



HAL
open science

**Étude des évènements précoces impliqués dans
l'activation des cellules dendritiques humaines induite
par le thimerosal : rôle du stress oxydant : implication
dans le développement de nouvelles méthodes
alternatives à l'expérimentation animale**

Camille Migdal

► **To cite this version:**

Camille Migdal. Étude des évènements précoces impliqués dans l'activation des cellules dendritiques humaines induite par le thimerosal : rôle du stress oxydant : implication dans le développement de nouvelles méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10087 . tel-00708505

HAL Id: tel-00708505

<https://theses.hal.science/tel-00708505>

Submitted on 15 Jun 2012

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

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

THESE

Présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON 1

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

par

Camille MIGDAL

Présentée et soutenue publiquement le 29 Juin 2010.

Etude des évènements précoces impliqués dans l'activation des cellules dendritiques humaines induite par le thimerosal : rôle du stress oxydant.

Implication dans le développement de nouvelles méthodes alternatives à l'expérimentation animale.

JURY :	Dr. Magalie TAILHARDAT	Examinatrice
	Pr. Marc PALLARDY	Examineur
	Pr. Jean-François NICOLAS	Examineur
	Pr. Stefan Martin	Examineur
	Dr. Jean-Claude OURLIN,	Rapporteur
	Dr. Frank ANTONICELLI	Rapporteur
	Dr Mireille SERRES	Directrice de thèse

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé (EDISS)

A mon père F. Migdal,

A ma mère S. Migdal,

A Ludo M.

Des chercheurs qui cherchent, on en trouve. Des chercheurs qui trouvent, on en cherche.

Charles de Gaulle.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

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

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur C. Gautier

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

TABLE DES MATIERES

Table des matières	4
Liste des abréviations	8
Liste des figures et tableaux	9
INTRODUCTION GENERALE	10
PARTIE 1	
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	13
Chapitre 1 : Peau et Immunité cutanée	13
I. La peau	13
1. L'épiderme	13
2. La jonction dermo-épidermique et le derme	16
3. L'hypoderme	16
II. Les acteurs de l'immunité cutanée	16
1. L'immunité innée ou mécanisme de défense non spécifique	17
↳ La réaction inflammatoire	
2. L'immunité adaptative ou mécanisme de défense spécifique	18
3. Les cellules dendritiques	20
3.1 Origine	20
3.2. Les cellules dendritiques de la peau	21
↳ Les cellules de Langerhans	
↳ Les cellules dendritiques du derme	
3.3. Rôle des sous-populations de DCs dans l'induction de la réponse spécifique	22
3.4. Cycle de vie des cellules dendritiques	22
3.5. Fonction des cellules dendritiques : entre immunité innée et adaptative	23
① Reconnaissance et internalisation des pathogènes	
② Activation et migration vers les organes lymphoïdes secondaires	
③ Activation lymphocytaire	
4. Génération <i>in vitro</i> de cellules dendritiques humaines	26
4.1. A partir de progéniteurs CD34 ⁺	26
4.2. A partir de progéniteurs CD14 ⁺	26

Chapitre 2 : Stress oxydant et hypersensibilité retardée de type IV	27
I. L'eczéma allergique de contact	27
1. Introduction	27
2. Physiopathologie de l'eczéma allergique de contact	28
II. Modèles d'études de l'eczéma allergique de contact	30
1. Les modèles d'études animaux	30
1.1. Le cobaye	30
1.2. Le modèle murin	31
2. Les modèles d'études <i>in vitro</i>	31
2.1. Etude des interactions haptènes-protéines	32
↳ Les modèles d'études <i>in silico</i>	
↳ Les modèles d'études <i>in chemico</i>	
2.2. Etude des modifications phénotypiques et de la production de cytokines	33
↳ Cellules dendritiques	
↳ Lignées cellulaires leucémiques myéломocytaires	
↳ Kératinocytes	
2.3. Activation des lymphocytes T naïfs	37
2.4. Les explants cutanés et modèles de peau reconstruite	37
2.5. Analyse génomique des cellules dendritiques	38
III. Voies de signalisation impliquées dans l'activation des cellules dendritiques	39
1. Activation des DCs en réponse au LPS et au TNF- α	39
2. Activation des DCs en réponse aux allergènes	39
IV. Stress oxydant	40
1. Introduction (<i>revue soumise à Médecine/Sciences</i>)	40
Stress oxydant et physiopathologies cutanées.	41
2. Stress oxydant et pathologies cutanées	57
3. Stress oxydant et activation des cellules dendritiques	57
4. Stress oxydant et voies de signalisation	59
4.1. Voies MAPKs et NF- κ B	59
4.2. La voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE	60
 OBJECTIFS DES TRAVAUX	 62

RESULTATS 65

↪ ARTICLE 1 : 67

Responsiveness of human monocyte-derived dendritic cells to thimerosal and mercury derivatives.

Migdal C, Tailhardat M, Courtellemont P, Haftek M, Serres M. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010.

- In press. Available online.

↪ ARTICLE 2 : 75

Sensitization effect of thimerosal is mediated in vitro via reactive oxygen species and calcium signaling.

Migdal C, Foggia L, Tailhardat M, Courtellemont P, Haftek M, Serres M. *Toxicology* 2010.

- In press. Available online.

↪ ARTICLE 3 : 86

U937 apoptosis induced by sensitizers is independent of CD86 expression and is elicited by mitochondrial ROS pathway: Protecting effect of thiol-containing antioxidants.

Migdal C, Tailhardat M, Courtellemont P, Haftek M, Serres M.

- En révision pour *Toxicology Letters*.

DISCUSSION 122

PARTIE 2

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 124

Chapitre 3 : Impact de nanoparticules hybrides organiques-inorganiques

(TiO₂/PABA) sur les cellules dendritiques humaines 124

I. Les nanoparticules 124

1. Introduction 124

2. Procédé de fabrication des nanoparticules manufacturées 126

3. Risques pour la santé 127

II. Les nanoparticules d'oxyde de titane 127

1. Oxyde de titane et rayonnement ultra-violets 127

2. Les rayonnements ultra-violets : rappel	128
3. Pénétration cutanée des TiO ₂ -NPs	130
4. Toxicité des TiO ₂ -NPs	130
III. TiO ₂ -NPs et cellules dendritiques	131
IV. Nanoparticules hybrides organiques/inorganiques	133
1. Définition	133
2. TiO ₂ /PABA NPs	133
 OBJECTIFS DES TRAVAUX	 135
 RÉSULTATS	 136
 ↳ ARTICLE 4 :	 137
Internalisation of hybrid titanium dioxide/<i>para</i>-amino benzoic acid nanoparticles in human dendritic cells did not induce toxicity and changes in their functions.	
<u>Migdal C</u> , Rahal R, Rubod A, Callejon S, Colomb E, Atrux-Tallau N, Haftek M, Vincent C, Serres M, Daniele S.	
➤ Soumis à <i>Toxicology Letters</i>	
 DISCUSSION	 163
 ANNEXES	
 TRAVAUX COLLABORATIFS	 165
 ↳ ARTICLE 5 :	 168
Characterization of early events involved in human dendritic cell maturation induced by sensitizers: cross talk between MAPK signalling pathways.	
Trompezinski S, <u>Migdal C</u> , Tailhardat M, Le Varlet B, Courtellemont P, Haftek M, Serres M. 2008. <i>Toxicol Appl Pharmacol</i> 230 : 397-406.	
 COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	 178
 REFERENCES	 179

LISTE DES ABREVIATIONS

ASK-1 : <i>Apoptosis Signal-regulating Kinase 1</i>	MEC : matrice extracellulaire
BB : base de Brandowski	MEST : <i>Mouse Ear Swelling Test</i>
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	MI : méthylisothiazolinone
CPA : cellule présentatrice de l'antigène	mono-DCs : cellules dendritiques générées à partir de monocytes
DCs : cellules dendritiques	NAC : N-acetyl-L-cystéine
DDCs : cellules dendritiques du derme	NK : tueuses naturelles (<i>Natural Killer</i>)
DTT : dithiothréitol	NPs : nanoparticules
EAC : eczéma allergique de contact	OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique
ERA : espèces réactives de l'azote	PABA : acide para-aminobenzoïque
ERO : espèces réactives de l'oxygène	PAMPs : <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
GB : granules de Birbeck	PRR : <i>Pattern Recognition Receptors</i>
GL : ganglion lymphatique	QSARs : <i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
GPMT : <i>Guinea Pig Maximization Test</i>	SAPK : <i>Stress-Activated Protein Kinase</i>
GSH : glutathion réduit	SOD : superoxyde dismutase
GSSG : glutathion oxydé	TiO ₂ -NPs : nanoparticules d'oxyde de titane
h-CLAT : <i>human Cell Line Activation Protocol</i>	TLR : <i>Toll-Like Receptor</i>
HO-1 : hème oxygénase 1	Trx : thiorédoxine
HSR : réaction d'hypersensibilité retardée	TSA : acide thiosalicylique
KC : kératinocytes	UV : ultra-violet
LB : lymphocyte B	
LCs : cellules de Langerhans	
LLNA : <i>Local Lymph Node Assay</i>	
LT : lymphocyte T	
MAPK: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>	
MCI : méthylchloroisothiazolinone	

LISTE DES FIGURES et TABLEAUX

Figure 1 : Structure de la peau.	14
Figure 2 : Représentation simplifiée de la réaction inflammatoire.	19
Figure 3 : Origine des cellules dendritiques.	20
Figure 4 : Eczéma allergique de contact au nickel d'une montre métallique.	27
Figure 5 : La réaction d'hypersensibilité retardée de type IV.	29
Figure 6 : Vue générale de la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE.	60
Figure 7 : Les deux approches d'élaboration des nanoparticules.	126
Figure 8 : Représentation du spectre solaire.	129
Figure 9 : Les mécanismes de capture de corps étrangers par les cellules dendritiques.	132
Figure 10 : Nanoparticules hybrides TiO ₂ /PABA.	134
Figure 11 : Spectre d'absorption des TiO ₂ /PABA NPs.	134
Tableau 1 : Résumé des défenses non spécifiques de la peau.	17
Tableau 2 : Les chimiokines pro-inflammatoires.	19
Tableau 3 : Les différents ligands des TLRs.	24
Tableau 4 : Principaux domaines d'applications des nanoparticules.	125

INTRODUCTION GENERALE

L'eczéma allergique de contact (EAC) ou dermatite de contact est une pathologie inflammatoire cutanée de plus en plus fréquente. Il s'agit d'une sensibilisation vis-à-vis de substances chimiques, non-protéiques et de faibles poids moléculaires appelés haptènes, en contact répété avec la peau.

Les haptènes responsables de l'EAC sont nombreux, et présents dans l'environnement quotidien et professionnel : métaux, solvants, médicaments, plantes, textiles. L'industrie cosmétique utilise plus de 3000 ingrédients de parfumerie dont une grande majorité peut être responsable de réactions allergiques.

A l'heure actuelle, le pouvoir sensibilisant d'une molécule est évalué principalement grâce à des modèles animaux. Cependant, le 7ème amendement de la directive cosmétique européenne prévoit, pour 2013, l'interdiction de l'expérimentation animale pour le test de toute nouvelle substance cosmétique potentiellement sensibilisante. La complexité des mécanismes de l'EAC ne permet pas pour l'instant la validation de méthodes alternatives prédictives pour l'évaluation du potentiel sensibilisant, cependant, de nouvelles approches basées sur des modèles acellulaires ou cellulaires semblent prometteuses. Ainsi, la compréhension et la reproduction *in vitro* des mécanismes de l'EAC permettent le développement de nouvelles stratégies.

L'étude de la réponse des cellules dendritiques (DCs) aux allergènes est un axe de recherche important parmi ces stratégies, qui offrent de nombreux paramètres d'études basés sur la capacité des DCs à s'activer en réponse à un allergène (et pas à une substance non-sensibilisante ou irritante). Ce processus d'activation peut être modélisé *in vitro* en utilisant des DCs générés à partir de monocytes ou de lignées humaines. En effet, ces modèles cellulaires répondent aux allergènes par une augmentation de l'expression de marqueurs spécifiques des DCs matures, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et leur capacité à induire une réponse lymphocytaire proliférative.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont pour but une meilleure compréhension des mécanismes responsables de l'activation des cellules dendritiques (DCs) induite *in vitro* par des allergènes de contact, et plus particulièrement par le thimerosal, et s'inscrivent dans une stratégie visant à élaborer des modèles biologiques fiables pour la discrimination allergène/irritant.

Ce travail a été réalisé sur deux modèles cellulaires différents, des DCs générées à partir de monocytes CD14⁺ (mono-DCs) et la lignée leucémique promyélocytaire U937. Il a pour but la caractérisation des événements intracellulaires précoces impliqués dans l'activation des DCs en réponse aux allergènes en privilégiant comme axe de recherche le rôle du stress oxydant.

Ce mémoire s'organise de la façon suivante :

En premier, une introduction bibliographique inclut un rappel sur la peau et les constituants de l'immunité cutanée (chapitre 1) et traite la notion de stress oxydant dans la physiopathologie de l'EAC (chapitre 2). La partie résultat est présentée sous forme d'articles et suivi d'une discussion.

La deuxième partie de ce mémoire (chapitre 3) aborde une thématique un peu différente et relate les travaux réalisés avec des nanoparticules d'oxyde de titane (TiO₂-NPs). De part leurs puissantes propriétés de filtres ultra-violet (UV) les TiO₂-NPs sont contenues dans de nombreuses crèmes solaires. Celles-ci sont appliquées de manière répétée sur la peau, soulevant la question d'un éventuel risque de sensibilisation. Basé sur le modèle cellulaire des mono-DCs pour le test de discrimination *in vitro* du pouvoir sensibilisant, l'effet des TiO₂-NPs sur le processus d'activation et l'induction d'un stress oxydant dans les DCs a été étudié. De plus, au vu de leur utilisation et afin de compléter l'étude, l'effet sur les DCs des TiO₂-NPs irradiées (par des UV ou un simulateur solaire) a été évalué en termes de toxicité et d'induction d'un stress oxydant. Cette partie se compose d'une introduction bibliographique sur les NPs et plus particulièrement sur les NPs d'oxyde de titane (TiO₂-NPs) contenues dans les crèmes solaires et les résultats sont présentés sous forme d'un article traitant des effets de ces TiO₂-NPs sur les mono-DCs. Une partie discussion clôturera le chapitre.

Enfin, dans la partie annexe, sont présentés les résultats issus de travaux collaboratifs au sein de l'équipe. Ils concernent le rôle des voies MAPKs et notamment p38 MAPK, JNK et Erk1/2 dans l'activation des DCs induite par des allergènes. Une partie des résultats obtenus est illustrée par un article. Cette partie annexe comprend également un récapitulatif des posters et communications orales présentés lors de congrès.

PARTIE 1

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Peau et Immunité cutanée

I. La peau

La peau est un organe complexe, pluri-tissulaire, d'origine embryologique différente (ectodermique et mésodermique). Il s'agit de l'organe le plus lourd (4 kg soit 7% de la masse corporelle totale) et le plus étendu (entre 1,5 et 2 m² chez l'adulte) du corps humain. Tissu de revêtement en continuité avec les muqueuses, la première fonction de la peau est de constituer une barrière physique contre l'environnement extérieur. Loin d'être un tissu inerte, la peau est un organe dynamique, qui s'adapte en permanence pour supporter les agressions extérieures, qu'elles soient physiques, chimiques, biologiques ou mécaniques. Elle assure ainsi de multiples fonctions :

1) une fonction de protection vis-à-vis du monde extérieur. La peau limite la perte insensible en eau, maintient une pression osmotique adéquate, protège des pathogènes (desquamation, peptides antimicrobiens, pH acide) et du rayonnement solaire (mélanine)

2) une fonction sensitive. La peau est le siège sensoriel du toucher, elle renferme des mécanorécepteurs, des thermorécepteurs et des récepteurs sensoriels à la douleur (nocicepteurs)

3) une fonction thermorégulatrice (glandes sudoripares et système pileux)

4) une fonction métabolique (synthèse de la vitamine D, processus de transformation d'hormones, réserve graisseuse)

5) une fonction immunitaire, notamment par la présence de cellules dendritiques, qui sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) « professionnelles » capables d'activer les lymphocytes T (LT).

La structure de la peau est composée de trois compartiments distincts : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1).

1. L'épiderme

L'épiderme, partie supérieure de la peau en contact direct avec l'extérieur, est un épithélium stratifié, squameux et kératinisé qui se compose de plusieurs sous-couches superposées (de l'intérieur vers l'extérieur : couche basale ou *stratum basale*, couche épineuse ou *stratum spinosum*, couche granuleuse ou *stratum granulosum*, couche claire ou *stratum lucidum* et couche cornée ou *stratum corneum*).

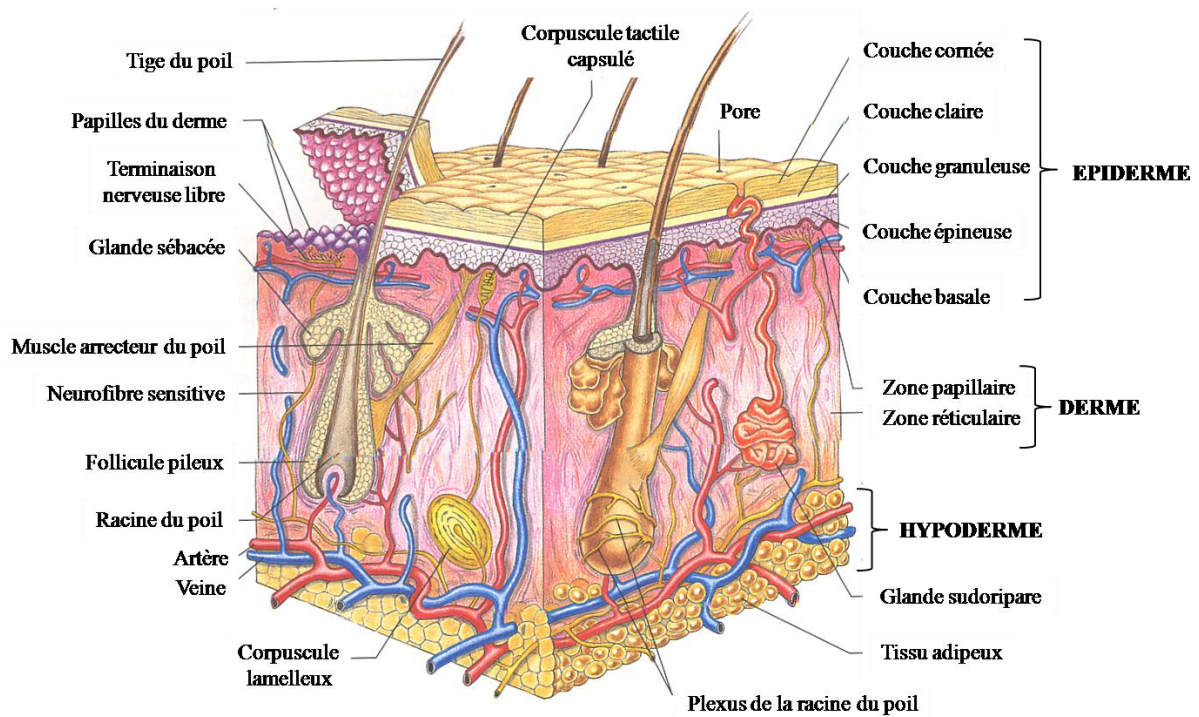


Figure 1 : Structure de la peau. Vue tridimensionnelle de la peau et des tissus sous-cutanés.
 (D'après une figure issue de « Anatomie et Physiologie Humaines » de E. N. Marieb,
 Ed. DeBoeck Université)

L'épiderme est constitué de 4 types cellulaires différents :

➤ les **kératinocytes**, principaux constituants, représentant environ 90% des cellules épidermiques totales, sont reliés entre eux par des desmosomes afin de maintenir la cohésion de l'épiderme. Les kératinocytes (KCs) subissent un processus de différenciation qui débute dans la couche basale de l'épiderme par des mitoses quasi continues et se termine au niveau de la couche cornée, où ne subsistent que des cellules mortes éliminées naturellement par le processus de desquamation. Durant leur migration vers la surface de la peau, les KCs subissent des changements morphologiques (ils s'aplatissent) et synthétisent la kératine, protéine fibreuse, qui confère à l'épiderme ses propriétés protectrices. Au niveau le plus extérieur (couche cornée), les KCs ne sont plus que des membranes plasmiques, sans noyau, remplis de kératine et appelés cornéocytes. Ainsi, l'épiderme se renouvelle entièrement tous les 25 à 45 jours, par une production et une disparition continue des kératinocytes.

Les kératinocytes assurent la première ligne de défense de par leur fonction de cohésion, leur fonction barrière, leur fonction de protection et participent à l'initiation et au développement des réactions inflammatoires cutanées.

➤ les **mélanocytes**, responsables de la pigmentation cutanée, représentent environ 5% des cellules épidermiques. On les retrouve dans les couches profondes de l'épiderme où ils synthétisent la mélanine qu'ils transmettent ensuite aux kératinocytes. La mélanine ainsi absorbée s'accumule dans les kératinocytes et forme une barrière pigmentaire qui protège les cellules des rayonnements ultraviolets (UV).

➤ les **cellules de Merkel**, cellules neuro-épithéliales, irrégulièrement réparties à la surface du corps humain. Elles sont particulièrement abondantes dans les régions sensibles au toucher en contact avec une terminaison nerveuse (lèvres, paume des mains, pulpe des doigts et du dos des pieds). Elles participeraient ainsi à la fonction tactile et à la sécrétion de neuromédiateurs.

➤ les **cellules de Langerhans**, sentinelles du système immunitaire. Ce sont des cellules dendritiques (DCs), représentant 1 à 5% des cellules épidermiques totales, situées en position suprabasale. Leur fonction est de surveiller et d'alerter le système immunitaire lors de la pénétration de pathogènes.

