol*. 2010 Dec;88(6):1081–7.
12. Rutkowska A, Shimshek DR, Sailer AW, Dev KK. EBI2 regulates pro-inflammatory signalling and cytokine release in astrocytes. *Neuropharmacology*. 2018 May 1;133:121–8.
13. Gatto D, Brink R. B cell localization: regulation by EBI2 and its oxysterol ligand. *Trends Immunol*. 2013 Jul;34(7):336–41.
14. Gatto D, Wood K, Caminschi I, Murphy-Durland D, Schofield P, Christ D, et al. The chemotactic receptor EBI2 regulates the homeostasis, localization and immunological function of splenic dendritic cells. *Nat Immunol*. 2013 May;14(5):446–53.
15. Yi T, Cyster JG. EBI2-mediated bridging channel positioning supports splenic dendritic cell homeostasis and particulate antigen capture. *Elife*. 2013 May 14;2:e00757.
16. Li J, Lu E, Yi T, Cyster JG. EBI2 augments Tfh cell fate by promoting interaction with IL-2- quenching dendritic cells. *Nature*. 2016 May;533(7601):110–4.

17. Wanke F, Moos S, Croxford AL, Heinen AP, Gräf S, Kalt B, et al. EBI2 Is Highly Expressed in Multiple Sclerosis Lesions and Promotes Early CNS Migration of Encephalitogenic CD4 T Cells. *Cell Rep*. 2017 Jan 31;18(5):1270–84.
18. Rutkowska A, Sailer AW, Dev KK. EBI2 receptor regulates myelin development and inhibits LPC-induced demyelination. *J Neuroinflammation*. 2017 Dec 16;14:250.
19. Chalmin F, Rochemont V, Lippens C, Clottu A, Sailer AW, Merkler D, et al. Oxysterols regulate encephalitogenic CD4(+) T cell trafficking during central nervous system autoimmunity. *J Autoimmun*. 2015 Jan;56:45–55.
20. Benned-Jensen T, Smethurst C, Holst PJ, Page KR, Sauls H, Sivertsen B, et al. Ligand modulation of the Epstein-Barr virus-induced seven-transmembrane receptor EBI2: identification of a potent and efficacious inverse agonist. *J Biol Chem*. 2011 Aug 19;286(33):29292–302.
21. Niss Arfelt K, Barington L, Benned-Jensen T, Kubale V, Kovalchuk AL, Daugvilaite V, et al. EBI2 overexpression in mice leads to B1 B-cell expansion and chronic lymphocytic leukemia-like B-cell malignancies. *Blood*. 2017 Feb 16;129(7):866–78.
22. Baptista AP, Gola A, Huang Y, Milanez-Almeida P, Torabi-Parizi P, Urban JF, et al. The Chemoattractant Receptor Ebi2 Drives Intranodal Naive CD4+ T Cell Peripheralization to Promote Effective Adaptive Immunity. *Immunity*. 2019 May 21;50(5):1188-1201.e6.
23. Sun S, Liu C. $7\alpha, 25$ -dihydroxycholesterol-mediated activation of EBI2 in immune regulation and diseases. *Front Pharmacol*. 2015;6:60.
24. Gessier F, Preuss I, Yin H, Rosenkilde MM, Laurent S, Endres R, et al. Identification and characterization of small molecule modulators of the Epstein-Barr virus-induced gene 2 (EBI2) receptor. *J Med Chem*. 2014 Apr 24;57(8):3358–68.
25. Clottu AS, Mathias A, Sailer AW, Schlupe M, Seebach JD, Du Pasquier R, et al. EBI2 Expression and Function: Robust in Memory Lymphocytes and Increased by Natalizumab in Multiple Sclerosis. *Cell Rep*. 2017 Jan 3;18(1):213–24.
26. Preuss I, Ludwig MG, Baumgarten B, Bassilana F, Gessier F, Seuwen K, et al. Transcriptional regulation and functional characterization of the oxysterol/EBI2 system in primary human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Apr 11;446(3):663–8.
27. Tang J, Shi Y, Zhan L, Qin C. Downregulation of GPR183 on infection restricts the early infection and intracellular replication of mycobacterium tuberculosis in macrophage. *Microb Pathog*. 2020 Aug;145:104234.
28. Suan D, Nguyen A, Moran I, Bourne K, Hermes JR, Arshi M, et al. T Follicular Helper Cells Have Distinct Modes of Migration and Molecular Signatures in Naive and Memory Immune Responses. *Immunity*. 2015 Apr 21;42(4):704–18.
29. Braden K, Giancotti LA, Chen Z, DeLeon C, Latzo N, Boehn T, et al. GPR183-Oxysterol Axis in Spinal Cord Contributes to Neuropathic Pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2020 Nov;375(2):367–75.

Supplemental Data

Supplemental Materials and methods

Micro-Array, and Quantitative Real-Time PCR and RNA-seq analyses:

Human microarray data were obtained from a previous study from our group (4) and are publicly available in Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) under accession no. GSE168735. Genes of interest were selected and normalized expression values were illustrated as a heatmap to compare molecular signature between allergic skin inflammation and non-inflammatory skin.

For qRT-PCR analyses, Total RNA was isolated from mice ears using the Qiagen RNeasy Mini Kit (Courtaboeuf, France), and contaminating DNA was removed using the DNA-Free™ DNA Removal kit (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The RNA was reverse-transcribed into double-stranded copy DNA (cDNA) and qRT-PCR investigations were performed using a StepOnePlus PCR system (ThermoFisher, Villebon-sur-Yvette, France) and primers from Qiagen (Courtaboeuf, France) for CXCL10: QuantiTect Primer Assays; or produced by Invitrogen (Cergy-Pontoise, France) for CD8A, CD4, IFNG, GZMB, GAPDH or Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) for CD69, GPR183, CH25H, CYP7B1 – designed using the publicly Primer designing tool-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). All the primers used are listed in **Table S1**. Expression values for each mRNA transcript were normalized to values obtained for the housekeeping gene GAPDH, and results are depicted as a heatmap to compare gene expression in lesional skin versus nonlesional skin.

To study the expression of GPR183 on mouse skin infiltrating T cells we used RNA-seq data previously generated by our team (unpublished data). To this end, $\gamma\delta$ T cells, CD8⁺ T effector cells (Teff) and resident memory T cells (Trm) were FACS sorted on a BD Biosciences FACS Aria at different time points after DNFB challenge (days 2, 4, 8, 15 and 30 post challenge). Then, frozen cells were sent to Single Cell Discoveries (Utrecht, The Netherlands) for total RNA isolation, library prep and sequencing. RNA extraction and library preparation followed the CEL-seq2 protocol. Mapping and generation of

count tables was done using the MapAndGo script. Normalized count (DESeq2's median of ratios) was used for data visualization.

Human Skin cell isolation and Flow cytometry analysis:

Human skin biopsies were incubated for 2 hours at 37°C in collagenase type 1 (121.9 CDU/ml; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and DNase (2 KU/ml; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and passed through a 100µm cell strainer to obtain single cell suspensions (ThermoFisher Scientific, Dardilly, France). Cell viability was determined by trypan blue exclusion.

Flow cytometry experiments were then conducted on skin cells harvested from human skin biopsies or directly on blood from healthy donors. Isolated single cell suspensions or whole blood were stained using fluorescently labeled mouse antibodies listed in **Table S2** and **Table S3**. Fixable viability staining was performed to exclude dead cells from the analysis using a Fixable Viability Dye, purchased from eBioscience (Villebon-sur-Yvette, France). Stained cells were acquired on a LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Analysis was conducted on FlowJo software (Treestar, Ashland, Oregon, USA).

dLN cell isolation:

dLN were collected, crushed, and passed through a 100-µm cell strainer to obtain single-cell suspensions (Thermo Fisher Scientific). Cell viability was determined using trypan blue exclusion.

CD8⁺ and CD4⁺ T cells were then isolated using Milteny Cell isolation kits and AutoMACS® Pro Separator (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

Bone-marrow-derived dendritic cell (BMDCs) generation and antigen-pulse:

BMDCs were generated *in vitro* from C57BL/6 bone marrow progenitors with granulocyte macrophage

colony-stimulating factor (GM-CSF). On day 7 of culture, 1.3 mM DNBS from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) was added for 15 minutes before harvesting the cells.

Proliferation assays (lymphocyte transformation test assays):

Frozen peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of allergic patients or isolated mouse CD8⁺ T cells were used.

Human or mice cells were then distributed in triplicate or sixuplicate, respectively, in 96 round-bottom microwell plates (2×10^5 /well and 10^5 /well, respectively), and stimulated with increasing concentrations of the suspected allergen or haptized BMDCs, respectively, and addition of increasing concentration of the GPR183 inhibitor NIBR189. Negative controls were performed with PBMC in the medium alone or mice CD8⁺ T cells with non-haptized BMDCs. Positive controls were performed in the presence of phytohaemagglutinin and ionomycin (Sigma, St Quentin Fallavier, France). The cultures were incubated for 5 days (for human) or 3 days (for mouse) at 37°C in 5% CO₂, and 1 μCi [³H]thymidine was added to each well for the last 12 hours. The specific proliferation was determined by [³H]thymidine incorporation using a beta counter Top Count (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA). The results were expressed as counts per minute (CPM) of incorporated 3H-thymidine, as well as stimulation index (SI), calculated as the ratio of 3H incorporated by allergen-stimulated cultures and basal 3H incorporation by unstimulated cells, for each NIBR189 dose.

Cytokine production assays (Elispot assay or ELISA)

The number of IFN-γ-producing mouse CD8⁺ T cells was determined using ELISPOT (enzyme-linked immunospot) assay kit (Mouse IFN_γ ELISPOT Set, BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France). 96-well plates (Millipore MultiScreen-IP 0,45 μm plate, Molsheim, France) were coated overnight at 4°C with anti-IFN-γ antibody provided in the kit and blocked with dry skimmed milk for 2 hours at 37°C. The plates were washed three times with PBS before use and mice CD8⁺ T cells (5×10^5 in 100 μl)

were incubated overnight at 37°C/5% CO₂ in the presence of haptenized BMDCs, respectively and addition of increasing concentration of the GPR183 inhibitor NIBR189. Plates were washed three times with PBS/Tween 0.05% and incubated for 2 h at 37°C with a biotinylated anti-IFN- γ antibody and then extensively washed. Interferon- γ spot-forming cells (SFCs) were developed using streptavidin-alkaline phosphatase, incubated for 2 h at 37°C, and extensively washed before adding the substrate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate). The number of IFN- γ SFCs present in each well was counted using a Carl Zeiss vision ELISPOT (Zeiss SAS, Le Pecq, France). Results of the IFN- γ ELISPOT assay are expressed as the numbers of IFN- γ SFC/10⁶ cells cultured with the allergen.

Production of IFN- γ by mouse CD8⁺ T cells was determined using ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay kit, Human IFN-gamma DuoSet, R&D Systems, Lille, France). Mice cells were distributed in sixuplicate, in 96 -bottom microwell plates (10⁵ cells/well) and stimulated with haptenized BMDCs and addition of increasing concentration of NIBR189. Unstimulated CD8⁺ T cells were used as negative controls, and nonspecific stimulation with phytohaemagglutinin and ionomycin (Sigma, St Quentin Fallavier, France) were used as positive controls. The cultures were incubated for 3 days (for mouse) at 37°C in 5% CO₂. Cell-free supernatants were harvested after 3 days and IFN- γ production was determined by ELISA following the manufactural protocol. Plates were read at 450 nm with an Ultramax microplate manager (Biorad, USA) and IFN- γ concentrations were calculated from the standard curve. Results are expressed as pg/ml of IFN- γ in supernatant.

Transwell Migration Assays :

Cells suspensions were allowed to transmigrate for 3 h across 5 μ m transwell filters (SABEU, Northeim, Germany) toward medium or increasing concentrations of 7 α ,25-OHC (Avanti Polar Lipids, Alabama, USA). Briefly, migration assays were performed in duplicate using 24-well transwell plate (Corning, Boulogne-Billancourt, France). *In vitro* stimulated or unstimulated mouse CD8⁺ T cells and CD4⁺ T cells as well as stimulated or unstimulated human PBMCs were resuspended at 1.5x10⁶ cells/ml in RPMI Medium 0,5% BSA and 100 μ l of the suspensions was added to a top chamber of the 24-well transwell

plate. Cells were then pre-treated with increased concentration of the GPR183 inhibitor NIBR189. $7\alpha 25$ -OHC were prepared at the indicated concentration and added to the bottom chamber. Cells were incubated for 3 h at 37 °C.

Transmigrated cells were enumerated by flow cytometry Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France). Sorted mouse CD4⁺ cells and CD8⁺ T cells were directly counted. Human PBMCs were stained using fluorescently labeled mouse antibodies: anti-CD4 (clone RPA-T4, BD Biosciences) and anti-CD8 (clone SK1, BD Biosciences) then counted. Fixable viability staining was performed to exclude dead cells from the analysis using a Fixable Viability Dye, purchased from eBioscience (Villebon-sur-Yvette, France) The chemotactic percentage was calculated via the formula $C = \text{number of cells transmigrated in response to chemotactic factor} / \text{number of cells in the upper well}$.

Data analysis:

Graphs and heatmaps were generated using Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA-USA) or Rstudio (Integrated Development Environment for R, Boston, MA). Calculation of Area Under Curve and Standard deviation were performed using Prism software.

Supplemental Table

Table S1: Primer sequences, primer ID and detected transcripts for qRT-PCR analysis.

| Gene name | Primer sequences | Amplicon length (bp) |
|------------------|--|-----------------------------|
| <i>CD8A</i> | Forward: CTTGTGCCTCAAAGTCAAG Reverse: CCGCTAAAGGCAGTTCTCC | 103 |
| <i>CD4</i> | Forward: TGAACCTGGTGGTGGATGAAA Reverse: TCTCCTGCTTCAGGGTCAAGT | 102 |
| <i>CD69</i> | Forward: ACATCTGGAGAGAGGGCAGAAG Reverse: AGGACGTGATGAGGACCACTA | 119 |
| <i>GZMB</i> | Forward: GCTGCTCACTGTGAAGGAAGT Reverse: TGGGGAATGCATTTTACCAT | 107 |
| <i>IFNG</i> | Forward: ATCTGGAGGAACTGGCAAAA Reverse: TTCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGGTA | 89 |
| <i>GPR183</i> | Forward: ACTATGCGCTGGGCTTTGAT Reverse: ACACCTGCGTACGTGTTGAT | 88 |
| <i>CH25H</i> | Forward: TCCACAAGGTGCATCACCAG Reverse: CGTCGAAGAAGGTCAGCGAA | 93 |
| <i>CYP7B1</i> | Forward: TTCCTCCACTCATACACAATG Reverse: CGTGCTTTTCTTCTTACCATC | 95 |
| <i>GAPDH</i> | Forward: GCATGGCCTTCCGTGTTC Reverse: TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT | 83 |

| Gene name | Primer ID | Detected transcript(s) | Amplicon length (bp) |
|------------------|-------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| <i>CXCL10</i> | Mm_CXCL10_va_1_SG | XM_975312 | 84 |

Table S2: Fluorescently labeled anti-human mouse antibodies for skin cells staining

| Antigen | Clone | Supplier |
|----------------|--------------|-----------------|
| <i>CD3</i> | UCHT1 | BD Biosciences |
| <i>CD45</i> | HI30 | BD Pharmingen |
| <i>CD4</i> | VIT4 | Miltenyi |
| <i>CD8</i> | RPA-T8 | BD Biosciences |
| <i>CD103</i> | Ber-ACT8 | eBiosciences |
| <i>CD66b</i> | G10F5 | BioLegend |
| <i>CD294</i> | BM16 | Miltenyi-Biotec |
| <i>GPR183</i> | SA313E4 | BioLegend |

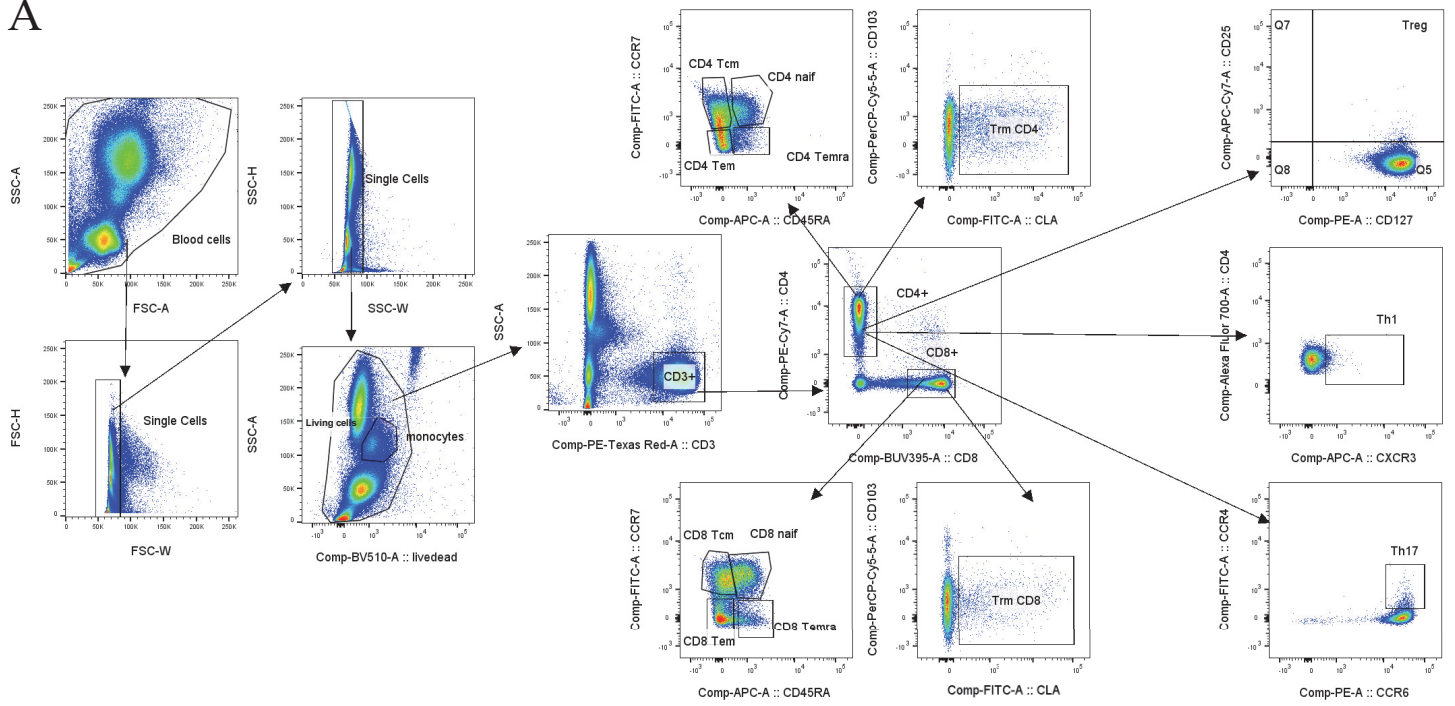
Table S3: Fluorescently labeled anti-human mouse antibodies for blood cells staining

| Antigen | Clone | Supplier |
|----------------|----------------|-----------------------|
| <i>CD3</i> | 7D6 | Invitrogene |
| <i>CD4</i> | RPA-T4 VIT4 | BioLegend Miltenyi |
| <i>CD8</i> | RPA-T8 | BD Biosciences |
| <i>CD127</i> | R34.34 | BCoulter |
| <i>CD25</i> | M-A251 | BD Biosciences |
| <i>CCR7</i> | 150503 | RD Systems |
| <i>CD45RA</i> | HI100 | BD Biosciences |
| <i>TCRab</i> | BW242/412 | Miltenyi-Biotec |

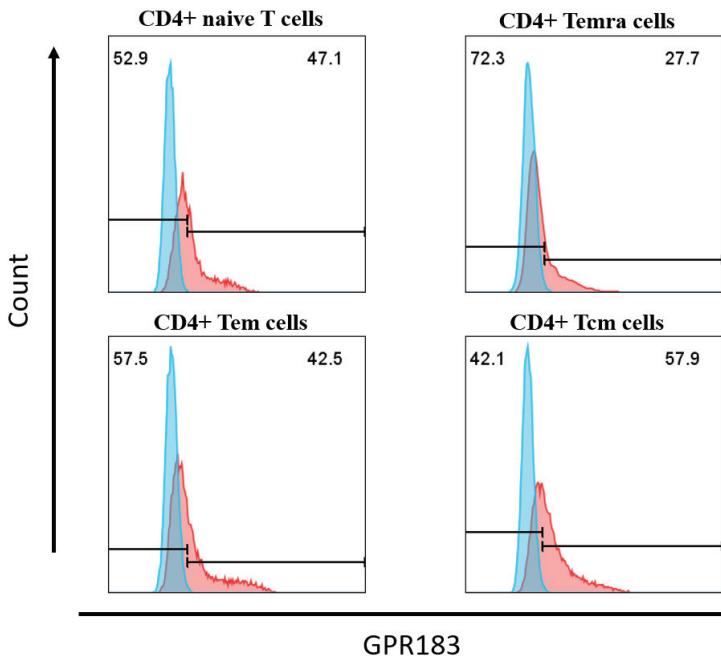
| | | |
|-------------------|-----------|-----------------|
| <i>CD56</i> | B159 | BD Pharmingen |
| <i>TCRgd</i> | B1 | BD Biosciences |
| <i>TCR Va 7,2</i> | 3C10 | BioLegend |
| <i>CD66b</i> | G10F5 | BioLegend |
| <i>HLA-DR</i> | AC122 | Miltenyi-Biotec |
| <i>CD294</i> | BM16 | Miltenyi-Biotec |
| <i>CD11c</i> | B-ly6 | BD Pharmingen |
| <i>CD45</i> | HI30 | BD Pharmingen |
| <i>CXCR3</i> | 1C6/CXCR3 | BD Pharmingen |
| <i>CCR6</i> | 11A9 | BD Biosciences |
| <i>CCR4</i> | 205410 | RD Systems |
| <i>CLA</i> | HECA-452 | Miltenyi-Biotec |
| <i>CD103</i> | Ber-ACT8 | eBiosciences |
| <i>GPR183</i> | SA313E4 | BioLegend |