2. La jonction dermo-épidermique et le derme

A l'interface entre l'épiderme et le derme se trouve la jonction dermo-épidermique, structure acellulaire composée d'un réseau de protéines appartenant à la matrice extracellulaire (MEC) qui stabilise la membrane basale. Les constituants de la jonction dermo-épidermique sont synthétisés par les fibroblastes sous-jacents mais également par les kératinocytes basaux auxquels ils servent d'ancrage.

Le derme sous-jacent est constitué d'une épaisseur de tissu conjonctif, à la fois résistant et flexible. Il peut être divisé en deux zones, la zone papillaire supérieure et la zone réticulaire plus profonde. Le derme est la partie vascularisée de la peau qui lui confère une fonction importante de nutrition de l'épiderme et de thermorégulation. Le derme est une matrice gélatineuse constituée principalement d'eau imprégnée de collagène et d'élastine directement synthétisées par ses principaux constituants : les fibroblastes. On retrouve également d'autres types cellulaires comme des cellules dendritiques dermiques (DDCs), des macrophages et des myofibroblastes, ainsi que les annexes de la peau (follicules pileux, glandes sébacées et sudoripares, ongles).

3. L'hypoderme

L'hypoderme est le compartiment le plus profond et le plus épais de la peau. Il est constitué principalement d'adipocytes séparés par du tissu conjonctif lâche, richement vascularisé et innervé. Le tissu adipeux de l'hypoderme joue un rôle de stockage des réserves énergétiques (triglycérides). En plus d'emmagasiner les graisses, l'hypoderme relie la peau aux structures sous-jacentes (muscles) ce qui lui permet ainsi de s'étirer et de bouger. Enfin, il confère une protection mécanique à la peau en absorbant les chocs et est responsable de la régulation thermique (isolant).

II. Les acteurs de l'immunité cutanée

La peau doit faire face et se défendre contre des agents pathogènes extérieurs que ce soit des virus, des bactéries ou des substances étrangères présentes dans l'air, la nourriture et l'eau. Pour éliminer un agent pathogène, deux systèmes de défense agissent de concert: le premier, non-spécifique, ne distingue pas les agents pathogènes les uns des autres ; à l'inverse, le deuxième est spécifique de chaque type de pathogène.

1. L'immunité innée ou mécanisme de défense non spécifique

L'immunité non spécifique (ou innée) érige les 2 premières lignes de défense face aux agressions extérieures (Tableau 1) :

- la première ligne est assurée par la peau intacte, qui constitue une barrière physique à l'entrée des pathogènes,
- la deuxième ligne fait intervenir les cellules de l'immunité innée et est mobilisée par des médiateurs solubles sécrétés par la peau agressée (notion de signal de danger). C'est la réaction inflammatoire, qui 1) empêche la propagation des agents pathogènes dans les tissus environnants, 2) élimine les débris cellulaires et les pathogènes et 3) amorce les premières étapes du processus de réparation.

Première ligne de défense : barrière physique	Deuxième ligne de défense : défenses cellulaires et chimiques non spécifiques
- Epiderme : barrière mécanique	- Réaction inflammatoire
- Acidité de la peau : inhibe la croissance bactérienne	- Kératinocytes
- Sécrétions (sébum) : toxicité direct	- Macrophages libres ou résidents
	- Neutrophiles
	- Cellules NK (<i>Natural Killer</i>)
	- Cellules dendritiques

Tableau 1 : Résumé des défenses non spécifiques de la peau

↳ La réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire (Figure 2) est la conséquence de la perception d'un signal de danger par le système inné. Les cellules immunitaires résidentes sont capables de discriminer les pathogènes des molécules du soi *via* la reconnaissance de motifs moléculaires conservés, les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern), présents uniquement sur les pathogènes, et qui sont reconnus par les cellules *via* les PRR (Pattern Recognition Receptors). Ces PRR sont responsables de la capture par endocytose des pathogènes et conduisent également à l'activation cellulaire.

En réponse à une agression physique ou chimique, une infection ou l'introduction dans l'organisme d'un antigène (allergène), les cellules des tissus lésés, dont les kératinocytes et les leucocytes résidents (macrophages, mastocytes), vont produire des médiateurs solubles pro-

inflammatoires, comme des amines vaso-actives (histamine), des prostaglandines et leucotriènes (médiateurs lipidiques), ainsi que des cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6), des chimiokines (voir tableau 2) et des neuropeptides. C'est la phase d'initiation de la réaction inflammatoire. Ces médiateurs agissent directement sur les capillaires sanguins. Ils contribuent à leur vasodilatation et augmentent leur perméabilité, entraînant la libération de l'exsudat plasmatique contenant des facteurs de coagulation et des anticorps. Ils augmentent également l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales, permettant le recrutement des cellules inflammatoires circulantes, à savoir les polynucléaires neutrophiles puis les monocytes-macrophages. Ces médiateurs agissent comme des agents chimiotactiques responsables de l'attraction des polynucléaires neutrophiles et des macrophages. C'est la phase d'amplification ou mobilisation phagocytaire. Ces cellules circulantes, issues de la moelle osseuse, passent dans le sang, s'accrochent à la paroi des capillaires activés, et rejoignent le site d'agression par diapédèse. Ces cellules sont les cellules effectrices de la réaction d'inflammation. Elles ont pour mission de se débarrasser des pathogènes par plusieurs mécanismes (phagocytose, bactéricidie) *via* l'acidification du milieu, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et d'espèces réactives de l'azote (ERA), ou la production de peptides antimicrobiens comme les défensines.

NB : Le phénomène de bactéricidie par les cellules phagocytaires est détaillé dans le chapitre 2, Stress Oxydant.

2. L'immunité adaptative ou mécanisme de défense spécifique

L'immunité innée assure l'élimination du pathogène. Après elle, la réponse adaptative mémoire spécifique, troisième ligne de défense de l'organisme, se met en place, afin de protéger l'organisme contre une éventuelle réexposition au même pathogène. L'immunité adaptative fait intervenir les lymphocytes T (LT) de type CD8⁺ et CD4⁺, responsables des réponses à médiation cellulaire, et les lymphocytes B (LB), responsables des réponses à médiation humorale.

Les LB activés ou plasmocytes, producteurs d'anticorps spécifiques de l'antigène, et les LT CD8⁺, capables de lyser les cellules infectées, sont les cellules effectrices de l'immunité adaptative alors que les LT CD4⁺ sont une famille complexe qui comprend les LT auxiliaires (ou helper, Th) de type Th1, Th2, Th17, Th22, et folliculaires (Tfh) et les LT régulateurs (Treg). Ensemble, LT et LB participent à la mémoire immunologique.

Bien que système immunitaire inné et adaptatif soient généralement décrits de façon indépendante, ils fonctionnent de concert, pour assurer la meilleure protection possible. La notion de signal de danger, décrite dans le paragraphe sur l'immunité innée, influence également les cellules de l'immunité adaptative et potentialise leur réponse vis-à-vis du pathogène. L'initiation de la réponse immunitaire innée est même un pré-requis pour une réponse immunitaire adaptative efficace.

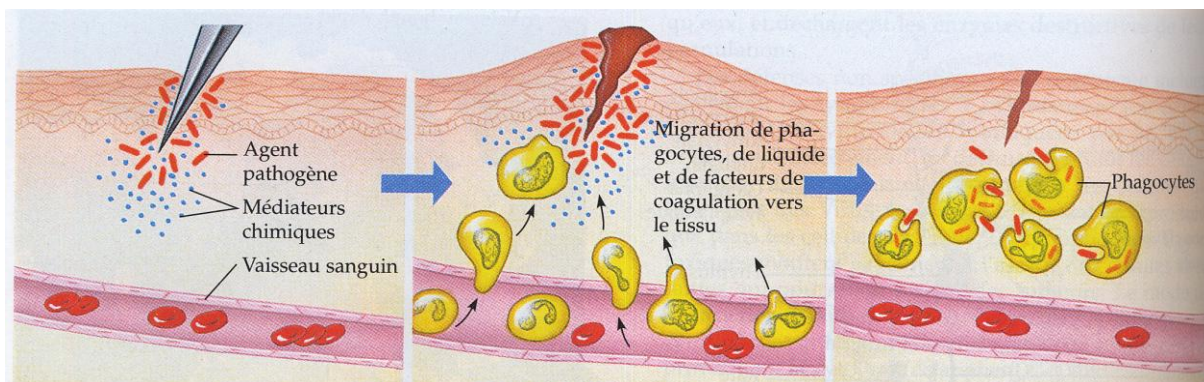


Figure 2 : Représentation simplifiée de la réaction inflammatoire.

(D'après une figure issue de « Anatomie et Physiologie Humaines » de E. N. Marieb, Ed. DeBoeck Université)

Classes	Chimiokines	Cellules sources	Récepteurs	Cellules cibles
CXCL	IL-8 (CXCL8)	Monocytes, macrophages, endothélium, fibroblastes, KCs	CXCR1, CXCR2	Neutrophiles
	IP-10 (CXCL10)	Monocytes, endothélium, fibroblastes, LT, KCs	CXCR3	Monocytes, cellules NK
	GRO α,β,γ (CXCL1, L2, L3)	Monocytes, fibroblastes, endothélium	CXCR2	Neutrophiles
CCL	MCP-1 (CCL2)	Monocytes, macrophages, fibroblastes, KCs	CCR2B	Macrophages, basophiles
	MIP-1 α (CCL3)	Monocytes, mastocytes, fibroblastes, LT	CCR1,3,5	Monocytes, NK, basophiles, LT, DCs
	MIP-1 β (CCL4)	Monocytes, macrophages, neutrophiles, endothélium,	CCR1,3,5	Monocytes, NK, LT, DCs
	RANTES (CCL5)	LT, endothélium, plaquettes	CCR1,3,5	Basophiles, LT

Tableau 2 : Les chimiokines pro-inflammatoires.

LT : lymphocytes T ; NK : Natural Killer ; KCs : kératinocytes ; DCs : cellules dendritiques

3. Les cellules dendritiques

Le lien entre immunité innée et adaptative se fait au travers des cellules dendritiques (DCs). Ces cellules captent et appréhendent l'antigène afin de le présenter directement aux LT naïfs induisant une réponse spécifique. En délivrant une grande variété de signaux aux LT, elles contrôlent l'orientation de leur réponse vers un type particulier de LT effecteurs. Les DCs participent également au maintien de la tolérance en diminuant la réponse T vis-à-vis des antigènes du soi. Cette capacité des DCs à induire un type spécifique de réponse T reflète les signaux d'activation qu'elles ont reçu au moment du contact avec l'antigène.

3.1 Origine

Il existe deux types de cellules dendritiques : les cellules dendritiques (DCs) lymphoïdes et myéloïdes, issues d'un progéniteur commun $CD34^+$ (Figure 3). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), d'origine lymphoïde, circulent du sang vers les zones T des organes lymphoïdes ; les cellules dendritiques myéloïde (mDCs), parmi lesquelles on retrouve les cellules de Langerhans et les DCs du derme, circulent entre le sang, les tissus et les organes lymphoïdes. Les DCs sont présentes dans tout l'organisme et représentent une famille hétérogène de cellules de par leur localisation anatomique, leur phénotype, leur origine et leur fonction.

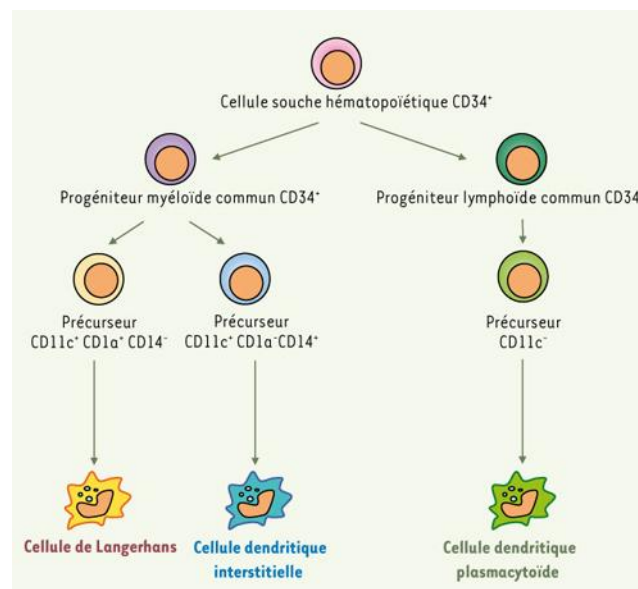


Figure 3 : Origine des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques se différencient à partir de cellules souches hématopoïétiques $CD34^+$ de la moelle osseuse. Deux voies de différenciation sont classiquement décrites : la voie lymphoïde et la voie myéloïde. Dans la voie lymphoïde, le progéniteur

lymphoïde commun CD34⁺ donne également naissance aux lignées de cellules B, T et NK (Figure extraite de Le Borgne, M. 2007 *Médecine/Sciences* 23 : 10)

3.2. Les cellules dendritiques de la peau

Dans la peau, les DCs sont présentes au niveau de l'épiderme (cellules de Langerhans, LCs) et du derme (DCs interstitielles du derme, DDCs), constituant ainsi deux lignes de défense. Ces deux sous-populations sont toutes les deux capables d'induire une réponse adaptative spécifique, cependant il semble que les LCs soient principalement impliqués dans l'immunité à médiation cellulaire et les DDCs dans l'immunité humorale.

↳ Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans (LCs) sont les premières DCs décrites (Langerhans, 1868). Elles sont caractérisées par la présence d'organites intra-cytoplasmiques spécifiques, les granules de Birbeck (GB), et de la langerine, lectine de type II, impliquée dans leur formation (Valladeau et coll., 1999; 2000). Les LCs expriment la protéine CD45 et les marqueurs myéloïdes CD13 et CD33. Ce sont des cellules présentatrices de l'antigène (CPA), dites professionnelles, capables de présenter l'information antigénique aux LT naïfs. Elles expriment ainsi le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II de manière constitutive, le CMH de classe I et les molécules de la famille du CD1 (a, b et c) impliquées dans la présentation d'antigènes glycolipidiques (Brigl et Brenner, 2004). Les LCs expriment également des molécules d'adhésion telles que les intégrines et des récepteurs de la laminine et de la fibronectine (Le Varlet et coll., 1991; 1992). La E-cadhérine, également retrouvée sur les kératinocytes, permet la cohésion entre ces derniers et les LCs (Tang et coll., 1993). En fonction de leur état d'activation, les LCs peuvent exprimer CD54 (ICAM-1), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) et CD40 nécessaires pour l'interaction avec les LT.

↳ Les cellules dendritiques du derme

Les DDCs se caractérisent par l'expression du CMH de classe II, du récepteur « scavenger » CD36, du CD1c, CD11c et par l'absence de granules de Birbeck (Cerio et coll., 1989; Zaba et coll., 2007). Il existe deux sous-populations de DDCs (Nestle et coll., 1993). La première est phénotypiquement proche des LCs (CD1a⁺-CD14⁻) et sécrète de l'IL-15 alors que la deuxième est CD1a⁻-CD14⁺. Le derme contiendrait également une population de DDCs CD14⁺ et langerine positive (Larregina et coll., 2001), cependant ces observations n'ont pas été confirmées (Ebner et coll., 2004; Furio et coll., 2005).

Le derme contient également d'autres CPA, qui participent à l'immunité dermique, comme des macrophages CD11c⁻, CD1c⁻ exprimant le facteur intra-cytoplasmique XIIIa et le CD163 (Zaba et coll., 2007).

Enfin, les **DCs plasmacytoïdes** sont retrouvées seulement en condition inflammatoire.

3.3. Rôle des sous-populations de DCs dans l'induction de la réponse spécifique

Pendant longtemps il a été admis que les LCs épidermiques étaient « LES » cellules responsables de l'induction de la réponse spécifique (pour revue, Romani et coll., 2003). Cependant, cette théorie a été ébranlée par des travaux qui montrent que d'autres populations de DCs, comme les DDCs sont capables de présentation antigénique (Nestle et coll., 1998). En utilisant des modèle murins génétiquement déplétés en LCs, la réaction d'hypersensibilité retardée est soit normale (Kissenpfennig et coll., 2005), soit diminuée (Bennett et coll., 2005), soit augmentée (Kaplan et coll., 2005) et plusieurs équipes ont montré que les LCs ne sont pas responsables de l'immunité anti-virale (Allan et coll., 2003; Zhao et coll., 2003). Il s'agirait plutôt de DCs des ganglions lymphatiques. Les LCs et les DDCs ne joueraient qu'un rôle de transporteur (Allan et coll., 2006), bien que les LCs soient quand même capables d'induire directement l'activation des LT CD8⁺ (He et coll., 2006).

Les deux sous populations de DCs cutanées (LCs et DDCs) semblent posséder des fonctions particulières et être capables d'induire des réponses adaptatives de types différents. Les LCs activent plus efficacement les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques induisant ainsi préférentiellement une réponse à médiation cellulaire alors que les DDCs CD14⁺ induisent la différenciation des LB en plasmocytes producteurs d'anticorps (IgM), soit directement (Caux et coll., 1997), soit en activant préalablement des LT CD4⁺ auxiliaires de type folliculaire (Klechevsky et coll., 2008).

Par ailleurs, les LCs peuvent également induire une réponse LT CD4⁺ de type Th2 (INF- γ), tout comme les DDCs, dans une moindre mesure cependant (Klechevsky et coll., 2008).

La deuxième sous-population de DDCs CD1a⁺-CD14⁻, tout comme les LCs, peut induire une prolifération des CD4⁺ et CD8⁺ (Klechevsky et coll., 2008).

3.4. Cycle de vie des cellules dendritiques

Le cycle de vie des DCs est basé sur leur capacité à migrer, leur permettant ainsi d'assurer pleinement leurs fonctions.

Les précurseurs des DCs issus de la moelle osseuse migrent *via* le sang jusqu'en périphérie où ils se différencient en DCs immatures résidentes au sein de l'épiderme et du derme. Les DCs sont alors capables de capter les antigènes associés aux signaux de danger et de les apprêter. Les DCs entrent alors dans un processus d'activation, qui dépend des signaux inflammatoires qu'elles reçoivent, notamment en provenance des cellules avoisinantes. Les DCs migrent alors vers les ganglions lymphatiques drainants *via* la lymphe afin de transmettre l'information antigénique aux LT et LB spécifiques de l'antigène.

Bien que ce modèle de cycle de vie soit bien décrit, l'origine des précurseurs des LCs et des DDCs reste encore mal identifiée. Schaerli et coll., 2005 ont démontré, sur modèle d'épiderme reconstruit, que des cellules CD14⁺ dérivées du sang périphérique ou de précurseurs CD34⁺ peuvent être recrutées et se différencier en LCs fonctionnelles. Les LCs pourraient également dérivés de précurseurs folliculaires locaux CD1a⁺ (Gilliam et coll., 1998). Les DDCs auraient une origine monocyttaire (Randolph et coll., 1998). Cependant il est très difficile de déterminer l'origine des DCs cutanées chez l'homme, car les LCs ont une durée de vie très longue et peuvent résider dans la peau pendant plusieurs années (Kanitakis et coll., 2004) ce qui fait que leurs précurseurs sont rares. De plus, l'état physiologique ou inflammatoire de la peau, et donc des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires produites localement, conditionne la nature des précurseurs de DCs qui seront recrutées. L'utilisation du modèle murin a permis de montrer que chez la souris aussi, en condition basale, les LCs ayant migré hors de l'épiderme sont remplacées soit par prolifération, soit par recolonisation de l'épiderme par des précurseurs locaux (Merad et coll., 2002). Par contre, en condition inflammatoire, la déplétion épidermique de LCs est restaurée par le recrutement de précurseurs sanguins, de type monocyttaire (Ginhoux et coll., 2006). La restauration de la population de DDCs murines semble être aussi soumise à l'état inflammatoire ou non de la peau (Bogunovic et coll., 2006).

3.5. Fonction des cellules dendritiques : entre immunité innée et adaptative

Les DCs se trouvent à l'interface entre le système inné et adaptatif. Leur rôle est central dans l'initiation et la régulation de la réponse lymphocytaire spécifique. La fonction des DCs dans la peau est de jouer un rôle de sentinelle en assurant la détection des signaux de danger et d'en informer le système immunitaire adaptatif.

① Reconnaissance et internalisation des pathogènes

La reconnaissance des pathogènes par les DCs se fait par l'intermédiaire d'une batterie de récepteurs. Les DCs expriment les PRR (Pattern Recognition Receptors) parmi lesquels on retrouve les Lectines de type C, les récepteurs scavengers, les récepteurs RIG-Like (RLR), les récepteurs NOD-Like (NLR) et les récepteurs Toll-Like (TLR, voir Tableau 3).

② Activation et migration vers les organes lymphoïdes secondaires

Après le contact avec l'antigène, les DCs passent d'un état immature à mature par un processus complexe de modifications phénotypes et fonctionnelles qui vont conduire à la migration des DCs vers les organes lymphoïdes secondaires. Ainsi, lors de leur arrivée dans les ganglions, les DCs matures ont acquis la capacité d'activer les LT naïfs et perdu celle d'endocytose et de phagocytose nécessaire à la capture de l'antigène. L'activation des DCs est associée à une

augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86, CD54), du CMH de classe II en surface, du CD83 et de DC-LAMP ainsi qu'une modification de l'expression des molécules d'adhérence et de certains récepteurs aux chimiokines (pour revue, Banchereau et coll., 2000).

FAMILLES DE TLR	AGONISTES MICROBIENS
Récepteurs membranaires	Ligands lipidiques ou protéiques
TLR1 (+ TLR2)	Lipoprotéines tri-acétylées (bactéries et mycobactéries)
TLR2	Lipoprotéines (nombreux pathogènes)
	Peptidoglycanes (bactéries Gram positif)
	Lipoarabinomannanes (mycobactéries)
TLR4	Lipopolysaccharide, LPS (bactéries Gram négatif)
	Protéines virales
TLR5	Flagelline (bactéries flagellées)
TLR6 (+ TLR2)	Lipoprotéines di-acétylées (mycobactéries)
Récepteurs endosomiales	Ligands nucléiques
TLR3	ARN double brin (virus)
TLR7 et TLR8	ARN simple brin (virus)
TLR9	ADN hypométhylé, motif CpG (bactéries)

Tableau 3 : Les différents ligands des TLRs.

La migration des DCs hors de l'épiderme se fait dans un contexte inflammatoire. Les cellules des tissus environnants tels que les kératinocytes produisant des médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1 β qui influencent les LCs (Cumberbatch et Kimber, 1992). En réponse aux pathogènes, l'expression de la E-cadhérine à la surface des LCs diminue (Jakob et Udey, 1998), permettant la sortie des LCs hors de la peau, en se détachant des kératinocytes, alors que l'activité de la métalloprotéase MMP-9 augmente afin de dégrader la membrane basale dermo-épidermique (Kobayashi et coll., 1999). L'augmentation de l'expression du récepteur CCR7 aux chimiokines CCL21 et CCL19/MIP3- β (Geissmann et coll., 2002) permet aux LCs d'être dirigées vers la lymphe afférente en réponse à CCL21 sécrétée par l'endothélium lymphatique, puis d'être attirées dans les zones T des ganglions lymphatiques qui expriment CCL19.

③ Activation lymphocytaire

Le système lymphocytaire adaptatif se caractérise par sa spécificité, sa diversité, sa capacité à discriminer le soi du non-soi et sa mémoire immunologique. Cette mémoire réside en sa capacité de se

rappeler les antigènes qu'il a déjà rencontré et de réagir rapidement et efficacement lors d'expositions ultérieures.

Bien que les DCs soient capables d'activer les lymphocytes B à différentes étapes de leur différenciation (voir Brière et coll., 2001), seule l'activation des lymphocytes T sera détaillée.

Les DCs doivent fournir 3 signaux aux lymphocytes T naïfs afin qu'ils se différencient en LT effecteurs. En absence d'un de ses signaux, le LT devient anergique.

➤ Signal 1 : Engagement du récepteur TCR spécifique de l'antigène présent sur les LT. Les DCs présentent aux LT un peptide dérivé de l'antigène, associé à une molécule de CMH de classe II (pour les LT CD4⁺) ou de classe I (pour les LT CD8⁺). Il existe également une possibilité de présentation croisée c'est-à-dire que les DCs ont la capacité de présenter des antigènes exogènes aux LT CD8⁺ via le CMH de classe II (Stoitzner et coll., 2006; Klechevsky et coll., 2008).

➤ Signal 2 : Expression de molécules de co-stimulation par les DCs qui vont être reconnues par les LT, et renforcer ainsi la synapse immunologique. Citons notamment les molécules de la famille B7 (CD80, CD86) qui engagent le récepteur CD28 à la surface des LT et la liaison de CD40 à son ligand (CD40L).

➤ Signal 3 : Sécrétion de cytokines par les DCs qui va orienter la réponse T spécifique. Les DCs polarisent la différenciation des LT naïfs en LT effecteurs auxiliaires (ou helper, Th) de type Th1, Th2, Th17, Th22, ou folliculaires (Tfh) ou en LT régulateurs (Treg).

L'environnement cytokinique créé par les DCs polarise ainsi la fonction immune : les cytokines de la famille de l'IL-12 (IL-12p70, IL-23, IL-27) favorisent une polarisation Th1 (les LT sécrètent principalement de l'IFN- γ et du TNF- α et favorisent les réponses cellulaires) qui participe à l'élimination des pathogènes intracellulaires par l'action des LT CD8⁺ cytotoxiques. La concentration en IL-4 induit une polarisation Th2 (les LT sécrètent de l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13) qui favorise les réponses humorales.

Une autre classe de LT helper a été décrite récemment, les Th17 (pour revue, Korn et coll., 2009). Ils se différencient en présence de TGF- β et d'IL-6, ainsi que d'IL-23 stabilisante et sécrètent de l'IL-17, de l'IL-21 et de l'IL-23. Le rôle des Th17 est de prendre en charge les pathogènes qui ne sont pas éradiqués par les réponses Th1 ou Th2 et qui nécessitent une inflammation massive pour être détruits. Les Th17 sont capables de répondre à une grande variété de pathogènes. Ce sont de puissants inducteurs de l'inflammation et de ce fait, ils participent à la pathogenèse de maladies auto-immunes et de nombreuses pathologies inflammatoires.

Deux autres sous-populations de LT auxiliaires viennent également d'être décrites. Les Th22, présents dans la peau de patients atteints de psoriasis, d'eczéma atopique et d'eczéma allergique de

contact (Eyerich et coll., 2009). Ces cellules sécrètent de l'IL-22 et du TNF- α . Leur action consiste au remodelage de l'épiderme en condition inflammatoire et à l'induction de l'immunité innée *via* les kératinocytes résidents. Les Th folliculaire (Tfh), que l'on retrouve au niveau des zones B des tissus lymphoïdes, activent une réponse LB spécifique de l'antigène (pour revue, Fazilleau et coll., 2009)

Enfin, les DCs sont capables de générer des LT régulateurs (Treg) en produisant de l'IL-10 (Hubert et coll., 2007). Ces Treg inhibent la prolifération des autres populations de LT et ainsi les DCs, appelées alors DCs tolérogènes, contrôlent la mise en place de la tolérance périphérique.

4. Génération *in vitro* de cellules dendritiques humaines

L'obtention *in vitro* de DCs, ayant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles très proches de celles des DCs observées *in situ*, a permis de palier à la difficulté d'isolation (et à la rareté) des DCs à partir de tissu humain.

4.1. A partir de progéniteurs CD34⁺

Des cellules progénitrices CD34⁺ issues de la moelle osseuse ou de sang de cordon sont capables de se différencier, en présence de GM-CSF et TNF- α , en deux sous-populations de DCs, l'une CD1a⁺ CD14⁻ qui génère des LCs et une CD1a⁻ CD14⁺ qui génère des DCs exprimant des marqueurs dermiques (Caux et coll., 1992; 1996). D'autres cytokines ont été par la suite décrites afin d'orienter la différenciation du progéniteur CD34⁺ : l'ajout de TGF- β 1 permet d'obtenir un phénotypique de LCs (Strobl et coll., 1996), alors que l'addition d'IL-4 ou d'IL-13 oriente les cellules dans la voie interstitielle (Caux et coll., 1999).

4.2. A partir de progéniteurs CD14⁺

Des monocytes CD14⁺ issus du sang périphérique se différencient, en présence de GM-CSF et d'IL-4, en DCs de phénotype CD1a⁺ CD14⁻, ayant toutes les caractéristiques des DCs immatures (Romani et coll., 1994; Sallusto et Lanzavecchia, 1994). Ces cellules, appelées mono-DCs, peuvent également être générées en présence d'IL-13 (Piemonti et coll., 1995) ou d'INF- α (Paquette et coll., 1998). L'ajout de TGF- β ou d'IL-13 est nécessaire à l'obtention d'un phénotype de LCs, c'est-à-dire exprimant le CD1a et la langerine (Geissmann et coll., 1998; Bechemille et coll., 2006).

Chapitre 2 : Stress oxydant et hypersensibilité retardée de type IV

I. L'eczéma allergique de contact

1. Introduction

Aujourd'hui, le nombre d'allergies est en constante augmentation dans les pays industrialisés. L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) classe les pathologies allergiques au quatrième rang mondial des affections et considère que ces pathologies représentent « un problème majeur de Santé publique ».

L'allergie, ou réaction d'hypersensibilité, correspond à une réaction inappropriée du système immunitaire vis à vis d'une substance étrangère (antigène), qui n'est pas dangereuse pour la plupart des individus (non atopiques par définition). Les réactions d'hypersensibilité sont spécifiques de l'antigène, appelé allergène, et peuvent se manifester au contact des pollens, acariens, poils d'animaux mais aussi de certains aliments ou médicaments. Les allergies peuvent affecter les yeux, la peau et les voies respiratoires comme le nez ou les bronches.

L'environnement professionnel mais également quotidien comporte de nombreux antigènes auxquels le patient allergique peut réagir. Citons à titre d'exemple le nickel (Figure 4), que l'on retrouve dans les bijoux fantaisies et les boutons de jeans. Le nickel est le candidat majeur des réactions allergiques (selon les pays, une sensibilité au nickel est observée chez 10 à 15% de la population). La prévalence des réactions d'allergie à certains produits cosmétiques, dont les ingrédients de parfumerie, est d'environ 10%.



Figure 4 : Eczéma allergique de contact au nickel d'une montre métallique.

Parmi les pathologies allergiques, l'eczéma (ou dermatite) allergique de contact (EAC) constitue l'une des affections les plus répandues en biologie cutanée. L'EAC est une réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) de type IV à médiation cellulaire impliquant les LT spécifiques de l'antigène. Elle est due à une sensibilisation à des substances étrangères, allergènes, en contact répété avec le revêtement cutané. Les allergènes responsables de l'EAC sont par définition des haptènes, c'est à dire des substances chimiques, non protéiques et de faible poids moléculaire qui ne sont pas immunogènes par eux-mêmes mais ont besoin de se fixer sur des protéines épidermiques afin de former un couple haptène-protéine qui constitue l'allergène complet. Les haptènes partagent la caractéristique commune d'être des substances électrophiles ayant la propriété de fixer les résidus nucléophiles des protéines. Cependant, de nombreux haptènes, appelés pro-haptènes, dérivent de substances chimiques et nécessitent une étape de métabolisation supplémentaire afin d'être convertis en une molécule électrophile capable de fixer les protéines.

Sur le plan clinique, l'EAC se caractérise par une phase érythémateuse initiale, plus ou moins rouge et congestive, avec apparition rapide de vésicules à sérosité claire. La peau est épaissie, recouverte de squames écailleuses. Le tout est prurigineux et amène des croûtes recouvrantes. L'EAC a son maximum au point de contact avec la substance allergisante, avec cependant la possibilité d'une extension ou d'une généralisation.

2. Physiopathologie de l'eczéma allergique de contact

L'EAC est une HSR de type IV, à médiation cellulaire, impliquant les lymphocytes T (LTs) CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques de l'haptène (Figure 5). Les LT CD8⁺ ont un rôle effecteur et cytotoxique alors que les LT CD4⁺ ont une fonction régulatrice (Bour et coll., 1995; Dubois et coll., 2003a). L'EAC se déroule en trois phases :

➤ La première, asymptomatique d'un point de vue clinique, est déclenchée lors du premier contact d'un haptène avec la peau. On parle alors de rupture de la tolérance immunitaire. Les DCs de l'épiderme ou du derme vont capter et apprêter cet haptène afin de le présenter aux LTs naïfs au sein des ganglions lymphatiques (GLs) drainants. Après prolifération, les LTs spécifiques de l'haptène quittent les GLs et circulent alors entre les organes lymphoïdes et la peau. C'est la phase dite de **sensibilisation**, qui conduit à l'établissement de la population de LT spécifiques de l'haptène. Les DCs sont capables d'activer aussi bien la population de CD8⁺ effecteurs *via* leur complexe d'histocompatibilité de type I (CMH I) que la population régulatrice CD4⁺ *via* leur CMH de type II (CMH II), contrôlant ainsi l'induction et la régulation de l'HSR (Krasteva et coll., 1998). Le système immunitaire a alors acquis une mémoire de l'haptène.

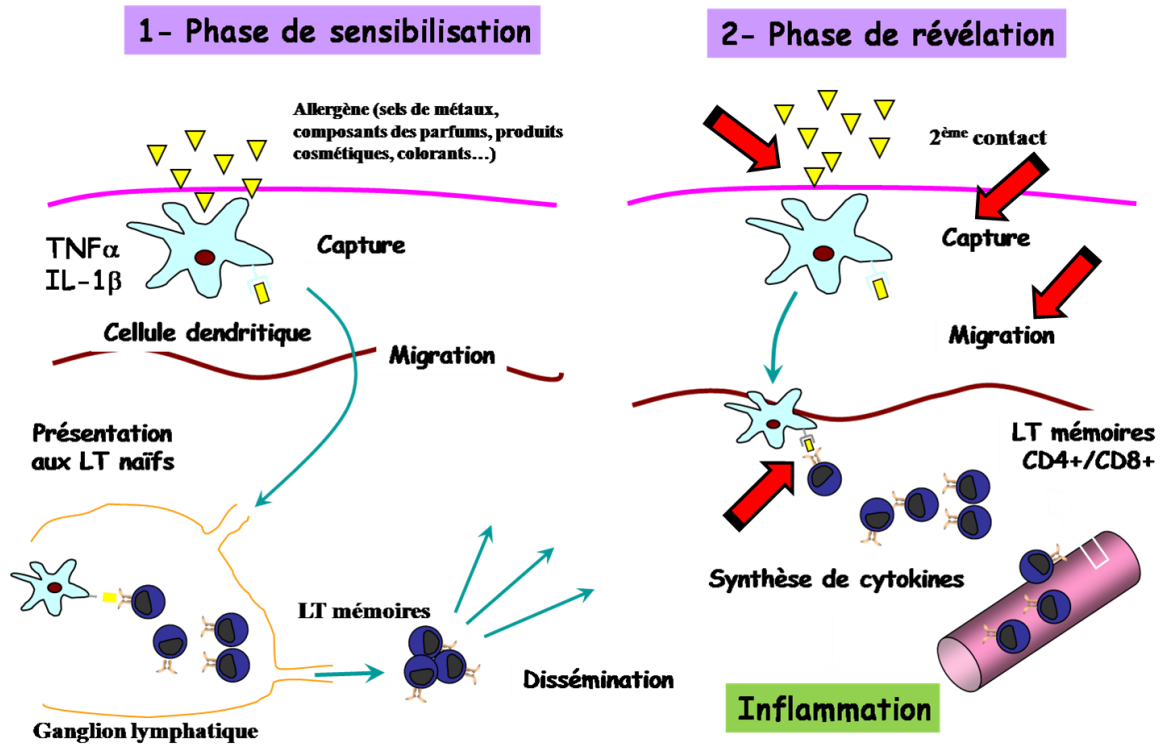


Figure 5 : La réaction d'hypersensibilité retardée de type IV (phases de sensibilisation et de révélation). Les flèches rouges indiquent une partie des étapes de la réaction d'HSR qui sont à l'étude pour la mise en place de tests prédictifs *in vitro*.

➤ La deuxième phase, dite **de révélation** ou d'élicitation résulte d'un deuxième contact avec l'haptène (au même site ou à un site distinct) et peut survenir quelques jours ou quelques mois après la sensibilisation. Les DCs prennent à nouveau en charge l'haptène et le présentent aux lymphocytes T spécifiques mémoires circulants (Krasteva et coll., 1999). L'inflammation générée aboutit au recrutement des LT CD8⁺ effecteurs, de l'infiltrat inflammatoire qui participe au développement de la lésion clinique, mais également des LT CD4⁺ régulateurs qui interviendront dans la diminution de la réaction inflammatoire. Les médiateurs pro-inflammatoires produits induisent l'activation des cellules non spécifiques de l'haptène (kératinocytes, polynucléaires), déclenchant la cascade inflammatoire. Cette phase se caractérise cliniquement par l'apparition d'un œdème, un érythème au site de contact avec l'haptène, par la formation de papules et de vésicules, évoluant vers la sécheresse et la desquamation.

➤ Enfin, la phase **de régulation**, qui est sous le contrôle des LT CD4⁺ régulateurs (Treg). Les Treg semblent faire régresser l'EAC selon deux mécanismes : le contrôle du priming et de l'expansion des LT CD8⁺ dans les organes lymphoïdes et la régulation de l'activation de ces mêmes T effecteurs dans la peau (Dubois et coll., 2003; Kish et coll., 2005). D'autre part, l'IL-10 semble également jouer un rôle dans la tolérance aux haptènes (Maurer et coll., 2003).

II. Modèles d'études de l'eczéma allergique de contact

1. Les modèles d'études animaux

1.1. Le cobaye

Depuis les travaux de Landsteiner et coll., (1936) le cobaye est l'animal modèle de choix pour les tests de sensibilisation. Parmi les nombreux protocoles établis sur ce modèle (Andersen et coll., 1985), deux restent toujours d'actualité : le test GPMT (Guinea Pig Maximization Test, OCDE n°406) et sa variante, le test Büehler (OCDE n°406). Dans ces deux protocoles, les animaux sont soumis à plusieurs injections de la molécule à tester par voie intradermique. Plusieurs jours après, l'animal est sensibilisé par un patch occlusif disposé sur les sites d'injection. La révélation est réalisée deux semaines plus tard par dépôt d'un nouveau patch occlusif (Magnusson et Kligman, 1969). Dans le test GPMT, la molécule à tester est injectée avec un adjuvant, qui permet de maximiser la réaction, mais la reproductibilité de cette approche et l'interprétation des résultats (nombreux faux positifs) sont contestés (Kligman et Basketter, 1995; Frankild et coll., 1996). Cependant ce test reste la seule méthode reconnue de manière internationale sur le plan légal. Dans sa variante, le test Büehler

(Buehler, 1994), le protocole utilisé requiert deux fois plus d'animaux mais la molécule à tester est injectée sans adjuvant, n'amplifiant pas la réaction inflammatoire.

1.2. Le modèle murin

La capacité d'évaluer visuellement la phase de révélation de l'EAC a également trouvé sa place avec le modèle murin. En effet, l'épaisseur de l'oreille de souris augmente après application répétée d'une substance sensibilisante. Ainsi, le test MEST (Mouse Ear Swelling Test) est basé sur la mesure de l'épaisseur de l'oreille de la souris en réponse à l'inflammation induite par la molécule à tester (Gad et coll., 1986). Cependant, la discrimination des sensibilisants faibles et modérés reste la principale limite de ce test.

En parallèle, l'évolution de la connaissance des mécanismes immunologiques responsables de l'EAC a permis de développer des tests non plus basés sur la phase de révélation mais sur la phase de sensibilisation. Ainsi le test LLNA (Local Lymph Node Assay, OCDE n°429) repose sur la mesure de la prolifération cellulaire au sein du ganglion drainant le site d'application de la molécule à tester (Basketter et coll., 1996; Kimber, 2001). En pratique, la molécule à tester est appliquée journalièrement au dos de l'oreille des souris et cinq jours après, une injection de thymidine tritiée est réalisée avant leur sacrifice. Basé sur la corrélation entre la prolifération des cellules ganglionnaires et le potentiel sensibilisant d'une molécule (Kimber et Dearman, 1991), la substance testée est dite sensibilisante lorsqu'elle induit trois fois ou plus de prolifération ganglionnaire que le contrôle.

Ce test présente de nombreux avantages : il est discriminant, c'est-à-dire qu'il permet de classer les molécules en substances sensibilisantes ou irritantes, il tient compte de la concentration de la substance testée, permet de limiter le nombre d'animaux utilisés et surtout limite leur traumatismes car la réponse allergique clinique n'est pas initiée. Il permet surtout une classification de la substance sensibilisante selon son pouvoir, faible, modéré ou fort (Gerberick et coll., 2004a). Ce test a été validé par le Comité de Coordination et de la Validation des Méthodes Alternatives (ICCVAM).

Le recours à l'animal de laboratoire est encore aujourd'hui le seul moyen validé pour les tests de sensibilisation, dont les protocoles expérimentaux sont reconnus par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique).

2. Les modèles d'études *in vitro*

Le 7ème amendement de la directive cosmétique européenne prévoit l'interdiction de l'expérimentation animale pour les tests de sensibilisation. Au vu de ces directives, les industriels doivent mettre en place de nouveaux moyens d'évaluer le pouvoir sensibilisant d'une molécule. La difficulté de la mise au point d'un test prédictif *in vitro* provient de la complexité de la réaction d'EAC mais également des conditions que doit remplir ce test : être capable de discriminer une molécule sensibilisante d'une molécule irritante qui ne déclenche qu'une réaction inflammatoire locale et

réversible, non immunologique, et pouvoir classer cette molécule selon son pouvoir sensibilisant (faible, modéré ou fort).

Les tests *in vitro* sont basés sur différentes approches, qui tentent de reproduire les différentes étapes du déroulement de la réaction d'AEC. Ces méthodes alternatives (à l'expérimentation animale) visent à modéliser les mécanismes responsables de la sensibilisation par un haptène (voir Figure 5).

2.1. Etude des interactions haptènes-protéines

↳ Les modèles d'études *in silico*

En premier lieu, l'haptène qui se retrouve à la surface cutanée doit être capable de traverser la couche cornée de l'épiderme. Cette première étape est la condition nécessaire au déclenchement de la sensibilisation, puisque par principe, un haptène qui n'est pas capable de traverser la barrière physique de la peau ne rencontrera jamais les cellules immunocompétentes épidermiques et dermiques, effectrices des réactions d'EAC. Cette étape est le support d'approches basées notamment sur la compréhension du métabolisme et des relations structure/activité des haptènes. Ces approches *in silico* utilisent des modèles mathématiques statistiques qui représentent les liens entre la structure chimique d'une molécule et une réponse biologique quantitative (QSARs). Ainsi le pouvoir sensibilisant d'une molécule est déterminé au départ à partir d'un index relatif d'alkylation, basé sur l'hydrophobicité, les propriétés électrophiles et la concentration de la molécule (Roberts et Williams, 1982; Fedorowicz et coll., 2005). Depuis, de nombreux systèmes QSARs ont vu le jour (TOPKAT, DEREK, TOPS-MODE, Multi-CASE, TIMES-SS) mais peu d'entre eux sont capables de déterminer seul le pouvoir sensibilisant d'une molécule, et pour certains d'entre eux, le résultat pour une molécule donnée en terme de prédiction n'est pas toujours en accord avec les mesures biologiques issues du LLNA (Roberts et Basketter, 2000; Patlewicz et coll., 2007; Roberts et coll., 2007). Cependant ces approches sont prometteuses et mettent en lumière l'importance de la chimie mécanistique des haptènes dans la prédiction du pouvoir sensibilisant d'une molécule (pour revue, Zvinavashe et coll., 2008).