Supplemental Figures

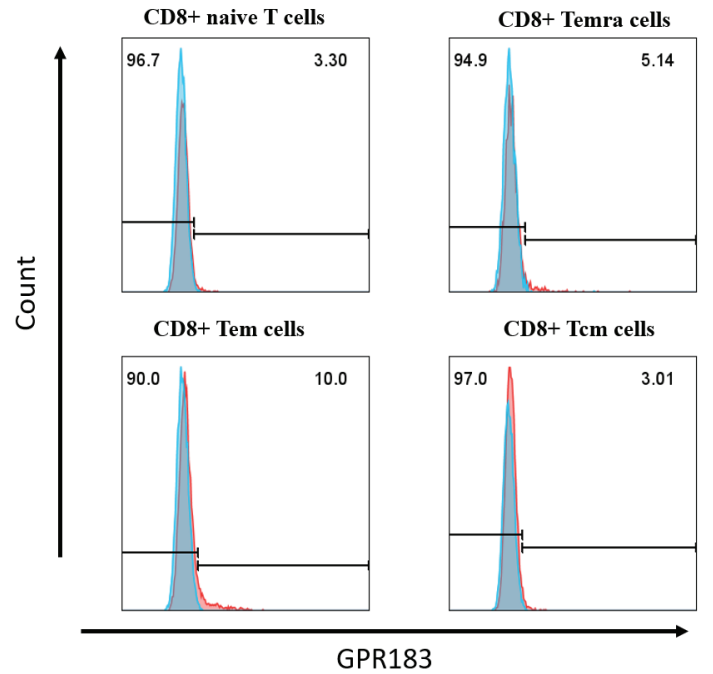
A



B



C



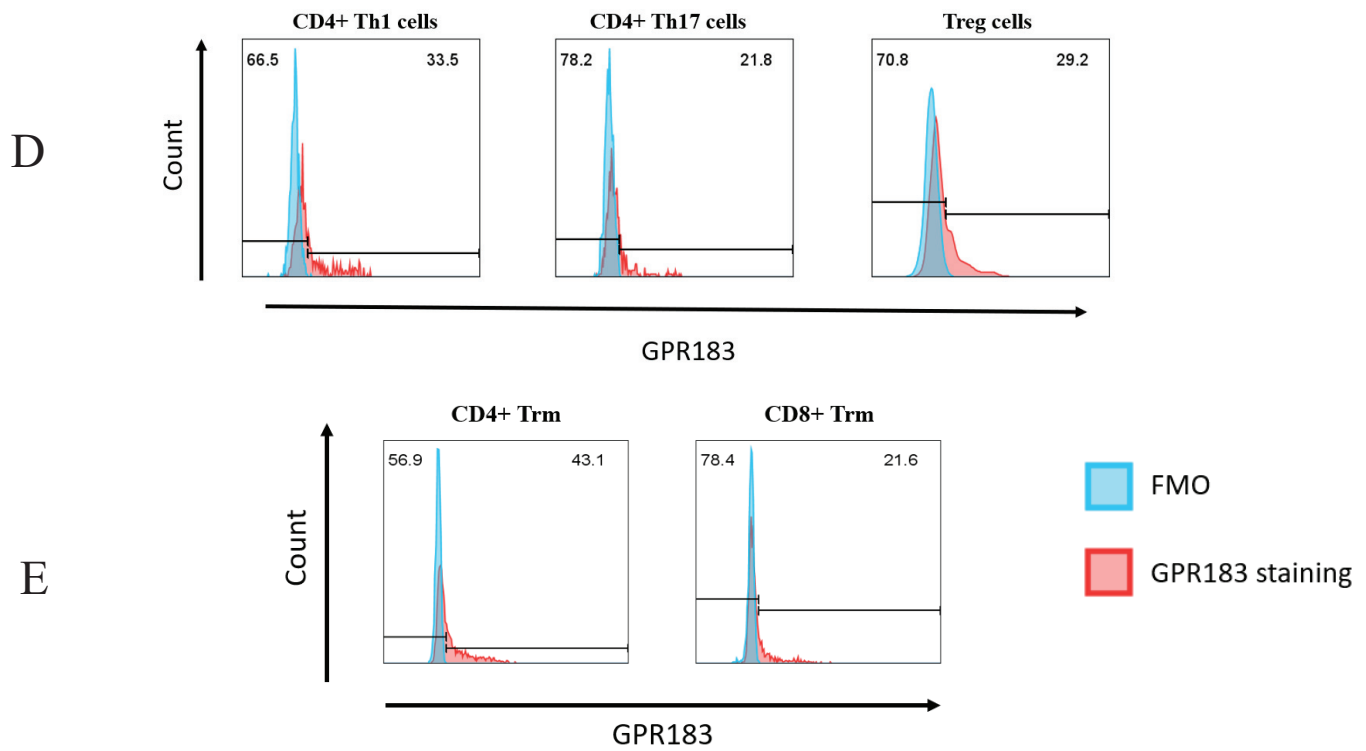
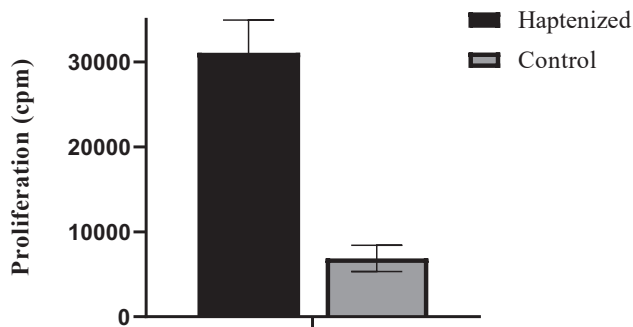


Figure S1: GPR183 expression on effector, memory and naive T cells

(A) Gating strategy to identify GPR183 expressing lymphocytes in the blood of healthy donors. (B, C) Flow cytometry analysis of GPR183 expression on effector, naive or memory CD4+ (B) and CD8+ (C) T cells. Plots are gated on CD4+ T cells, CD8+ T cells, as well as CCR7 and CD45RA. (D) Flow cytometry analysis of GPR183 expression on CD4+ T cells subsets Th1, Th17 or regulatory T cells. Plots are gated on CD4+ T cells, CD8+ T cells, as well as CCR6, CCR4 and CXCR3. (E) Flow cytometry analysis of GPR183 expression on CD4+ and CD8+ T cells with a cutaneous tropism. Plots are gated on CD4+ T cells, CD8+ T cells, as well as CD103 and CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen). Numbers in quadrants indicate percent cells of GPR183 staining of the corresponding populations (red) in each throughout. Each plot has been made with a Fluorescence Minus One control to validate GPR183 staining (blue).

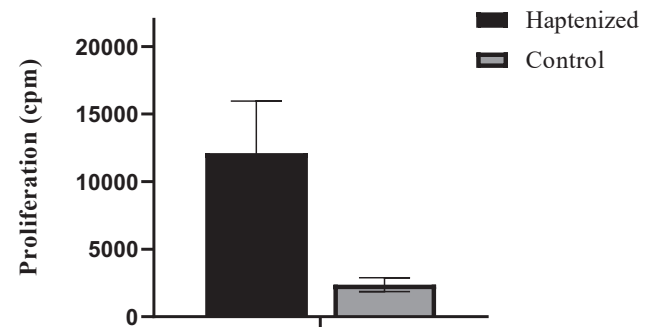
A1

Specific proliferation of mouse cells CD4+ T cells used for migration assay



A2

Specific proliferation of mouse cells CD8+ T cells) used for migration assay



B

Specific proliferation of human PBMCs used for migration assay

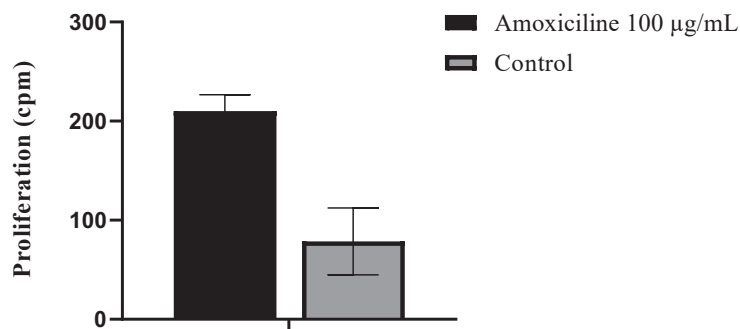
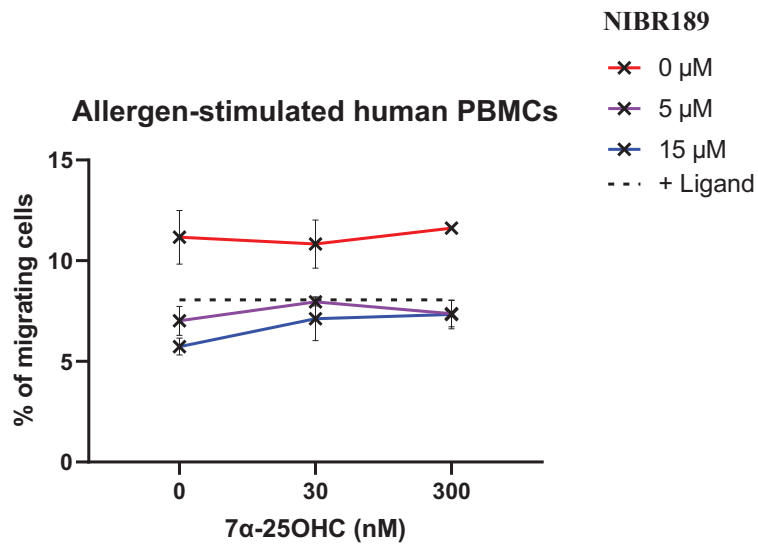


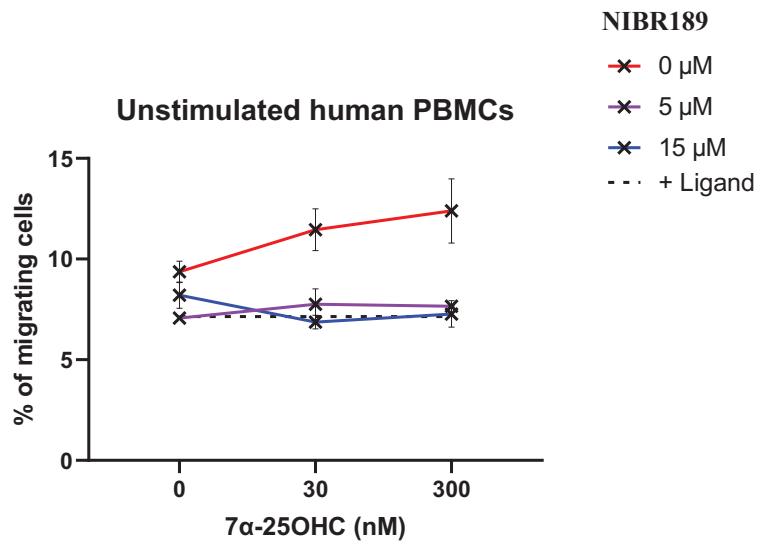
Figure S3: Validation of human PBMCs, mouse CD4+ and CD8+ T cells activation

Secondary proliferative response of CD8+ T cells, CD4+ T cells or PBMCs assessed by lymphocyte transformation tests in mouse (A) and human (B) models to verify the activation state of cells before transwell migration assay. The black color represents the results for cells cultured with the specific allergen and the grey color represents the results for cells cultured without allergen. The results are expressed as ³Hthymidine incorporation counts per minute.

A



B



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abed, I. (2018). Psoriasis: Tumor Necrosis Factor α , Interleukin 18, C Reactive Protein Polymorphism , and Osteopontin Role.: Psoriasis. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES*, 1(1), Article 1.
- Abji, F., Pollock, R. A., Liang, K., Chandran, V., & Gladman, D. D. (2016). Brief Report: CXCL10 Is a Possible Biomarker for the Development of Psoriatic Arthritis Among Patients With Psoriasis. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 68(12), 2911–2916. <https://doi.org/10.1002/art.39800>
- Adam, C., Wohlfarth, J., Haußmann, M., Sennefelder, H., Rodin, A., Maler, M., Martin, S. F., Goebeler, M., & Schmidt, M. (2017). Allergy-Inducing Chromium Compounds Trigger Potent Innate Immune Stimulation Via ROS-Dependent Inflammasome Activation. *The Journal of Investigative Dermatology*, 137(2), 367–376. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.10.003>
- Agache, I., & Akdis, C. A. (2019). Precision medicine and phenotypes, endotypes, genotypes, regiotypes, and theratypes of allergic diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(4), 1493–1503. <https://doi.org/10.1172/JCI124611>
- Agner, T., Aalto-Korte, K., Andersen, K. E., Foti, C., Giménez-Arnau, A., Goncalo, M., Goossens, A., Le Coz, C., Diepgen, T. L., & European Environmental and Contact Dermatitis Research Group. (2015). Classification of hand eczema. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 29(12), 2417–2422. <https://doi.org/10.1111/jdv.13308>
- Ahlström, M. G., Thyssen, J. P., Menné, T., & Johansen, J. D. (2017). Prevalence of nickel allergy in Europe following the EU Nickel Directive—A review. *Contact Dermatitis*, 77(4), Article 4. <https://doi.org/10.1111/cod.12846>
- Ahlström, M. G., Thyssen, J. P., Wennervaldt, M., Menné, T., & Johansen, J. D. (2019). Nickel allergy and allergic contact dermatitis: A clinical review of immunology, epidemiology, exposure, and treatment. *Contact Dermatitis*, 81(4), 227–241. <https://doi.org/10.1111/cod.13327>
- Ahmad, N., & Mukhtar, H. (2004). Cytochrome p450: A target for drug development for skin diseases. *The Journal of Investigative Dermatology*, 123(3), 417–425. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23307.x>
- Ahrens, B., Schulz, G., Bellach, J., Niggemann, B., & Beyer, K. (2015). Chemokine levels in serum of children with atopic dermatitis with regard to severity and sensitization status. *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 26(7), 634–640. <https://doi.org/10.1111/pai.12431>
- Ainscough, J. S., Frank Gerberick, G., Dearman, R. J., & Kimber, I. (2013). Danger, intracellular signaling, and the orchestration of dendritic cell function in skin sensitization. *Journal of Immunotoxicology*, 10(3), 223–234. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2012.711782>
- Alafeef, M., Moitra, P., Dighe, K., & Pan, D. (2021). RNA-extraction-free nano-amplified colorimetric test for point-of-care clinical diagnosis of COVID-19. *Nature Protocols*, 16(6), 3141–3162. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00546-w>
- Ale, I. S., & Maibach, H. I. (2014). Irritant contact dermatitis. *Reviews on Environmental Health*, 29(3), 195–206. <https://doi.org/10.1515/reveh-2014-0060>
- Alinaghi, F., Bennike, N. H., Egeberg, A., Thyssen, J. P., & Johansen, J. D. (2019). Prevalence of contact allergy in the general population: A systematic review and meta-analysis. *Contact Dermatitis*, 80(2), Article 2. <https://doi.org/10.1111/cod.13119>
- Allinson, J. L. (2018). Clinical biomarker validation. *Bioanalysis*, 10(12), 957–968. <https://doi.org/10.4155/bio-2018-0061>
- Amsler, E., Assier, H., Soria, A., Bara, C., Ferrier le Bouëdec, M. C., Barbaud, A., Milpied, B., Giordano-Labadie, F., Pasteur, J., Badaoui, A., Valois, A., Castelain, F., Kurihara, F., Castagna, J., Boulard, C., Bernier, C., Leleu, C., Marcant, P., Crépy, M. N., ... from the Dermatology and Allergy Group of the French Society of Dermatology (DAG). (2022). What is the optimal duration for a ROAT? The experience of the French Dermatology and Allergology group (DAG). *Contact Dermatitis*, 87(2), 170–175. <https://doi.org/10.1111/cod.14118>
- Anderson, R. T., & Rajagopalan, R. (1997). Development and validation of a quality of life instrument for cutaneous diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 37(1), 41–50. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(97\)70210-x](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(97)70210-x)
- Anderson, R. T., & Rajagopalan, R. (2001). Effects of allergic dermatosis on health-related quality of life. *Current Allergy and Asthma Reports*, 1(4), 309–315. <https://doi.org/10.1007/s11882-001-0041-3>
- Angelova-Fischer, I. (2016). Irritants and Skin Barrier Function. *Current Problems in Dermatology*, 49, 80–89. <https://doi.org/10.1159/000441547>
- Antonopoulos, C., Cumberbatch, M., Mee, J. B., Dearman, R. J., Wei, X.-Q., Liew, F. Y., Kimber, I., & Groves, R. W. (2008). IL-18 is a key proximal mediator of contact hypersensitivity and allergen-induced Langerhans cell migration in murine epidermis. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(2), 361–367. <https://doi.org/10.1189/jlb.0604352>
- Ardigò, M., Longo, C., Cristaudo, A., Berardesca, E., & Pellacani, G. (2012). Evaluation of allergic vesicular reaction

- to patch test using in vivo confocal microscopy. *Skin Research and Technology: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 18(1), Article 1. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2011.00531.x>
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., & Sherlock, G. (2000). Gene ontology: Tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics*, 25(1), 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>
- Astner, S., González, E., Cheung, A. C., Rius-Díaz, F., Doukas, A. G., William, F., & González, S. (2005). Non-invasive evaluation of the kinetics of allergic and irritant contact dermatitis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 124(2), Article 2. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23605.x>
- Astner, S., Gonzalez, E., Cheung, A., Rius-Diaz, F., & González, S. (2005). Pilot study on the sensitivity and specificity of in vivo reflectance confocal microscopy in the diagnosis of allergic contact dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.08.026>
- Azmi, I., Faizan, M. I., Kumar, R., Raj Yadav, S., Chaudhary, N., Kumar Singh, D., Butola, R., Ganotra, A., Datt Joshi, G., Deep Jhingan, G., Iqbal, J., Joshi, M. C., & Ahmad, T. (2021). A Saliva-Based RNA Extraction-Free Workflow Integrated With Cas13a for SARS-CoV-2 Detection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 632646. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.632646>
- Bacci, S., Alard, P., Dai, R., Nakamura, T., & Streilein, J. W. (1997). High and low doses of haptens dictate whether dermal or epidermal antigen-presenting cells promote contact hypersensitivity. *European Journal of Immunology*, 27(2), 442–448. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270214>
- Baeck, M., Marot, L., Nicolas, J.-F., Tennstedt, D., & Goossens, A. (2010). Hypersensibilité allergique aux corticostéroïdes topiques et systémiques. *Revue Française d'Allergologie*, 50(3), 146–162. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2010.01.025>
- Bagel, J., Wang, Y., Paul Montgomery, I. I. I., Abaya, C., Andrade, E., Boyce, C., Tomich, T., Lee, B.-I., Pariser, D., Menter, A., & Dickerson, T. (2021). A Machine Learning-Based Test for Predicting Response to Psoriasis Biologics. *SKIN The Journal of Cutaneous Medicine*, 5(6), Article 6. <https://doi.org/10.25251/skin.5.6.5>
- Bains, S. N., Nash, P., & Fonacier, L. (2019). Irritant Contact Dermatitis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 56(1), 99–109. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8713-0>
- Bakker, D. S., de Graaf, M., Nierkens, S., Delemarre, E. M., Knol, E., van Wijk, F., de Bruin-Weller, M. S., Drylewicz, J., & Thijs, J. L. (2022). Unraveling heterogeneity in pediatric atopic dermatitis: Identification of serum biomarker based patient clusters. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 149(1), 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.06.029>
- Bakker, D. S., Nierkens, S., Knol, E. F., Giovannone, B., Delemarre, E. M., van der Schaft, J., van Wijk, F., de Bruin-Weller, M. S., Drylewicz, J., & Thijs, J. L. (2021). Confirmation of multiple endotypes in atopic dermatitis based on serum biomarkers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 147(1), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.062>
- Bakos, R. M., Blumetti, T. P., Roldán-Marín, R., & Salerni, G. (2018). Noninvasive Imaging Tools in the Diagnosis and Treatment of Skin Cancers. *American Journal of Clinical Dermatology*, 19(Suppl 1), 3–14. <https://doi.org/10.1007/s40257-018-0367-4>
- Baptista, A. P., Gola, A., Huang, Y., Milanez-Almeida, P., Torabi-Parizi, P., Urban, J. F., Shapiro, V. S., Gerner, M. Y., & Germain, R. N. (2019). The Chemoattractant Receptor Ebi2 Drives Intranodal Naive CD4+ T Cell Peripheralization to Promote Effective Adaptive Immunity. *Immunity*, 50(5), 1188–1201.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.001>
- Barratt, M. D. (1995). Quantitative structure activity relationships for skin corrosivity of organic acids, bases and phenols. *Toxicology Letters*, 75(1–3), 169–176. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(94\)03177-9](https://doi.org/10.1016/0378-4274(94)03177-9)
- Basketter, D. A. (1998). Chemistry of contact allergens and irritants. *American Journal of Contact Dermatitis: Official Journal of the American Contact Dermatitis Society*, 9(2), 119–124.
- Basketter, D. A., Andersen, K. E., Liden, C., Van Loveren, H., Boman, A., Kimber, I., Alanko, K., & Berggren, E. (2005). Evaluation of the skin sensitizing potency of chemicals by using the existing methods and considerations of relevance for elicitation. *Contact Dermatitis*, 52(1), 39–43. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2005.00490.x>
- Basketter, D., Dooms-Goossens, A., Karlberg, A. T., & Lepoittevin, J. P. (1995). The chemistry of contact allergy: Why is a molecule allergenic? *Contact Dermatitis*, 32(2), 65–73. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1995.tb00748.x>
- Belloni Fortina, A., Cooper, S. M., Spiewak, R., Fontana, E., Schnuch, A., & Uter, W. (2015). Patch test results in children and adolescents across Europe. Analysis of the ESSCA Network 2002-2010. *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 26(5), 446–455. <https://doi.org/10.1111/pai.12397>

- Belsito, D. V. (2005). Occupational contact dermatitis: Etiology, prevalence, and resultant impairment/disability. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.02.045>
- Benned-Jensen, T., Smethurst, C., Holst, P. J., Page, K. R., Sauls, H., Sivertsen, B., Schwartz, T. W., Blanchard, A., Jepras, R., & Rosenkilde, M. M. (2011). Ligand modulation of the Epstein-Barr virus-induced seven-transmembrane receptor EB12: Identification of a potent and efficacious inverse agonist. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(33), 29292–29302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.196345>
- Bennike, N. H., Palangi, L., Christensson, J. B., Nilsson, U., Zachariae, C., Johansen, J. D., & Hagvall, L. (2019a). Allergic contact dermatitis caused by hydroperoxides of limonene and dose-response relationship-A repeated open application test (ROAT) study. *Contact Dermatitis*, 80(4), 208–216. <https://doi.org/10.1111/cod.13168>
- Bennike, N. H., Palangi, L., Christensson, J. B., Nilsson, U., Zachariae, C., Johansen, J. D., & Hagvall, L. (2019b). Allergic contact dermatitis caused by hydroperoxides of limonene and dose-response relationship-A repeated open application test (ROAT) study. *Contact Dermatitis*, 80(4), Article 4. <https://doi.org/10.1111/cod.13168>
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., Hall, K. P., Evers, D. J., Barnes, C. L., Bignell, H. R., Boutell, J. M., Bryant, J., Carter, R. J., Keira Cheetham, R., Cox, A. J., Ellis, D. J., Flatbush, M. R., Gormley, N. A., Humphray, S. J., ... Smith, A. J. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456(7218), 53–59. <https://doi.org/10.1038/nature07517>
- Berard, F., Marty, J.-P., & Nicolas, J.-F. (2003). Allergen penetration through the skin. *European Journal of Dermatology: EJD*, 13(4), 324–330.
- Berdyshev, E., Goleva, E., Bronova, I., Dyjack, N., Rios, C., Jung, J., Taylor, P., Jeong, M., Hall, C. F., Richers, B. N., Norquest, K. A., Zheng, T., Seibold, M. A., & Leung, D. Y. (2018). Lipid abnormalities in atopic skin are driven by type 2 cytokines. *JCI Insight*, 3(4), 98006. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98006>
- Bhardwaj, S. S., Jaimes, J. P., Liu, A., & Warshaw, E. M. (2007). A double-blind randomized placebo-controlled pilot study comparing topical immunomodulating agents and corticosteroids for treatment of experimentally induced nickel contact dermatitis. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 18(1), 26–31. <https://doi.org/10.2310/6620.2007.06031>
- Bhatia, R., & Sharma, V. K. (2017). Occupational dermatoses: An Asian perspective. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 83(5), 525–535. https://doi.org/10.4103/ijdv.IJDVL_1041_15
- Bhatt, A., Fatima, Z., Ruwali, M., Misra, C. S., Rangu, S. S., Rath, D., Rattan, A., & Hameed, S. (2022). CLEVER assay: A visual and rapid RNA extraction-free detection of SARS-CoV-2 based on CRISPR-Cas integrated RT-LAMP technology. *Journal of Applied Microbiology*, 133(2), 410–421. <https://doi.org/10.1111/jam.15571>
- Bieber, T., D'Erme, A. M., Akdis, C. A., Traidl-Hoffmann, C., Lauener, R., Schäppi, G., & Schmid-Grendelmeier, P. (2017a). Clinical phenotypes and endophenotypes of atopic dermatitis: Where are we, and where should we go? *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(4S), S58–S64. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.01.008>
- Bieber, T., D'Erme, A. M., Akdis, C. A., Traidl-Hoffmann, C., Lauener, R., Schäppi, G., & Schmid-Grendelmeier, P. (2017b). Clinical phenotypes and endophenotypes of atopic dermatitis: Where are we, and where should we go? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(4), S58–S64. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.01.008>
- Biedermann, T., Kneilling, M., Mailhammer, R., Maier, K., Sander, C. A., Kollias, G., Kunkel, S. L., Hültner, L., & Röcken, M. (2000). Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(10), 1441–1452. <https://doi.org/10.1084/jem.192.10.1441>
- Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), 89–95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
- Bissonnette, R., Worm, M., Gerlach, B., Guenther, L., Cambazard, F., Ruzicka, T., Maares, J., & Brown, T. C. (2010). Successful retreatment with alitretinoin in patients with relapsed chronic hand eczema. *The British Journal of Dermatology*, 162(2), 420–426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09572.x>
- Blauvelt, A., de Bruin-Weller, M., Gooderham, M., Cather, J. C., Weisman, J., Pariser, D., Simpson, E. L., Papp, K. A., Hong, H. C.-H., Rubel, D., Foley, P., Prens, E., Griffiths, C. E. M., Etoh, T., Pinto, P. H., Pujol, R. M., Szepietowski, J. C., Ettl, K., Kemény, L., ... Shumel, B. (2017). Long-term management of moderate-to-severe atopic dermatitis with dupilumab and concomitant topical corticosteroids (LIBERTY AD CHRONOS): A 1-year, randomised, double-blinded, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, 389(10086), 2287–2303. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31191-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31191-1)
- Blömeke, B., Brans, R., Coenraads, P.-J., Dickel, H., Bruckner, T., Hein, D. W., Heesen, M., Merk, H.-F., & Kawakubo, Y. (2009). Para-phenylenediamine and allergic sensitization: Risk modification by N-acetyltransferase 1 and 2 genotypes. *The British Journal of Dermatology*, 161(5), 1130–1135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09352.x>
- Blömeke, B., Brans, R., Dickel, H., Bruckner, T., Erdmann, S., Heesen, M., Merk, H. F., & Coenraads, P.-J. (2009).