↳ Les modèles d'études *in chemico*

Les haptènes ne sont pas immunogènes par eux-mêmes et doivent se fixer sur des protéines épidermiques afin de former un couple haptène-protéine qui constitue l'allergène complet. Ce processus, appelé hapténisation, est possible car la plupart des haptènes sont des substances électrophiles ayant la propriété de fixer, principalement par liaison covalente, les résidus nucléophiles des protéines.

En ce basant sur ces connaissances, des études appelées « peptide reactivity assay » cherchent à prédire le pouvoir sensibilisant d'une molécule en étudiant ses capacités d'hapténisation, c'est-à-dire en étudiant la réactivité de cette molécule vis-à-vis de résidus protéiques définis. Pour la plupart des « peptides reactivity assay », l'haptène est testé pour ses capacités à fixer soit le glutathion (GSH), soit

des protéines synthétiques possédant un ou plusieurs résidus nucléophiles (cystéine, lysine ou histidine). L'expérimentateur mesure soit la disparition du nucléophile en question soit la formation du conjugué haptène/peptide (Gerberick et coll., 2008). Différentes méthodes sont alors développées pour mesurer et quantifier cette réactivité (Roberts et coll., 2008): cinétique de réaction entre l'haptène et un peptide donné (Böhme et coll., 2009), la mesure de la concentration en un temps donné qui donne 50% d'interaction haptène/peptide (Schultz et coll., 2005; 2007) et le pourcentage de déplétion du peptide à un temps donné (Gerberick et coll., 2004b; 2007). Ces premiers essais ont été optimisés en fournissant pour une substance donnée, en plus de la mesure de la disparition du nucléophile et la formation du conjugué, la mesure d'oxydation du peptide et la réactivité vis-à-vis des groupements thiols (Natsch et Gfeller, 2008 ; Aleksic et coll., 2009). Enfin, d'autres travaux ont permis l'établissement de « peptide reactivity assay » pour les pré- et pro-haptènes qui nécessitent une étape de métabolisation (Gerberick et coll., 2009).

2.2. Etude des modifications phénotypiques et de la production de cytokines.

En parallèle des modèles précédemment cités, des modèles *in vitro* sont en cours de développement. Ils reposent sur les études de la réponse des DCs aux allergènes versus des irritants.

Les allergènes qui, *in vivo*, ont réussi à pénétrer l'épiderme ou le derme sont captés par les DCs immatures résidentes de la peau, ce qui entraîne leur activation et migration vers les GLs où elles vont activer les LTs. Ces observations ont permis l'élaboration de modèles d'études basés sur la culture cellulaire. Plusieurs modèles cellulaires (voir ci-dessous) répondent *in vitro* aux allergènes par une augmentation des marqueurs de co-stimulation et du CMH de classe II, une production de cytokines, migrent hors d'explants cutanés et induisent la prolifération de LTs spécifiques de l'allergène.

La DC étant la cellule responsable de l'initiation de l'EAC, l'étude de ces réponses aux allergènes fait l'objet d'une intense recherche. Comme nous l'avons vu précédemment, les DCs peuvent être générées *in vitro*, ou bien être fraîchement isolées de l'épiderme humain. Elles servent alors de modèle cellulaire pour tester le pouvoir sensibilisant d'une molécule.

↳ Cellules dendritiques

L'activation et la maturation des DCs est un évènement clé dans l'induction de l'EAC. Ainsi, de nombreux travaux ont étudié les effets des allergènes sur ces cellules. Les DCs fraîchement isolées de la peau répondent aux allergènes forts tels que le DNCB, le TNBS et la base de Brandowski (BB), et aux allergènes modérés, comme le nickel et l'eugénol par une diminution de la E-cadhérine et de l'expression en surface du HLA-DR (Verrier et coll., 1999), associés à une augmentation des marqueurs d'activation CD86 et CD54 (Tuschl et Kovac, 2001). A l'inverse, l'irritant SDS n'a pas d'effet. Cependant, le faible rendement des DCs, leur capacité à s'activer spontanément en culture et la

difficulté d'approvisionnement en explants cutanés a laissé la place aux DCs générées *in vitro*. En effet, l'expression des marqueurs d'activation et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires sont également observées dans les CD34⁺-DCs et les mono-DCs.

Modèles basés sur les DCs générées à partir de précurseurs CD34⁺

Les CD34⁺-DCs exposées au DNCB, DNFB et à la BB mais également au nickel, expriment les marqueurs CD86, CD83 et HLA-DR (De Smedt et coll., 2002; 2005), augmentent l'expression du récepteur CCR7 (Boislève et coll., 2004) et diminuent l'expression de la E-Cadhérine (Rougier et coll., 2000). A l'inverse, des substances irritantes comme le SDS et le chlorure de benzalkonium n'induisent aucune modification phénotypique. La production d'IL-6 est induite en réponse au nickel, mais la production de TNF- α et d'IL-12 est soumise à la variabilité inter-donneur (De Smedt et coll., 2005). Une production d'IL-8 est détectée en réponse au ligand du CD40 (Caux et coll., 1994) ou des TLR 2, 4 et 5 (Rozis et coll., 2008), cependant aucune production d'IL-1 β n'est observée (De Smedt et coll., 2001).

Modèles basés sur les DCs générées à partir monocytes CD14⁺

Le DNCB et le nickel induisent dans les mono-DCs une expression des marqueurs CD86, CD54, CD40, CD80, HLA-DR et CD83 (Aiba et coll., 1997; Tuschl et coll., 2000; Arrighi et coll., 2001; Hulette et coll., 2002) ainsi que la production de TNF- α et IL-1 β (Aiba et coll., 1997; 1999; Pichowski et coll., 2001). Une diminution de l'expression de la E-cadhérine ainsi qu'une augmentation de l'expression du CCR7 ont été démontrées dans des mono-DCs différenciées en présence de TGF- β 1 (Aiba et coll., 2000; Staquet et coll., 2004).

D'autres modèles de DCs sont également à l'étude, comme les DCs plasmacytoïdes (Ayehunie et coll., 2009) ou les DCrc (DC-related cells) générées à partir de monocytes en co-culture avec des kératinocytes et traitées par le TGF- β et l'IL-4 (Schreiner et coll., 2008; Wanner et Schreiner, 2008).

Cependant, la plus grande difficulté rencontrée avec ces modèles de DCs générées à partir de précurseurs sanguins réside dans la variabilité inter-donneurs observée en réponse aux allergènes que ce soit en terme d'expression de marqueurs d'activation (Aiba et coll., 1997; Tuschl et coll., 2000; Hulette et coll., 2002) ou de sécrétion de cytokines (Pichowski et coll., 2001). De plus, ces modèles ne permettent pas de classer la molécule testée selon son pouvoir sensibilisant (Rougier et coll., 2000; Staquet et coll., 2004) et des résultats divergents peuvent être obtenus avec les allergènes faibles/modérés d'un modèle cellulaire à un autre. C'est pourquoi, dans ce contexte, de nouvelles approches ont vu le jour, utilisant des modèles de lignées cellulaires.

↳ Lignées cellulaires leucémiques myélomonocytaires

Plusieurs lignées cellulaires sont actuellement à l'étude pour les tests de sensibilisation. En plus d'être facilement disponibles et abondantes, en comparaison avec les modèles de DCs issues de progéniteurs sanguins, ces modèles cellulaires semblent être prometteurs, puisqu'ils reproduisent *in vitro* les réponses des DCs aux allergènes (surexpression des marqueurs de co-stimulation, sécrétion de cytokines pro-inflammatoires).

Lignées THP-1 et U937

Les lignées THP-1 et U937 ont montré un véritable potentiel à discriminer les allergènes des irritants. Le protocole h-CLAT (human Cell Line Activation Protocol) mis au point par les japonais (Ashikaga et coll., 2006) définit les conditions de culture et d'analyse pour ces deux lignées où le potentiel sensibilisant d'une molécule est basée sur sa capacité à induire les marqueurs CD86 et/ou CD54. Ce test (h-CLAT) a aussi fait l'objet d'études inter-laboratoires afin d'évaluer la reproductibilité et la capacité de prédiction de ses modèles cellulaires (Sakaguchi et coll., 2006).

D'autres travaux ont mis en évidence le potentiel des lignées THP-1 et U937 à répondre aux allergènes : les THP-1 sont activées par le DNCB et le nickel qui induisent l'expression du CD86, CD54 et CD40 (Ashikaga et coll., 2002; Yoshida et coll., 2003, Sakaguchi et coll., 2007; 2009) ainsi que la sécrétion d'IL-8 et de TNF- α (Miyazawa et coll., 2007; 2008a; Mitjans et coll., 2008). Les modifications phénotypiques et la sécrétion d'IL-8 ont été par la suite confirmées par le test d'un plus grand nombre de substances (Nukada et coll., 2008 ; An et coll., 2009). Les cellules de la lignée U937 expriment elles aussi le marqueur CD86 et sécrètent de l'IL-1 β et de l'IL-8 en réponse aux allergènes forts comme le DNCB et le TNBS (Ade et coll., 2006; Python et coll., 2007).

Lignées MUTZ-3 et KG-1

Les lignées MUTZ-3 et KG-1 ont aussi montré des modifications phénotypes et/ou fonctionnelles après exposition à des allergènes. MUTZ-3 est une lignée cellulaire dont la différenciation est cytokine-dépendante. En présence de GM-CSF et de TNF- α , les cellules MUTZ-3 acquièrent un phénotype de DCs immatures (iMUTZ-DCs) très similaire à celui des CD34⁺-DCs (Masterson et coll., 2002). La présence de TGF- β 1 dans le milieu conduit à la différenciation des MUTZ-3 vers un phénotype de LCs avec expression de la langerine et la présence de granules de Birbeck alors que la présence d'IL-4 conduit vers un phénotype de DDCs (Santegoets et coll., 2006). L'activation des iMUTZ-DCs en MUTZ-3 matures (mMUTZ-DCs) peut être induite par le TNF- α et

le ligand du CD40 (Masterson et coll., 2002; Santegoets et coll., 2006), alors que le LPS n'a pas d'effet. Cette lignée a également suscité l'intérêt pour les tests des produits sensibilisants et s'est montrée prometteuse. Des allergènes forts comme le DNCB, mais également des allergènes faibles comme la benzocaïne, induisent l'activation de MUTZ-3 en terme, principalement, d'expression de CD86 et CD54 (Azam et coll., 2006) alors que l'irritant SDS n'a pas d'effet. Nelissen et coll., (2009) reportent l'induction de l'expression des ARNm de l'IL-1 β , l'IL-8, CCL2, CCL3, CCL3L1 and CCL4 par le nickel bien que ce dernier n'induit aucune expression des marqueurs d'activation. De même, la sécrétion d'IL-8 observée en réponse à des allergènes comme le DNCB et le nickel semble être un meilleur marqueur du pouvoir sensibilisant que l'expression du CD86 qui n'est pas induit de manière reproductible (Ouwehand et coll., 2010). Enfin, la migration préférentielle des MUTZ-3 traitées par les allergènes se fait préférentiellement en réponse à l'IL-12 alors que les MUTZ-3 exposées aux irritants migrent en réponse à CCL5.

D'autre part, la lignée KG-1, dont la différenciation est également cytokine-dépendante (Hulette et coll., 2001) peut acquérir un phénotype de DCs immatures, et bien qu'elles ne répondent pas au LPS ni au ligand du CD40 (Teobald et coll., 2008), elles surexpriment le marqueur CD86 en réponse au MCI/MI (Hulette et coll., 2002). Cependant certains des auteurs nommés ci-dessus relèvent le manque de sensibilité de cette lignée et la difficulté de discriminer les allergènes forts des allergènes faibles/modérés.

Des études comparatives entre la réponse des mono-DCs et celle des THP-1 ont montrées des résultats similaires entre les deux modèles (Tietze et coll., 2008; Bocchietto et coll., 2007) alors qu'une étude entre les différents modèles de lignées (U937, THP-1, KG-1 et MUTZ-3) révèlent des différences, comme une expression basale de HLA-DR, CD54 et CD86 différente selon la lignée et qui leur confère des différences dans leurs réponses aux allergènes (Azam et coll., 2006).

↪ **Kératinocytes**

Les kératinocytes (KCs) jouent un rôle régulateur important dans l'induction de la réponse immunitaire en produisant des médiateurs solubles lors de la réaction d'inflammation. Ils interviennent ainsi dans l'immunité cutanée *via* l'activité antibactérienne de certains lipides de la couche cornée (Miller et coll., 1988), la synthèse de peptides antibactériens comme les défensines (Gallo et Nizet, 2003), la production de nombreuses molécules telles que des chimio-attractants pour les cellules dendritiques (par exemple, MIP-3 α /CCL20, reconnu par le récepteur CCR6 des DCs) et des cytokines inflammatoires (par exemple l'IL-1 β et le TNF- α qui permettent la migration des DCs hors de l'épiderme). Les KCs expriment également des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires spécifiques aux pathogènes tels que les Toll-Like récepteur, TLR (Song et coll., 2002; Kawai et coll., 2002) et, en condition inflammatoire, sont capables d'exprimer le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II.

Comme nous l'avons déjà dit, un haptène, pour être immunogène, doit fixer une protéine épidermique afin d'être reconnu par les DCs. Cependant, cette condition n'est pas suffisante en soit. De nombreux travaux démontrent qu'un haptène doit également être en mesure de délivrer un « signal de danger » qui conduit à l'augmentation, la production et la sécrétion de médiateurs par les cellules environnantes, notamment kératinocytaires, qui sont nécessaires à l'initiation et même à l'orientation d'une réponse immune spécifique (Lebre et coll., 2003). Les propriétés irritantes d'un haptène sont donc directement liées à sa capacité d'induire une réaction sensibilisante spécifique (Cumberbatch et coll., 1993; Grabbe et coll., 1996). En d'autres termes, un allergène qui possède des propriétés irritantes, capables d'induire un « signal de danger » à son site d'entrée dans l'épiderme, est un allergène plus fort (induit une sensibilisation plus importante) qu'un allergène non irritant (Auton et coll., 1995; Basketter et coll., 2007).

L'avantage d'utiliser des kératinocytes (KCs) dans les tests de prédiction vient du fait qu'ils représentent le véritable site d'entrée des haptènes *in vivo* et le lieu des processus d'hapténisation. *In vitro* les KCs, et notamment les KCs murins de la lignée HEL-30, répondent aux haptènes en produisant des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 α et l'IL-18 (pour revue, Vandebriel et coll., 2005). D'autres méthodes utilisent le transfert des surnageant de culture de KCs dans des cultures de DCs (Lebre et coll., 2003) ou la co-culture des deux types cellulaires (Schreiner et coll., 2007). De plus, les KCs font partie intégrante des modèles de peau reconstruite (voir ci-dessous).

2.3. Activation des lymphocytes T naïfs

La prolifération de LT spécifiques d'haptène à partir de LT naïfs peut être induite *in vitro* à partir de LCs fraîchement isolées (Krasteva et coll., 1996), de CD34⁺-DCs (Rougier et coll., 1998; 2000) et de mono-DCs (Guironnet et coll., 2000). Dans tous ces travaux, seules les DCs traitées par des sensibilisants forts sont capables d'induire une réponse primaire lymphocytaire proliférative. Dans le cas des pro-haptènes, faute d'étape de métabolisation, de nombreux faux négatifs sont obtenus, et la réponse proliférative est donneur-dépendante pour les allergènes faibles.

2.4. Les explants cutanés et modèles de peau reconstruite

Les explants cutanés ont permis d'étudier la migration des DCs en réponse aux allergènes comme nouvelle approche pour la discrimination allergènes/irritants. Dans le modèle de Jacobs et coll., (2006), le nickel induit la migration des LCs hors de l'explant. Cependant une migration des LCs est également observée en réponse au SDS. Cette technique peut être un bon modèle si la mesure de la migration des LCs est accompagnée de l'induction de l'expression de marqueurs d'activation comme le CD83 et le HLA-DR par les LCs, qui elle est spécifique des allergènes (Lehé et coll., 2006).

Les modèles d'explants cutanés et de peau reconstruite semblent être un bon moyen d'étudier le pouvoir sensibilisant des molécules. Cependant, les limites de tels modèles reposent sur la difficulté

à solubiliser les sensibilisants dans le milieu de culture et à mesurer la fraction exacte de la substance qui a réellement atteint l'épiderme. De plus, *in vivo*, la capacité de l'haptène à pénétrer la peau est une étape importante qui n'est pas reproduite dans les modèles d'épiderme reconstruit. Cependant, les modèles 3-D humains de peau reconstruite (RHE) offrent de grandes possibilités. Vendu dans le commerce pour certains (SKinEthic, EpiDerm, EpiSkin), ces modèles sont obtenus en cultivant des kératinocytes sur un support synthétique. L'élévation de la culture à l'interface air-liquide permet la différenciation de l'épiderme et l'obtention d'une couche cornée. Ces modèles sont principalement destinés à la discrimination des substances irritantes versus des non-irritantes (Kandárová et coll., 2009), cependant quelques travaux montrent que ces modèles peuvent aussi être utiles dans la discrimination allergènes/irritants en mesurant par exemple la production d'IL-8 et d'IL-1 α induites par le DNCB, le nickel ou le DNFB (Coquette et coll., 2003).

Depuis quelques années ces modèles de peau reconstruite et les équivalents dermiques intègrent des cellules immunocompétentes comme les DCs (Fransson et coll., 1998; Régnier et coll., 1997; 1998; Guironnet et coll., 2001). Sous l'effet d'allergènes comme le nickel, le DNFB et le DNCB, des peaux reconstruites intégrant par exemple des CD34⁺-DCs (Dezutter-Dambuyant et coll., 2006) servent alors de modèles pour le test des sensibilisants, en mesurant la disparition épidermique des DCs, l'apparition de marqueur spécifique comme le CD86 et la sécrétion de cytokines, en comparaison avec l'irritant SDS qui n'a pas d'effet (Facy et coll., 2004; Uchino et coll., 2009).

2.5. Analyse génomique des DCs

La dernière approche est l'étude du transcriptome des DCs en réponse aux allergènes. Les premiers travaux ont étudié le profil d'expression des gènes dans des DCs immatures (LCs, mono-DCs ou CD34⁺-DCs) versus des DCs matures induites par le LPS, le TNF- α et le CD40L. Ces études montrent une augmentation des gènes impliqués dans la présentation antigénique, dans la migration et le recrutement cellulaire (gènes codant principalement des cytokines et des récepteurs de cytokines), et dans l'activation des LT, comme les gènes codant les marqueurs de co-stimulation (Hashimoto et coll., 1999; 2000; Angénieux et coll., 2001; Türeci et coll., 2003).

Plusieurs études ont par la suite utilisé l'analyse génomique de CD34⁺-DCs (Schoeters et coll., 2005; 2006; 2007; Hooyberghs et coll., 2008), de mono-DCs (Ryan et coll., 2004), de MUTZ-3 (Python et coll., 2009) et de THP-1 (Lambrechts et coll., 2009) traitées par des allergènes forts ou modérés afin de mettre en évidence des gènes cibles qui pourraient être pertinents pour la discrimination du potentiel sensibilisant d'allergène. De plus, en utilisant la technologie des puces à ADN (Szameit et coll., 2009), Cluzel-Tailhardat et coll., (2007) démontrent que des allergènes faibles comme l'eugénol peuvent également être discriminés.

Au vu de l'ensemble de ces données, il semble évident qu'il n'existe pas de test *in vitro* unique et fiable pour prédire le pouvoir sensibilisant d'une substance. De par la complexité et l'étendue des mécanismes de l'EAC, sa modélisation et la mise en place d'un test alternatif à l'expérimentation animale nécessite forcément une approche multiparamétrique.

III. Voies de signalisation induites par les sensibilisants de contact

L'étude des voies de signalisation induites par les sensibilisants de contact dans les modèles *in vitro* est basée sur les travaux concernant les voies de signalisation induites par d'autres signaux de danger, comme le LPS et le TNF- α .

1. Activation des DCs en réponse au LPS et au TNF- α .

L'activation des mono-DCs induite par le LPS et le TNF- α est dépendante des voies MAPKs (p38 MAPK, JNK et Erk1/2) et de la voie NF- κ B. Les voies p38 MAPK et JNK sont des SAPKs (Stress-Activated Protein Kinase) activées par un stress oxydant alors que la voie Erk1/2 régule préférentiellement la prolifération et la différenciation cellulaire (Chang et coll., 2001). L'expression des marqueurs CD80, CD83 et CD86 induite par le LPS et le TNF- α dans les mono-DCs est principalement liée à l'activation des voies p38 MAPK (Ardeshtna et coll., 2000; Arrighi et coll., 2001; Bouchon et coll., 2001) et JNK (Nakahara et coll., 2004). Inversement, l'activation de la voie Erk1/2 ne semble pas être impliquée dans l'expression des marqueurs d'activation induit par le LPS (Ardeshtna et coll., 2000; Arrighi et coll., 2001; Bouchon et coll., 2001) et semble plutôt réguler négativement l'activation induite par le TNF- α (Puig-Kröger et coll., 2001).

La voie NF- κ B est impliquée dans l'expression du HLA-DR, en plus des molécules de co-stimulation précédemment citées (Ardeshtna et coll., 2000; Yoshimura et coll., 2001; Tas et coll., 2005).

Au niveau cytokinique, la voie p38 MAPK est également impliquée, au moins partiellement, dans l'induction de l'expression des ARN messagers du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL1Ra induite par le LPS et le TNF- α (Arrighi et coll., 2001). La voie NF- κ B est impliquée dans la sécrétion d'IL-6, d'IL-12 et de TNF- α induite par le LPS (Tas et coll., 2005).

Bien que la signalisation induite par le LPS passe par des récepteurs (de type TLR4), il est quasiment impossible que des récepteurs soient impliqués dans la transduction du signal induit par les allergènes, de par notamment l'absence de structure conservée entre les sensibilisants. Cependant, au vu des résultats présentés ci-dessous, les mécanismes intracellulaires qui entrent en jeu partagent de grandes similitudes avec la réponse des DCs au LPS et au TNF- α .

2. Activation des DCs en réponse aux allergènes.

Des mono-DCs traitées par le nickel, le DNFB, le TNCB et le DNCB montrent une activation de p38 MAPK (Arrighi et coll., 2001; Aiba et coll., 2003; Bruchhausen et coll., 2003; Mizuashi et coll., 2005). Ces résultats sont retrouvés dans des CD34⁺-DC traitées par le nickel et le DNCB (Boislève et coll., 2004; 2005).

L'activation de JNK a été démontrée dans les mono-DCs et les CD34⁺-DCs en réponse au nickel et au DNCB (Aiba et coll., 2003; Boislève et coll., 2004; 2005).

L'activation des voies p38 MAPK et JNK est impliquée, dans les deux modèles de DCs (mono-DCs et CD34⁺-DCs), dans l'expression des marqueurs d'activation comme le CD86, le CD83, HLA-DR, le récepteur CRR7 et la sécrétion de cytokines telles que l'IL-8 et le TNF- α (Aiba et coll., 2003; Boislève et coll., 2004; 2005).

Bien que l'activation de la voie Erk1/2 soit détectée en réponse principalement au nickel, son inhibition entraîne des résultats contradictoires selon le modèle: dans les mono-DCs, l'inhibition d'Erk1/2 altère la production des cytokines IL-1 β et TNF- α (Aiba et coll., 2003) alors qu'elle diminue l'expression du CD86, du CD83 et du récepteur CRR7 dans les CD34⁺-DC (Boislève et coll., 2005).

Enfin, l'activation de la voie NF- κ B est retrouvée dans les mono-DCs en réponse au nickel (Aiba et coll., 2003).

D'autres travaux ont étudié les voies de signalisation induites par les allergènes dans les lignées cellulaires humaines. L'engagement du récepteur CD40 présent à la surface des THP-1 entraîne l'activation d'Erk1/2 et dans une moindre mesure, celle de JNK. L'inhibition de la voie Erk1/2, supprime la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de TNF- α (Pearson et coll., 2001). La voie NF- κ B est impliquée dans l'induction du transcript de l'IL-12p40, toujours induit par CD40 (Yoshimoto et coll., 1997). Pour les allergènes, l'activation des THP-1 (expression du CD86, CD54 et CD40) induite par le DNCB et le nickel, mais aussi par l'action autocrine du TNF- α et par l'ATP extracellulaire (Miyazawa et coll., 2008b) est dépendante de l'activation de p38 MAPK et Erk1/2 (Nukada et coll., 2008). L'inhibition de p38 MAPK abolit la sécrétion d'IL-8 induite notamment par le nickel (Mitjans et coll., 2008). De même, l'expression du CD54 et la sécrétion d'IL-8 induite par le DNFB dans cette même lignée est sous le contrôle de l'activation de p38 MAPK, et aucune activation de NF- κ B n'est détectée (Megherbi et coll., 2009).

IV. Stress oxydant

1. Introduction

Revue soumise à Médecine/Sciences.

Stress oxydant et physiopathologies cutanées

C. Migdal et M. Serres.

Introduction

Le stress oxydant se définit par un déséquilibre de la production d'espèces radicalaires de l'oxygène (ERO) et/ou une diminution des fonctions antioxydantes de la cellule. Il a longtemps été considéré comme un phénomène nuisible lié au métabolisme de l'oxygène et capable d'interagir, entre autre, avec l'ADN, les protéines et les lipides. Cependant, la production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) par les cellules phagocytaires dans la lutte contre les pathogènes et le rôle biologique du monoxyde d'azote (NO), vont mettre l'accent sur le rôle physiologique du stress oxydant. Depuis plusieurs années, la production contrôlée d'ERO apparaît comme un mécanisme essentiel de la régulation et de la signalisation cellulaire participant au maintien de l'homéostasie radicalaire de la cellule. A l'heure actuelle, une perturbation de cette homéostasie est considérée comme étant impliquée dans l'apparition de nombreuses pathologies (cancer, athérosclérose, maladies cardiaques et neuro-dégénératives, maladies cutanées).

Plus qu'une enveloppe extérieure, la peau est un organe à part entière qui joue un rôle essentiel, non seulement dans la protection contre les agressions extérieures, mais aussi sur le plan esthétique et émotionnel. Aucun autre de nos organes ne peut revendiquer d'être à la fois photoprotecteur, thermorégulateur, barrière de défense, mais aussi récepteur sensoriel et capable de synthétiser des produits indispensables à l'organisme comme la vitamine D. Cependant, sa position unique à l'interface de notre milieu intérieur et de notre environnement l'expose plus que d'autres à de nombreuses agressions.

L'effet des radicaux libres en biologie et notamment en biologie cutanée est maintenant bien documenté et montre que les organismes vivants ne se sont pas seulement adaptés à coexister en présence de radicaux, mais ont également développés des mécanismes pour les utiliser à leurs avantages.

Cette revue fait le point sur le stress oxydant en se focalisant principalement sur le rôle physiologique et pathologique des espèces réactives de l'oxygène dans la peau, en abordant successivement les notions du vieillissement et de l'immunité cutanée.

Le stress oxydant

Un radical est par définition une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique qui lui confère un considérable degré de réactivité. Parmi les différents radicaux participants aux phénomènes de stress oxydant, on retrouve les radicaux centrés sur un atome d'oxygène, les espèces réactives de l'oxygène (ERO), et les radicaux centrés sur l'azote, les espèces

réactives de l'azote (ERA). Les ERO comme les ERA sont des produits du métabolisme cellulaire normal et jouent un rôle paradoxal : un effet bénéfique/physiologique lorsqu'ils sont produits de manière régulée et à faible concentration ; et un effet délétère/pathologique dans le cas d'une production en excès, souvent associée à une perturbation des systèmes de défense antioxydants.

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les radicaux libres sont générés physiologiquement en très faible quantité au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale lors du métabolisme normal de l'oxygène. La réduction tétravalente de l'oxygène en eau se fait en plusieurs étapes successives qui donnent naissance à des intermédiaires potentiellement réduits. Ainsi, environ 2% de l'oxygène consommé au niveau mitochondrial est transformé en radicaux superoxydes $O_2^{\cdot-}$. A partir de ce radical, dit primaire, d'autres radicaux ou molécules peuvent être formés comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyle $\cdot OH$ (Fig. 1). Ces sous-produits du métabolisme aérobie sont appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO) car ces entités radicalaires et moléculaires sont beaucoup plus réactives que l'oxygène qui leur a donné naissance.

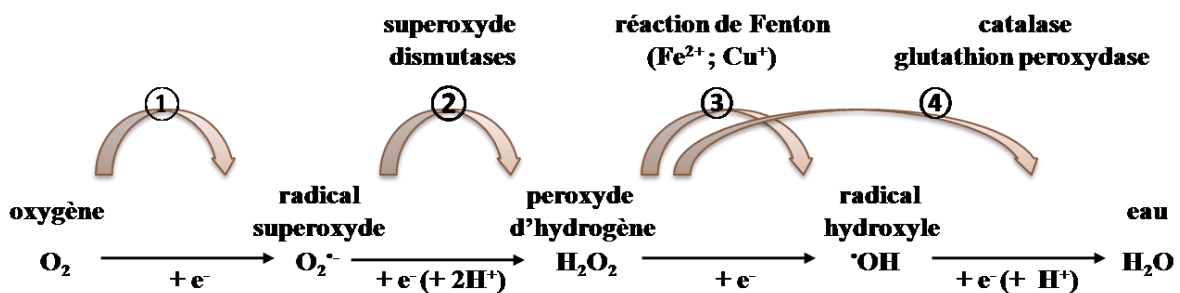


Figure 1. Origine des ERO, les quatre étapes de la réduction de l'oxygène. Le radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ est formé lors de la première réduction électronique de l'oxygène ①. La production de ces radicaux est régulée par des enzymes, les superoxyde dismutases, qui catalysent leur dismutation en peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 ②. Bien que le peroxyde d'hydrogène ne soit pas un radical mais une molécule, il est lui-même toxique et peut donner naissance, *via* des réactions de type « réaction de Fenton », au plus délétère des espèces radicalaires du stress oxydant, le radical hydroxyle $\cdot OH$ ③. H_2O_2 est lui-même régulé par la catalase qui accélère sa dismutation, et la glutathion peroxydase qui catalyse sa réduction par le glutathion ④.

Sources cellulaires des ERO et modes d'action

En parallèle de leur production physiologique par le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire, la plupart des cellules sont capables de produire des radicaux superoxydes $O_2^{\cdot-}$ *via* une activité NAD(P)H oxydase membranaire (NOX). La NOX est une enzyme qui catalyse la réduction monoélectronique de l' O_2 en utilisant le NADPH ou le NADH comme donneur d'électrons :

$$NAD(P)H + 2O_2 \rightleftharpoons NAD(P)^+ + H^+ + 2O_2^{\cdot-}$$

La NOX a été initialement étudiée dans les cellules phagocytaires où elle joue un rôle primordial dans la défense contre les pathogènes, mais existe également dans toutes les autres cellules non phagocytaires où elle participe à la signalisation cellulaire. La NOX est localisée dans la membrane cytoplasmique et dans certains granules spécifiques des neutrophiles. Selon le type cellulaire, la NOX peut libérer $O_2^{\cdot-}$ de manière préférentielle vers l'extérieur (cellules phagocytaires) ou vers l'intérieur (cellules non phagocytaires) de la cellule. Parmi les isoformes existant dans la famille NOX, la NOX2 des cellules phagocytaires est la plus étudiée. Les sous-unités principales constitutives de la NOX2 sont présentes dans deux compartiments cellulaires distincts : la membrane (où se trouve le site catalytique, le cytochrome b_{558} composé de gp91^{phox} et p22^{phox}) et le cytosol (où sont localisées les protéines régulatrices p47^{phox}, p40^{phox} et p67^{phox}). Après stimulation, les protéines cytosoliques migrent vers la membrane et s'associent au cytochrome b_{558} pour former une NOX2 active par l'intermédiaire de protéines G (Nauseef, 2008). Les autres isoformes de la NOX (Fig. 2) partagent toutes une homologie de séquence avec gp91^{phox}. Elles se différencient de la NOX2 phagocytaire par des organisations structurales différentes, la présence ou non de p22^{phox} et de mécanismes régulateurs (séquences et/ou sous-unités cytosoliques régulatrices, protéines associées, dépendance au calcium).

D'autres sources, cytosoliques ou présentes au sein de différents organites, peuvent également produire des ERO : la xanthine oxydase, qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine au cours du métabolisme des purines, les enzymes de la voie de l'acide arachidonique, enzymes du réticulum endoplasmique, peroxyosomes, lysosomes (qui contiennent la myéloperoxydase, MPO, responsable de la formation d'acide hypochloreux, HOCl) et le noyau, qui possède, comme la mitochondrie, des cytochromes oxydases et une chaîne de transport d'électrons capables de générer $O_2^{\cdot-}$.

Les espèces réactives de l'azote (ERA)

Le principal représentant des espèces réactives de l'azote est le monoxyde d'azote radicalaire (\cdot NO). Le \cdot NO, synthétisé grâce aux NO synthases, NOS (Darblade et coll. 2000), exerce ses effets régulateurs sur un grand nombre de fonctions physiologiques telles que le maintien du tonus vasculaire, les phénomènes de neurotransmission, le fonctionnement rénal et dans la régulation de l'immunité non spécifique. Le \cdot NO joue principalement un rôle physiologique dans la signalisation

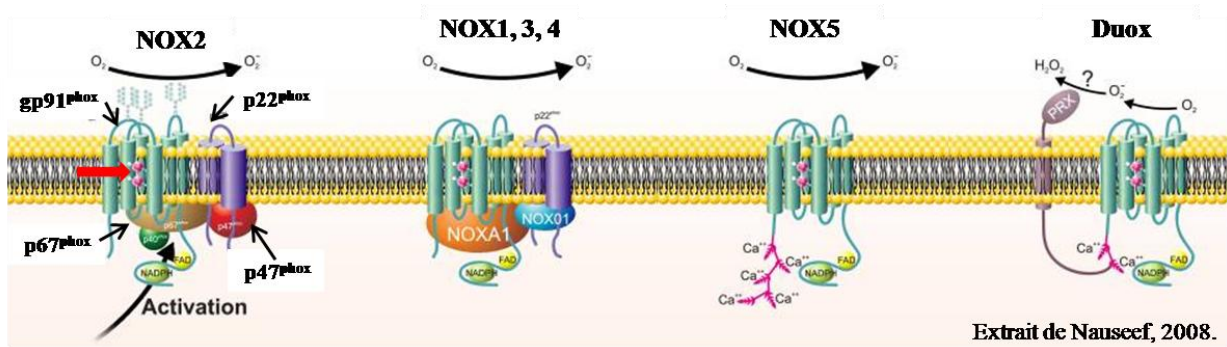


Figure 2. Toute la famille des enzymes NOX possède un domaine gp91^{phox}/NOX2, ou similaire, composé d'un domaine C-terminal cytoplasmique capable de fixer le NAD(P)H, et d'un domaine N-terminal comportant six domaines transmembranaires ayant deux groupements hémiques (flèche rouge). Les électrons sont transférés du NAD(P)H, via le FAD et les hèmes intramembranaires, à l'oxygène moléculaire, donnant naissance au radical superoxyde O₂^{•-}. Les NOX2 et 1, 3, 4 forment un hétérodimère avec p22^{phox}. Des homologues des protéines cytosoliques régulatrices de NOX2, NOXA1 et NOX01 sont impliqués dans l'activité des NOX1, 3 et 4. NOX5 et les Duox1 et 2 possèdent des domaines dits «mains E-F», qui rend leur activité oxydase calcium dépendante. Enfin, les Duox peuvent produire H₂O₂.

cellulaire en tant que messenger secondaire. Cependant, comme pour les ERO, le 'NO, lorsqu'il est produit en condition non régulée, est impliqué dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, l'athérosclérose, le cancer et les lésions neuronales dégénératives. Ce sujet ne sera que très peu abordé dans cet article.

Systèmes antioxydants

L'organisme a développé des systèmes de défense, enzymatiques ou non, capables de contrecarrer les effets des ERO. Ces molécules, dites antioxydantes, sont par définition «une substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat» (Halliwell et Gutteridge, 1990). Ce sont donc des «capteurs» d'ERO, capables de se substituer aux cibles biologiques vis à vis de l'attaque radicalaire, afin de protéger ces dernières. De plus, ces «capteurs» doivent être capables de se régénérer après oxydation.

Les antioxydants enzymatiques endogènes sont représentés par les superoxyde dismutases (SOD), métalloenzymes qui catalysent la dismutation du radical superoxyde O₂^{•-} (voir Fig. 1), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx), qui agissent sur les peroxydes et le système de la thiorédoxine (Trx) et intervient dans la protection des protéines à fonction thiol.

Parmi les antioxydants non enzymatiques endogènes, citons principalement les thiols, composés organiques comportant un groupement sulfhydryle (-SH) attaché à un atome de carbone. Le glutathion

(GSH) est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) qui représente le groupement thiol majoritaire au niveau intracellulaire (10^{-4} à 10^{-3} M.L⁻¹ sous forme réduite). Il possède un fort pouvoir réducteur et peut également chélater les ions Cu²⁺ et ainsi limiter leur participation à la génération d'ERO par les réactions de type Fenton (voir Fig. 1). Le GSH est capable de piéger directement des radicaux comme $\cdot\text{OH}$, R \cdot , RO₂ \cdot , HOCl et ONOO⁻ (Halliwell et Gutteridge, 1999) et participe à l'activité d'antioxydants enzymatiques comme la GPx.

L'organisme possède d'autres antioxydants non enzymatiques endogènes comme la bilirubine, qui résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine et est capable de piéger RO₂ \cdot , les hormones sexuelles femelles (œstrogènes), capables d'inhiber la peroxydation lipidique *in vitro* (Ayres et coll., 1996), l'acide urique, capable de réagir avec $\cdot\text{OH}$, l'ubiquinol, ou coenzyme Q, présent dans les membranes cellulaires et les lipoprotéines où il piège RO₂ \cdot et inhibe la peroxydation lipidique (Ernster et Dallner, 1995), la mélanine qui protège des rayonnements ultraviolets et se comporte comme un piègeur de radicaux libres vis à vis de O₂ \cdot^- et RO₂ \cdot (Sarna et coll., 1986), la mélatonine, hormone produite par la glande pinéale qui présente des propriétés antioxydantes vis à vis de $\cdot\text{OH}$ et H₂O₂ mais également des ERA comme le $\cdot\text{NO}$ et le peroxydant (Reiter et coll., 2001). Enfin, citons l'acide lipoïque, cofacteur essentiel du cycle de Krebs possédant *in vitro* des propriétés antioxydantes vis à vis de $\cdot\text{OH}$ et RO₂ \cdot (Bast et Haenen, 2003).

En plus des mécanismes de défense développés par l'organisme contre la production d'ERO, les composants de l'alimentation jouent un rôle primordial. Les bienfaits d'une alimentation riche en fruits et légumes sont attribués à leur teneur élevée en antioxydants. Ainsi une alimentation riche en micronutriments (vitamines, caroténoïdes, sélénium, zinc) et autres microconstituants (flavonoïdes, sulfures d'allyle) diminue le risque de cancers (Riboli et Norat, 2003), de maladies cardiovasculaires (Hu, 2003) et de maladies neurodégénératives (Desport et coll., 2002).

Caractéristiques et modes d'action des ERO

Les propriétés principales des ERO sont leur réactivité vis à vis d'un grand nombre de cibles biologiques. Ils sont capables d'attaquer/modifier des lipides, des protéines et l'ADN.

Les acides aminés et les protéines sont les premières cibles des ERO. Il a été estimé que 50 à 70% des ERO produits par une cellule peuvent être piégés par les protéines. Les protéines oxydées constituent un marqueur intéressant du stress oxydant qui accompagne de nombreuses pathologies. Les chaînes latérales de tous les acides aminés sont des cibles potentielles pour les ERO mais également pour les ERA (Davies, 1987). Les cibles majeures sont les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine), les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) (Tableau 1). Cependant, l'oxydation de certaines protéines spécifiques n'est pas uniquement le témoin de la présence d'un stress oxydant délétère, mais intervient également dans la régulation de processus métabolique (Levine, 2002). Citons par exemple que

l'oxydation réversible de la cystéine joue un rôle important dans l'activation ou l'inactivation de certaines protéines (Finkel, 2000). En effet, un grand nombre de fonctions physiologiques sont sous le contrôle des ERO/ERA et de leurs effets activateurs/régulateurs dans les voies de signalisation. De nombreux signaux membranaires peuvent être à l'origine d'une production d'ERO. Certains récepteurs aux cytokines, tyrosine kinases, sérine/thréonine kinases, couplés aux protéines G ou à des canaux ioniques, génèrent des ERO après fixation sur leurs ligands. Ces ERO produits vont alors participer à la transduction et l'amplification du signal, on parle alors de «signalisation redox». Les ERO/ERA peuvent activer des récepteurs par phosphorylation (récepteurs à l'EGF (epidermal growth factor) et à l'insuline), inhiber des phosphatases amplifiant ainsi les cascades de signalisation, activer directement des kinases (MAPKs, PKC) et des facteurs de transcription (AP-1, NF- κ B) ou initier une augmentation du calcium cytosolique. Les ERO/ERA amplifient et/ou initient les signaux intracellulaires par deux mécanismes :

- modification de l'équilibre redox intracellulaire (équilibre GSH/GSSG et thiorédoxine capable de moduler le signal redox intracellulaire).
- modification oxydative des protéines (oxydation de résidus cystéinyles, formation de ponts disulfures, de dityrosine et oxydation médiée par des métaux de transition).

Une autre cible majeure de l'attaque radicalaire est les acides gras polyinsaturés, comme l'acide linoléique et l'acide arachidonique, présents notamment dans les membranes plasmiques. Leur oxydation par les ERO, appelée peroxydation lipidique, conduit à la formation de très nombreux produits primaires (les hydroperoxydes) et secondaires (les aldéhydes) dont les activités biologiques sont multiples (Murphy, 1996). Les phospholipides oxydés ainsi produits miment l'action du médiateur pro-inflammatoire PAF (platelet-activating factor) et activent ses récepteurs (Marathe et coll., 1999) exprimés par un grand nombre de cellules dont les cellules épidermiques (Travers, 1999). En réponse à un stress oxydant, les phospholipides oxydés (ou PAF-like) jouent ainsi un rôle direct dans l'inflammation cutanée (Alappatt et coll., 2000) en induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 par les kératinocytes (Pei et coll., 1998).

ACIDES AMINÉS	AGENT OXYDANT
Cystéine	$\cdot\text{OH}$ OONO^-
Méthionine	$\cdot\text{OH}$ OONO^-
Arginine	$\cdot\text{OH}$ en présence d'O_2 $\text{RO}_2\cdot$
Histidine	$\cdot\text{OH}$
Lysine	$\cdot\text{OH}$ en présence d'O_2
Phénylalanine	$\cdot\text{OH}$ OONO^-
Tryptophane	$\cdot\text{OH}$ OONO^-
Tyrosine	$\cdot\text{OH}$ OONO^- HOCl

Tableau 1. Pouvoir antioxydant de quelques acides aminés.