- Association between TNFA-308 G/A polymorphism and sensitization to para-phenylenediamine: A case-control study. *Allergy*, 64(2), 279–283. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2008.01704.x>
- Boehm, D., Schmid-Ott, G., Finkeldey, F., John, S. M., Dwinger, C., Werfel, T., Diepgen, T. L., & Breuer, K. (2012). Anxiety, depression and impaired health-related quality of life in patients with occupational hand eczema. *Contact Dermatitis*, 67(4), 184–192. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2012.02062.x>
- Boer, M., Duchnik, E., Maleszka, R., & Marchlewicz, M. (2016). Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Postepy Dermatologii I Alergologii*, 33(1), 1–5. <https://doi.org/10.5114/pdia.2015.48037>
- Bolt, H. M., & Thier, R. (2006). Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Current Drug Metabolism*, 7(6), 613–628. <https://doi.org/10.2174/138920006778017786>
- Bonefeld, C. M., Geisler, C., Giménez-Arnau, E., Lepoittevin, J.-P., Uter, W., & Johansen, J. D. (2017). Immunological, chemical and clinical aspects of exposure to mixtures of contact allergens. *Contact Dermatitis*, 77(3), 133–142. <https://doi.org/10.1111/cod.12847>
- Boonchai, W., Charoenpipatsin, N., Winayanuwattikun, W., Phaitoonwattanakij, S., & Sukakul, T. (2020). Assessment of the quality of life (QoL) of patients with dermatitis and the impact of patch testing on QoL: A study of 519 patients diagnosed with dermatitis. *Contact Dermatitis*, 83(3), 182–188. <https://doi.org/10.1111/cod.13535>
- Boone, M. A. L. M., Jemec, G. B. E., & Del Marmol, V. (2015). Differentiating allergic and irritant contact dermatitis by high-definition optical coherence tomography: A pilot study. *Archives of Dermatological Research*, 307, 11–22. <https://doi.org/10.1007/s00403-014-1492-4>
- Boonstra, M., Rustemeyer, T., & Middelkamp-Hup, M. A. (2018). Both children and adult patients with difficult-to-treat atopic dermatitis have high prevalences of concomitant allergic contact dermatitis and are frequently polysensitized. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 32(9), 1554–1561. <https://doi.org/10.1111/jdv.14973>
- Bordignon, V., Palamara, F., Altomonte, G., Sperduti, I., Pietravalle, M., Cavallotti, C., Cordiali-Fei, P., Fuggetta, M. P., Cristaudo, A., & Ensoli, F. (2015). A laboratory test based on determination of cytokine profiles: A promising assay to identify exposition to contact allergens and predict the clinical outcome in occupational allergic contact dermatitis. *BMC Immunology*, 16, 4. <https://doi.org/10.1186/s12865-015-0066-3>
- Bos, J. D., & Meinardi, M. M. (2000). The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental Dermatology*, 9(3), 165–169. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x>
- Botto, N., Raffi, J., Trivedi, M., Ramirez, F., Allen, I. E., & Chren, M.-M. (2019). Validating a Quality-of-Life Instrument for Allergic Contact Dermatitis. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 30(5), 300–305. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000515>
- Bourke, J. F., Batta, K., Prais, L., Abdullah, A., & Foulds, I. S. (1999). The reproducibility of patch tests. *The British Journal of Dermatology*, 140(1), Article 1. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1999.02615.x>
- Brans, R., Jakasa, I., Goc, S., John, S. M., & Kezic, S. (2021). Stratum corneum levels of inflammatory mediators and natural moisturizing factor in patch test reactions to thiurams and fragrances and their possible role in discrimination between irritant and allergic reactions to hapten mixtures. *Contact Dermatitis*, 84(5), 299–307. <https://doi.org/10.1111/cod.13746>
- Bråred Christensson, J., Matura, M., Bäcktorp, C., Börje, A., Nilsson, J. L. G., & Karlberg, A.-T. (2006). Hydroperoxides form specific antigens in contact allergy. *Contact Dermatitis*, 55(4), 230–237. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2006.00913.x>
- Brasch, J., Henseler, T., Aberer, W., Bäuerle, G., Frosch, P. J., Fuchs, T., Fünfstück, V., Kaiser, G., Lischka, G. G., & Pilz, B. (1994a). Reproducibility of patch tests. A multicenter study of synchronous left-versus right-sided patch tests by the German Contact Dermatitis Research Group. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 31(4), 584–591.
- Brasch, J., Henseler, T., Aberer, W., Bäuerle, G., Frosch, P. J., Fuchs, T., Fünfstück, V., Kaiser, G., Lischka, G. G., & Pilz, B. (1994b). Reproducibility of patch tests. A multicenter study of synchronous left-versus right-sided patch tests by the German Contact Dermatitis Research Group. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 31(4), Article 4.
- Bregnbak, D., Johansen, J. D., Jellesen, M. S., Zachariae, C., Menné, T., & Thyssen, J. P. (2015). Chromium allergy and dermatitis: Prevalence and main findings. *Contact Dermatitis*, 73(5), 261–280. <https://doi.org/10.1111/cod.12436>
- Breiman, L. (2001). Random Forests. *Machine Learning*, 45(1), 5–32. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>
- Brown, S. J., & Cordell, H. J. (2008). Are filaggrin mutations associated with hand eczema or contact allergy?—We do not know. *The British Journal of Dermatology*, 158(6), 1383–1384. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08551.x>

- Brunner, P. M., Israel, A., Zhang, N., Leonard, A., Wen, H.-C., Huynh, T., Tran, G., Lyon, S., Rodriguez, G., Immaneni, S., Wagner, A., Zheng, X., Estrada, Y. D., Xu, H., Krueger, J. G., Paller, A. S., & Guttman-Yassky, E. (2018). Early-onset pediatric atopic dermatitis is characterized by TH2/TH17/TH22-centered inflammation and lipid alterations. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *141*(6), 2094–2106. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.02.040>
- Brunner, P. M., Pavel, A. B., Khattri, S., Leonard, A., Malik, K., Rose, S., Jim On, S., Vekaria, A. S., Traidl-Hoffmann, C., Singer, G. K., Baum, D., Gilleaudeau, P., Sullivan-Whalen, M., Fuentes-Duculan, J., Li, X., Zheng, X., Estrada, Y., Garcet, S., Wen, H.-C., ... Guttman-Yassky, E. (2019). Baseline IL-22 expression in patients with atopic dermatitis stratifies tissue responses to fezakinumab. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *143*(1), 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.07.028>
- Bruze, M., Frick, M., & Persson, L. (2003). Patch testing with thin-layer chromatograms. *Contact Dermatitis*, *48*(5), 278–279. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0536.2003.00009.x>
- Bruze, M., Isaksson, M., Gruvberger, B., & Frick-Engfeldt, M. (2007). Recommendation of appropriate amounts of petrolatum preparation to be applied at patch testing. *Contact Dermatitis*, *56*(5), 281–285. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01098.x>
- Cahill, J. L., Williams, J. D., Matheson, M. C., Palmer, A. M., Burgess, J. A., Dharmage, S. C., & Nixon, R. L. (2016). Occupational skin disease in Victoria, Australia. *The Australasian Journal of Dermatology*, *57*(2), 108–114. <https://doi.org/10.1111/ajd.12375>
- Calhoun, K. N., Luckett-Chastain, L. R., Frempah, B., & Gallucci, R. M. (2019). Associations Between Immune Phenotype and Inflammation in Murine Models of Irritant Contact Dermatitis. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *168*(1), 179–189. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy289>
- Calnan, C. D., & Wells, G. C. (1956). Suspender dermatitis and nickel sensitivity. *British Medical Journal*, *1*(4978), 1265–1268. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.4978.1265>
- Capon, F., Burden, A. D., Trembath, R. C., & Barker, J. N. (2012). Psoriasis and other complex trait dermatoses: From Loci to functional pathways. *The Journal of Investigative Dermatology*, *132*(3 Pt 2), 915–922. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.395>
- Cargill, M., Schrodli, S. J., Chang, M., Garcia, V. E., Brandon, R., Callis, K. P., Matsunami, N., Ardlie, K. G., Civello, D., Catanese, J. J., Leong, D. U., Panko, J. M., McAllister, L. B., Hansen, C. B., Papenfuss, J., Prescott, S. M., White, T. J., Leppert, M. F., Krueger, G. G., & Begovich, A. B. (2007). A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *American Journal of Human Genetics*, *80*(2), 273–290. <https://doi.org/10.1086/511051>
- Cashman, M. W., Reutemann, P. A., & Ehrlich, A. (2012). Contact dermatitis in the United States: Epidemiology, economic impact, and workplace prevention. *Dermatologic Clinics*, *30*(1), 87–98, viii. <https://doi.org/10.1016/j.det.2011.08.004>
- Cassano, N., Loconsole, F., Coviello, C., & Vena, G. A. (2006). Infliximab in recalcitrant severe atopic eczema associated with contact allergy. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, *19*(1), 237–240.
- Cavani, A., Nasorri, F., Ottaviani, C., Sebastiani, S., De Pità, O., & Girolomoni, G. (2003). Human CD25+ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *171*(11), 5760–5768. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.5760>
- Chalmin, F., Rochemont, V., Lippens, C., Clottu, A., Sailer, A. W., Merkler, D., Hugues, S., & Pot, C. (2015). Oxysterols regulate encephalitogenic CD4(+) T cell trafficking during central nervous system autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, *56*, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.10.001>
- Cheng, L., Lopez-Beltran, A., Massari, F., MacLennan, G. T., & Montironi, R. (2018). Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: A move toward precision medicine. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *31*(1), 24–38. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.104>
- Cheng, T.-Y., Tseng, Y.-H., Sun, C.-C., & Chu, C.-Y. (2008). Contact sensitization to metals in Taiwan. *Contact Dermatitis*, *59*(6), 353–360. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2008.01468.x>
- Cheung, C., Smith, C. K., Hoog, J. O., & Hotchkiss, S. A. (1999). Expression and localization of human alcohol and aldehyde dehydrogenase enzymes in skin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *261*(1), 100–107. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0943>
- Cho, Y., Kwon, D., & Kang, S.-J. (2017). The Cooperative Role of CD326+ and CD11b+ Dendritic Cell Subsets for a Hapten-Induced Th2 Differentiation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *199*(9), 3137–3146. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601262>
- Clausen, B. E., & Stoitzner, P. (2015). Functional Specialization of Skin Dendritic Cell Subsets in Regulating T Cell Responses. *Frontiers in Immunology*, *6*, 534. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00534>
- Clemmensen, A., Andersen, K. E., Clemmensen, O., Tan, Q., Petersen, T. K., Kruse, T. A., & Thomassen, M.

- (2010). Genome-wide expression analysis of human in vivo irritated epidermis: Differential profiles induced by sodium lauryl sulfate and nonanoic acid. *The Journal of Investigative Dermatology*, 130(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.102>
- Cockayne, S. E., & Gawkrödger, D. J. (2000). Angry back syndrome is often due to marginal irritants: A study of 17 cases seen over 4 years. *Contact Dermatitis*, 43(5), 280–282. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0536.2000.043005280.x>
- Coecke, S., Ahr, H., Blaauboer, B. J., Bremer, S., Casati, S., Castell, J., Combes, R., Corvi, R., Crespi, C. L., Cunningham, M. L., Elaut, G., Eletti, B., Freidig, A., Gennari, A., Gherzi-Egea, J.-F., Guillouzo, A., Hartung, T., Hoet, P., Ingelman-Sundberg, M., ... Worth, A. (2006). Metabolism: A bottleneck in in vitro toxicological test development. The report and recommendations of ECVAM workshop 54. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, 34(1), 49–84. <https://doi.org/10.1177/026119290603400113>
- Cohen, D. E., & Heidary, N. (2004). Treatment of irritant and allergic contact dermatitis. *Dermatologic Therapy*, 17(4), 334–340. <https://doi.org/10.1111/j.1396-0296.2004.04031.x>
- Colagiovanni, A., Di Renzo, L., Sarlo, F., Schiavino, D., & De Lorenzo, A. (2016). Role of TNF-alpha polymorphism in patients with nickel allergy: A marker of susceptibility to contact polysensitization. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20(12), 2663–2666.
- Cook, N. R., & Ridker, P. M. (2009). Advances in measuring the effect of individual predictors of cardiovascular risk: The role of reclassification measures. *Annals of Internal Medicine*, 150(11), 795–802. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-150-11-200906020-00007>
- Corazza, M., Amendolagine, G., Toni, G., Mantovani, L., & Borghi, A. (2019). Side-effects of tango: Connubial contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 80(4), 241–242. <https://doi.org/10.1111/cod.13179>
- Corbett, M., Ramessur, R., Marshall, D., Acencio, M. L., Ostaszewski, M., Barbosa, I. A., Dand, N., Di Meglio, P., Haddad, S., Jensen, A. H. M., Koopmann, W., Mahil, S. K., Rahmatulla, S., Rastrick, J., Saklatvala, J., Weidinger, S., Wright, K., Eyerich, K., Barker, J. N., ... BIOMAP consortium. (2022). Biomarkers of systemic treatment response in people with psoriasis: A scoping review. *The British Journal of Dermatology*, 187(4), 494–506. <https://doi.org/10.1111/bjd.21677>
- Correa da Rosa, J., Kim, J., Tian, S., Tomalin, L. E., Krueger, J. G., & Suárez-Fariñas, M. (2017). Shrinking the Psoriasis Assessment Gap: Early Gene-Expression Profiling Accurately Predicts Response to Long-Term Treatment. *The Journal of Investigative Dermatology*, 137(2), 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.09.015>
- Correa da Rosa, J., Malajian, D., Shemer, A., Rozenblit, M., Dhingra, N., Czarnowicki, T., Khattri, S., Ungar, B., Finney, R., Xu, H., Zheng, X., Estrada, Y. D., Peng, X., Suárez-Fariñas, M., Krueger, J. G., & Guttman-Yassky, E. (2015). Patients with atopic dermatitis have attenuated and distinct contact hypersensitivity responses to common allergens in skin. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(3), 712–720. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.017>
- Corsini, E., & Galli, C. L. (1998). Cytokines and irritant contact dermatitis. *Toxicology Letters*, 102–103, 277–282. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(98\)00323-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(98)00323-3)
- Cortial, A., Nosbaum, A., Rozières, A., Baeck, M., de Montjoye, L., Grande, S., Briançon, S., Nicolas, J.-F., & Vocanson, M. (2015). Encapsulation of hydrophobic allergens into nanoparticles improves the in vitro immunological diagnosis of allergic contact dermatitis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(4), Article 4. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.02.001>
- Coughtrie, M. W., Sharp, S., Maxwell, K., & Innes, N. P. (1998). Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. *Chemico-Biological Interactions*, 109(1–3), 3–27. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(97\)00117-8](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(97)00117-8)
- Cury Martins, J., Martins, C., Aoki, V., Gois, A. F. T., Ishii, H. A., & da Silva, E. M. K. (2015). Topical tacrolimus for atopic dermatitis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 7, CD009864. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009864.pub2>
- Czarnowicki, T., He, H., Krueger, J. G., & Guttman-Yassky, E. (2019). Atopic dermatitis endotypes and implications for targeted therapeutics. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.10.032>
- Czech, W., Krutmann, J., Schöpf, E., & Kapp, A. (1992). Serum eosinophil cationic protein (ECP) is a sensitive measure for disease activity in atopic dermatitis. *The British Journal of Dermatology*, 126(4), 351–355. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1992.tb00677.x>
- Davis, M. D. P., Bhate, K., Rohlinger, A. L., Farmer, S. A., Richardson, D. M., & Weaver, A. L. (2008). Delayed patch test reading after 5 days: The Mayo Clinic experience. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 59(2), 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2008.04.022>
- de Graaf, N. P. J., Bontkes, H. J., Roffel, S., Kleverlaan, C. J., Rustemeyer, T., Gibbs, S., & Feilzer, A. J. (2020). Non-heat inactivated autologous serum increases accuracy of in vitro CFSE lymphocyte proliferation test (LPT) for

- nickel. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 50(6), 722–732. <https://doi.org/10.1111/cea.13603>
- de Groot, A. C. (2015). New Contact Allergens: 2008 to 2015. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 26(5), 199–215. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000144>
- de Groot, A. C. (2018). *Patch Testing: Test Concentrations and Vehicles for 4900 Chemicals*. Elsevier Science Ltd. <https://escd.org/news/4th-edition-of-patch-testing-by-a-c-de-groot-has-been-published/>
- de Jongh, C. M., Khrenova, L., Verberk, M. M., Calkoen, F., van Dijk, F. J. H., Voss, H., John, S. M., & Kezic, S. (2008). Loss-of-function polymorphisms in the filaggrin gene are associated with an increased susceptibility to chronic irritant contact dermatitis: A case-control study. *The British Journal of Dermatology*, 159(3), 621–627. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08730.x>
- DeKoven, J. G., Silverberg, J. I., Warshaw, E. M., Atwater, A. R., Reeder, M. J., Sasseville, D., Taylor, J. S., Zug, K. A., Belsito, D. V., Maibach, H. I., Pratt, M. D., Cgt, M., DeLeo, V. A., & Fowler, J. F. (2021). North American Contact Dermatitis Group Patch Test Results: 2017-2018. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 32(2), 111–123. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000729>
- D'Erme, A. M., Wilsman-Theis, D., Wagenpfeil, J., Hölzel, M., Ferring-Schmitt, S., Sternberg, S., Wittmann, M., Peters, B., Bosio, A., Bieber, T., & Wenzel, J. (2015). IL-36γ (IL-1F9) is a biomarker for psoriasis skin lesions. *The Journal of Investigative Dermatology*, 135(4), 1025–1032. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.532>
- Dhingra, N., Shemer, A., Correa da Rosa, J., Rozenblit, M., Fuentes-Duculan, J., Gittler, J. K., Finney, R., Czarnowicki, T., Zheng, X., Xu, H., Estrada, Y. D., Cardinale, I., Suárez-Fariñas, M., Krueger, J. G., & Guttman-Yassky, E. (2014). Molecular profiling of contact dermatitis skin identifies allergen-dependent differences in immune response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.03.009>
- Diepgen, T. L., Andersen, K. E., Brandao, F. M., Bruze, M., Bruynzeel, D. P., Frosch, P., Gonçalo, M., Goossens, A., Le Coz, C. J., Rustemeyer, T., White, I. R., Agner, T., & European Environmental and Contact Dermatitis Research Group. (2009). Hand eczema classification: A cross-sectional, multicentre study of the aetiology and morphology of hand eczema. *The British Journal of Dermatology*, 160(2), 353–358. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08907.x>
- Diepgen, T. L., Ofenloch, R. F., Bruze, M., Bertuccio, P., Cazzaniga, S., Coenraads, P.-J., Elsner, P., Goncalo, M., Svensson, Å., & Naldi, L. (2016). Prevalence of contact allergy in the general population in different European regions. *The British Journal of Dermatology*, 174(2), Article 2. <https://doi.org/10.1111/bjd.14167>
- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Aït-Yahia, S., Brière, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., & Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(2), 373–386. <https://doi.org/10.1084/jem.188.2.373>
- Dittmar, D., & Schuttelaar, M. L. (2017). Immunology and genetics of tumour necrosis factor in allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 76(5), 257–271. <https://doi.org/10.1111/cod.12769>
- Dittmar, D., & Schuttelaar, M. L. A. (2019a). Contact sensitization to hydroperoxides of limonene and linalool: Results of consecutive patch testing and clinical relevance. *Contact Dermatitis*, 80(2), 101–109. <https://doi.org/10.1111/cod.13137>
- Dittmar, D., & Schuttelaar, M. L. A. (2019b). Contact sensitization to hydroperoxides of limonene and linalool: Results of consecutive patch testing and clinical relevance. *Contact Dermatitis*, 80(2), Article 2. <https://doi.org/10.1111/cod.13137>
- Divkovic, M., Pease, C. K., Gerberick, G. F., & Basketter, D. A. (2005). Hapten-protein binding: From theory to practical application in the in vitro prediction of skin sensitization. *Contact Dermatitis*, 53(4), 189–200. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2005.00683.x>
- Dou, X., Zhao, Y., Ni, C., Zhu, X., & Liu, L. (2011). Prevalence of contact allergy at a dermatology clinic in China from 1990-2009. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 22(6), 324–331. <https://doi.org/10.2310/6620.2011.11051>
- Dudeck, A., Dudeck, J., Scholten, J., Petzold, A., Surianarayanan, S., Köhler, A., Peschke, K., Vöhringer, D., Waskow, C., Krieg, T., Müller, W., Waisman, A., Hartmann, K., Gunzer, M., & Roers, A. (2011). Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. *Immunity*, 34(6), 973–984. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.028>
- Dudeck, J., Ghouse, S. M., Lehmann, C. H. K., Hoppe, A., Schubert, N., Nedospasov, S. A., Dudziak, D., & Dudeck, A. (2015). Mast-Cell-Derived TNF Amplifies CD8(+) Dendritic Cell Functionality and CD8(+) T Cell Priming. *Cell Reports*, 13(2), 399–411. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.078>
- Dupont, A., Chwastyniak, M., Beseme, O., Guihot, A.-L., Drobecq, H., Amouyel, P., & Pinet, F. (2008). Application of saturation dye 2D-DIGE proteomics to characterize proteins modulated by oxidized low density lipoprotein