Le stress oxydant dans le vieillissement

La théorie radicalaire

La théorie radicalaire du vieillissement a été introduite pour la 1^{ère} fois par Denham et Harman en 1956 et appartient aux théories stochastiques (par opposition aux théories déterministes qui énoncent que le vieillissement est contrôlé par le génome). Elle stipule que le vieillissement s'explique par l'accumulation, au cours de la vie, de dommages oxydatifs causés aux cellules par un excès de production d'ERO comme conséquence du métabolisme aérobie. Quelques années plus tard, Harman lui-même va étayer sa propre théorie, en plaçant la mitochondrie au cœur du mécanisme du vieillissement. Ainsi la théorie radicalaire va évoluer vers ce que l'on appelle aujourd'hui, la théorie mitochondriale du vieillissement.

La théorie mitochondriale

La mitochondrie étant l'une des principales sources physiologiques d'ERO, l'accumulation de dommages oxydatifs causée à l'ADN mitochondrial (ADN_{mt}) au cours de la vie pourrait directement

entraîner un progressif déclin cellulaire et tissulaire et participer ainsi activement au processus du vieillissement. En effet, les dommages oxydatifs peuvent entraîner des mutations somatiques au sein de l'ADN_{mt}, perturbant le fonctionnement de la chaîne respiratoire, augmentant la production d'ERO et créant alors de nouvelles mutations. Des corrélations ont été démontrées entre vieillissement et augmentation de la production d'ERO mitochondriale et entre la diminution de la fonction mitochondriale et l'accumulation de mutations au sein de l'ADN_{mt}.

Cette théorie est supportée par plusieurs arguments, observés *in vivo* et *in vitro* (humains ou animaux), dans différents tissus et types cellulaires. Ainsi on retrouve chez les sujets âgés :

- une diminution de l'activité générale de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette chute de l'activité se caractérise par une diminution du transport des électrons et de la phosphorylation oxydative, de l'activité des différents complexes enzymatiques et de l'activité ATPase (Wei et coll., 2009),
- une augmentation de la production d'ERO mitochondriale qui entraîne l'apparition de mutations dans l'ADN_{mt} mais également dans l'ADN nucléaire (Yakes et Van Houten, 1997),
- une augmentation de la quantité de protéines mitochondriales oxydées (Agarwal et Sohal, 1995),
- une diminution de l'activité des systèmes antioxydants tels que la SOD, la catalase et la GPx (Lu et coll., 1999),
- une augmentation de l'apoptose dépendante des ERO caractérisée notamment par une fragmentation de l'ADN associée à une forte expression de p53 et Fas/FasL (Higami et Shimokawa, 2000).

La théorie mitochondriale du vieillissement a été par la suite renforcée par l'utilisation de souris transgéniques. Des souris partiellement déficientes en Mn-SOD mitochondriale (Sod2^{+/-}) présentent de plus faibles quantités de GSH, une augmentation des dommages oxydatifs de l'ADN et des protéines carbonylées (Williams et coll., 1998). D'autre part, des souris qui présentent une mutation dans l'ADN polymérase mitochondriale (PolgA^{mut}/PolgA^{mut}), entraînant une augmentation des mutations de 3 à 5 fois supérieure aux souris sauvages, affichent des signes de vieillissement prématuré (Trifunovic et coll., 2004).

Parmi les travaux évoqués ci-dessus, nombreux sont ceux qui portent sur la théorie mitochondriale du vieillissement dans des fibroblastes. En effet, le fibroblaste est largement utilisé comme modèle *in vitro* du vieillissement. En culture, les fibroblastes ne peuvent se diviser qu'un nombre limité de fois, au-delà duquel, les cellules entrent en sénescence et meurent. La sénescence des fibroblastes *in vitro* peut expliquer en partie le vieillissement *in vivo* : le nombre de cycles cellulaires d'un fibroblaste en culture diminue avec l'âge du donneur et ce nombre de cycle est moindre dans les maladies où on observe un vieillissement précoce (Hayflick, 1975).

Les fibroblastes sont les principales cellules du tissu conjonctif dermique cutané. C'est l'altération de ce tissu conjonctif qui est la cause du vieillissement de la peau. Elle fait partie des organes qui subissent les premiers signes visibles du vieillissement. Ainsi la peau âgée est fine, sèche,

relâchée, avec une perte d'élasticité et de régularité architecturale, une atrophie générale de la matrice extracellulaire (MEC) associée à une diminution du nombre de fibroblastes. On observe également une diminution de la synthèse protéique entraînant une diminution des teneurs en collagène et en élastine associée à une détérioration des protéines de la MEC. Le vieillissement cutané est influencé par de nombreux facteurs, incluant la génétique, les changements hormonaux et des processus métaboliques. L'influence de l'environnement, et particulièrement l'exposition au soleil (irradiations UV) joue un rôle prépondérant. Historiquement, le photovieillissement induit par les irradiations UV et le vieillissement cutané dit chronologique sont deux mécanismes bien distincts. Bien que l'apparence de la peau photovieillie et celle dû au vieillissement chronologique soit différentes, elles partagent de nombreuses caractéristiques au niveau moléculaire et fait ainsi du photovieillissement un bon modèle d'étude du vieillissement chronologique.

Le vieillissement induit par les UV mobilise le TGF- β et le facteur de transcription AP-1, tous deux impliqués dans la régulation de la production du collagène. Le TGF- β induit la production de collagène, alors qu'AP-1 (sous le contrôle des MAPKs) l'inhibe en induisant les enzymes MMPs (métalloprotéinases) responsables de sa dégradation. Sous l'effet des UV, la peau génère des ERO et active AP-1, qui par l'action des MMPs, va entraîner la dégradation du collagène. De plus, les UV diminuent l'expression du TGF- β entraînant une baisse concomitante de sa synthèse (Helfrich et coll., 2008). Les mécanismes moléculaires impliqués dans le vieillissement chronologique font intervenir les mêmes acteurs, AP-1 (Chung et coll., 2000) et MMPs (Fisher et coll., 2002). Il est maintenant reconnu que l'exposition aux irradiations UV augmente et amplifie le processus du vieillissement chronologique.

Stress oxydant et immunité cutanée innée

La première ligne de défense de l'organisme face aux agressions extérieures est la peau et les muqueuses qui constituent une barrière physique. Une des grandes fonctions de l'organisme est la défense contre les pathogènes étrangers, par le biais du système immunitaire. Macrophages, neutrophiles et autres cellules phagocytaires jouent un rôle essentiel dans l'élimination des micro-organismes tels que les bactéries, virus, champignons, protistes ou parasites, de part leur capacité à générer des ERO et ERA, aux effets antimicrobiens et cytotoxiques.

Lorsqu'un agent pathogène arrive à traverser cette barrière et se retrouve dans le tissu conjonctif sous-jacent, il déclenche une série de réactions qui va conduire à son élimination par les phagocytes. La réaction inflammatoire est une réaction des tissus lésés qui vont produire des médiateurs chimiques et déclencher la cascade inflammatoire. La libération d'histamine, de prostaglandines et de leucotriènes dans le liquide interstitiel va contribuer à augmenter la perméabilité des capillaires. En conséquence, l'afflux de liquides riches en facteurs de coagulation et en anticorps va activement participer à la réparation tissulaire (dilution des substances toxiques présentes, apport

d'O₂ et de nutriments, coagulation etc..). La réaction inflammatoire va également déclencher un recrutement des cellules phagocytaires vers le site d'infection (leucocytose) *via* la libération de facteurs chimiotactiques par les tissus lésés. Les neutrophiles, puis les monocytes-macrophages, sont ainsi attirés précocement (moins d'une heure après l'agression) et atteignent le lieu de l'infection par diapédèse en traversant les capillaires dont la perméabilité est accrue. Ces cellules phagocytent les microorganismes dans le phagosome qui fusionne avec les vésicules lysosomiales pour former le phagolysosome à l'intérieur duquel les particules infectieuses sont digérées. La destruction du pathogène fait intervenir deux mécanismes : O₂-indépendant ou dégranulation et O₂-dépendant, encore appelé explosion oxydative (oxidative burst en anglais).

- la bactéricidie indépendante de l'oxygène est soit de nature enzymatique et implique le lysozyme, soit de nature non enzymatique et fait intervenir les acides, la lactoferrine et les protéines cationiques au fort pouvoir antibactérien (défensines, cathépsine G, azurocidine, etc...). Le lysozyme entraîne la décomposition de la paroi bactérienne et l'acidification de la vésicule indispensable à l'activité des enzymes lysosomiales et à la myéloperoxydase (MPO). La diminution du pH a également un effet bactéricide et bactériostatique direct. La lactoferrine capte le fer vésiculaire indispensable à la croissance bactérienne. Enfin, les déchets sont rejetés dans le milieu extracellulaire par un processus d'exocytose, ce qui peut entretenir la réaction inflammatoire.

- la bactéricidie dépendante de l'oxygène fait intervenir trois systèmes enzymatiques (NOX, NOS et MPO) pour la formation d'ERO et d'ERA. Juste après la phagocytose du pathogène, les phagocytes augmentent considérablement leur consommation d'oxygène et passent d'un état quiescent à activé. L'oxygène est réduit par la NOX2 phagocytaire en radical superoxyde. O₂^{•-} est auto-bactéricide par formation d'autres espèces comme le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ qui, à son tour, en présence de métaux de transition, va pouvoir donner naissance au puissant radical hydroxyle [•]OH (voir Figure 1). En parallèle, les MPO (en milieu acide) catalysent par H₂O₂ l'oxydation des ions halogénures pour former l'acide hypochloreux (HOCl). Enfin, les NOS2 vont former des ERA et notamment [•]NO (hautement important pour la lyse des bactéries et des parasites intracellulaires) qui, en réagissant avec O₂^{•-} produit par NOX2, va donner naissance au peroxinitrite OONO[•]. Toutes ces substances produites, O₂^{•-}, H₂O₂, [•]OH, [•]NO et OONO[•], qui interagissent les unes avec les autres afin de détruire le pathogène, traduisent l'explosion oxydative (Figure 3).

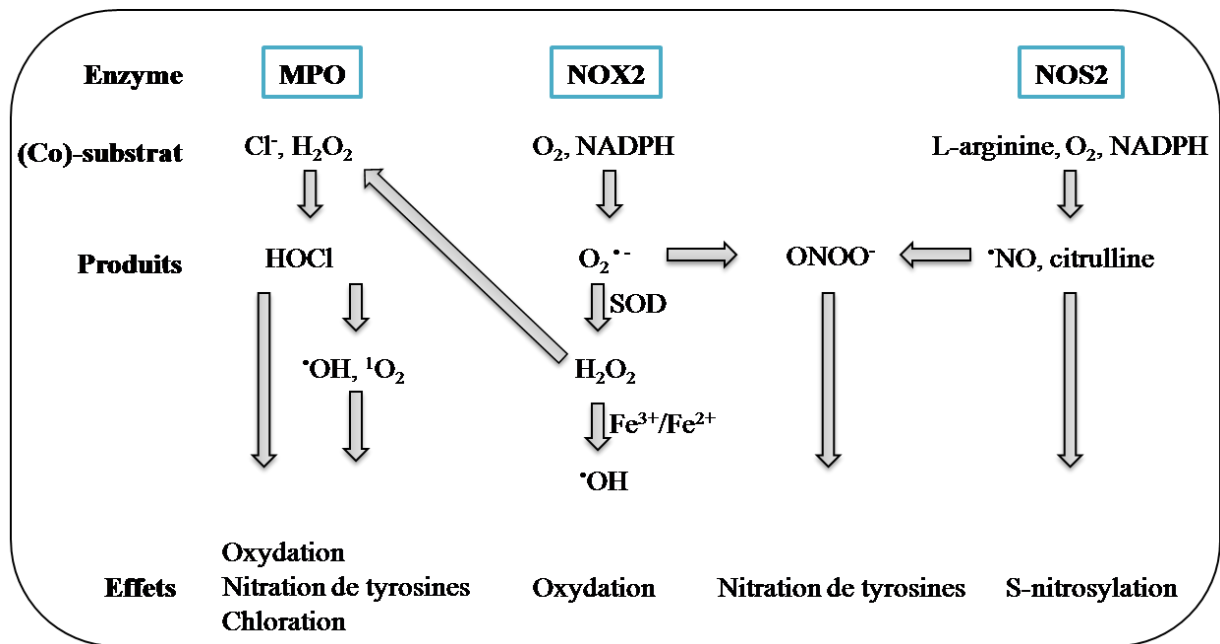


Figure 3. Vue d'ensemble de l'explosion oxydative, ou effet bactéricide oxygène dépendant, des phagocytes.

Stress oxydant et immunité cutanée adaptative. Le cas des allergies.

La peau, de par sa localisation à l'interface avec l'environnement, est le seul organe constamment soumis au stress (pollution, tabac, rayons UV, exposition à des pathogènes). De plus, tous ces constituants sont victimes des radicaux libres : les lipides, en particulier du film hydrolipidique, les protéines, en particulier celles qui maintiennent la tonicité et l'élasticité de la peau, et même l'ADN des noyaux cellulaires et des mitochondries. De nombreuses pathologies sont liées de près ou de loin au stress oxydant.

Les allergies, ou réactions d'hypersensibilité, correspondent à une réaction inappropriée du système immunitaire vis à vis d'une substance étrangère (antigène), qui pour la plupart des individus (non atopiques par définition), n'est pas dangereuse. Les réactions d'hypersensibilité sont spécifiques de l'antigène (appelée allergène) et se déroule en deux phases. La première, asymptomatique d'un point de vue clinique, correspond au premier contact avec l'allergène. La deuxième phase, dite de révélation ou d'élicitation, résulte d'un deuxième contact avec l'allergène (au même site ou à un site distinct) et peut survenir quelques jours ou quelques mois après la sensibilisation. La classification de Gell et Coombs, 1945, classe les réactions d'allergies selon quatre types : l'hypersensibilité de type I médiée par les IgE, l'hypersensibilité de type II qui correspond aux lésions cellulaires et tissulaires dues à l'action des anticorps IgM et IgG et concerne plus particulièrement les cellules du sang (cytopénie), l'hypersensibilité de type III qui implique également les anticorps IgM et IgG et le système du complément mais plus particulièrement, il s'agit d'une maladie par complexes immuns

formés d'anticorps, et l'hypersensibilité de type IV qui correspond à une réaction à médiation cellulaire impliquant les lymphocytes T spécifiques.

On retrouve la notion de stress oxydant dans les réactions d'hypersensibilité de type I et IV, qui en terme de pathologies allergiques sont les plus fréquemment observées.

Le stress oxydant a été mis en évidence dans plusieurs pathologies inflammatoires cutanées induites par les lymphocytes T, comme le psoriasis, la dermatite atopique et l'eczéma de contact (pour revue, Fuchs et coll., 2001). Le stress oxydant intervient à différentes étapes de la physiopathologie. Dans l'eczéma allergique de contact (EAC), qui est la forme la plus répandue des allergies de type IV, de nombreux allergènes sont par eux-mêmes des pro-oxydants, comme les sels de métaux (nickel, chrome) qui nécessitent une étape d'oxydation afin de devenir pleinement allergénique (cas de pré-haptène comme le limonène). Dans l'eczéma allergique de contact, l'allergène, une fois au contact de la peau, est rapidement capté par les cellules dendritiques (DCs) résidentes de l'épiderme (cellules de Langerhans) et du derme. Ces cellules sont les sentinelles immunologiques de la peau qui reconnaissent et appréhendent les antigènes afin de les présenter aux lymphocytes T naïfs des ganglions lymphatiques drainants. La reconnaissance de l'allergène par les DCs entraîne leur activation et leur migration. Le processus d'activation des DCs induit par les allergènes se traduit par une surexpression des marqueurs de co-stimulation (CD80, CD86, CD83, CD54) nécessaires à l'activation des lymphocytes T et du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II présent à la surface des DCs et nécessaire à la présentation antigénique. Une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et la modification de l'expression de certaines protéines nécessaires à leur migration (CCR7, E-cadhérine) sont également observées (pour revue, Bancheau et coll., 2000). Des travaux récents montrent que des allergènes expérimentaux comme le DNCB ou le nickel sont capables d'induire *in vitro* l'activation des DCs (Aiba et al. 1997) *via* une signalisation rédox qui fait intervenir la production d'ERO (Migdal et coll., 2010) associée à une perturbation des systèmes antioxydants comme le GSH (Mizuashi et coll., 2005). L'utilisation d'antioxydants comme la N-acétyl-L-cystéine (NAC) et GSH a mis en évidence le rôle direct des ERO et des fonctions thiols dans la transduction du signal en réponse aux allergènes (Bruchhausen et coll., 2003; Becker et coll., 2003), et plus particulièrement dans l'expression des marqueurs de co-stimulation (Trompezinski et coll., 2008). Le processus d'activation des DCs fait intervenir le facteur de transcription NF- κ B et les voies des MAPKs (Ardeshtna et coll., 2000; Arrighi et coll., 2001 ; Trompezinski et coll., 2008), reconnus pour être des protéines sensibles à l'état rédox cellulaire (Dröge, 2002). De plus, en condition inflammatoire, les tissus lésés et les cellules environnantes sont également des producteurs d'ERO qui peuvent activer directement les DCs (Rutault et coll., 1999), amplifiant ainsi la réponse. Les ERO participent ainsi de manière contrôlée à la réponse allergique en modulant et amplifiant de nombreuses réponses cellulaires.

On retrouve également la notion de stress oxydant dans les réactions d'hypersensibilité de type I. L'asthme est une maladie inflammatoire pulmonaire chronique, caractérisée par un influx et l'activation de cellules inflammatoires (macrophages alvéolaires, neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes et mastocytes). L'inflammation des voies aériennes est provoquée par la production d'ERO (Dworski, 2000) produites et sécrétées par les cellules inflammatoires (Kanazawa et coll., 1991; Vachier et coll., 1992). Cette production est corrélée à la sévérité de la maladie (Wood et coll., 2000). La production d'ERO par les cellules inflammatoires s'accompagne d'une production induite par les facteurs responsables de l'asthme, comme les polluants atmosphériques ou la fumée de cigarette qui sont par eux-mêmes des pro-oxydants. Ensemble, ces ERO peuvent être directement responsables des lésions pulmonaires et de la contraction des muscles bronchiques.

Conclusion et perspectives

Bien que le mot délétère soit encore trop souvent associé aux ERO, de nombreux travaux évoquent depuis quelques années leurs effets bénéfiques, comme dans la lutte contre les pathogènes ou la régulation du tonus vasculaire. Les ERO ne sont pas seulement des radicaux « destructeurs » capables d'attaquer les constituants cellulaires, ce sont également des acteurs majeurs de la régulation métabolique et cellulaire de l'organisme. Le stress oxydant apparaît donc comme un mécanisme ubiquitaire, où de nombreuses réactions physiologiques et pathologiques mettent en évidence une composante radicalaire.

Bien que des mécanismes rédox interviennent dans la régulation de nombreux organes, la peau reste une cible privilégiée de par sa localisation et sa composition. Le vieillissement s'appuie une théorie radicalaire et de nombreuses maladies cutanées font intervenir les ERO. De par son extrême accessibilité, de nombreux essais utilisent les connaissances tirées de l'étude des ERO pour mettre au point ce que l'on appelle aujourd'hui les thérapies antioxydantes (administration en systémique ou topique d'antioxydants). Cependant, dans le cas de l'EAC, et malgré les résultats prometteurs obtenus chez l'animal, les essais cliniques chez l'homme ne sont pas concluants.

Enfin, la connaissance des mécanismes *in vitro* impliqués dans la réponse des DCs vis à vis des allergènes est actuellement en cours d'étude comme méthode alternative à l'expérimentation animale dans le cadre de la discrimination du pouvoir sensibilisant d'ingrédients inclus dans les produits cosmétiques.

Références

- Agarwal S, Sohal RS. Differential oxidative damage to mitochondrial proteins during aging. *Mech Ageing Dev* 1995; 85: 55-63.
- Aiba S, Terunuma A, Manome H, Tagami H. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3031-8.
- Alappatt C, Johnson CA, Clay KL, Travers JB. Acute keratinocyte damage stimulates platelet-activating factor production. *Arch Dermatol Res* 2000; 292: 256-9.
- Ardeshna KM, Pizzey AR, Devereux S, Khwaja A. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2000; 96: 1039-46.
- Arrighi JF, Rebsamen M, Rousset F, *et al.* A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol* 2001; 166: 3837-45.
- Ayres S, Tang M, Subbiah MT. Estradiol-17beta as an antioxidant: some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants. *J Lab Clin Med* 1996; 128: 367-75.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
- Bast A, Haenen GR. Lipoic acid: a multifunctional antioxidant. *Biofactors* 2003; 17: 207-13.
- Becker D, Valk ., Zahn S, *et al.* Coupling of contact sensitizers to thiol groups is a key event for the activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 233-38.
- Bruchhausen S, Zahn S, Valk E, *et al.* Thiol antioxidants block the activation of antigen-presenting cells by contact sensitizers. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 1039-44.
- Chung JH, Kang S, Varani J, *et al.* Decreased extracellular-signal-regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 177-82.
- Darblade B, Privat C, Caillaud D, *et al.* Exploration clinique et biologique du NO. *J Soc Biol* 2000; 194: 151-57.
- Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* 1987; 262: 9895-901.
- Desport JC. Home artificial nutrition in chronic neurological disorders. *Clin Nutr* 2002; 21: 97-8.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev* 2002; 82: 47-95.
- Dworski R. Oxidant stress in asthma. *Thorax* 2000; 55: S51-S53.
- Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271: 195-204.
- Finkel T. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett* 2000; 476: 52-4.

Fisher GJ, Kang S, Varani J, *et al.* Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 2002; 138: 1462-70.