- treatment of human macrophages. *Journal of Proteome Research*, 7(8), 3572–3582. <https://doi.org/10.1021/pr700683s>
- Dyjack, N., Goleva, E., Rios, C., Kim, B. E., Bin, L., Taylor, P., Bronchick, C., Hall, C. F., Richers, B. N., Seibold, M. A., & Leung, D. Y. M. (2018). Minimally invasive skin tape strip RNA sequencing identifies novel characteristics of the type 2-high atopic dermatitis disease endotype. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(4), 1298–1309. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.10.046>
- Eaton, L. H., Roberts, R. A., Kimber, I., Dearman, R. J., & Metryka, A. (2015). Skin sensitization induced Langerhans' cell mobilization: Variable requirements for tumour necrosis factor- α . *Immunology*, 144(1), 139–148. <https://doi.org/10.1111/imm.12359>
- Edelson, B. T., Kc, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L. A., Klekotka, P. A., Moon, C., Albring, J. C., Ise, W., Michael, D. G., Bhattacharya, D., Stappenbeck, T. S., Holtzman, M. J., Sung, S.-S. J., Murphy, T. L., Hildner, K., & Murphy, K. M. (2010). Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 α + conventional dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(4), 823–836. <https://doi.org/10.1084/jem.20091627>
- Eilstein, J., Giménez-Arnau, E., Duché, D., Rousset, F., & Lepoittevin, J.-P. (2006). Synthesis and reactivity toward nucleophilic amino acids of 2,5-[13C]-dimethyl-p-benzoquinonediimine. *Chemical Research in Toxicology*, 19(9), 1248–1256. <https://doi.org/10.1021/tx0601408>
- Eilstein, J., Giménez-Arnau, E., Duché, D., Rousset, F., & Lepoittevin, J.-P. (2007). Mechanistic studies on the lysine-induced N-formylation of 2,5-dimethyl-p-benzoquinonediimine. *Chemical Research in Toxicology*, 20(8), 1155–1161. <https://doi.org/10.1021/tx700040s>
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., & Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 14863–14868. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14863>
- El Ali, Z., Gerbeix, C., Hemon, P., Esser, P. R., Martin, S. F., Pallardy, M., & Kerdine-Römer, S. (2013). Allergic skin inflammation induced by chemical sensitizers is controlled by the transcription factor Nrf2. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 134(1), 39–48. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft084>
- Emgård, J., Kammoun, H., García-Cassani, B., Chesné, J., Parigi, S. M., Jacob, J.-M., Cheng, H.-W., Evren, E., Das, S., Czarnewski, P., Sleiers, N., Melo-Gonzalez, F., Kvedaraitė, E., Svensson, M., Scandella, E., Hepworth, M. R., Huber, S., Ludewig, B., Peduto, L., ... Willinger, T. (2018). Oxysterol Sensing through the Receptor GPR183 Promotes the Lymphoid-Tissue-Inducing Function of Innate Lymphoid Cells and Colonic Inflammation. *Immunity*, 48(1), 120-132.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.020>
- Engebretsen, K. A., & Thyssen, J. P. (2016). Skin Barrier Function and Allergens. *Current Problems in Dermatology*, 49, 90–102. <https://doi.org/10.1159/000441548>
- Erfani, B., Midander, K., Lidén, C., & Julander, A. (2017). Development, validation and testing of a skin sampling method for assessment of metal exposure. *Contact Dermatitis*, 77(1), 17–24. <https://doi.org/10.1111/cod.12781>
- Erfurt-Berge, C., & Mahler, V. (2017). Contact Sensitization in Patients With Lower Leg Dermatitis, Chronic Venous Insufficiency, and/or Chronic Leg Ulcer: Assessment of the Clinical Relevance of Contact Allergens. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 27(6), 378–380. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0188>
- Eskes, C., Detappe, V., Koëter, H., Kreysa, J., Liebsch, M., Zuang, V., Amcoff, P., Barroso, J., Cotovio, J., Guest, R., Hermann, M., Hoffmann, S., Masson, P., Alépée, N., Arce, L. A., Brüscheweiler, B., Catone, T., Cihak, R., Clouzeau, J., ... Depallens, O. (2012). Regulatory assessment of in vitro skin corrosion and irritation data within the European framework: Workshop recommendations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 62(2), 393–403. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.10.015>
- Esser, P. R., & Martin, S. F. (2017). Pathomechanisms of Contact Sensitization. *Current Allergy and Asthma Reports*, 17(12), Article 12. <https://doi.org/10.1007/s11882-017-0752-8>
- Esser, P. R., Wölfle, U., Dürr, C., von Loewenich, F. D., Schempp, C. M., Freudenberg, M. A., Jakob, T., & Martin, S. F. (2012). Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation. *PloS One*, 7(7), e41340. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041340>
- Farber, E. M., Nall, M. L., & Watson, W. (1974). Natural history of psoriasis in 61 twin pairs. *Archives of Dermatology*, 109(2), 207–211.
- Fartasch, M. (1997). Ultrastructure of the epidermal barrier after irritation. *Microscopy Research and Technique*, 37(3), 193–199. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19970501\)37:3<193::AID-JEMT4>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19970501)37:3<193::AID-JEMT4>3.0.CO;2-P)
- Feil, R., & Fraga, M. F. (2012). Epigenetics and the environment: Emerging patterns and implications. *Nature Reviews. Genetics*, 13(2), 97–109. <https://doi.org/10.1038/nrg3142>
- Finlay, A. Y., & Khan, G. K. (1994). Dermatology Life Quality Index (DLQI)—A simple practical measure for routine clinical use. *Clinical and Experimental Dermatology*, 19(3), 210–216. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.1994.tb01167.x>

- Fischer, L. A., Johansen, J. D., & Menné, T. (2007). Nickel allergy: Relationship between patch test and repeated open application test thresholds. *The British Journal of Dermatology*, 157(4), Article 4. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.08095.x>
- Fischer, L. A., Voelund, A., Andersen, K. E., Menné, T., & Johansen, J. D. (2009). The dose-response relationship between the patch test and ROAT and the potential use for regulatory purposes. *Contact Dermatitis*, 61(4), Article 4. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2009.01607.x>
- Fisher, R. A., & Russell, E. J. (1922). On the mathematical foundations of theoretical statistics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character*, 222(594–604), 309–368. <https://doi.org/10.1098/rsta.1922.0009>
- Fisker, M. H., Ebbelhøj, N. E., Jungersted, J. M., & Agner, T. (2013). What do patients with occupational hand eczema know about skin care? *Contact Dermatitis*, 69(2), 93–98. <https://doi.org/10.1111/cod.12060>
- Flier, J., Boorsma, D. M., Bruynzeel, D. P., Van Beek, P. J., Stoof, T. J., Scheper, R. J., Willemze, R., & Tensen, C. P. (1999). The CXCR3 activating chemokines IP-10, Mig, and IP-9 are expressed in allergic but not in irritant patch test reactions. *The Journal of Investigative Dermatology*, 113(4), Article 4. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00730.x>
- Flier, J., Boorsma, D. M., van Beek, P. J., Nieboer, C., Stoof, T. J., Willemze, R., & Tensen, C. P. (2001). Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of skin inflammation. *The Journal of Pathology*, 194(4), Article 4. [https://doi.org/10.1002/1096-9896\(200108\)194:4<397::aid-path899>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/1096-9896(200108)194:4<397::aid-path899>3.0.co;2-s)
- Fortino, V., Wisgrill, L., Werner, P., Suomela, S., Linder, N., Jalonen, E., Suomalainen, A., Marwah, V., Kero, M., Pesonen, M., Lundin, J., Lauerma, A., Aalto-Korte, K., Greco, D., Alenius, H., & Fyhrquist, N. (2020). Machine-learning-driven biomarker discovery for the discrimination between allergic and irritant contact dermatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(52), 33474–33485. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009192117>
- Friis, U. F., Menné, T., Flyvholm, M.-A., Bonde, J. P. E., & Johansen, J. D. (2013). Occupational allergic contact dermatitis diagnosed by a systematic stepwise exposure assessment of allergens in the work environment. *Contact Dermatitis*, 69(3), 153–163. <https://doi.org/10.1111/cod.12102>
- Friis, U. F., Menné, T., Flyvholm, M.-A., Bonde, J. P. E., & Johansen, J. D. (2015). Difficulties in using Material Safety Data Sheets to analyse occupational exposures to contact allergens. *Contact Dermatitis*, 72(3), 147–153. <https://doi.org/10.1111/cod.12314>
- Frings, V. G., Böer-Auer, A., & Breuer, K. (2018). Histomorphology and Immunophenotype of Eczematous Skin Lesions Revisited-Skin Biopsies Are Not Reliable in Differentiating Allergic Contact Dermatitis, Irritant Contact Dermatitis, and Atopic Dermatitis. *The American Journal of Dermatopathology*, 40(1), Article 1. <https://doi.org/10.1097/DAD.0000000000000842>
- Fujisawa, T., Nagao, M., Hiraguchi, Y., Katsumata, H., Nishimori, H., Iguchi, K., Kato, Y., Higashiura, M., Ogawauchi, I., & Tamaki, K. (2009). Serum measurement of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 in children with atopic dermatitis: Elevated normal levels in infancy and age-specific analysis in atopic dermatitis. *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 20(7), 633–641. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2009.00851.x>
- Fulzele, S. V., Babu, R. J., Ahaghotu, E., & Singh, M. (2007). Estimation of proinflammatory biomarkers of skin irritation by dermal microdialysis following exposure with irritant chemicals. *Toxicology*, 237(1–3), Article 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.05.005>
- Galbiati, V., Papale, A., Galli, C. L., Marinovich, M., & Corsini, E. (2014). Role of ROS and HMGB1 in contact allergen-induced IL-18 production in human keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 134(11), 2719–2727. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.203>
- Gamerding, K., Moulon, C., Karp, D. R., Van Bergen, J., Koning, F., Wild, D., Pflugfelder, U., & Weltzien, H. U. (2003). A new type of metal recognition by human T cells: Contact residues for peptide-independent bridging of T cell receptor and major histocompatibility complex by nickel. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(10), 1345–1353. <https://doi.org/10.1084/jem.20030121>
- Gamradt, P., Laoubi, L., Nosbaum, A., Mutez, V., Lenief, V., Grande, S., Redoulès, D., Schmitt, A.-M., Nicolas, J.-F., & Vocanson, M. (2019). Inhibitory checkpoint receptors control CD8+ resident memory T cells to prevent skin allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.11.048>
- Garzorz-Stark, N., Krause, L., Lauffer, F., Atenhan, A., Thomas, J., Stark, S. P., Franz, R., Weidinger, S., Balato, A., Mueller, N. S., Theis, F. J., Ring, J., Schmidt-Weber, C. B., Biedermann, T., Eyerich, S., & Eyerich, K. (2016). A novel molecular disease classifier for psoriasis and eczema. *Experimental Dermatology*, 25(10), Article 10. <https://doi.org/10.1111/exd.13077>
- Gatto, D., Wood, K., Caminschi, I., Murphy-Durland, D., Schofield, P., Christ, D., Karupiah, G., & Brink, R. (2013). The chemotactic receptor EBI2 regulates the homeostasis, localization and immunological function of splenic

dendritic cells. *Nature Immunology*, 14(5), 446–453. <https://doi.org/10.1038/ni.2555>

Gendrisch, F., Völkel, L., Fluck, M., Apostolova, P., Zeiser, R., Jakob, T., Martin, S. F., & Esser, P. R. (2022). IRE1 and PERK signaling regulates inflammatory responses in a murine model of contact hypersensitivity. *Allergy*, 77(3), 966–978. <https://doi.org/10.1111/all.15024>

Gibbs, S. (2009). In vitro irritation models and immune reactions. *Skin Pharmacology and Physiology*, 22(2), 103–113. <https://doi.org/10.1159/000178869>

Giralt, M., Cervello, I., Nogues, M. R., Puerto, A. M., Ortin, F., Argany, N., & Mallol, J. (1996). Glutathione, glutathione S-transferase and reactive oxygen species of human scalp sebaceous glands in male pattern baldness. *The Journal of Investigative Dermatology*, 107(2), 154–158. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12329551>

Gittler, J. K., Shemer, A., Suárez-Fariñas, M., Fuentes-Duculan, J., Gulewicz, K. J., Wang, C. Q. F., Mitsui, H., Cardinale, I., Strong, C. de G., Krueger, J. G., & Guttman-Yassky, E. (2012). Progressive activation of TH2/TH22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(6), 1344–1354. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.012>

Glickman, J. W., Han, J., Garcet, S., Krueger, J. G., Pavel, A. B., & Guttman-Yassky, E. (2020). Improving evaluation of drugs in atopic dermatitis by combining clinical and molecular measures. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice*. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.07.015>

Goh, C. L. (1986). Prevalence of contact allergy by sex, race and age. *Contact Dermatitis*, 14(4), 237–240. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1986.tb01232.x>

Goldenberg, A., Mousdicas, N., Silverberg, N., Powell, D., Pelletier, J. L., Silverberg, J. I., Zippin, J., Fonacier, L., Tosti, A., Lawley, L., Wu Chang, M., Scheman, A., Kleiner, G., Williams, J., Watsky, K., Dunnick, C. A., Frederickson, R., Matiz, C., Chaney, K., ... Jacob, S. E. (2016). Pediatric Contact Dermatitis Registry Inaugural Case Data. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 27(5), 293–302. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000214>

Goldminz, A. M., & Scheinman, P. L. (2018). Comparison of Nickel Sulfate 2.5% and Nickel Sulfate 5% for Detecting Nickel Contact Allergy. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 29(6), 321–323. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000419>

Goldminz, A. M., Wald, M. S., & Scheinman, P. L. (2018). Positive Occluded Patch Test in the Face of Negative Repeat Open Application Test. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 29(3), 162–163. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000372>

Gomez de Agüero, M., Vocanson, M., Hacini-Rachinel, F., Taillardet, M., Sparwasser, T., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaiserlian, D., & Dubois, B. (2012). Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8(+) T cells and activating Foxp3(+) regulatory T cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(5), 1700–1711. <https://doi.org/10.1172/JCI59725>

González, S., González, E., White, W. M., Rajadhyaksha, M., & Anderson, R. R. (1999). Allergic contact dermatitis: Correlation of in vivo confocal imaging to routine histology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 40(5 Pt 1), Article 5 Pt 1.

Goon, A. T. J., & Goh, C. L. (2005). Metal allergy in Singapore. *Contact Dermatitis*, 52(3), 130–132. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2005.00518.x>

Goossens, A. (2009). [Alternatives to patch tests]. *Annales De Dermatologie Et De Venereologie*, 136(8–9), 623–625. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2009.06.007>

Goujon, C., Viguier, M., Staumont-Sallé, D., Bernier, C., Guillet, G., Lahfa, M., Ferrier Le Bouedec, M.-C., Cambazard, F., Bottiglioli, D., Grande, S., Dahel, K., Bérard, F., Rabilloud, M., Mercier, C., & Nicolas, J.-F. (2018). Methotrexate Versus Cyclosporine in Adults with Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis: A Phase III Randomized Noninferiority Trial. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice*, 6(2), 562-569.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2017.07.007>

Granlund, H., Erkkö, P., Eriksson, E., & Reitamo, S. (1996). Comparison of cyclosporine and topical betamethasone-17,21-dipropionate in the treatment of severe chronic hand eczema. *Acta Dermato-Venereologica*, 76(5), 371–376. <https://doi.org/10.2340/0001555576371376>

Granlund, H., Erkkö, P., & Reitamo, S. (1998). Long-term follow-up of eczema patients treated with cyclosporine. *Acta Dermato-Venereologica*, 78(1), 40–43. <https://doi.org/10.1080/00015559850135814>

Gulliver, W. P., Macdonald, D., Gladney, N., Alaghebandan, R., Rahman, P., & Adam Baker, K. (2011). Long-term prognosis and comorbidities associated with psoriasis in the Newfoundland and Labrador founder population. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 15(1), 37–47. <https://doi.org/10.2310/7750.2010.10013>

Guttman-Yassky, E., Bissonnette, R., Ungar, B., Suárez-Fariñas, M., Ardeleanu, M., Esaki, H., Suprun, M., Estrada, Y., Xu, H., Peng, X., Silverberg, J. I., Menter, A., Krueger, J. G., Zhang, R., Chaudhry, U., Swanson, B., Graham, N. M. H., Pirozzi, G., Yancopoulos, G. D., & D Hamilton, J. D. (2019). Dupilumab progressively improves systemic and cutaneous abnormalities in patients with atopic dermatitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*,

143(1), 155–172. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.08.022>

Guttman-Yassky, E., Diaz, A., Pavel, A. B., Fernandes, M., Lefferdink, R., Erickson, T., Canter, T., Rangel, S., Peng, X., Li, R., Estrada, Y., Xu, H., Krueger, J. G., & Paller, A. S. (2019). Use of Tape Strips to Detect Immune and Barrier Abnormalities in the Skin of Children With Early-Onset Atopic Dermatitis. *JAMA Dermatology*. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2019.2983>

Guyon, I., & Elisseeff, A. (2003). An Introduction of Variable and Feature Selection. *J. Machine Learning Research Special Issue on Variable and Feature Selection*, 3, 1157–1182. <https://doi.org/10.1162/153244303322753616>

Halbert, A. R., Gebauer, K. A., & Wall, L. M. (1992). Prognosis of occupational chromate dermatitis. *Contact Dermatitis*, 27(4), 214–219. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1992.tb03248.x>

Hald, M., Agner, T., Blands, J., Johansen, J. D., & Danish Contact Dermatitis Group. (2009). Delay in medical attention to hand eczema: A follow-up study. *The British Journal of Dermatology*, 161(6), 1294–1300. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09402.x>

Ham, J. E., Siegel, P. D., & Maibach, H. (2019). Undeclared formaldehyde levels in patient consumer products: Formaldehyde test kit utility. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 38(2), 112–117. <https://doi.org/10.1080/15569527.2018.1471485>

Hannedouche, S., Zhang, J., Yi, T., Shen, W., Nguyen, D., Pereira, J. P., Guerini, D., Baumgarten, B. U., Roggo, S., Wen, B., Knochenmuss, R., Noël, S., Gessier, F., Kelly, L. M., Vanek, M., Laurent, S., Preuss, I., Miault, C., Christen, I., ... Sailer, A. W. (2011). Oxysterols direct immune cell migration via EB12. *Nature*, 475(7357), 524–527. <https://doi.org/10.1038/nature10280>

Hartigan, J. A., & Wong, M. A. (1979). A K-Means Clustering Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*, 28(1), 100–108. <https://doi.org/10.2307/2346830>

He, H., Bissonnette, R., Wu, J., Diaz, A., Saint-Cyr Proulx, E., Maari, C., Jack, C., Louis, M., Estrada, Y., Krueger, J. G., Zhang, N., Pavel, A. B., & Guttman-Yassky, E. (2021). Tape strips detect distinct immune and barrier profiles in atopic dermatitis and psoriasis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 147(1), 199–212. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.05.048>

He, H., & Guttman-Yassky, E. (2019). JAK Inhibitors for Atopic Dermatitis: An Update. *American Journal of Clinical Dermatology*, 20(2), 181–192. <https://doi.org/10.1007/s40257-018-0413-2>

Helou, D. G., Martin, S. F., Pallardy, M., Chollet-Martin, S., & Kerdine-Römer, S. (2019). Nrf2 Involvement in Chemical-Induced Skin Innate Immunity. *Frontiers in Immunology*, 10, 1004. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01004>

Herman, A., Aerts, O., Baeck, M., Bruze, M., De Block, C., Goossens, A., Hamnerius, N., Huygens, S., Maiter, D., Tennstedt, D., Vandeleene, B., & Mowitz, M. (2017). Allergic contact dermatitis caused by isobornyl acrylate in Freestyle® Libre, a newly introduced glucose sensor. *Contact Dermatitis*, 77(6), 367–373. <https://doi.org/10.1111/cod.12866>

Hijnen, D., De Bruin-Weller, M., Oosting, B., Lebre, C., De Jong, E., Bruijnzeel-Koomen, C., & Knol, E. (2004). Serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and cutaneous T cell- attracting chemokine (CTACK) levels in allergic diseases: TARC and CTACK are disease-specific markers for atopic dermatitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(2), 334–340. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.12.007>

Hochberg, Y., & Benjamini, Y. (1990). More powerful procedures for multiple significance testing. *Statistics in Medicine*, 9(7), 811–818. <https://doi.org/10.1002/sim.4780090710>

Hollenberg, P. F. (1992). Mechanisms of cytochrome P450 and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6(2), 686–694. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.2.1537457>

Holness, D. L., Beaton, D., Harniman, E., DeKoven, J., Skotnicki, S., Nixon, R., & Switzer-McIntyre, S. (2013). Hand and upper extremity function in workers with hand dermatitis. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 24(3), 131–136. <https://doi.org/10.1097/DER.0b013e3182910416>

Honda, T., Egawa, G., Grabbe, S., & Kabashima, K. (2013). Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: Toward the understanding of allergic contact dermatitis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.284>

Honda, T., Nakajima, S., Egawa, G., Ogasawara, K., Malissen, B., Miyachi, Y., & Kabashima, K. (2010). Compensatory role of Langerhans cells and langerin-positive dermal dendritic cells in the sensitization phase of murine contact hypersensitivity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(5), 1154–1156.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.005>

Hou, T., Tsang, M. S.-M., Chu, I. M.-T., Kan, L. L.-Y., Hon, K.-L., Leung, T.-F., Lam, C. W.-K., & Wong, C.-K. (2021). Skewed inflammation is associated with aberrant interleukin-37 signaling pathway in atopic dermatitis. *Allergy*, 76(7), 2102–2114. <https://doi.org/10.1111/all.14769>

- Hüffmeier, U., Uebe, S., Ekici, A. B., Bowes, J., Giardina, E., Korendowych, E., Juneblad, K., Apel, M., McManus, R., Ho, P., Bruce, I. N., Ryan, A. W., Behrens, F., Lascorz, J., Böhm, B., Traupe, H., Lohmann, J., Gieger, C., Wichmann, H.-E., ... Reis, A. (2010). Common variants at TRAF3IP2 are associated with susceptibility to psoriatic arthritis and psoriasis. *Nature Genetics*, *42*(11), 996–999. <https://doi.org/10.1038/ng.688>
- Hughes, A. J., Tawfik, S. S., Baruah, K. P., O'Toole, E. A., & O'Shaughnessy, R. F. L. (2021). Tape strips in dermatology research. *The British Journal of Dermatology*, *185*(1), 26–35. <https://doi.org/10.1111/bjd.19760>
- Indini, A., Rijavec, E., & Grossi, F. (2021). Trastuzumab Deruxtecan: Changing the Destiny of HER2 Expressing Solid Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 4774. <https://doi.org/10.3390/ijms22094774>
- Inkeles, M. S., Scumpia, P. O., Swindell, W. R., Lopez, D., Teles, R. M. B., Graeber, T. G., Meller, S., Homey, B., Elder, J. T., Gilliet, M., Modlin, R. L., & Pellegrini, M. (2015). Comparison of molecular signatures from multiple skin diseases identifies mechanisms of immunopathogenesis. *The Journal of Investigative Dermatology*, *135*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.352>
- Jacob, S. E., & Castanedo-Tardan, M. P. (2007). Pharmacotherapy for allergic contact dermatitis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *8*(16), 2757–2774. <https://doi.org/10.1517/14656566.8.16.2757>
- Jahnz-Rozyk, K., Targowski, T., Paluchowska, E., Owczarek, W., & Kucharczyk, A. (2005). Serum thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine and eotaxin as markers of severity of atopic dermatitis. *Allergy*, *60*(5), 685–688. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00774.x>
- Janmohamed, A., Dolphin, C. T., Phillips, I. R., & Shephard, E. A. (2001). Quantification and cellular localization of expression in human skin of genes encoding flavin-containing monooxygenases and cytochromes P450. *Biochemical Pharmacology*, *62*(6), 777–786. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(01\)00718-3](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(01)00718-3)
- Jeanmougin, M., de Reynies, A., Marisa, L., Paccard, C., Nuel, G., & Guedj, M. (2010). Should we abandon the t-test in the analysis of gene expression microarray data: A comparison of variance modeling strategies. *PloS One*, *5*(9), e12336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012336>
- Johansen, J. D., Aalto-Korte, K., Agner, T., Andersen, K. E., Bircher, A., Bruze, M., Cannavó, A., Giménez-Arnau, A., Gonçalves, M., Goossens, A., John, S. M., Lidén, C., Lindberg, M., Mahler, V., Matura, M., Rustemeyer, T., Serup, J., Spiewak, R., Thyssen, J. P., ... Uter, W. (2015). European Society of Contact Dermatitis guideline for diagnostic patch testing—Recommendations on best practice. *Contact Dermatitis*, *73*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1111/cod.12432>
- Johansen, J. D., Bruze, M., Andersen, K. E., Frosch, P. J., Dreier, B., White, I. R., Rastogi, S., Lepoittevin, J. P., & Menné, T. (1998). The repeated open application test: Suggestions for a scale of evaluation. *Contact Dermatitis*, *39*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1998.tb05850.x>
- Joshi, A. A., Lerman, J. B., Abera, T. M., Afshar, M., Teague, H. L., Rodante, J. A., Krishnamoorthy, P., Ng, Q., Aridi, T. Z., Salahuddin, T., Natarajan, B., Lockshin, B. N., Ahlman, M. A., Chen, M. Y., Rader, D. J., Reilly, M. P., Remaley, A. T., Bluemke, D. A., Playford, M. P., ... Mehta, N. N. (2016). GlycA Is a Novel Biomarker of Inflammation and Subclinical Cardiovascular Disease in Psoriasis. *Circulation Research*, *119*(11), 1242–1253. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309637>
- K, K., M, A., T, M., H, C., M, T., S, M., H, F., Y, Y., T, K., & Z, I. (2012). Association of serum interleukin-18 and other biomarkers with disease severity in adults with atopic dermatitis. *Archives of Dermatological Research*, *304*(4). <https://doi.org/10.1007/s00403-011-1198-9>
- Kadyk, D. L., McCarter, K., Achen, F., & Belsito, D. V. (2003). Quality of life in patients with allergic contact dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *49*(6), 1037–1048. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(03\)02112-1](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(03)02112-1)
- Kägi, M. K., Joller-Jemelka, H., & Wüthrich, B. (1992). Correlation of eosinophils, eosinophil cationic protein and soluble interleukin-2 receptor with the clinical activity of atopic dermatitis. *Dermatology (Basel, Switzerland)*, *185*(2), 88–92. <https://doi.org/10.1159/000247419>
- Kakinuma, T., Nakamura, K., Wakugawa, M., Mitsui, H., Tada, Y., Saeki, H., Torii, H., Asahina, A., Onai, N., Matsushima, K., & Tamaki, K. (2001). Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: Serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *107*(3), 535–541. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.113237>
- Kamsteeg, M., Jansen, P. a. M., van Vlijmen-Willems, I. M. J. J., van Erp, P. E. J., Rodijk-Olthuis, D., van der Valk, P. G., Feuth, T., Zeeuwen, P. L. J. M., & Schalkwijk, J. (2010). Molecular diagnostics of psoriasis, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis and irritant contact dermatitis. *The British Journal of Dermatology*, *162*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09547.x>
- Kanda, N., Hoashi, T., & Saeki, H. (2019). The Roles of Sex Hormones in the Course of Atopic Dermatitis. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(19), E4660. <https://doi.org/10.3390/ijms20194660>
- Kaplan, D. H., Igyártó, B. Z., & Gaspari, A. A. (2012). Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nature Reviews. Immunology*, *12*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nri3150>

- Karimkhani, C., Dellavalle, R. P., Coffeng, L. E., Flohr, C., Hay, R. J., Langan, S. M., Nsoesie, E. O., Ferrari, A. J., Erskine, H. E., Silverberg, J. I., Vos, T., & Naghavi, M. (2017). Global Skin Disease Morbidity and Mortality: An Update From the Global Burden of Disease Study 2013. *JAMA Dermatology*, *153*(5), 406–412. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2016.5538>
- Karlberg, A.-T., Bergström, M. A., Börje, A., Luthman, K., & Nilsson, J. L. G. (2008). Allergic contact dermatitis—Formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers. *Chemical Research in Toxicology*, *21*(1), 53–69. <https://doi.org/10.1021/tx7002239>
- Karlberg, A.-T., Börje, A., Duus Johansen, J., Lidén, C., Rastogi, S., Roberts, D., Uter, W., & White, I. R. (2013). Activation of non-sensitizing or low-sensitizing fragrance substances into potent sensitizers—Prehaptens and prohaptens. *Contact Dermatitis*, *69*(6), 323–334. <https://doi.org/10.1111/cod.12127>
- Kataoka, Y. (2014). Thymus and activation-regulated chemokine as a clinical biomarker in atopic dermatitis. *The Journal of Dermatology*, *41*(3), 221–229. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12440>
- Kaur, S., Zilmer, K., Leping, V., & Zilmer, M. (2012). Comparative Study of Systemic Inflammatory Responses in Psoriasis Vulgaris and Mild to Moderate Allergic Contact Dermatitis. *Dermatology*, *225*(1), 54–61. <https://doi.org/10.1159/000339866>
- Kawakubo, Y., Merk, H. F., Masaoudi, T. A., Sieben, S., & Blömeke, B. (2000). N-Acetylation of paraphenylenediamine in human skin and keratinocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *292*(1), 150–155.
- Keegel, T., Cahill, J., Noonan, A., Dharmage, S., Saunders, H., Frowen, K., & Nixon, R. (2005). Incidence and prevalence rates for occupational contact dermatitis in an Australian suburban area. *Contact Dermatitis*, *52*(5), 254–259. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2005.00571.x>
- Kemény, L., Varga, E., & Novak, Z. (2019). Advances in phototherapy for psoriasis and atopic dermatitis. *Expert Review of Clinical Immunology*, *15*(11), 1205–1214. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2020.1672537>
- Kendall, A. C., Pilkington, S. M., Sassano, G., Rhodes, L. E., & Nicolaou, A. (2016). N-Acyl ethanolamide and eicosanoid involvement in irritant dermatitis. *The British Journal of Dermatology*, *175*(1), 163–171. <https://doi.org/10.1111/bjd.14521>
- Keragala, B. S. D. P., Herath, H. M. M. T. B., Keragala, T. S., Malavi, M. a. M. H., Rodrigo, C., & Gunasekera, C. N. (2019). A seven-year retrospective analysis of patch test data in a cohort of patients with contact dermatitis in Sri Lanka. *BMC Dermatology*, *19*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12895-019-0090-8>
- Khashaba, S. A., Attwa, E., Said, N., Ahmed, S., & Khattab, F. (2021). Serum YKL-40 and IL 17 in Psoriasis: Reliability as prognostic markers for disease severity and responsiveness to treatment. *Dermatologic Therapy*, *34*(1), e14606. <https://doi.org/10.1111/dth.14606>
- Khattari, S., Brunner, P. M., Garcet, S., Finney, R., Cohen, S. R., Oliva, M., Dutt, R., Fuentes-Duculan, J., Zheng, X., Li, X., Bonifacio, K. M., Kunjraiva, N., Coats, I., Cueto, I., Gilleaudeau, P., Sullivan-Whalen, M., Suárez-Fariñas, M., Krueger, J. G., & Guttman-Yassky, E. (2017). Efficacy and safety of ustekinumab treatment in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis. *Experimental Dermatology*, *26*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1111/exd.13112>
- Kim, J., Kim, B. E., Lee, J., Han, Y., Jun, H.-Y., Kim, H., Choi, J., Leung, D. Y. M., & Ahn, K. (2016). Epidermal thymic stromal lymphopoietin predicts the development of atopic dermatitis during infancy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *137*(4), 1282–1285.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.12.1306>
- Kim, S. H., Kim, J. H., Lee, S. J., Jung, M. S., Jeong, D. H., & Lee, K. H. (2022). Minimally invasive skin sampling and transcriptome analysis using microneedles for skin type biomarker research. *Skin Research and Technology: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, *28*(2), 322–335. <https://doi.org/10.1111/srt.13135>
- Kimyon, R. S., & Warshaw, E. M. (2019). Airborne Allergic Contact Dermatitis: Management and Responsible Allergens on the American Contact Dermatitis Society Core Series. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, *30*(2), 106–115. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000439>
- Kirchlechner, S., Hübner, A., & Uter, W. (2016). Survey of sensitizing components of oxidative hair dyes (retail and professional products) in Germany. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, *14*(7), 707–715. <https://doi.org/10.1111/ddg.13099>
- Kirstein, O. D., Abbasi, I., Horwitz, B. Z., Skrip, L., Hailu, A., Jaffe, C., Li, L. L., Prow, T. W., & Warburg, A. (2017). Minimally invasive microbiopsies: A novel sampling method for identifying asymptomatic, potentially infectious carriers of *Leishmania donovani*. *International Journal for Parasitology*, *47*(10–11), 609–616. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.02.005>
- Klein, R. J., Zeiss, C., Chew, E. Y., Tsai, J.-Y., Sackler, R. S., Haynes, C., Henning, A. K., SanGiovanni, J. P., Mane, S. M., Mayne, S. T., Bracken, M. B., Ferris, F. L., Ott, J., Barnstable, C., & Hoh, J. (2005). Complement factor

- H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5720), 385–389. <https://doi.org/10.1126/science.1109557>
- Klein-Hessling, S., Muhammad, K., Klein, M., Pusch, T., Rudolf, R., Flöter, J., Qureischi, M., Beilhack, A., Vaeth, M., Kummerow, C., Backes, C., Schoppmeyer, R., Hahn, U., Hoth, M., Bopp, T., Berberich-Siebelt, F., Patra, A., Avots, A., Müller, N., ... Serfling, E. (2017). NFATc1 controls the cytotoxicity of CD8+ T cells. *Nature Communications*, 8(1), 511. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00612-6>
- Klekotka, P. A., Yang, L., & Yokoyama, W. M. (2010). Contrasting roles of the IL-1 and IL-18 receptors in MyD88-dependent contact hypersensitivity. *The Journal of Investigative Dermatology*, 130(1), 184–191. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.242>
- Kohavi, R., & John, G. H. (1997). Wrappers for feature subset selection. *Artificial Intelligence*, 97(1), 273–324. [https://doi.org/10.1016/S0004-3702\(97\)00043-X](https://doi.org/10.1016/S0004-3702(97)00043-X)
- Kohavi, R., & Provost, F. (1998). Glossary of terms. Special issue of applications of machine learning and the knowledge discovery process. *Mach. Learn.*, 30.
- Kolbinger, F., Loesche, C., Valentin, M.-A., Jiang, X., Cheng, Y., Jarvis, P., Peters, T., Calonder, C., Bruin, G., Polus, F., Aigner, B., Lee, D. M., Bodenlenz, M., Sinner, F., Pieber, T. R., & Patel, D. D. (2017). β -Defensin 2 is a responsive biomarker of IL-17A-driven skin pathology in patients with psoriasis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(3), 923–932.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.038>
- Koppes, S. A., Ljubojevic Hadzavdic, S., Jakasa, I., Franceschi, N., Jurakić Tončić, R., Marinović, B., Brans, R., Gibbs, S., Frings-Dresen, M. H. W., Rustemeyer, T., & Kezic, S. (2017). Stratum corneum profiles of inflammatory mediators in patch test reactions to common contact allergens and sodium lauryl sulfate. *The British Journal of Dermatology*, 176(6), Article 6. <https://doi.org/10.1111/bjd.15163>
- Koppes, S. A., Ljubojević Hadžavdić, S., Jakasa, I., Franceschi, N., Riethmüller, C., Jurakić Tončić, R., Marinovic, B., Raj, N., Rawlings, A. V., Voegeli, R., Lane, M. E., Haftek, M., Frings-Dresen, M. H. W., Rustemeyer, T., & Kezic, S. (2017). Effect of allergens and irritants on levels of natural moisturizing factor and corneocyte morphology. *Contact Dermatitis*, 76(5), 287–295. <https://doi.org/10.1111/cod.12770>
- Korinth, G., Geh, S., Schaller, K. H., & Drexler, H. (2003). In vitro evaluation of the efficacy of skin barrier creams and protective gloves on percutaneous absorption of industrial solvents. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 76(5), 382–386. <https://doi.org/10.1007/s00420-002-0429-y>
- Korkmaz, P., & Boyvat, A. (2019). Effect of Patch Testing on the Course of Allergic Contact Dermatitis and Prognostic Factors That Influence Outcomes. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 30(2), 135–141. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000452>
- Korman, N. J. (2020). Management of psoriasis as a systemic disease: What is the evidence? *The British Journal of Dermatology*, 182(4), 840–848. <https://doi.org/10.1111/bjd.18245>
- Kou, K., Okawa, T., Yamaguchi, Y., Ono, J., Inoue, Y., Kohno, M., Matsukura, S., Kambara, T., Ohta, S., Izuhara, K., & Aihara, M. (2014). Periostin levels correlate with disease severity and chronicity in patients with atopic dermatitis. *The British Journal of Dermatology*, 171(2), 283–291. <https://doi.org/10.1111/bjd.12943>
- Krueger, S. K., & Williams, D. E. (2005). Mammalian flavin-containing monooxygenases: Structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics*, 106(3), 357–387. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.01.001>
- Kruh, G. D., Zeng, H., Rea, P. A., Liu, G., Chen, Z. S., Lee, K., & Belinsky, M. G. (2001). MRP subfamily transporters and resistance to anticancer agents. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 33(6), 493–501. <https://doi.org/10.1023/a:1012827221844>
- Ku, H.-O., Jeong, S.-H., Kang, H.-G., Pyo, H.-M., Cho, J.-H., Son, S.-W., Yun, S.-M., & Ryu, D.-Y. (2009). Gene expression profiles and pathways in skin inflammation induced by three different sensitizers and an irritant. *Toxicology Letters*, 190(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.022>
- Kumari, V., Babina, M., Hazzan, T., & Worm, M. (2015). Thymic stromal lymphopoietin induction by skin irritation is independent of tumour necrosis factor- α , but supported by interleukin-1. *The British Journal of Dermatology*, 172(4), 951–960. <https://doi.org/10.1111/bjd.13465>
- Lachapelle, J. M. (1996). Efficacy of protective creams and/or gels. *Current Problems in Dermatology*, 25, 182–192. <https://doi.org/10.1159/000425529>
- Lachapelle, J. M. (1997). A proposed relevance scoring system for positive allergic patch test reactions: Practical implications and limitations. *Contact Dermatitis*, 36(1), 39–43. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1997.tb00920.x>
- Lachapelle, J. M., & Maibach, H. I. (2020). *Patch Testing and Prick Testing*. Librairie Lavoisier. https://www.lavoisier.fr/livre/medecine/patch-testing-and-prick-testing/descriptif_4258813
- LaDuca, J. R., & Gaspari, A. A. (2001). Targeting tumor necrosis factor alpha. New drugs used to modulate inflammatory diseases. *Dermatologic Clinics*, 19(4), 617–635. [https://doi.org/10.1016/s0733-8635\(05\)70304-1](https://doi.org/10.1016/s0733-8635(05)70304-1)

- Lagrelus, M., Wahlgren, C.-F., Bradley, M., Melén, E., Kull, I., Bergström, A., & Lidén, C. (2020). Filaggrin gene mutations in relation to contact allergy and hand eczema in adolescence. *Contact Dermatitis*, 82(3), 147–152. <https://doi.org/10.1111/cod.13444>
- Lammintausta, K., Zimerson, E., Hasan, T., Susitaival, P., Winhoven, S., Gruvberger, B., Beck, M., Williams, J. D., & Bruze, M. (2010). An epidemic of furniture-related dermatitis: Searching for a cause. *The British Journal of Dermatology*, 162(1), 108–116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09419.x>
- Landeck, L., Visser, M., Kezic, S., & John, S. M. (2012). Impact of tumour necrosis factor- α polymorphisms on irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 66(4), Article 4. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2011.02045.x>
- Landsteiner, K., & Jacobs, J. (1936). STUDIES ON THE SENSITIZATION OF ANIMALS WITH SIMPLE CHEMICAL COMPOUNDS. II. *The Journal of Experimental Medicine*, 64(4), 625–639. <https://doi.org/10.1084/jem.64.4.625>
- Lauffer, F., Baghin, V., Standl, M., Stark, S. P., Jargosch, M., Wehrle, J., Thomas, J., Schmidt-Weber, C. B., Biedermann, T., Eyerich, S., Eyerich, K., & Garzorz-Stark, N. (2021). Predicting persistence of atopic dermatitis in children using clinical attributes and serum proteins. *Allergy*, 76(4), 1158–1172. <https://doi.org/10.1111/all.14557>
- Le Borgne, M., Etchart, N., Goubier, A., Lira, S. A., Sirard, J. C., van Rooijen, N., Caux, C., Ait-Yahia, S., Vicari, A., Kaiserlian, D., & Dubois, B. (2006). Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo. *Immunity*, 24(2), 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.01.005>
- Lee, H. Y., Stieger, M., Yawalkar, N., & Kakeda, M. (2013). Cytokines and chemokines in irritant contact dermatitis. *Mediators of Inflammation*, 2013, 916497. <https://doi.org/10.1155/2013/916497>
- Lee, J. W., Devanarayan, V., Barrett, Y. C., Weiner, R., Allinson, J., Fountain, S., Keller, S., Weinryb, I., Green, M., Duan, L., Rogers, J. A., Millham, R., O'Brien, P. J., Sailstad, J., Khan, M., Ray, C., & Wagner, J. A. (2006). Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. *Pharmaceutical Research*, 23(2), 312–328. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-9045-3>
- Lefevre, M.-A., Nosbaum, A., Rozieres, A., Lenief, V., Mosnier, A., Cortial, A., Prioux, M., De Bernard, S., Nourikyan, J., Jouve, P.-E., Buffat, L., Hacard, F., Ferrier-Lebouedec, M.-C., Pralong, P., Dzvinga, C., Herman, A., Baeck, M., Nicolas, J.-F., & Vocanson, M. (2021). Unique molecular signatures typify skin inflammation induced by chemical allergens and irritants. *Allergy*, 76(12), 3697–3712. <https://doi.org/10.1111/all.14989>
- Lejding, T., Engfeldt, M., Bruze, M., Isaksson, M., Svedman, C., Zimerson, E., Verma, K., & Mowitz, M. (2020). Skin application of glutathione and iron sulfate can inhibit elicitation of allergic contact dermatitis from hexavalent chromium. *Contact Dermatitis*, 82(1), 45–53. <https://doi.org/10.1111/cod.13409>
- Lepoittevin, J.-P. (2006). Metabolism versus chemical transformation or pro- versus prehapten? *Contact Dermatitis*, 54(2), 73–74. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2006.00795.x>
- Lepoittevin, J.-P., & Leblond, I. (2000). Hapten-peptide-T cell receptor interactions: Molecular basis for the recognition of haptens by T lymphocytes. *European Journal of Dermatology*, 7(3), Article 3.
- Leung, D. Y. M., Calatroni, A., Zaramela, L. S., LeBeau, P. K., Dyjack, N., Brar, K., David, G., Johnson, K., Leung, S., Ramirez-Gama, M., Liang, B., Rios, C., Montgomery, M. T., Richers, B. N., Hall, C. F., Norquest, K. A., Jung, J., Bronova, I., Kreimer, S., ... Goleva, E. (2019). The nonlesional skin surface distinguishes atopic dermatitis with food allergy as a unique endotype. *Science Translational Medicine*, 11(480), eaav2685. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav2685>
- Levine, W. G., & Zbaida, S. (1991). Two classes of azo dye reductase activity associated with rat liver microsomal cytochrome P-450. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 283, 315–321. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5877-0_39
- Li, J., Lu, E., Yi, T., & Cyster, J. G. (2016). EB12 augments Tfh cell fate by promoting interaction with IL-2-queenching dendritic cells. *Nature*, 533(7601), Article 7601. <https://doi.org/10.1038/nature17947>
- Li, X., & Zhong, F. (2014). Nickel induces interleukin-1 β secretion via the NLRP3-ASC-caspase-1 pathway. *Inflammation*, 37(2), 457–466. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9759-z>
- Lin, L. L., Prow, T. W., Raphael, A. P., Harrold Iii, R. L., Primiero, C. A., Ansaldo, A. B., & Soyer, H. P. (2013). Microbiopsy engineered for minimally invasive and suture-free sub-millimetre skin sampling. *F1000Research*, 2, 120. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-120.v2>
- Lindemann, M., Böhmer, J., Zabel, M., & Grosse-Wilde, H. (2003). ELISpot: A new tool for the detection of nickel sensitization. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 33(7), Article 7. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01700.x>
- Lindemann, M., Rietschel, F., Zabel, M., & Grosse-Wilde, H. (2008). Detection of chromium allergy by cellular in vitro methods. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 38(9), Article 9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.02970.x>
- Liu, C., Yang, X. V., Wu, J., Kuei, C., Mani, N. S., Zhang, L., Yu, J., Sutton, S. W., Qin, N., Banie, H., Karlsson, L.,

- Sun, S., & Lovenberg, T. W. (2011). Oxysterols direct B-cell migration through EBI2. *Nature*, 475(7357), 519–523. <https://doi.org/10.1038/nature10226>
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., & Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, 251364. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
- Liu, X., Krishnan, A., & Mondry, A. (2005). An entropy-based gene selection method for cancer classification using microarray data. *BMC Bioinformatics*, 6, 76. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-76>
- Lobito, A. A., Ramani, S. R., Tom, I., Bazan, J. F., Luis, E., Fairbrother, W. J., Ouyang, W., & Gonzalez, L. C. (2011). Murine insulin growth factor-like (IGFL) and human IGFL1 proteins are induced in inflammatory skin conditions and bind to a novel tumor necrosis factor receptor family member, IGFLR1. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(21), 18969–18981. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.224626>
- Lord, S. J., Irwig, L., & Simes, R. J. (2006). When is measuring sensitivity and specificity sufficient to evaluate a diagnostic test, and when do we need randomized trials? *Annals of Internal Medicine*, 144(11), 850–855. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-144-11-200606060-00011>
- Lowes, M. A., Suárez-Fariñas, M., & Krueger, J. G. (2014). Immunology of psoriasis. *Annual Review of Immunology*, 32, 227–255. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120225>
- Luckey, U., Schmidt, T., Pfender, N., Romer, M., Lorenz, N., Martin, S. F., Bopp, T., Schmitt, E., Nikolaev, A., Yogeve, N., Waisman, A., Jakob, T., & Steinbrink, K. (2012). Crosstalk of regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells prevents contact allergy in subjects with low zone tolerance. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(3), 781–797.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.06.022>
- Luis, A., Martins, J. D., Silva, A., Ferreira, I., Cruz, M. T., & Neves, B. M. (2014). Oxidative stress-dependent activation of the eIF2 α –ATF4 unfolded protein response branch by skin sensitizer 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene modulates dendritic-like cell maturation and inflammatory status in a biphasic manner [corrected]. *Free Radical Biology & Medicine*, 77, 217–229. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.008>
- Lysdal, S. H., Søsted, H., Andersen, K. E., & Johansen, J. D. (2011). Hand eczema in hairdressers: A Danish register-based study of the prevalence of hand eczema and its career consequences. *Contact Dermatitis*, 65(3), 151–158. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2011.01935.x>
- Lyubchenko, T., Collins, H. K., Goleva, E., & Leung, D. Y. M. (2021). Skin Tape Sampling Technique Identifies Proinflammatory Cytokines in Atopic Dermatitis Skin. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 126(1), 46–53.e2. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2020.08.397>
- Machler, B. C., Sung, C. T., Darwin, E., & Jacob, S. E. (2019). Dupilumab use in allergic contact dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(1), 280–281.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.07.043>
- Madan, V., & Beck, M. H. (2005). Contact allergy to octocrylene in sunscreen with recurrence from passive transfer of a cosmetic. *Contact Dermatitis*, 53(4), 241–242. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2005.0670j.x>
- Mansouri, Y., & Guttman-Yassky, E. (2015). Immune Pathways in Atopic Dermatitis, and Definition of Biomarkers through Broad and Targeted Therapeutics. *Journal of Clinical Medicine*, 4(5), 858–873. <https://doi.org/10.3390/jcm4050858>
- Martin, S. F., Dudda, J. C., Bachtanian, E., Lembo, A., Liller, S., Dürr, C., Heimesaat, M. M., Bereswill, S., Fejer, G., Vassileva, R., Jakob, T., Freudenberg, N., Termeer, C. C., Johner, C., Galanos, C., & Freudenberg, M. A. (2008). Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(9), 2151–2162. <https://doi.org/10.1084/jem.20070509>
- Martin, S. F., Esser, P. R., Weber, F. C., Jakob, T., Freudenberg, M. A., Schmidt, M., & Goebeler, M. (2011). Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy*, 66(9), 1152–1163. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02652.x>
- Martin, S. F., Rustemeyer, T., & Thyssen, J. P. (2018). Recent advances in understanding and managing contact dermatitis. *F1000Research*, 7. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13499.1>
- McAleer, M. A., Jakasa, I., Hurault, G., Sarvari, P., McLean, W. H. I., Tanaka, R. J., Kezic, S., & Irvine, A. D. (2019). Systemic and stratum corneum biomarkers of severity in infant atopic dermatitis include markers of innate and T helper cell-related immunity and angiogenesis. *The British Journal of Dermatology*, 180(3), 586–596. <https://doi.org/10.1111/bjd.17088>
- McGregor, E., & Dunn, M. J. (2006). Proteomics of the heart: Unraveling disease. *Circulation Research*, 98(3), 309–321. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000201280.20709.26>
- Meixiong, J., Anderson, M., Limjunyawong, N., Sabbagh, M. F., Hu, E., Mack, M. R., Oetjen, L. K., Wang, F., Kim, B. S., & Dong, X. (2019). Activation of Mast-Cell-Expressed Mas-Related G-Protein-Coupled Receptors Drives Non-histaminergic Itch. *Immunity*, 50(5), 1163–1171.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.013>
- Meller, S., Lauerma, A. I., Kopp, F. M., Winterberg, F., Anthoni, M., Müller, A., Gombert, M., Haahtela, A., Alenius,