Fuchs J, Zollner TM, Kaufmann R, Podda M. Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 337-53.

Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-85.

Hayflick L. Current theories of biological aging. *Fed Proc* 1975; 34: 9-13.

Helfrich YR, Sachs DL, Voorhees JJ. Overview of skin aging and photoaging. *Dermatol Nurs* 2008; 20: 177-83.

Higami Y, Shimokawa I. Apoptosis in the aging process. *Cell Tissue Res* 2000; 301: 125-32.

Hu FB. Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 544S-51S.

Kanazawa H, Kurihara N, Hirata K, Takeda T. The role of free radicals in airway obstruction in asthmatic patients. *Chest* 1991; 100: 1319-22.

Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 790-6.

Lu CY, Lee HC, Fahn HJ, Wei YH. Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutat Res* 1999; 423: 11-21.

Marathe GK, Davies SS, Harrison KA, *et al.* Inflammatory platelet-activating factor like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines. *J Biol Chem* 1999; 274: 28395-404.

Migdal C, Tailhardat M, Courtellemont P, *et al.* Responsiveness of human monocyte-derived dendritic cells to thimerosal and mercury derivatives. *Toxicol App Pharmacol* 2010; *in press*.

Mizuashi M, Ohtani T, Nakagawa S, Aiba S. Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 579-86.

Murphy RC. Free radical-induced oxidation of glycerophosphocholine lipids and formation of biologically active products. *Adv Exp Med Biol* 1996; 416: 51-8.

Nauseef WM. Nox enzymes in immune cells. *Semin Immunopathol* 2008; 30: 195-208.

Pei Y, Barber LA, Murphy RC, *et al.* Activation of the epidermal platelet-activating factor receptor results in cytokine and cyclooxygenase-2 biosynthesis. *J Immunol* 1998; 161: 1954-61.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 2001; 34: 237-56.

Riboli E, Norat T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 559S-69S.

Rutault K, Alderman C, Chain BM, Katz DR. Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 232-38.

Sarna T, Pilas B, Land EJ, Truscott TG. Interaction of radicals from water radiolysis with melanin. *Biochim Biophys Acta* 1986; 883: 162-7.

Travers JB. Oxidative stress can activate the epidermal platelet-activating factor receptor. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 279-83.

Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, *et al.* Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 2004; 429: 417-23.

Trompezinski S, Migdal C, Tailhardat M, *et al.* Characterization of early events involved in human dendritic cell maturation induced by sensitizers: cross talk between MAPK signaling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 230: 397-406.

Vachier I, Damon M, Le Doucen C, *et al.* Increased oxygen species generation in blood monocytes of asthmatic patients. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 1161-66.

Wei YH, Wu SB, Ma YS, Lee HC. Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging. *Chang Gung Med J* 2009; 32: 113-32.

Williams MD, Van Remmen H, Conrad CC, *et al.* Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. *J Biol Chem* 1998; 273: 28510-5.

Wood LJ, Fitzgerald DA, Gibson PG, *et al.* Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma. *Lipids* 2000; 35: 967-74.

Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 514-9.

Cette revue résume les principales caractéristiques physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène (ERO), et introduit quelques fonctions biologiques cutanées à composante radicalaire. Cependant, le rôle du stress oxydant dans les réponses des DCs aux allergènes nécessite d'être enrichi de quelques précisions et références.

2. Stress oxydant et pathologies cutanées

De par sa localisation à l'interface avec l'environnement, la peau est constamment exposée à des agents oxydants, incluant les particules polluantes de l'air produites par les automobiles et les industries, les radiations UV, les contaminants alimentaires tels que les conservateurs et additifs ou les produits cosmétiques (Bickers et Athar, 2006). Ces agents oxydants sont des producteurs directs ou indirects d'ERO. Il est maintenant établi que de nombreuses pathologies cutanées possèdent une composante radicalaire comme par exemple le psoriasis, la dermatite atopique, l'acné et le vitiligo (Fuchs et coll., 2001) et les ERO participent également à la physiopathologie des réactions allergiques (Okayama, 2005). Comme la place des DCs dans les réactions allergiques médiées par des lymphocytes T spécifiques est centrale, l'effet des ERO sur ces cellules a été étudié, ainsi que le rôle du stress oxydant dans le processus d'activation des DCs induit par des sensibilisants de contact.

3. Stress oxydant et activation des cellules dendritiques

Le premier contact des DCs avec un environnement oxydant se fait lors de la pénétration de l'allergène au niveau de la peau et de la cascade inflammatoire qui en découle. Les cellules du système immunitaire inné attirées sur le site, et les tissus environnements lésés sont des producteurs d'ERO libérés dans le milieu extracellulaire. Les ERO, comme H_2O_2 et $O_2^{\cdot -}$ produits par le système enzymatique de la xanthine oxydase, sont capables d'induire directement l'activation des mono-DCs (Rutault et coll., 1999; Kantengwa et coll., 2003) associée à une augmentation des marqueurs de co-stimulation CD80, CD83 et CD86 et du CMH de classe II, une diminution des capacités d'endocytose et une meilleure fonction stimulante des lymphocytes T. De plus, H_2O_2 induit la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-8 et TNF- α par les mono-DCs, et cette induction dépend des propriétés oxydantes d' H_2O_2 car elle est inhibée en présence de catalase (Verhasselt et coll., 1998). L'implication du stress oxydant dans la régulation de l'expression du gène de l'IL-8 est maintenant établie (DeForge et coll., 1993; Remick et Villarete, 1996). De même, les produits d'oxydation avancée des protéines (AOPP), formés lors d'un stress oxydant, augmentent la capacité des mono-DCs à induire la prolifération des lymphocytes T. Cependant, aucune modification phénotypique des mono-DCs n'est observée, ce qui suppose que les AOPP agissent comme des superantigènes (Alderman et coll., 2002). Ensemble, ces résultats soutiennent la notion de « signal de danger » nécessaire à l'activation complète des DCs, en liant les cellules et tissus environnements producteurs d'ERO à l'initiation et/ou l'amplification de la réponse immune spécifique et confirment le rôle pivot des DCs

entre l'immunité innée et adaptative. Les ERO interviennent de manière encore plus précoce en participant à la différenciation des DCs à partir des précurseurs sanguins monocytaires (Del Prete et coll., 2008), suggérant que les ERO jouent également un rôle dans l'établissement de la population sentinelle de DCs immatures.

Mizuashi et coll., (2005) ont également mis en évidence un rôle du stress oxydant dans la transduction du signal en réponse aux allergènes. Des mono-DCs traitées par le nickel, le DNCB et le composé mercurique thimerosal montrent un ratio glutathion réduit / glutathion oxydé (GSH/GSSG) diminué comparé aux cellules non traitées. Ce déséquilibre de la balance rédox cellulaire participe au processus d'activation.

De plus, un rôle direct du stress oxydant a été démontré dans l'activation des mono-DCs induite par le LPS, qui entraîne une production d'ERO par les cellules, associée à une diminution du ratio GSH/GSSG (Yamada et coll., 2006). L'induction des marqueurs de maturation CD80, CD83, CD86 et HLA-DR, ainsi que la sécrétion d'IL-12, d'IL-8, d'IL-6 et de TNF- α induite par le LPS ou par l'engagement du CD40 est inhibée en présence de GSH ou de N-acetyl-L-cystéine (NAC) (Yamada et coll., 2006; Verhasselt et coll., 1999). Par ailleurs, les mono-DCs prétraitées par le GSH perdent leur capacité allostimulante vis-à-vis des lymphocytes T. Ces résultats sont retrouvés dans un modèle de lignée dendritique murine XS52 (Matsue et coll., 2003) où l'absélène (antioxydant sélénodépendant) inhibe l'activation des DCs induite par le LPS et où les auteurs démontrent que les DCs, mais aussi les lymphocytes T, produisent des ERO durant la présentation antigénique.

Parallèlement, les systèmes antioxydants tels que la superoxyde dismutase (SOD) et les peroxydases sont augmentés au cours de la différenciation des mono-DCs immatures en mono-DCs matures induite par le ligand de CD40 (Rivollier et coll., 2006).

Cependant, peu de travaux ont démontré le rôle du stress oxydant dans l'induction des marqueurs de co-stimulation ou la sécrétion des cytokines en réponse aux allergènes. Un prétraitement des mono-DCs par l'antioxydant NAC inhibe l'expression du CD86 induit par le DNCB et le nickel (Mizuashi et coll., 2005) et par l'agent oxydant phénanthroline (Kagatani et coll., 2010). Dans la lignée THP-1, le DNCB induit la déplétion en GSH intracellulaire (Megherbi et coll., 2009) et l'effet inhibiteur du NAC est retrouvé au niveau de l'expression du CD86 (Ade et coll., 2006).

Par ailleurs, l'hypothèse de l'implication des ERO dans la transduction du signal est supportée par d'autres travaux, qui démontrent que les allergènes induisent une augmentation de la phosphorylation des résidus tyrosines dans les mono-DCs (Kühn et coll., 1998). Bruchhausen et coll., (2003) montrent que seuls les antioxydants à fonction thiol (NAC et cystéine versus vitamines E et C) sont capables d'inhiber la phosphorylation des tyrosines induites par le MCI/MI, le DNCB et le thimerosal. Cette inhibition n'est effective que si l'antioxydant est présent au moment du contact allergène/mono-DCs suggérant un mécanisme de compétition entre les thiols des antioxydants et ceux contenus dans les protéines cellulaires. En effet, les allergènes responsables de l'EAC sont des

haptènes, qui doivent se fixer à des protéines endogènes avant de devenir pleinement immunogènes. Il a été montré que les allergènes se fixent préférentiellement au groupement thiols des protéines plutôt qu'aux groupements amines (Becker et coll., 2003) et que cette liaison haptène/protéine thiol initierait l'activation des mono-DCs.

L'importance des groupements thiols a également été mise en évidence dans les modèles de lignées. Les travaux d'Hirota et coll., (2009) supportent l'hypothèse que la plupart des haptènes sont des substances électrophiles ayant la propriété de se fixer sur les chaînes des acides aminés de la plupart des protéines, et notamment sur les résidus cystéines (Gerberick et coll., 2004b) en démontrent que les THP-1 traitées par le DNCB et le nickel (mais pas par l'irritant SDS) présentent une diminution des groupements thiols libres présents à leur surface et que cette modification est liée à l'activation de p38 MAPK. Cette propriété des haptènes, versus les non-sensibilisants et irritants, a été confirmée par l'évaluation de 36 allergènes contre 16 non sensibilisants et montrent une corrélation de 85% par rapport aux données *in vivo* (Suzuki et coll., 2009). Par ailleurs, une modification de l'équilibre redox intracellulaire (ratio GSH/GSSG) a été démontrée dans cette lignée après traitement par le DNCB et le nickel (Mizuashi et coll., 2005) ainsi que l'induction de gènes relatifs au stress oxydant comme celui de l'hème oxygénase 1, HO-1 (Hirota et Moro, 2005).

L'oxydation des thiols membranaires, comme processus initiateur de l'activation de voies de signalisation intracellulaire, est également démontré par des travaux sur la lignée U937 (Filomeni et coll., 2003). L'oxydation des résidus cystéinyles de la membrane plasmique externe des U937 par la forme oxydée du GSH, le GSSG (imperméable aux membranes cellulaires), entraîne la déplétion du GSH intracellulaire, la production d'ERO associée à une diminution de la forme réduite du système antioxydant de la thioredoxine (Trx), et l'activation des voies p38 MAPK et ASK-1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1).

Les propriétés d'interaction des haptènes aux protéines thiols a également fait l'objet d'une étude, appelée essai TETRATOX, visant à discriminer un allergène d'un irritant en se basant sur les propriétés des molécules à fixer ou non le GSH, couplé à une analyse de leur toxicité chez *Tetrahymena pyriformis* (Aptula et coll., 2006).

Ces travaux convergent vers l'idée que, bien que l'étude de la structure tridimensionnelle des haptènes soit d'une importance majeure, la réactivité des haptènes est également à prendre en considération dans les mécanismes de discrimination allergènes/irritants par les DCs.

4. Stress oxydant et voies de signalisation

4.1. Voies MAPKs et NF- κ B

L'implication des voies MAPKs, incluant notamment les SAPKs (p38 MAPK et JNK) et la voie NF- κ B dans l'activation des mono-DCs et des CD34⁺-DCs a été démontré en réponse à des

allergènes comme le nickel et le DNCB (voir paragraphe III.2.). Ces différentes voies sont dites rédox-sensibles, c'est-à-dire qu'elles peuvent être activées soit directement par les ERO soit dépendre de l'état redox (état d'oxydation) de la cellule (pour revue, Dröge, 2002). Cependant, seulement quelques travaux ont montré l'implication directe du stress oxydant dans l'activation de ces voies de signalisation induites par les allergènes. H₂O₂ active NF-κB dans des mono-DCs et cette activation est inhibée en présence de l'antioxydant NAC (Kantengwa et coll., 2003). NAC inhibe également l'activation de p38 MAPK induite par le nickel, le TNCB et le DNCB (Bruchhausen et coll., 2003; Mizuashi et coll., 2005).

4.2. La voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE

Le complexe Keap1/Nrf2 est présent dans la plupart des types cellulaires et régule l'expression de gènes antioxydants et d'enzymes de détoxification de phase 2. En condition « basale » le facteur de transcription Nrf2 est inactif, lié à Keap1 et dégradé par polyubiquitinylation par la culline 3 (Figure 6). Keap1 contient de nombreux résidus cystéinyles, et en réponse à un stress oxydant, le complexe Nrf2-Keap1 se dissocie et Nrf2 s'accumule dans le noyau où il agit sur des gènes impliqués dans l'homéostasie du potentiel redox *via* les séquences ARE (pour « Antioxydant Réponse Élément ») présents sur les gènes, comme par exemple celui de la catalase et de l'hème oxygénase 1 (pour revue, Dinkova-Kostova et coll., 2005).

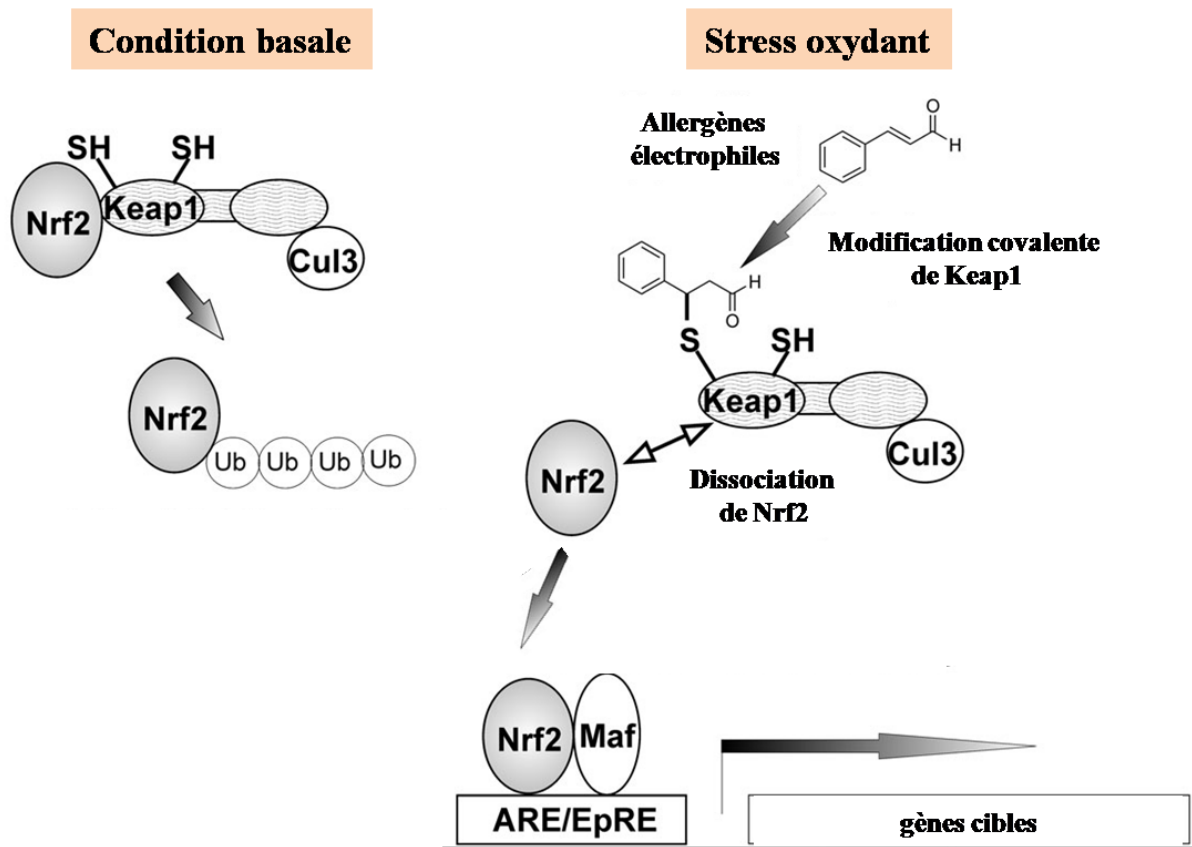


Figure 6 : Vue générale de la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE (D'après Natsch, 2010).

De par la capacité de la voie Keap1/Nrf2/ARE à détecter les électrophiles, principales propriétés commune à la plupart des haptènes, son rôle dans la transduction du signal induit par les haptènes a donc été étudié. Le DNFB induit, dans les mono-DCs, l'expression de plusieurs gènes sous le contrôle de séquence ARE (Ryan et coll., 2004). Natsch et Emter (2008) utilisent un modèle de lignée AREc32 dérivée des cellules tumorales mammaires MCF7, stablement transfectée par le gène rapporteur de la luciférase placé sous le contrôle de huit séquences ARE et montrent, en testant 102 substances, que la plupart des sensibilisants induisent une activité luciférase contrairement aux non-sensibilisants et irritants. Ces travaux viennent d'être validés en utilisant la lignée kératinocytaire humaine HaCaT, afin de se rapprocher un peu plus des conditions cutanées (Emter et coll., 2010).

Ces résultats sont confirmés dans d'autres modèles de DCs : des CD34⁺-DCs et des THP-1 traitées par le DNCB, le nickel et le pPD montrent une accumulation de Nrf2 et l'expression des gènes *hmox1* et *nqo1* placés sous le contrôle de séquence ARE (Ade et coll., 2009). L'accumulation de Nrf2 induit par le DNCB dans les THP-1 a également été démontré (Megherbi et coll., 2009). D'autres observations indirectes supportent l'hypothèse de l'implication de la voie Keap1/Nrf2/ARE dans l'activation des DCs. L'IL-8, une des principales cytokines sécrétées en réponse aux allergènes, est sous le contrôle de Nrf2 (Zhang et coll., 2005). Cette voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE, induite par un stress oxydant, fait actuellement l'objet d'un vif intérêt pour la discrimination des allergènes par rapport aux irritants (Natsch et coll., 2009; 2010).

OBJECTIFS DES TRAVAUX

Dans le contexte actuel où le 7^{ème} amendement de la directive cosmétique européenne prévoit l'interdiction du modèle animal pour le test de substances potentiellement sensibilisantes, le développement de méthodes alternatives devient une nécessité pour les industriels. L'utilisation de modèles cellulaires pour la discrimination des allergènes versus des non-sensibilisants/irritants semble être, parmi les nombreux modèles proposés, une voie prometteuse.

Les travaux présentés ici sont réalisés sur un modèle de culture primaire (mono-DCs) et une lignée promyélomonocytaire (U937) prédisposée pour être utilisée dans les tests de sensibilisation *in vitro*. Le but de ce travail est de mieux caractériser les événements précoces de la signalisation intracellulaire induite par des allergènes. La compréhension des mécanismes impliqués *in vitro* dans l'activation des DCs devrait permettre de mieux appréhender la manière de discriminer un allergène d'un irritant. Plus particulièrement, le rôle du stress oxydant dans l'activation des DCs induite par des allergènes a été étudié.

Ces travaux se sont essentiellement focalisés sur la réponse des mono-DCs et des U937 au thimerosal, un composé mercurique possédant un pouvoir sensibilisant mais dont les effets sont bien moins décrits que ceux du DNCB et du nickel. Depuis plusieurs années, de nombreux auteurs ont mis en avant le danger de l'exposition à des métaux toxiques comme le mercure. Le mercure est un métal lourd, qui existe sous plusieurs formes : le mercure métallique élémentaire (noté Hg⁰), le mercure inorganique que l'on retrouve sous forme gazeuse ou ionique appelé atome de mercure (notés Hg²⁺) et le mercure organique, combiné avec une molécule contenant du carbone (éthyle et méthyle mercure par exemple).

Le thimérosal, aux propriétés anti-bactériennes et anti-fongiques, est composé d'éthyle mercure (EtHgCl) et peut être aussi appelé thiomersal ou merthiolate. Il est composé d'approximativement 49,6% (en masse) d'EtHgCl, et se dissocie en EtHgCl et acide thiosalicylique (TSA) non mercurique. Le thimérosal est retrouvé dans de nombreux agents antiseptiques, et est utilisé comme conservateur dans les préparations à usage ophtalmique, dans les cosmétiques, dans les préparations antigéniques utilisées dans le cadre de diagnostics d'allergies, les antivenins et dans de nombreux vaccins (Geier et coll., 2007).