- H., Rieker, J., Dieu-Nosjean, M.-C., Kubitza, R. C., Gleichmann, E., Ruzicka, T., Zlotnik, A., & Homey, B. (2007). Chemokine responses distinguish chemical-induced allergic from irritant skin inflammation: Memory T cells make the difference. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.12.654>
- Melo, M. das G. M., Villarinho, A. L. C. F., & Leite, I. da C. (2019). Sociodemographic and clinical profile of patients with occupational contact dermatitis seen at a work-related dermatology service, 2000—2014. *Anais Brasileiros De Dermatologia*, 94(2), 147–156. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20197235>
- Mercurio, L., Morelli, M., Scarponi, C., Eisenmesser, E. Z., Doti, N., Pagnanelli, G., Gubinelli, E., Mazzanti, C., Cavani, A., Ruvo, M., Dinarello, C. A., Albanesi, C., & Madonna, S. (2018). IL-38 has an anti-inflammatory action in psoriasis and its expression correlates with disease severity and therapeutic response to anti-IL-17A treatment. *Cell Death & Disease*, 9(11), 1104. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1143-3>
- Meyer, J. D., Chen, Y., Holt, D. L., Beck, M. H., & Cherry, N. M. (2000). Occupational contact dermatitis in the UK: A surveillance report from EPIDERM and OPRA. *Occupational Medicine (Oxford, England)*, 50(4), 265–273. <https://doi.org/10.1093/occmed/50.4.265>
- Michalek, I. M., Loring, B., & John, S. M. (2017). A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 31(2), 205–212. <https://doi.org/10.1111/jdv.13854>
- Migdal, C., Foggia, L., Tailhardat, M., Courtellemont, P., Haftek, M., & Serres, M. (2010). Sensitization effect of thimerosal is mediated in vitro via reactive oxygen species and calcium signaling. *Toxicology*, 274(1–3), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.04.016>
- Mitra, S., & Acharya, T. (2005). *Data Mining: Multimedia, Soft Computing, and Bioinformatics*. John Wiley & Sons.
- Miyahara, H., Okazaki, N., Nagakura, T., Korematsu, S., & Izumi, T. (2011). Elevated umbilical cord serum TARC/CCL17 levels predict the development of atopic dermatitis in infancy. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 41(2), 186–191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03634.x>
- Moed, H., von Blomberg, M., Bruynzeel, D. P., Scheper, R., Gibbs, S., & Rustemeyer, T. (2005). Improved detection of allergen-specific T-cell responses in allergic contact dermatitis through the addition of 'cytokine cocktails'. *Experimental Dermatology*, 14(8), Article 8. <https://doi.org/10.1111/j.0906-6705.2005.00344.x>
- Morishima, Y., Kawashima, H., Takekuma, K., & Hoshika, A. (2010). Changes in serum lactate dehydrogenase activity in children with atopic dermatitis. *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 52(2), 171–174. <https://doi.org/10.1111/j.1442-200X.2009.02908.x>
- Morita, A., Tani, Y., Matsumoto, K., Yamaguchi, M., Teshima, R., & Ohtsuki, M. (2020). Assessment of serum biomarkers in patients with plaque psoriasis on secukinumab. *The Journal of Dermatology*, 47(5), 452–457. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.15278>
- Mose, K. F., Andersen, F., Røpke, M. A., Skov, L., Friedmann, P. S., & Andersen, K. E. (2018). Anti-inflammatory potency testing of topical corticosteroids and calcineurin inhibitors in human volunteers sensitized to diphenylcyclopropanone. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84(8), 1719–1728. <https://doi.org/10.1111/bcp.13596>
- Moss, E., Debeuckelaere, C., Berl, V., Elbayed, K., Moussallieh, F.-M., Namer, I.-J., & Lepoittevin, J.-P. (2016). In Situ Metabolism of Cinnamyl Alcohol in Reconstructed Human Epidermis: New Insights into the Activation of This Fragrance Skin Sensitizer. *Chemical Research in Toxicology*, 29(7), 1172–1178. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00148>
- Muto, J., Morioka, Y., Yamasaki, K., Kim, M., Garcia, A., Carlin, A. F., Varki, A., & Gallo, R. L. (2014). Hyaluronan digestion controls DC migration from the skin. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(3), 1309–1319. <https://doi.org/10.1172/JCI67947>
- Mw, C., Pa, R., & A, E. (2012). Contact dermatitis in the United States: Epidemiology, economic impact, and workplace prevention. *Dermatologic Clinics*, 30(1). <https://doi.org/10.1016/j.det.2011.08.004>
- Naggal, N., Gordon-Elliott, J., & Lipner, S. (2019). Comparison of quality of life and illness perception among patients with acne, eczema, and psoriasis. *Dermatology Online Journal*, 25(5), 13030/qt3fk3f989.
- Nakada, T., Hostynek, J. J., & Maibach, H. I. (2000). Use tests: ROAT (repeated open application test)/PUT (provocative use test): an overview. *Contact Dermatitis*, 43(1), Article 1. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0536.2000.043001001.x>
- Nakazato, J., Kishida, M., Kuroiwa, R., Fujiwara, J., Shimoda, M., & Shinomiya, N. (2008). Serum levels of Th2 chemokines, CCL17, CCL22, and CCL27, were the important markers of severity in infantile atopic dermatitis. *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 19(7), 605–613. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2007.00692.x>
- Nassau, S., & Fonacier, L. (2020). Allergic Contact Dermatitis. *The Medical Clinics of North America*, 104(1), 61–

76. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.08.012>

Ní Chaoimh, C., Nico, C., Puppels, G. J., Caspers, P. J., Wong, X. F. C. C., Common, J. E., Irvine, A. D., & Hourihane, J. O. (2020). In vivo Raman spectroscopy discriminates between FLG loss-of-function carriers vs wild-type in day 1-4 neonates. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 124(5), 500–504. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2020.01.022>

Nikle, A., Ericson, M., & Warshaw, E. (2019). Formaldehyde Release From Personal Care Products: Chromotropic Acid Method Analysis. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 30(1), 67–73. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000434>

Niknezhad, N., Haghghatkhah, H. R., Zargari, O., Ghalamkarpour, F., Younespour, S., Niknejad, N., Alikhan, A., & Abdollahimajd, F. (2020). High-sensitivity C-reactive protein as a biomarker in detecting subclinical atherosclerosis in psoriasis. *Dermatologic Therapy*, 33(4), e13628. <https://doi.org/10.1111/dth.13628>

Niss Arfelt, K., Barington, L., Benned-Jensen, T., Kubale, V., Kovalchuk, A. L., Daugvilaite, V., Christensen, J. P., Thomsen, A. R., Egerod, K. L., Bassi, M. R., Spiess, K., Schwartz, T. W., Wang, H., Morse, H. C., Holst, P. J., & Rosenkilde, M. M. (2017). EBI2 overexpression in mice leads to B1 B-cell expansion and chronic lymphocytic leukemia-like B-cell malignancies. *Blood*, 129(7), 866–878. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-02-697185>

Noda, S., Suárez-Fariñas, M., Ungar, B., Kim, S. J., Strong, C. de G., Xu, H., Peng, X., Estrada, Y. D., Nakajima, S., Honda, T., Shin, J. U., Lee, H., Krueger, J. G., Lee, K.-H., Kabashima, K., & Guttman-Yassky, E. (2015). The Asian atopic dermatitis phenotype combines features of atopic dermatitis and psoriasis with increased TH17 polarization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(5), 1254–1264. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.015>

Noordegraaf, M., Flacher, V., Stoitzner, P., & Clausen, B. E. (2010). Functional redundancy of Langerhans cells and Langerin+ dermal dendritic cells in contact hypersensitivity. *The Journal of Investigative Dermatology*, 130(12), 2752–2759. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.223>

Nosbaum, A., Vocanson, M., Rozieres, A., Hennino, A., & Nicolas, J.-F. (2009). Allergic and irritant contact dermatitis. *European Journal of Dermatology: EJD*, 19(4), Article 4. <https://doi.org/10.1684/ejd.2009.0686>

Novak, N., Baurecht, H., Schäfer, T., Rodriguez, E., Wagenpfeil, S., Klopp, N., Heinrich, J., Behrendt, H., Ring, J., Wichmann, E., Illig, T., & Weidinger, S. (2008). Loss-of-function mutations in the filaggrin gene and allergic contact sensitization to nickel. *The Journal of Investigative Dermatology*, 128(6), 1430–1435. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701190>

Odiwuor, N., Xiong, J., Ogolla, F., Hong, W., Li, X., Khan, F. M., Wang, N., Yu, J., & Wei, H. (2022). A point-of-care SARS-CoV-2 test based on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification without RNA extraction with diagnostic performance same as RT-PCR. *Analytica Chimica Acta*, 1200, 339590. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339590>

Oesch, F., Fabian, E., & Landsiedel, R. (2018). Xenobiotica-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Archives of Toxicology*, 92(8), 2411–2456. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2232-x>

Oesch, F., Fabian, E., Oesch-Bartlomowicz, B., Werner, C., & Landsiedel, R. (2007). Drug-metabolizing enzymes in the skin of man, rat, and pig. *Drug Metabolism Reviews*, 39(4), 659–698. <https://doi.org/10.1080/03602530701690366>

Oosterhaven, J. a. F., & Schuttelaar, M. L. A. (2020). Responsiveness and interpretability of the Hand Eczema Severity Index. *The British Journal of Dermatology*, 182(4), 932–939. <https://doi.org/10.1111/bjd.18295>

Ortiz Salvador, J. M., Esteve Martínez, A., Subiabre Ferrer, D., Victoria Martínez, A. M., de la Cuadra Oyanguren, J., & Zaragoza Ninet, V. (2017). Pediatric Allergic Contact Dermatitis: Clinical and Epidemiological Study in a Tertiary Hospital. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, 108(6), 571–578. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2016.12.018>

Özkaya, E., & Elinç Aslan, M. S. (2021). Occupational allergic contact dermatitis: A 24-year, retrospective cohort study from Turkey. *Contact Dermatitis*, 85(5), 503–513. <https://doi.org/10.1111/cod.13938>

Park, B. K., Pirmohamed, M., & Kitteringham, N. R. (1995). The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 68(3), 385–424. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)02013-6)

Park, K., & Scott, A. L. (2010). Cholesterol 25-hydroxylase production by dendritic cells and macrophages is regulated by type I interferons. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(6), 1081–1087. <https://doi.org/10.1189/jlb.0610318>

Park, S. Y., Oh, S., Kim, E. J., Yoon, S. Y., Park, H. S., Yoon, H.-S., & Cho, S. (2014). Utility of eosinophil cationic protein levels in the diagnosis of intrinsic atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*, 94(3), 333–334. <https://doi.org/10.2340/00015555-1715>

Patel, A., Burns, E., & Burkemper, N. M. (2018). Methotrexate use in allergic contact dermatitis: A retrospective study. *Contact Dermatitis*, 78(3), 194–198. <https://doi.org/10.1111/cod.12925>

- Patel, S. (2018). Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): The Derivatives and Triggers of Inflammation. *Current Allergy and Asthma Reports*, 18(11), 63. <https://doi.org/10.1007/s11882-018-0817-3>
- Patil, V. S., Madrigal, A., Schmiedel, B. J., Clarke, J., O'Rourke, P., de Silva, A. D., Harris, E., Peters, B., Seumois, G., Weiskopf, D., Sette, A., & Vijayanand, P. (2018). Precursors of human CD4+ cytotoxic T lymphocytes identified by single-cell transcriptome analysis. *Science Immunology*, 3(19), eaan8664. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aan8664>
- Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(4), 263–269. <https://doi.org/10.1038/nrm3314>
- Pencina, M. J., D'Agostino, R. B., D'Agostino, R. B., & Vasan, R. S. (2008). Evaluating the added predictive ability of a new marker: From area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Statistics in Medicine*, 27(2), 157–172; discussion 207-212. <https://doi.org/10.1002/sim.2929>
- Peng, B., Che, D., Hao, Y., Zheng, Y., Liu, R., Qian, Y., Cao, J., Wang, J., Zhang, Y., He, L., & Geng, S. (2019). Thimerosal induces skin pseudo-allergic reaction via Mas-related G-protein coupled receptor B2. *Journal of Dermatological Science*, 95(3), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2019.07.007>
- Pesonen, M., Jolanki, R., Larese Filon, F., Wilkinson, M., Kręćisz, B., Kieć-Świerczyńska, M., Bauer, A., Mahler, V., John, S. M., Schnuch, A., Uter, W., & ESSCA network. (2015). Patch test results of the European baseline series among patients with occupational contact dermatitis across Europe—Analyses of the European Surveillance System on Contact Allergy network, 2002-2010. *Contact Dermatitis*, 72(3), 154–163. <https://doi.org/10.1111/cod.12333>
- Picchianti-Diamanti, A., Rosado, M. M., Scarsella, M., Laganà, B., & D'Amelio, R. (2014). P-glycoprotein and drug resistance in systemic autoimmune diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 4965–4976. <https://doi.org/10.3390/ijms15034965>
- Pichler, W. J., & Tilch, J. (2004). The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy*, 59(8), 809–820. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2004.00547.x>
- Piguet, P. F., Grau, G. E., Hauser, C., & Vassalli, P. (1991). Tumor necrosis factor is a critical mediator in hapten induced irritant and contact hypersensitivity reactions. *The Journal of Experimental Medicine*, 173(3), Article 3. <https://doi.org/10.1084/jem.173.3.673>
- Potaczek, D. P., Harb, H., Michel, S., Alhamwe, B. A., Renz, H., & Tost, J. (2017). Epigenetics and allergy: From basic mechanisms to clinical applications. *Epigenomics*, 9(4), 539–571. <https://doi.org/10.2217/epi-2016-0162>
- Potts, R. O., & Guy, R. H. (1992). Predicting skin permeability. *Pharmaceutical Research*, 9(5), 663–669. <https://doi.org/10.1023/a:1015810312465>
- Preuss, I., Ludwig, M.-G., Baumgarten, B., Bassilana, F., Gessier, F., Seuwen, K., & Sailer, A. W. (2014). Transcriptional regulation and functional characterization of the oxysterol/EBI2 system in primary human macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(3), 663–668. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.069>
- Prusakiewicz, J. J., Ackermann, C., & Voorman, R. (2006). Comparison of skin esterase activities from different species. *Pharmaceutical Research*, 23(7), 1517–1524. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-0273-y>
- Quaranta, M., Eyerich, S., Knapp, B., Nasorri, F., Scarponi, C., Mattii, M., Garzorz, N., Harlfinger, A. T., Jaeger, T., Grosber, M., Pennino, D., Mempel, M., Schnopp, C., Theis, F. J., Albanesi, C., Cavani, A., Schmidt-Weber, C. B., Ring, J., & Eyerich, K. (2014). Allergic contact dermatitis in psoriasis patients: Typical, delayed, and non-interacting. *PLoS One*, 9(7), e101814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101814>
- Quaranta, M., Knapp, B., Garzorz, N., Mattii, M., Pullabhatla, V., Pennino, D., Andres, C., Traidl-Hoffmann, C., Cavani, A., Theis, F. J., Ring, J., Schmidt-Weber, C. B., Eyerich, S., & Eyerich, K. (2014). Intra-individual genome expression analysis reveals a specific molecular signature of psoriasis and eczema. *Science Translational Medicine*, 6(244), Article 244. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008946>
- Quinlan, J. R. (1986). Induction of decision trees. *Machine Learning*, 1(1), 81–106. <https://doi.org/10.1007/BF00116251>
- Raffi, J., Elaine Allen, I., & Botto, N. (2020). Validating Responsiveness of a Quality-of-Life Instrument for Allergic Contact Dermatitis. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 31(3), 209–214. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000542>
- Raffi, J., Suresh, R., Botto, N., & Murase, J. E. (2020). The impact of dupilumab on patch testing and the prevalence of comorbid allergic contact dermatitis in recalcitrant atopic dermatitis: A retrospective chart review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 82(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2019.09.028>
- Rajadhyaksha, M., González, S., Zavislan, J. M., Anderson, R. R., & Webb, R. H. (1999). In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: Advances in instrumentation and comparison with histology. *The Journal of Investigative Dermatology*, 113(3), Article 3. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00690.x>

- Ramessur, R., Corbett, M., Marshall, D., Acencio, M. L., Barbosa, I. A., Dand, N., Di Meglio, P., Haddad, S., Jensen, A. H. M., Koopmann, W., Mahil, S. K., Ostaszewski, M., Rahmatulla, S., Rastrick, J., Saklatvala, J., Weidinger, S., Wright, K., Eyerich, K., Ndlovu, M., ... BIOMAP consortium. (2022). Biomarkers of disease progression in people with psoriasis: A scoping review. *The British Journal of Dermatology*, 187(4), 481–493. <https://doi.org/10.1111/bjd.21627>
- Ratzinger, G., Stoitzner, P., Ebner, S., Lutz, M. B., Layton, G. T., Rainer, C., Senior, R. M., Shipley, J. M., Fritsch, P., Schuler, G., & Romani, N. (2002). Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(9), 4361–4371. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.9.4361>
- Reduta, T., Ludańska, H., & Laudanski, P. (2007). Tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1 levels are increased in serum of patients with allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 57(2), 100–104. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01167.x>
- Reduta, T., Śniecińska, M., Pawłoś, A., Sulkiewicz, A., & Sokołowska, M. (2015). Serum osteopontin levels in disseminated allergic contact dermatitis. *Advances in Medical Sciences*, 60(2), 273–276. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2015.05.001>
- Reed, J. T., Ghadially, R., & Elias, P. M. (1995). Skin type, but neither race nor gender, influence epidermal permeability barrier function. *Archives of Dermatology*, 131(10), 1134–1138.
- Reimann, E., Lättelä, F., Keermann, M., Abram, K., Köks, S., Kingo, K., & Fazeli, A. (2019). Multicomponent Biomarker Approach Improves the Accuracy of Diagnostic Biomarkers for Psoriasis Vulgaris. *Acta Dermatovenereologica*, 99(13), 1258–1265. <https://doi.org/10.2340/00015555-3337>
- Renert-Yuval, Y., Thyssen, J. P., Bissonnette, R., Bieber, T., Kabashima, K., Hijnen, D., & Guttman-Yassky, E. (2021). Biomarkers in atopic dermatitis—A review on behalf of the International Eczema Council. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 147(4), 1174–1190.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.01.013>
- Ricciardi, L., Minciullo, P. L., Saitta, S., Trombetta, D., Saija, A., & Gangemi, S. (2009). Increased serum levels of IL-22 in patients with nickel contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 60(1), Article 1. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2008.01454.x>
- Riemann, H., Loser, K., Beissert, S., Fujita, M., Schwarz, A., Schwarz, T., & Grabbe, S. (2005). IL-12 breaks dinitrothiocyanobenzene (DNTB)-mediated tolerance and converts the tolerogen DNTB into an immunogen. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(9), 5866–5874. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.9.5866>
- Riis, J. L., Johansen, C., Vestergaard, C., Bech, R., Kragballe, K., & Iversen, L. (2011). Kinetics and differential expression of the skin-related chemokines CCL27 and CCL17 in psoriasis, atopic dermatitis and allergic contact dermatitis. *Experimental Dermatology*, 20(10), 789–794. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01323.x>
- Ring, J. (2017). Occupational skin disease—A major health problem in Europe. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 31(6), 919–920. <https://doi.org/10.1111/jdv.14307>
- Ring, J., Alomar, A., Bieber, T., Deleuran, M., Fink-Wagner, A., Gelmetti, C., Gieler, U., Lipozencic, J., Luger, T., Oranje, A. P., Schäfer, T., Schwennsen, T., Seidenari, S., Simon, D., Ständer, S., Stingl, G., Szalai, S., Szepletowski, J. C., Taïeb, A., ... Global Allergy and Asthma European Network. (2012). Guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) Part II. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 26(9), 1176–1193. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2012.04636.x>
- Roberts, M. S., & Walters, K. A. (2008). *Dermal Absorption and Toxicity Assessment, Second Edition*. Taylor & Francis.
- Roediger, B., Kyle, R., Yip, K. H., Sumaria, N., Guy, T. V., Kim, B. S., Mitchell, A. J., Tay, S. S., Jain, R., Forbes-Blom, E., Chen, X., Tong, P. L., Bolton, H. A., Artis, D., Paul, W. E., Fazekas de St Groth, B., Grimbaldston, M. A., Le Gros, G., & Weninger, W. (2013). Cutaneous immunosurveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells. *Nature Immunology*, 14(6), 564–573. <https://doi.org/10.1038/ni.2584>
- Rolls, S., Chowdhury, M. M., Cooper, S., Cousen, P., Flynn, A. M., Ghaffar, S. A., Green, C. M., Haworth, A., Holden, C., Johnston, G. A., Naidoo, K., Orton, D. I., Reckling, C., Sabroe, R. A., Scorer, M., Stone, N. M., Thompson, D., Wakelin, S., Wilkinson, M., & Buckley, D. A. (2019). Recommendation to include hydroxyethyl (meth)acrylate in the British baseline patch test series. *The British Journal of Dermatology*, 181(4), 811–817. <https://doi.org/10.1111/bjd.17708>
- Romagnoli, P., Labhardt, A. M., & Sinigaglia, F. (1991). Selective interaction of Ni with an MHC-bound peptide. *The EMBO Journal*, 10(6), 1303–1306. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07648.x>
- Romaní, J., Caixàs, A., Ceperuelo-Mallafré, V., Carrascosa, J. M., Ribera, M., Rigla, M., Vendrell, J., & Luelmo, J. (2013). Circulating levels of lipocalin-2 and retinol-binding protein-4 are increased in psoriatic patients and correlated with baseline PASI. *Archives of Dermatological Research*, 305(2), 105–112. <https://doi.org/10.1007/s00403-012-1306-5>
- Rønholt, K., & Iversen, L. (2017). Old and New Biological Therapies for Psoriasis. *International Journal of Molecular*

Sciences, 18(11), E2297. <https://doi.org/10.3390/ijms18112297>

- Rosenkilde, M. M., Benned-Jensen, T., Andersen, H., Holst, P. J., Kledal, T. N., Lüttichau, H. R., Larsen, J. K., Christensen, J. P., & Schwartz, T. W. (2006). Molecular pharmacological phenotyping of EBI2. An orphan seven-transmembrane receptor with constitutive activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13199–13208. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602245200>
- Ross-Hansen, K., Linneberg, A., Johansen, J. D., Hersoug, L.-G., Brasch-Andersen, C., Menné, T., & Thyssen, J. P. (2013). The role of glutathione S-transferase and claudin-1 gene polymorphisms in contact sensitization: A cross-sectional study. *The British Journal of Dermatology*, 168(4), 762–770. <https://doi.org/10.1111/bjd.12126>
- Rozieres, A., Hennino, A., Rodet, K., Gutowski, M.-C., Gunera-Saad, N., Berard, F., Cozon, G., Bienvenu, J., & Nicolas, J.-F. (2009). Detection and quantification of drug-specific T cells in penicillin allergy. *Allergy*, 64(4), 534–542. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2008.01674.x>
- Rozieres, A., Vocanson, M., Rodet, K., Benetiere, J., Bienvenu, J., Berard, F., Hennino, A., & Nicolas, J.-F. (2010). CD8+ T cells mediate skin allergy to amoxicillin in a mouse model. *Allergy*, 65(8), 996–1003. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02307.x>
- Ruini, C., Rahimi, F., Fiocco, Z., French, L. E., Hartmann, D., Opiel, E., & Sattler, E. (2021). Optical coherence tomography for patch test grading: A prospective study on its use for noninvasive diagnosis of allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 84(3), 183–191. <https://doi.org/10.1111/cod.13714>
- Russell, G., Graveley, R., Seid, J., al-Humidan, A. K., & Skjodt, H. (1992). Mechanisms of action of cyclosporine and effects on connective tissues. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 21(6 Suppl 3), 16–22. [https://doi.org/10.1016/0049-0172\(92\)90009-3](https://doi.org/10.1016/0049-0172(92)90009-3)
- Rutkowska, A., Sailer, A. W., & Dev, K. K. (2017). EBI2 receptor regulates myelin development and inhibits LPC-induced demyelination. *Journal of Neuroinflammation*, 14, 250. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-1025-0>
- Rutkowska, A., Shimshek, D. R., Sailer, A. W., & Dev, K. K. (2018). EBI2 regulates pro-inflammatory signalling and cytokine release in astrocytes. *Neuropharmacology*, 133, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.01.029>
- Ruzicka, T., Lynde, C. W., Jemec, G. B. E., Diepgen, T., Berth-Jones, J., Coenraads, P. J., Kaszuba, A., Bissonnette, R., Varjonen, E., Holló, P., Cambazard, F., Lahfa, M., Elsner, P., Nyberg, F., Svensson, A., Brown, T. C., Harsch, M., & Maares, J. (2008). Efficacy and safety of oral alitretinoin (9-cis retinoic acid) in patients with severe chronic hand eczema refractory to topical corticosteroids: Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *The British Journal of Dermatology*, 158(4), 808–817. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08487.x>
- S, N., T, B., A, T., & DI, H. (2014). Health care utilization characteristics in patch test patients. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 25(5). <https://doi.org/10.1097/DER.000000000000059>
- Saetterstrøm, B., Olsen, J., & Johansen, J. D. (2014). Cost-of-illness of patients with contact dermatitis in Denmark. *Contact Dermatitis*, 71(3), 154–161. <https://doi.org/10.1111/cod.12231>
- Saint-Mezard, P., Berard, F., Dubois, B., Kaiserlian, D., & Nicolas, J.-F. (2004). The role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *European Journal of Dermatology: EJD*, 14(3), Article 3.
- Saint-Mezard, P., Chavagnac, C., Bosset, S., Ionescu, M., Peyron, E., Kaiserlian, D., Nicolas, J.-F., & Bérard, F. (2003). Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(8), 4073–4080. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.8.4073>
- Saint-Mezard, P., Rosieres, A., Krasteva, M., Berard, F., Dubois, B., Kaiserlian, D., & Nicolas, J.-F. (2004). Allergic contact dermatitis. *European Journal of Dermatology: EJD*, 14(5), Article 5.
- Sanschagrín, S., & Yergeau, E. (2014). Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 90. <https://doi.org/10.3791/51709>
- Saripalli, Y. V., Gadzia, J. E., & Belsito, D. V. (2003). Tacrolimus ointment 0.1% in the treatment of nickel-induced allergic contact dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 49(3), 477–482. [https://doi.org/10.1067/s0190-9622\(03\)01826-7](https://doi.org/10.1067/s0190-9622(03)01826-7)
- Sasseville, D. (2008). Occupational Contact Dermatitis. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology: Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 4(2), Article 2. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-4-2-59>
- Sattler, E., Kästle, R., & Welzel, J. (2013). Optical coherence tomography in dermatology. *Journal of Biomedical Optics*, 18(6), 061224. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.6.061224>
- Schalock, P. C., Menné, T., Johansen, J. D., Taylor, J. S., Maibach, H. I., Lidén, C., Bruze, M., & Thyssen, J. P. (2012). Hypersensitivity reactions to metallic implants—Diagnostic algorithm and suggested patch test series for clinical use. *Contact Dermatitis*, 66(1), 4–19. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2011.01971.x>
- Scheinman, P. L., Vocanson, M., Thyssen, J. P., Johansen, J. D., Nixon, R. L., Dear, K., Botto, N. C., Morot, J., &

- Goldminz, A. M. (2021). Contact dermatitis. *Nature Reviews. Disease Primers*, 7(1), 38. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00271-4>
- Schmidt, J. D., Ahlström, M. G., Johansen, J. D., Dyring-Andersen, B., Agerbeck, C., Nielsen, M. M., Poulsen, S. S., Woetmann, A., Ødum, N., Thomsen, A. R., Geisler, C., & Bonfeld, C. M. (2017). Rapid allergen-induced interleukin-17 and interferon- γ secretion by skin-resident memory CD8(+) T cells. *Contact Dermatitis*, 76(4), Article 4. <https://doi.org/10.1111/cod.12715>
- Schmidt, M., & Goebeler, M. (2015). Immunology of metal allergies. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, 13(7), 653–660. <https://doi.org/10.1111/ddg.12673>
- Schmidt, M., Raghavan, B., Müller, V., Vogl, T., Fejer, G., Tchaptchet, S., Keck, S., Kalis, C., Nielsen, P. J., Galanos, C., Roth, J., Skerra, A., Martin, S. F., Freudenberg, M. A., & Goebeler, M. (2010). Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nature Immunology*, 11(9), 814–819. <https://doi.org/10.1038/ni.1919>
- Schnuch, A., Westphal, G., Mössner, R., Uter, W., & Reich, K. (2011). Genetic factors in contact allergy—Review and future goals. *Contact Dermatitis*, 64(1), Article 1. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2010.01800.x>
- Schubert, S., Geier, J., Skudlik, C., Reich, A., Hansen, A., Buhl, T., Mempel, M., Schön, M. P., John, S. M., & Brans, R. (2020). Relevance of contact sensitizations in occupational dermatitis patients with special focus on patch testing of workplace materials. *Contact Dermatitis*, 83(6), 475–486. <https://doi.org/10.1111/cod.13688>
- Seier, A. M., Renkl, A. C., Schulz, G., Uebele, T., Sindrilaru, A., Iben, S., Liaw, L., Kon, S., Uede, T., & Weiss, J. M. (2010). Antigen-specific induction of osteopontin contributes to the chronification of allergic contact dermatitis. *The American Journal of Pathology*, 176(1), 246–258. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090488>
- Shahidi-Dadras, M., Haghghatkah, H. R., Abdollahimajd, F., Younespour, S., Partovi Kia, M., & Zargari, O. (2016). Correlation between vascular endothelial growth factor and subclinical atherosclerosis in patients with psoriasis. *International Journal of Dermatology*, 55(1), 52–59. <https://doi.org/10.1111/ijd.12842>
- Sharma, V. K., Bhat, R., Sethuraman, G., & Manchanda, Y. (2007). Treatment of parthenium dermatitis with methotrexate. *Contact Dermatitis*, 57(2), 118–119. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2006.00950.x>
- Sharma, V. K., Chakrabarti, A., & Mahajan, V. (1998). Azathioprine in the treatment of Parthenium dermatitis. *International Journal of Dermatology*, 37(4), 299–302. <https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.1998.00307.x>
- Sheary, B. (2018). Steroid Withdrawal Effects Following Long-term Topical Corticosteroid Use. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 29(4), 213–218. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000387>
- Sieben, S., Baron, J. M., Blömeke, B., & Merk, H. F. (1999). Multiple cytochrome P450-isoenzymes mRNA are expressed in dendritic cells. *International Archives of Allergy and Immunology*, 118(2–4), 358–361. <https://doi.org/10.1159/000024135>
- Silverberg, J. I., Hou, A., Warshaw, E. M., DeKoven, J. G., Maibach, H. I., Belsito, D. V., Zug, K. A., Taylor, J. S., Sasseville, D., Dunnick, C. A., Houle, M.-C., Atwater, A. R., Reeder, M. J., DeLeo, V. A., Pratt, M. D., Fowler, J. F., Zirwas, M. J., & Marks, J. G. (2022). Age-related differences in patch testing results among children: Analysis of North American Contact Dermatitis Group Data, 2001-2018. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 86(4), 818–826. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2021.07.030>
- Silvestre, M. C., & Reis, V. M. S. D. (2018). Evaluation of the profile of inflammatory cytokines, through immunohistochemistry, in the skin of patients with allergic contact dermatitis to nickel in the acute and chronic phases. *Anais Brasileiros De Dermatologia*, 93(6), 829–835. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20187126>
- Simon, D., Vassina, E., Yousefi, S., Kozłowski, E., Braathen, L. R., & Simon, H.-U. (2004). Reduced dermal infiltration of cytokine-expressing inflammatory cells in atopic dermatitis after short-term topical tacrolimus treatment. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(4), 887–895. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.05.066>
- Simonsen, A. B., Johansen, J. D., Deleuran, M., Mortz, C. G., & Sommerlund, M. (2017). Contact allergy in children with atopic dermatitis: A systematic review. *The British Journal of Dermatology*, 177(2), 395–405. <https://doi.org/10.1111/bjd.15628>
- Simpson, E. L., Bieber, T., Guttman-Yassky, E., Beck, L. A., Blauvelt, A., Cork, M. J., Silverberg, J. I., Deleuran, M., Kataoka, Y., Lacour, J.-P., Kingo, K., Worm, M., Poulin, Y., Wollenberg, A., Soo, Y., Graham, N. M. H., Pirozzi, G., Akinlade, B., Staudinger, H., ... SOLO 1 and SOLO 2 Investigators. (2016). Two Phase 3 Trials of Dupilumab versus Placebo in Atopic Dermatitis. *The New England Journal of Medicine*, 375(24), 2335–2348. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1610020>
- Slodownik, D., Levi, A., Lapidoth, M., & Moshe, S. (2022). Occupational Chronic Contact Dermatitis Successfully Treated with Dupilumab: A Case Series. *Dermatology (Basel, Switzerland)*, 1–3. <https://doi.org/10.1159/000524380>
- Smith, C. K., Moore, C. A., Elahi, E. N., Smart, A. T., & Hotchkiss, S. A. (2000). Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde, and cinnamic alcohol. *Toxicology and Applied*

Pharmacology, 168(3), 189–199. <https://doi.org/10.1006/taap.2000.9025>

Sølberg, J. B. K., Quaade, A. S., Jacobsen, S. B., Andersen, J. D., Kampmann, M.-L., Morling, N., Litman, T., Thyssen, J. P., & Johansen, J. D. (2022). The transcriptome of hand eczema assessed by tape stripping. *Contact Dermatitis*, 86(2), 71–79. <https://doi.org/10.1111/cod.14015>

Soltanipoor, M., Stilla, T., Riethmüller, C., Thyssen, J. P., Sluiter, J. K., Rustemeyer, T., Fischer, T. W., Kezic, S., & Angelova-Fischer, I. (2018). Specific barrier response profiles after experimentally induced skin irritation in vivo. *Contact Dermatitis*, 79(2), 59–66. <https://doi.org/10.1111/cod.12981>

Song, T. W., Sohn, M. H., Kim, E. S., Kim, K. W., & Kim, K.-E. (2006). Increased serum thymus and activation-regulated chemokine and cutaneous T cell-attracting chemokine levels in children with atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 36(3), 346–351. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02430.x>

Sowada, J., Schmalenberger, A., Ebner, I., Luch, A., & Tralau, T. (2014). Degradation of benzo[a]pyrene by bacterial isolates from human skin. *FEMS Microbiology Ecology*, 88(1), 129–139. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12276>

Ständer, S., Oppel, E., Thomas, P., & Summer, B. (2017). Evaluation of lymphocyte transformation tests as compared with patch tests in nickel allergy diagnosis. *Contact Dermatitis*, 76(4), 228–234. <https://doi.org/10.1111/cod.12751>

Starchenko, A., & Lauffenburger, D. A. (2018). In vivo systems biology approaches to chronic immune/inflammatory pathophysiology. *Current Opinion in Biotechnology*, 52, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.02.006>

Stejskal, V. D., Forsbeck, M., & Nilsson, R. (1990). Lymphocyte transformation test for diagnosis of isothiazolinone allergy in man. *The Journal of Investigative Dermatology*, 94(6), 798–802. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12874656>

Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463–466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>

Sud, A., Kinnersey, B., & Houlston, R. S. (2017). Genome-wide association studies of cancer: Current insights and future perspectives. *Nature Reviews. Cancer*, 17(11), 692–704. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.82>

Sukakul, T., Bruze, M., Mowitz, M., Antelmi, A., Bergendorff, O., Björk, J., Dahlin, J., Hamnerius, N., Hauksson, I., Isaksson, M., Lejding, T., Pontén, A., & Svedman, C. (2021). Contact allergy to oxidized linalool and oxidized limonene—Patch testing in consecutive dermatitis patients. *Contact Dermatitis*. <https://doi.org/10.1111/cod.13980>

Sun, X., Liu, L., Chen, S., Wang, J., Cai, X., Song, J., Zhou, M., Guo, D., Kuai, L., Ding, X., Li, B., & Li, X. (2022). Fibrinogen-Like Protein 1 as a Novel Biomarker of Psoriasis Severity. *Journal of Inflammation Research*, 15, 4637–4647. <https://doi.org/10.2147/JIR.S378953>

Sung, C. T., McGowan, M. A., Machler, B. C., & Jacob, S. E. (2019). Systemic Treatments for Allergic Contact Dermatitis. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 30(1), Article 1. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000435>

Sutterwala, F. S., Ogura, Y., Szczepanik, M., Lara-Tejero, M., Lichtenberger, G. S., Grant, E. P., Bertin, J., Coyle, A. J., Galán, J. E., Askenase, P. W., & Flavell, R. A. (2006). Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity*, 24(3), 317–327. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.02.004>

Svensson, A., Ofenloch, R. F., Bruze, M., Naldi, L., Cazzaniga, S., Elsner, P., Goncalo, M., Schuttelaar, M.-L. A., & Diepgen, T. L. (2018). Prevalence of skin disease in a population-based sample of adults from five European countries. *The British Journal of Dermatology*, 178(5), Article 5. <https://doi.org/10.1111/bjd.16248>

Swindells, K., Burnett, N., Rius-Diaz, F., González, E., Mihm, M. C., & González, S. (2004). Reflectance confocal microscopy may differentiate acute allergic and irritant contact dermatitis in vivo. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 50(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2003.08.005>

Tam, I., Hill, K. R., Park, J. M., & Yu, J. (2021). Skin tape stripping identifies gene transcript signature associated with allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 84(5), 308–316. <https://doi.org/10.1111/cod.13749>

Tamoutounour, S., Williams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., Dalod, M., Malissen, B., & Henri, S. (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity*, 39(5), 925–938. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.004>

Tan, J.-M., Lin, L. L., Lambie, D., Flewell-Smith, R., Jagirdar, K., Schaidler, H., Sturm, R. A., Prow, T. W., & Soyer, H. P. (2015). BRAF wild-type melanoma in situ arising in a BRAF V600E mutant dysplastic nevus. *JAMA Dermatology*, 151(4), 417–421. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2014.3775>

Tautvydaitė, L., Friis, U. F., Thyssen, J. P., & Johansen, J. D. (2020). Usability of a spot test for isothiazolinones. *Contact Dermatitis*, 82(3), 165–167. <https://doi.org/10.1111/cod.13389>

- Teo, Y., McFadden, J. P., White, I. R., Lynch, M., & Banerjee, P. (2019). Allergic contact dermatitis in atopic individuals: Results of a 30-year retrospective study. *Contact Dermatitis*, 81(6), 409–416. <https://doi.org/10.1111/cod.13363>
- Težak, Ž., Kondratovich, M. V., & Mansfield, E. (2010). US FDA and personalized medicine: In vitro diagnostic regulatory perspective. *Personalized Medicine*, 7(5), 517–530. <https://doi.org/10.2217/pme.10.53>
- Thawer-Esmail, F., Jakasa, I., Todd, G., Wen, Y., Brown, S. J., Kroboth, K., Campbell, L. E., O'Regan, G. M., McLean, W. H. I., Irvine, A. D., Kezic, S., & Sandilands, A. (2014). South African amaXhosa patients with atopic dermatitis have decreased levels of filaggrin breakdown products but no loss-of-function mutations in filaggrin. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(1), 280–282.e1-2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.053>
- Thierse, H.-J., Gamerdinger, K., Junkes, C., Guerreiro, N., & Weltzien, H. U. (2005). T cell receptor (TCR) interaction with haptens: Metal ions as non-classical haptens. *Toxicology*, 209(2), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.12.015>
- Thijs, J., Krastev, T., Weidinger, S., Buckens, C. F., de Bruin-Weller, M., Bruijnzeel-Koomen, C., Flohr, C., & Hijnen, D. (2015). Biomarkers for atopic dermatitis: A systematic review and meta-analysis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 15(5), 453–460. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000198>
- Thijs, J. L., Nierkens, S., Herath, A., Bruijnzeel-Koomen, C. A. F., Knol, E. F., Giovannone, B., de Bruin-Weller, M. S., & Hijnen, D. (2015). A panel of biomarkers for disease severity in atopic dermatitis. *Clinical & Experimental Allergy*, 45(3), 698–701. <https://doi.org/10.1111/cea.12486>
- Thijs, J. L., Strickland, I., Bruijnzeel-Koomen, C. A. F. M., Nierkens, S., Giovannone, B., Csomor, E., Sellman, B. R., Mustelin, T., Sleeman, M. A., de Bruin-Weller, M. S., Herath, A., Drylewicz, J., May, R. D., & Hijnen, D. (2017). Moving toward endotypes in atopic dermatitis: Identification of patient clusters based on serum biomarker analysis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.03.023>
- Thyssen, J. P., Carlsen, B. C., & Menné, T. (2008). Nickel sensitization, hand eczema, and loss-of-function mutations in the filaggrin gene. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 19(6), 303–307.
- Thyssen, J. P., Linneberg, A., Menné, T., Nielsen, N. H., & Johansen, J. D. (2009). The association between hand eczema and nickel allergy has weakened among young women in the general population following the Danish nickel regulation: Results from two cross-sectional studies. *Contact Dermatitis*, 61(6), 342–348. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2009.01625.x>
- Tian, Q., Price, N. D., & Hood, L. (2012). Systems cancer medicine: Towards realization of predictive, preventive, personalized and participatory (P4) medicine. *Journal of Internal Medicine*, 271(2), 111–121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2011.02498.x>
- Timmerman, J. G., Heederik, D., Spee, T., van Rooy, F. G., Krop, E. J. M., Koppelman, G. H., Rustemeyer, T., & Smit, L. a. M. (2016). Contact dermatitis in the construction industry: The role of filaggrin loss-of-function mutations. *The British Journal of Dermatology*, 174(2), 348–355. <https://doi.org/10.1111/bjd.14215>
- Toholka, R., Wang, Y.-S., Tate, B., Tam, M., Cahill, J., Palmer, A., & Nixon, R. (2015). The first Australian Baseline Series: Recommendations for patch testing in suspected contact dermatitis. *The Australasian Journal of Dermatology*, 56(2), 107–115. <https://doi.org/10.1111/ajd.12186>
- Tom, L. n., Dix, C. f., Hoang, V. I. t., Lin, L. I., Nufer, K. I., Tomihara, S., Prow, N. a., Soyer, H. p., Prow, T. w., & Ardigo, M. (2016). Skin microbiopsy for HPV DNA detection in cutaneous warts. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 30(12), e216–e217. <https://doi.org/10.1111/jdv.13548>
- Tracey, B. M., & Shuker, D. E. (1997). Characterization of azo coupling adducts of benzenediazonium ions with aromatic amino acids in peptides and proteins. *Chemical Research in Toxicology*, 10(12), 1378–1386. <https://doi.org/10.1021/tx970117+>
- Trembath, R. C., Clough, R. L., Rosbotham, J. L., Jones, A. B., Camp, R. D., Frodsham, A., Browne, J., Barber, R., Terwilliger, J., Lathrop, G. M., & Barker, J. N. (1997). Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Human Molecular Genetics*, 6(5), 813–820. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.5.813>
- Tsoi, L. C., Patrick, M. T., Shuai, S., Sarkar, M. K., Chi, S., Ruffino, B., Billi, A. C., Xing, X., Uppala, R., Zang, C., Fullmer, J., He, Z., Maverakis, E., Mehta, N. N., Perez White, B. E., Getsios, S., Helfrich, Y., Voorhees, J. J., Kahlenberg, J. M., ... Gudjonsson, J. E. (2022). Cytokine responses in nonlesional psoriatic skin as clinical predictor to anti-TNF agents. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 149(2), 640–649.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.07.024>
- Tsoi, L. C., Rodriguez, E., Degenhardt, F., Baurecht, H., Wehkamp, U., Volks, N., Szymczak, S., Swindell, W. R., Sarkar, M. K., Raja, K., Shao, S., Patrick, M., Gao, Y., Uppala, R., Perez White, B. E., Getsios, S., Harms, P. W., Maverakis, E., Elder, J. T., ... Weidinger, S. (2019). Atopic Dermatitis Is an IL-13-Dominant Disease with Greater Molecular Heterogeneity Compared to Psoriasis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 139(7), 1480–1489. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.12.018>

- Tsoi, L. C., Spain, S. L., Knight, J., Ellinghaus, E., Stuart, P. E., Capon, F., Ding, J., Li, Y., Tejasvi, T., Gudjonsson, J. E., Kang, H. M., Allen, M. H., McManus, R., Novelli, G., Samuelsson, L., Schalkwijk, J., Stähle, M., Burden, A. D., Smith, C. H., ... Trembath, R. C. (2012). Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. *Nature Genetics*, *44*(12), 1341–1348. <https://doi.org/10.1038/ng.2467>
- Tsoi, L. C., Stuart, P. E., Tian, C., Gudjonsson, J. E., Das, S., Zawistowski, M., Ellinghaus, E., Barker, J. N., Chandran, V., Dand, N., Duffin, K. C., Enerbäck, C., Esko, T., Franke, A., Gladman, D. D., Hoffmann, P., Kingo, K., Köks, S., Krueger, G. G., ... Elder, J. T. (2017). Large scale meta-analysis characterizes genetic architecture for common psoriasis associated variants. *Nature Communications*, *8*, 15382. <https://doi.org/10.1038/ncomms15382>
- Tuckermann, J. P., Kleiman, A., McPherson, K. G., & Reichardt, H. M. (2005). Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, *42*(1), 71–104. <https://doi.org/10.1080/10408360590888983>
- Tukey, R. H., & Strassburg, C. P. (2000). Human UDP-glucuronosyltransferases: Metabolism, expression, and disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *40*, 581–616. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.581>
- Turner, S., Carder, M., van Tongeren, M., McNamee, R., Lines, S., Hussey, L., Bolton, A., Beck, M. H., Wilkinson, M., & Agius, R. (2007). The incidence of occupational skin disease as reported to The Health and Occupation Reporting (THOR) network between 2002 and 2005. *The British Journal of Dermatology*, *157*(4), 713–722. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.08045.x>
- Ulfgren, A. K., Klareskog, L., & Lindberg, M. (2000). An immunohistochemical analysis of cytokine expression in allergic and irritant contact dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*, *80*(3), 167–170. <https://doi.org/10.1080/000155500750042899>
- Ungar, B., Garcet, S., Gonzalez, J., Dhingra, N., Correa da Rosa, J., Shemer, A., Krueger, J. G., Suarez-Farinas, M., & Guttman-Yassky, E. (2017). An Integrated Model of Atopic Dermatitis Biomarkers Highlights the Systemic Nature of the Disease. *The Journal of Investigative Dermatology*, *137*(3), 603–613. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.09.037>
- Uter, W., Aalto-Korte, K., Agner, T., Andersen, K. E., Bircher, A. J., Brans, R., Bruze, M., Diepgen, T. L., Foti, C., Giménez Arnau, A., Gonçalves, M., Goossens, A., McFadden, J., Paulsen, E., Svedman, C., Rustemeyer, T., White, I. R., Wilkinson, M., Johansen, J. D., & European Environmental Contact Dermatitis Research Group. (2020). The epidemic of methylisothiazolinone contact allergy in Europe: Follow-up on changing exposures. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, *34*(2), 333–339. <https://doi.org/10.1111/jdv.15875>
- Uter, W., Amario-Hita, J. C., Balato, A., Ballmer-Weber, B., Bauer, A., Belloni Fortina, A., Bircher, A., Chowdhury, M. M. U., Cooper, S. M., Czarnecka-Operacz, M., Dugonik, A., Gallo, R., Giménez-Arnau, A., Johansen, J. D., John, S. M., Kieć-Swierczyńska, M., Kmecl, T., Kręćisz, B., Larese Filon, F., ... Wilkinson, S. M. (2017). European Surveillance System on Contact Allergies (ESSCA): Results with the European baseline series, 2013/14. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, *31*(9), 1516–1525. <https://doi.org/10.1111/jdv.14423>
- Valentine-Thon, E., & Schiwara, H.-W. (2003). Validity of MELISA for metal sensitivity testing. *Neuro Endocrinology Letters*, *24*(1–2), 57–64.
- Veien, N. K. (2011). Systemic contact dermatitis. *International Journal of Dermatology*, *50*(12), 1445–1456. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05104.x>
- Visser, M. J., Landeck, L., Campbell, L. E., McLean, W. H. I., Weidinger, S., Calkoen, F., John, S. M., & Kezic, S. (2013). Impact of atopic dermatitis and loss-of-function mutations in the filaggrin gene on the development of occupational irritant contact dermatitis. *The British Journal of Dermatology*, *168*(2), 326–332. <https://doi.org/10.1111/bjd.12083>
- Visser, M. J., Verberk, M. M., Campbell, L. E., McLean, W. H. I., Calkoen, F., Bakker, J. G., van Dijk, F. J. H., Bos, J. D., & Kezic, S. (2014). Filaggrin loss-of-function mutations and atopic dermatitis as risk factors for hand eczema in apprentice nurses: Part II of a prospective cohort study. *Contact Dermatitis*, *70*(3), 139–150. <https://doi.org/10.1111/cod.12139>
- Vocanson, M., Achachi, A., Mutez, V., Cluzel-Tailhardat, M., Varlet, B. L., Rozières, A., Fournier, P., & Nicolas, J.-F. (2014). Human T cell priming assay: Depletion of peripheral blood lymphocytes in CD25(+) cells improves the in vitro detection of weak allergen-specific T cells. *Experientia Supplementum* (2012), *104*, 89–100. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0726-5_7
- Vocanson, M., Hennino, A., Cluzel-Tailhardat, M., Saint-Mezard, P., Benetiere, J., Chavagnac, C., Berard, F., Kaiserlian, D., & Nicolas, J.-F. (2006). CD8+ T cells are effector cells of contact dermatitis to common skin allergens in mice. *The Journal of Investigative Dermatology*, *126*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700174>
- Vocanson, M., Hennino, A., Rozières, A., Poyet, G., & Nicolas, J.-F. (2009). Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*, *64*(12), Article 12. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02082.x>
- Wang, B.-J. R., Shiao, J.-S., Chen, C.-J., Lee, Y.-C., & Guo, Y.-L. (2007). Tumour necrotizing factor-alpha promoter

- and GST-T1 genotype predict skin allergy to chromate in cement workers in Taiwan. *Contact Dermatitis*, 57(5), 309–315. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01242.x>
- Wang, D., & Beck, L. A. (2016). Immunologic Targets in Atopic Dermatitis and Emerging Therapies: An Update. *American Journal of Clinical Dermatology*, 17(5), 425–443. <https://doi.org/10.1007/s40257-016-0205-5>
- Wang, Y., & Tatakis, D. N. (2017). Human gingiva transcriptome during wound healing. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(4), 394–402. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12669>
- Warshaw, E. M., Zhang, A. J., DeKoven, J. G., Maibach, H. I., Belsito, D. V., Sasseville, D., Fowler, J. F., Fransway, A. F., Mathias, T., Pratt, M. D., Marks, J. G., Zug, K. A., Zirwas, M. J., Taylor, J. S., & DeLeo, V. A. (2019). Epidemiology of nickel sensitivity: Retrospective cross-sectional analysis of North American Contact Dermatitis Group data 1994-2014. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(3), 701–713. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.09.058>
- Watanabe, H., Gehrke, S., Contassot, E., Roques, S., Tschopp, J., Friedmann, P. S., French, L. E., & Gaide, O. (2008). Danger signaling through the inflammasome acts as a master switch between tolerance and sensitization. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(9), 5826–5832. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5826>
- Weber, F. C., Esser, P. R., Müller, T., Ganesan, J., Pellegatti, P., Simon, M. M., Zeiser, R., Idzko, M., Jakob, T., & Martin, S. F. (2010). Lack of the purinergic receptor P2X(7) results in resistance to contact hypersensitivity. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(12), 2609–2619. <https://doi.org/10.1084/jem.20092489>
- Weber, F. C., Németh, T., Csepregi, J. Z., Dudeck, A., Roers, A., Ozsvári, B., Oswald, E., Puskás, L. G., Jakob, T., Mócsai, A., & Martin, S. F. (2015). Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(1), 15–22. <https://doi.org/10.1084/jem.20130062>
- Wedig, J. H., & Maibach, H. I. (1981). Percutaneous penetration of dipyrithione in man: Effect of skin color (race). *Journal of the American Academy of Dermatology*, 5(4), 433–438. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(81\)70105-1](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(81)70105-1)
- Weidinger, S., Beck, L. A., Bieber, T., Kabashima, K., & Irvine, A. D. (2018). Atopic dermatitis. *Nature Reviews. Disease Primers*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0001-z>
- Wen, H.-J., Wang, Y.-J., Lin, Y.-C., Chang, C.-C., Shieh, C.-C., Lung, F.-W., & Guo, Y. L. (2011). Prediction of atopic dermatitis in 2-yr-old children by cord blood IgE, genetic polymorphisms in cytokine genes, and maternal mentality during pregnancy. *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 22(7), 695–703. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2011.01177.x>
- Wennervaldt, M., Ahlström, M. G., Menné, T., Thyssen, J. P., & Johansen, J. D. (2021). Nickel release from metallic earrings: A survey of the Danish market and validation of the nickel spot test. *Contact Dermatitis*. <https://doi.org/10.1111/cod.13832>
- Werfel, T., Hentschel, M., Renz, H., & Kapp, A. (1997). Analysis of the phenotype and cytokine pattern of blood- and skin-derived nickel specific T cells in allergic contact dermatitis. *International Archives of Allergy and Immunology*, 113(1–3), Article 1–3. <https://doi.org/10.1159/000237610>
- Westphal, G. A., Reich, K., Schulz, T. G., Neumann, C., Hallier, E., & Schnuch, A. (2000). N-acetyltransferase 1 and 2 polymorphisms in para-substituted arylamine-induced contact allergy. *The British Journal of Dermatology*, 142(6), 1121–1127. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2000.03536.x>
- Weyler, W., Hsu, Y. P., & Breakefield, X. O. (1990). Biochemistry and genetics of monoamine oxidase. *Pharmacology & Therapeutics*, 47(3), 391–417. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90064-9)
- Wigger-Alberti, W., & Elsner, P. (1998). Do barrier creams and gloves prevent or provoke contact dermatitis? *American Journal of Contact Dermatitis: Official Journal of the American Contact Dermatitis Society*, 9(2), 100–106.
- Wijnhoven, S., Ezendam, J., Schuur, A., Loveren, H., Van, L., & Contact, E. (2008). *Allergens in Consumer Products*.
- Williams, J., Cahill, J., & Nixon, R. (2007). Occupational autoeczematization or atopic eczema precipitated by occupational contact dermatitis? *Contact Dermatitis*, 56(1), 21–26. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01005.x>
- Willis, C. M., Stephens, C. J., & Wilkinson, J. D. (1993). Differential patterns of epidermal leukocyte infiltration in patch test reactions to structurally unrelated chemical irritants. *The Journal of Investigative Dermatology*, 101(3), 364–370. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12365561>
- Wilson, B., Balogh, E., Rayhan, D., Shitabata, P., Yousefzadeh, D., & Feldman, S. (2021). Chromate-Induced Allergic Contact Dermatitis Treated With Dupilumab. *Journal of Drugs in Dermatology: JDD*, 20(12), 1340–1342. <https://doi.org/10.36849/jdd.6246>
- Wisgrill, L., Werner, P., Jalonen, E., Berger, A., Lauerma, A., Alenius, H., & Fyhrquist, N. (2020). Integrative transcriptome analysis deciphers mechanisms of nickel contact dermatitis. *Allergy*. <https://doi.org/10.1111/all.14519>
- Wishart, D. S., Jewison, T., Guo, A. C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., Djoumbou, Y., Mandal, R., Aziat, F., Dong, E., Bouatra, S., Sinelnikov, I., Arndt, D., Xia, J., Liu, P., Yallou, F., Bjorndahl, T., Perez-Pineiro, R., Eisner, R., ...

- Scalbert, A. (2013). HMDB 3.0—The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D801-807. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1065>
- Wiszniewska, M., & Walusiak-Skorupa, J. (2015). Recent Trends in Occupational Contact Dermatitis. *Current Allergy and Asthma Reports*, 15(7), 43. <https://doi.org/10.1007/s11882-015-0543-z>
- Witten, D. M., Tibshirani, R., & Hastie, T. (2009). A penalized matrix decomposition, with applications to sparse principal components and canonical correlation analysis. *Biostatistics (Oxford, England)*, 10(3), 515–534. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxp008>
- Wollenberg, A., Barbarot, S., Bieber, T., Christen-Zaech, S., Deleuran, M., Fink-Wagner, A., Gieler, U., Girolomoni, G., Lau, S., Muraro, A., Czarnecka-Operacz, M., Schäfer, T., Schmid-Grendelmeier, P., Simon, D., Szalai, Z., Szepietowski, J. C., Taïeb, A., Torrelo, A., Werfel, T., ... European Dermatology Forum (EDF), the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV), the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), the European Task Force on Atopic Dermatitis (ETFAD), European Federation of Allergy and Airways Diseases Patients' Associations (EFA), the European Society for Dermatology and Psychiatry (ESDaP), the European Society of Pediatric Dermatology (ESPD), Global Allergy and Asthma European Network (GA2LEN) and the European Union of Medical Specialists (UEMS). (2018). Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: Part I. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 32(5), 657–682. <https://doi.org/10.1111/jdv.14891>
- Wright, A. M., & Cahill, J. L. (2016). Airborne exposure to methylisothiazolinone in paint causing allergic contact dermatitis: An Australian perspective. *The Australasian Journal of Dermatology*, 57(4), 294–295. <https://doi.org/10.1111/ajd.12384>
- Yamada, M., Melville, E., Cowin, A. J., Prow, T. W., & Kopecki, Z. (2021). Microbiopsy-based minimally invasive skin sampling for molecular analysis is acceptable to Epidermolysis Bullosa Simplex patients where conventional diagnostic biopsy was refused. *Skin Research and Technology: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 27(3), 461–463. <https://doi.org/10.1111/srt.12971>
- Yasukawa, S., Miyazaki, Y., Yoshii, C., Nakaya, M., Ozaki, N., Toda, S., Kuroda, E., Ishibashi, K., Yasuda, T., Natsuaki, Y., Mi-ichi, F., Iizasa, E., Nakahara, T., Yamazaki, M., Kabashima, K., Iwakura, Y., Takai, T., Saito, T., Kurosaki, T., ... Hara, H. (2014). An ITAM-Syk-CARD9 signalling axis triggers contact hypersensitivity by stimulating IL-1 production in dendritic cells. *Nature Communications*, 5, 3755. <https://doi.org/10.1038/ncomms4755>
- Yasukochi, Y., Nakahara, T., Abe, T., Kido-Nakahara, M., Kohda, F., Takeuchi, S., Hagihara, A., & Furue, M. (2014). Reduction of serum TARC levels in atopic dermatitis by topical anti-inflammatory treatments. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 32(3), 240–245. <https://doi.org/10.12932/AP0419.32.3.2014>
- Yi, T., Wang, X., Kelly, L. M., An, J., Xu, Y., Sailer, A. W., Gustafsson, J.-A., Russell, D. W., & Cyster, J. G. (2012). Oxysterol gradient generation by lymphoid stromal cells guides activated B cell movement during humoral responses. *Immunity*, 37(3), 535–548. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.015>
- Yoosuf, N., Navarro, J. F., Salmén, F., Ståhl, P. L., & Daub, C. O. (2020). Identification and transfer of spatial transcriptomics signatures for cancer diagnosis. *Breast Cancer Research: BCR*, 22(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1242-9>
- Zahid, S., Mustafa, A., Dina, A., Sawsan, B., Felwa, A., Mohammed, G., & Hasan, A. (2019). Nickel challenge up regulates CD69 expression on T lymphocyte sub-sets from patients with nickel induced contact dermatitis. *African Health Sciences*, 19(1), 1460–1466. <https://doi.org/10.4314/ahs.v19i1.19>
- Zhai, H., & Maibach, H. I. (1996). Percutaneous penetration (dermatopharmacokinetics) in evaluating barrier creams. *Current Problems in Dermatology*, 25, 193–205. <https://doi.org/10.1159/000425530>
- Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., & Wang, X. (2012). Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *Journal of Proteomics*, 75(4), 1079–1088. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.10.027>
- Zhang, H., Lin, L., & Qiang, B. (2012). *A semantic wrapper of deep web data source based on RDF view*. 8, 3527–3539.
- Zinkevičienė, A., Kainov, D., Lastauskienė, E., Kvedarienė, V., Bychkov, D., Byrne, M., & Girkontaitė, I. (2015). Serum Biomarkers of Allergic Contact Dermatitis: A Pilot Study. *International Archives of Allergy and Immunology*, 168(3), 161–164. <https://doi.org/10.1159/000442749>
- Zug, K. A., Pham, A. K., Belsito, D. V., DeKoven, J. G., DeLeo, V. A., Fowler, J. F., Fransway, A. F., Maibach, H. I., Marks, J. G., Mathias, C. G. T., Pratt, M. D., Sasseville, D., Storrs, F. J., Taylor, J. S., Warshaw, E. M., & Zirwas, M. J. (2014). Patch testing in children from 2005 to 2012: Results from the North American contact dermatitis group. *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 25(6), 345–355. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000083>

Eczémas de contact aux produits chimiques : de la recherche de biomarqueurs au développement de nouvelles approches de diagnostic moléculaire

L'eczéma de contact (EC) est une dermatose inflammatoire fréquente, induite par l'exposition répétée de la peau à des produits chimiques présents dans notre environnement. La distinction entre les formes allergique (ECA) et irritante (ECI) des EC s'avère souvent difficile en pratique clinique.

Ce projet de thèse avait pour objectif premier de caractériser les signatures moléculaires des inflammations cutanées induites par l'exposition aux allergènes (haptènes) et aux irritants. Pour ce faire, nous avons conduit trois études cliniques translationnelles chez des patients suspectés d'ECA, en phase active de la maladie ou lors de la réalisation d'un bilan allergologique.

Nos travaux ont mis en évidence (i) l'existence de profils moléculaires et de voies de signalisation uniques caractérisant chaque inflammation. Nous avons aussi mis en évidence (ii) que le même profil de biomarqueurs d'allergie est exprimé à la fois dans les lésions actives d'ECA et celles induites après la pose de patch-tests lors du bilan allergologique.

Nous avons ensuite développé (iii) des méthodes de « machine learning » afin d'identifier et valider des algorithmes de diagnostic basé sur les niveaux d'expression d'un set minimum de biomarqueurs. Nous avons ainsi évalué les performances de ces combinaisons de biomarqueurs et montré que (iv) leur niveau d'expression corrèle avec l'intensité clinique des réactions ainsi que la dose d'allergène auquel l'individu est exposé. Finalement, nous avons validé leur efficacité pour (v) stratifier les patients dès la première consultation avant la réalisation du bilan allergologique, ou encore pour (vi) pour optimiser l'interprétation des résultats lors de ce bilan.

L'ensemble de ce travail démontre que l'analyse moléculaire de l'inflammation cutanée induite par les produits chimiques aide à renforcer le diagnostic clinique des EC. Ces résultats ouvrent également la voie au développement d'outils diagnostiques innovants, qui permettront de simplifier et d'améliorer à terme la prise en charge des patients.

Contact dermatitis: from biomarker discovery to the development of new molecular diagnostic approaches

Contact dermatitis (CD) is a common inflammatory skin disease induced by repeated exposure of the skin to environmental chemicals. The distinction between allergic (ACD) and irritant (ICD) forms of CD is often challenging in clinical practice.

The aim of this thesis was to characterize the molecular signatures of skin inflammation induced by exposure to contact allergens and irritants. To this end, we performed three translational clinical studies including patients suffering from CD, in the active phase of their disease or undergoing allergology workups.

Our results demonstrated (i) the existence of unique molecular profiles and signaling pathways characterizing each inflammation. We also showed that (ii) the same panel of allergy biomarkers is expressed in both active ACD lesions and relevant positive patch-test reactions.

(iii) Using machine learning approaches, we identified and validated diagnostic algorithms based on the expression level of a minimal set of biomarkers. We evaluated the performance of these biomarker combinations and showed that (iv) their expression level correlates with the intensity of the clinical reactions as well as with the dose of allergen applied to the skin; and finally, (v) their detection could allow patient stratification as early as the first consultation; and (vi) optimize the interpretation of patch-test results.

This work demonstrates that molecular analysis of chemical-induced skin inflammation could help to strengthen the clinical diagnosis of CD. These results also pave the way for the development of innovative diagnostic tools, which will simplify and refine the management of CD patients.

Mots-clés : eczéma de contact – allergie – irritation – biomarqueurs – transcriptome – diagnostic – patch test – haptènes – irritants

Lieu de la thèse : Centre International de Recherche en Infectiologie – INSERM U1111 – 21 Avenue Tony Garnier - 69365 Lyon Cedex 07, France

Eczémas de contact aux produits chimiques : de la recherche de biomarqueurs au développement de nouvelles approches de diagnostic moléculaire

L'eczéma de contact (EC) est une dermatose inflammatoire fréquente, induite par l'exposition répétée de la peau à des produits chimiques présents dans notre environnement. La distinction entre les formes allergique (ECA) et irritante (ECI) des EC s'avère souvent difficile en pratique clinique.

Ce projet de thèse avait pour objectif premier de caractériser les signatures moléculaires des inflammations cutanées induites par l'exposition aux allergènes (haptènes) et aux irritants. Pour ce faire, nous avons conduit trois études cliniques translationnelles chez des patients suspectés d'ECA, en phase active de la maladie ou lors de la réalisation d'un bilan allergologique.

Nos travaux ont mis en évidence (i) l'existence de profils moléculaires et de voies de signalisation uniques caractérisant chaque inflammation. Nous avons aussi mis en évidence (ii) que le même profil de biomarqueurs d'allergie est exprimé à la fois dans les lésions actives d'ECA et celles induites après la pose de patch-tests lors du bilan allergologique.

Nous avons ensuite développé (iii) des méthodes de « machine learning » afin d'identifier et valider des algorithmes de diagnostic basé sur les niveaux d'expression d'un set minimum de biomarqueurs. Nous avons ainsi évalué les performances de ces combinaisons de biomarqueurs et montré que (iv) leur niveau d'expression corrèle avec l'intensité clinique des réactions ainsi que la dose d'allergène auquel l'individu est exposé. Finalement, nous avons validé leur efficacité pour (v) stratifier les patients dès la première consultation avant la réalisation du bilan allergologique, ou encore pour (vi) pour optimiser l'interprétation des résultats lors de ce bilan.

L'ensemble de ce travail démontre que l'analyse moléculaire de l'inflammation cutanée induite par les produits chimiques aide à renforcer le diagnostic clinique des EC. Ces résultats ouvrent également la voie au développement d'outils diagnostiques innovants, qui permettront de simplifier et d'améliorer à terme la prise en charge des patients.

Contact dermatitis: from biomarker discovery to the development of new molecular diagnostic approaches

Contact dermatitis (CD) is a common inflammatory skin disease induced by repeated exposure of the skin to environmental chemicals. The distinction between allergic (ACD) and irritant (ICD) forms of CD is often challenging in clinical practice.

The aim of this thesis was to characterize the molecular signatures of skin inflammation induced by exposure to contact allergens and irritants. To this end, we performed three translational clinical studies including patients suffering from CD, in the active phase of their disease or undergoing allergology workups.

Our results demonstrated (i) the existence of unique molecular profiles and signaling pathways characterizing each inflammation. We also showed that (ii) the same panel of allergy biomarkers is expressed in both active ACD lesions and relevant positive patch-test reactions.

(iii) Using machine learning approaches, we identified and validated diagnostic algorithms based on the expression level of a minimal set of biomarkers. We evaluated the performance of these biomarker combinations and showed that (iv) their expression level correlates with the intensity of the clinical reactions as well as with the dose of allergen applied to the skin; and finally, (v) their detection could allow patient stratification as early as the first consultation; and (vi) optimize the interpretation of patch-test results.

This work demonstrates that molecular analysis of chemical-induced skin inflammation could help to strengthen the clinical diagnosis of CD. These results also pave the way for the development of innovative diagnostic tools, which will simplify and refine the management of CD patients.

Mots-clés : eczéma de contact – allergie – irritation – biomarqueurs – transcriptome – diagnostic – patch test – haptènes – irritants

Lieu de la thèse : Centre International de Recherche en Infectiologie – INSERM U1111 – 21 Avenue Tony Garnier - 69365 Lyon Cedex 07, France