C'est sa présence dans les vaccins qui a notamment fait l'objet d'une grande attention. Le thimerosal est retrouvé dans la vaccination anti-diphtérique, anti-tétanique, anti-coquelucheuse et dans les vaccins contre la grippe, et tout particulièrement d'actualité, dans le vaccin contre le virus A(H1N1). On le retrouve habituellement à 0,01% (247 µM), correspondant à 25 µg de thimérosal par dose de 0,5 ml (www.afssaps.fr; www.eurosurveillance.org; www.fda.gov; www.vaccinesafety.edu). Un enfant reçoit en moyenne durant ses premières années de vie, une série de vaccins qui l'expose à des doses de mercure bien supérieure à ce que recommande l'Agence de Protection Environnementale

(Agrawal et coll., 2007). L'exposition au mercure, et plus particulièrement au mercure organique, peut induire des troubles neuro-développementaux comme un retard de langage, l'hyperactivité avec déficit de l'attention et même l'autisme (Geier et Geier, 2005). D'autre part, l'administration de vaccins peut déclencher des réactions d'hypersensibilité au thimérosal qu'ils contiennent (Zenarola et coll., 1995; Goncalo et coll., 1996; Patrizi et coll., 1999; Suneja et Belsito, 2001; Lee-Wong et coll., 2005). Des études synthétisant les résultats de patch-tests dans différents pays révèlent une sensibilité au thimérosal chez de nombreux patients et le classe même comme le deuxième allergène le plus courant après le nickel (Goon et Goh, 2006; Wattanakrai et Rajatanavin, 2007; Tudela et coll., 2008; Cheng et coll., 2008; Hammonds et coll., 2009). Bien que quelques patients réagissent à la partie non mercurique du thimérosal, le TSA, la partie sensibilisante de la molécule est principalement l'EtHgCl (Goncalo et coll., 1996).

L'allergie aux métaux tels que le nickel et le mercure est bien documenté (Garner, 2004), cependant seules quelques d'études ont investi le rôle du thimérosal sur le système immunitaire, ou principalement sur des modèles murins. L'effet du thimérosal sur les DCs, et même plus généralement ceux d'autres dérivés de mercure, a été peu étudié malgré le rôle clé de ces cellules dans l'initiation des réactions allergiques. Le thimérosal est un réactif perméable aux membranes cellulaires qui possède la propriété de réagir avec les groupements sulfhydryles. Le thimérosal perturbe l'homéostasie calcique (Elferink, 1999) et dans les cellules T, perturbe les défenses antioxydantes telles que le GSH en produisant des ERO (Makani et coll., 2002). L'EtHgCl qu'il contient, en tant que métal, est également un agent oxydant producteur d'ERO (Ercal et coll., 2001). Le thimérosal induit la phosphorylation des résidus tyrosine des mono-DCs de manière similaire à l'allergène fort MCI/MI (Bruchhausen et coll., 2003) et induit dans ces cellules une réponse de type Th2, associée à une déplétion du GSH intracellulaire (Agrawal et coll., 2007). Par ailleurs, le thimérosal induit l'apoptose des U937 par une voie dépendante des caspases et du stress oxydant (Woo et coll., 2006). Des travaux récents réalisés par l'équipe du Dr. Serres montrent que le thimérosal active p38 MAPK et JNK et inhibe Erk1/2 dans les mono-DCs, comme le DNCB. Dans cette étude, l'utilisation de l'antioxydant N-acetyl-L-cystéine (NAC) a permis de révéler le rôle du stress oxydant dans l'activation de p38 MAPK et dans l'activation des DCs en réponse au thimérosal (Trompezinski et coll., 2008, article présenté en annexe).

Au vu de ces données, le but de la première partie de ce travail (**article 1 et 2**) a été de mieux caractériser les effets du thimérosal sur les DCs, en comparaison au DNCB. Plus spécifiquement, le rôle du stress oxydant a été étudié. Ce dernier est caractérisé par une production d'ERO associée le plus souvent à une diminution des fonctions antioxydantes. Les travaux présentés ici s'appuient sur cette définition. Ils étudient d'une part la production d'ERO induite par le thimérosal, son dérivé mercurique l'EtHgCl mais aussi par d'autres composés mercuriques (méthyle mercure(II), thiocyanate de mercure(II), chlorure de mercure(II)) et d'autre part, étudient la déplétion du principal antioxydant

intracellulaire, le glutathion (GSH). Comme la mitochondrie est la principale source d'ERO, son rôle ainsi que l'état de polarisation de sa membrane ($\Delta\Psi_m$) ont été étudiés. L'implication du stress oxydant dans l'activation des DCs induites par les composés de mercure et les allergènes est mise en évidence par l'utilisation d'antioxydants.

Dans une dernière partie (**article 3**), les travaux ont porté sur l'étude du mécanisme d'apoptose induit par le thimerosal et l'allergène DNCB dans la lignée U937 et son rôle éventuel dans l'induction du CD86. L'implication du stress oxydant et de p38 MAPK dans l'apoptose induite par les allergènes a été déterminée et la relation entre apoptose et expression du CD86 a été étudié par le biais d'inducteurs et d'inhibiteurs d'apoptose.

Cette étude de la signalisation rédox induite par le thimerosal et le DNCB a été complétée par des travaux sur le calcium, et la mesure de l'influx calcique après exposition des U937 à ces allergènes a été réalisée. La relation entre stress oxydant et calcium est discutée (**article 2 et 3**).

ARTICLE 1

Responsiveness of human monocyte-derived dendritic cells to thimerosal and mercury derivatives.

Migdal C, Tailhardat M, Courtellemont P, Haftek M, Serres M.

Toxicol Appl Pharmacol 2010.

➤ In press. Available on line.

Ce premier article a pour objectif de mieux caractériser les effets du thimerosal et d'autres composés mercuriques sur les mono-DCs, en comparaison avec les allergènes DNCB et nickel. Ce travail s'est particulièrement focalisé sur le rôle du stress oxydant dans l'activation des mono-DCs induite par ces molécules chimiques.


Les résultats montrent que le thimerosal, tout comme son métabolite l'éthyle mercure (EtHgCl) et les autres composés mercuriques (méthyle mercure(II), thiocyanate de mercure(II), chlorure de mercure(II)), induisent l'activation des mono-DCs, principalement corrélée à une augmentation des marqueurs CD86 et HLA-DR et à la sécrétion d'IL-8 et de TNF- α .

L'induction d'ERO est détectée très rapidement après exposition des mono-DCs au thimerosal, à l'EtHgCl et au DNCB, associée à une dépolarisation de la membrane plasmique mitochondriale ($\Delta\Psi_m$). L'irritant SDS et la partie non mercurique du thimerosal, l'acide thiosalicylique (TSA), n'ont pas d'effet. Un prétraitement des mono-DCs par l'antioxydant N-acétyl-L-cystéine (NAC) inhibe l'expression du CD86 induite par les composés mercuriques et le DNCB démontrant ainsi que l'induction d'ERO est directement impliquée dans l'activation des mono-DCs.

Ce travail a été réalisé sur des mono-DCs issues de 10 donneurs différents afin d'observer une éventuelle variabilité inter-donneurs. En terme d'expression des marqueurs d'activation, l'augmentation du CD86 est le marqueur le plus fiable, bien que des différences dans l'intensité de l'induction soient observées. Les monocytes isolés de 9 donneurs sur 10 répondent au thimerosal et à sa partie mercurique l'EtHgCl par une production d'ERO suggérant que le potentiel sensibilisant du thimerosal provient de l'EtHgCl. Cependant, les DCs générées à partir des monocytes du 10ème donneur ne répond pas aux parties mercuriques et aucune production d'ERO n'est détectée, mais elles répondent à la partie non mercurique, le TSA. Ces résultats *in vitro* sont en accord avec des observations cliniques.

Puisque le thimerosal est retrouvé dans de nombreux produits cosmétiques et ophtalmiques ainsi que dans des vaccins (contre le A(H1N1) par exemple), ces travaux portent l'attention sur un éventuel effet sensibilisant du thimerosal, mais également de ces métabolites.

AUTHOR QUERY FORM

 ELSEVIER	Journal: YTAAP Article Number: 11808	Please e-mail or fax your responses and any corrections to: E-mail: corrections.essd@elsevier.spitech.com Fax: +1 61 9699 6721
-----------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Dear Author,

Any queries or remarks that have arisen during the processing of your manuscript are listed below and highlighted by flags in the proof. Please check your proof carefully and mark all corrections at the appropriate place in the proof (e.g., by using on-screen annotation in the PDF file) or compile them in a separate list.

For correction or revision of any artwork, please consult <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Articles in Special Issues: Please ensure that the words ‘this issue’ are added (in the list and text) to any references to other articles in this Special Issue.

Uncited references: References that occur in the reference list but not in the text – please position each reference in the text or delete it from the list.	
Missing references: References listed below were noted in the text but are missing from the reference list – please make the list complete or remove the references from the text.	
Location in article	Query / remark Please insert your reply or correction at the corresponding line in the proof
Q1	Figure 1 contained pixelated text with unreadable data. Please check and provide replacement as deemed necessary.
Q2	The citation ‘Silberg et al., 2005’ (original) has been changed to ‘Silbergeld et al., 2005’. Please check if appropriate.
Q3	The citation ‘Ashigata et al. 2006’ (original) has been changed to ‘Ashikaga et al., 2006’. Please check if appropriate.
Q4	The citation ‘Katagani et al., 2010’ (original) has been changed to ‘Kagatani et al., 2010’. Please check if appropriate.

Electronic file usage

Sometimes we are unable to process the electronic file of your article and/or artwork. If this is the case, we have proceeded by:

Scanning (parts of) your article
 Rekeying (parts of) your article
 Scanning the artwork

Thank you for your assistance.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology and Applied Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ytap

Responsiveness of human monocyte-derived dendritic cells to thimerosal and mercury derivatives

C. Migdal^a, M. Tailhardat^b, P. Courtellemont^b, M. Haftek^a, M. Serres^{a,*}

^a Université Lyon 1, EA 41-69, Laboratoire de Recherche Dermatologique, Pavillon R, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

^b LVMH Recherche, St Jean de Braye, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2010

Revised 22 March 2010

Accepted 12 April 2010

Available online xxx

Keywords:

Human dendritic cells

Oxidative stress

Reactive oxygen species

Thimerosal

Mercury derivatives

ABSTRACT

Several cases of skin sensitization have been reported following the application of thimerosal, which is composed of ethyl mercury and thiosalicylic acid (TSA). However, few *in vitro* studies have been carried out on human dendritic cells (DCs) which play an essential role in the initiation of allergic contact dermatitis. The aim of the present study was to identify the effect of thimerosal and other mercury compounds on human DCs. To address this purpose, DCs derived from monocytes (mono-DCs) were used. Data show that thimerosal and mercury derivatives induced DC activation, as monitored by CD86 and HLA-DR overexpression associated with the secretion of tumor necrosis factor α and interleukin 8, similarly to lipopolysaccharide and the sensitizers, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB) and nickel sulfate, which were used as positive controls. In contrast, TSA, the non-mercury part of thimerosal, as well as dichloronitrobenzene, a DNCB negative control, and the irritant, sodium dodecyl sulfate, had no effect. Moreover, oxidative stress, monitored by ROS induction and depolarization of the mitochondrial membrane potential, was induced by thimerosal and mercury compounds, as well as DNCB, in comparison with hydrogen peroxide, used as a positive control. The role of thiol oxidation in the initiation of mono-DC activation was confirmed by a pre-treatment with *N*-acetyl-L-cysteine which strongly decreased chemical-induced CD86 overexpression. These data are in agreement with several clinical observations of the high relevance of thimerosal in patch-test reactions and prove that human mono-DCs are useful *in vitro* tools for determining the allergenic potency of chemicals.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Thimerosal, which is also called merthiolate or thiomersal in clinical assays, is an organomercury product composed of ethyl mercury (EtHgCl) and thiosalicylic acid (TSA). Due to its antimicrobial properties, thimerosal is frequently found in topical antiseptic solutions and ointments. It is widely used as a preservative in vaccines, ophthalmic products and cosmetics (for a review, see Geier et al., 2007). Since the last decade, many cases of cutaneous reactions and skin sensitization in atopic children have been reported (Zenarola et al., 1995; Goncalo et al., 1996; Patrizi et al., 1999; Suneja and Belsito, 2001). Recently, statistical overviews of long-term trends in patch-test reactions in several countries reported large patch-test studies that reflected the high reactivity of thimerosal which was classified as the second most common allergen after nickel (Goon and Goh, 2006; Wattanakrai and Rajatanavin, 2007; Tudela et al., 2008; Cheng et al., 2008; Hammonds et al., 2009). However,

the clinical relevance of thimerosal is still under discussion (Belsito, 2002; Slodownik and Ingber, 2005; Breithaupt and Jacob, 2008) and is currently pertinent as thimerosal is still added in several types of vaccines such as influenza A(H1N1), diphtheria toxoid, acellular pertussis and tetanus toxoid (www.afssaps.fr; www.eurosurveillance.org; www.fda.gov; www.vaccinesafety.edu). However, only few investigations were targeted on thimerosal effect towards the immune system. The effect of thimerosal has been studied mostly in rodents where a toxic reaction and some cases of autoimmunity were reported (Havarinasab et al., 2004; Silbergeld et al., 2005). Investigations on Jurkat T cell line have shown that thimerosal was able to induce apoptosis (Makani et al., 2002) and confirmed the sensitivity of T cells to thimerosal (Lee-Wong et al., 2005). Only recent studies (Goth et al., 2006; Agrawal et al., 2007) have demonstrated a direct effect of thimerosal on human dendritic cells (DCs), which play an essential role in the immune response and in the initiation of allergic contact dermatitis.

Several studies reported that immature DCs are generated *in vitro* from human monocytes (mono-DCs) and acquire a mature phenotype after 48 h exposure to sensitizers as previously described for 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB) and nickel sulfide (NiSO₄) whereas non-sensitizers such as SDS had no significant effect (Aiba et al., 1997; Coutant et al., 1999; Guironnet et al., 2000; Tuschl et al., 2000; Huletto

Abbreviations: DCs, dendritic cell; mono-DCs, DCs derived from monocytes; NAC, *N*-acetyl-L-cysteine; ROS, reactive oxygen species; TSA, thiosalicylic acid.

* Corresponding author. EA 41-69, Laboratoire de Recherche Dermatologique, Pavillon R, Hôpital Edouard Herriot, 69437 Lyon Cedex 03, France.

E-mail address: mireille.serres@univ-lyon1.fr (M. Serres).

0041-008X/\$ – see front matter © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.taap.2010.04.007

Please cite this article as: Migdal, C., et al., Responsiveness of human monocyte-derived dendritic cells to thimerosal and mercury derivatives, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2010), doi:10.1016/j.taap.2010.04.007

et al., 2002; 2005). This maturation process is characterized after 48 h of exposure of mono-DCs by an increase of HLA-DR, CD83, CD54 and CD86 phenotypic markers and the secretion of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-8 and TNF α). From these data, the prediction of chemical sensitizer potential based upon changes in the expression of DC surface markers was proposed. Concerning thimerosal, our previous studies (Trompezinski et al., 2008) have demonstrated that after 48 h of exposure, thimerosal induced mono-DC activation according to overexpression of DC phenotypic markers (CD83, CD54, CD86 and HLA-DR) and cytokine secretion (IL-8 and TNF α).

In studies based on the characterization of early events involved in DC activation, sensitizers such as DNCB and NiSO₄ were reported to initiate DC activation via stress-activated protein kinases (SAPKs) such as JNK and p38 MAPK (Rescigno et al., 1998; Ardeshtna et al., 2000; Arrighi et al., 2001; Aiba et al., 2003; Boislève et al., 2005). Thimerosal was shown to induce p38 MAPK phosphorylation (activation) from 15 min to 2 h whereas JNK was activated after 2 h (Trompezinski et al., 2008). In this study, a pre-treatment with the antioxidant, *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) markedly reduced thimerosal-induced CD86 overexpression and p38 MAPK phosphorylation, suggesting that oxidative stress is directly involved in DC activation, as previously reported (Rutault et al., 1999; Fuchs et al., 2001; Becker et al., 2003; Kantengwa et al., 2003; Mizuashi et al., 2005). Indeed, reactive oxygen species (ROS) are characterized as secondary messengers which control a broad range of physiological and pathological processes (Kumar et al., 1999) including the activation of SAPKs via cysteine oxidation (Matsuzawa and Ichijo, 2005).

In this context, the role of early events such as oxidative stress was presently investigated in order to better characterize the role of thimerosal and other mercury compounds in mono-DC activation. According to kinase phosphorylation kinetic previously reported, ROS induction and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) were assessed at early time after exposure to chemicals whereas DC activation was detected only after 48 h of exposure to chemicals as previously reported.

Materials and methods

Chemicals. Hydrogen peroxide (H₂O₂), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB), thimerosal, mercury(II) thiocyanate (Hg(SCN)₂), mercury(II) chloride (HgCl₂), methyl mercury(II) chloride (MeHgCl), ethyl mercuric chloride (EtHgCl), thiosalicylic acid (TSA), sodium dodecyl sulfate (SDS), dichloronitrobenzene (DCNB), nickel sulfate (NiSO₄), lipopolysaccharide (LPS), *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) and propidium iodide (PI) were all purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Generation of DCs from monocytes. DCs were generated *in vitro* from human monocytes purified from heparinized peripheral blood of healthy donors. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by centrifugation on Lymphoprep™ (Abcys, Paris, France) as previously described (Trompezinski et al., 2008). Monocytes were further isolated by magnetic positive selection using CD14 microbeads separated with a magnetic cell separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The resulting suspension routinely contained more than 80% of CD14⁺ cells. Mono-DCs were generated from monocytes after culture for 5 days in six-well tissue culture plates (10⁶ cells/ml) in RPMI 1640 medium with Glutamax™, 25 mM HEPES and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (Abcys) and recombinant human cytokines such as granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) at 500 units/ml (Immunotools, Friesoythe, Germany) and interleukin (IL)-4 at 50 units/ml (R&D System, Lille, France). Mono-DCs were generated from 10 different healthy donors and only preparations that contained more than 80% of CD14-positive cells (a specific marker of immature DCs) were selected.

Cell treatment with chemicals. For all chemical treatments, immature DCs obtained at day 5 were cultured in X-Vivo serum-free medium (Lonza, Verviers, Belgium), supplemented with cytokines, GM-CSF (500 units/ml) and IL-4 (50 units/ml). Thimerosal, Hg(SCN)₂, HgCl₂, SDS and LPS were dissolved in culture medium, MeHgCl in culture medium containing 1% dichloromethane (at 0.0001%), TSA and EtHgCl in ethanol (at 0.1%) and DNCB and DCNB in dimethyl sulfoxide (DMSO) (at 0.04%). All of these solvents were tested in all experiments. Cells were treated with several concentrations of the chemicals: DNCB, 15 and 30 μ M; NiSO₄, 0.5 mM; thimerosal, 2.5–7.5 μ M; EtHgCl, 1 and 2.5 μ M; MeHgCl, 5 and 7.5 μ M; Hg(SCN)₂, 7.5 and 15 μ M; HgCl₂, 2.5 and 5 μ M; TSA, 15 μ M; DCNB, 30 μ M; and SDS, 35 μ M. LPS (100 ng/ml) was used as a positive control for mono-DC activation and H₂O₂ (0.5 mM) as a positive control for the measurement of reactive oxygen species (ROS). Cells were seeded at 10⁶ cells/ml and treated with chemicals for 5 min to 48 h. After 1 h of treatment with H₂O₂, NiSO₄, DNCB and mercury compounds, cells were rinsed in phosphate buffered saline (PBS) and X-Vivo medium was added. Each chemical was tested at least twice on each donor. In some experiments, mono-DCs were pre-incubated for 1 h with NAC (10 mM) before exposure to chemicals.

Cell viability. Mono-DC viability was assessed using MTT in a colorimetric assay (Denizot and Lang, 1986). Briefly, after chemical treatment as previously described, cells were incubated with the MTT reagent (at 1 mg/ml) for 4 h. The solution was then removed and DMSO was added. The optical densities were read using a microplate spectrophotometer (ELX 800, Bio-Tek Instruments, Vermont, USA). In addition, cell viability was assessed by propidium iodide (PI) dye exclusion. Treated cells were washed in cold PBS, stained with 12.5 μ g/ml PI for 10 min and analyzed from 5000 cells using the FL3-H wavelength band of a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Pont de Claix, France) and analyzed using CellQuest™ software (Becton Dickinson).

Immunofluorescent staining and flow cytometry analysis. Changes in mono-DC phenotype (CD86, CD54 and HLA-DR) were detected using a FACScan flow cytometer. Treated cells were harvested and incubated for 30 min at 4 °C with human fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD86, anti-CD54 or anti-HLA-DR monoclonal antibodies and their corresponding isotype controls. Anti-human CD86 (clone Fun-1) was from BD-Pharmingen (Becton Dickinson) and anti-human CD54 (clone 84H10) was from Beckman Coulter (Villepinte, France). Their corresponding isotype control IgG1 was from Biolegend (Ozyme, Saint Quentin, France). Anti-human HLA-DR (clone B8.12.2) and its corresponding isotype control IgG2b were from Immunotech (Marseille, France). After incubation, cells were washed at 4 °C in PBS containing 1% bovine serum albumin and fixed with 1% formaldehyde in PBS. Samples were stored at 4 °C in the dark until analysis. For each sample, 5000 cells were acquired and analyzed using Cell Quest™ software as previously described (Python et al., 2007): in the control cell population (untreated), the homogeneous cell subpopulation (called region R1 that exclude cellular fragments) was selected in the side versus forward scatter dot plot (Figs. 1A and E). The marker M1 was set at the intersection between isotype control staining and the interest marker staining (Fig. 1B) corresponding to 4–8% of the isotype control stained cells from R1. Then, the subpopulation R1 and the marker M1 were used to measure the mean fluorescence intensity (MFI) of each marker for each test items (Figs. 1C and D). In some experiments, cells were analyzed for activation marker expression after gating on PI negative cells (Fig. 1E, R2). The level of CD86 positive cells was then analyzed on the subpopulation R1 (Fig. 1F) or only on viable cells (PI negative cells, Fig. 1G). The relative mean fluorescence index (RFI) induced by each chemical was calculated by the following formula: mean fluorescence index (MFI) of treated cells compared

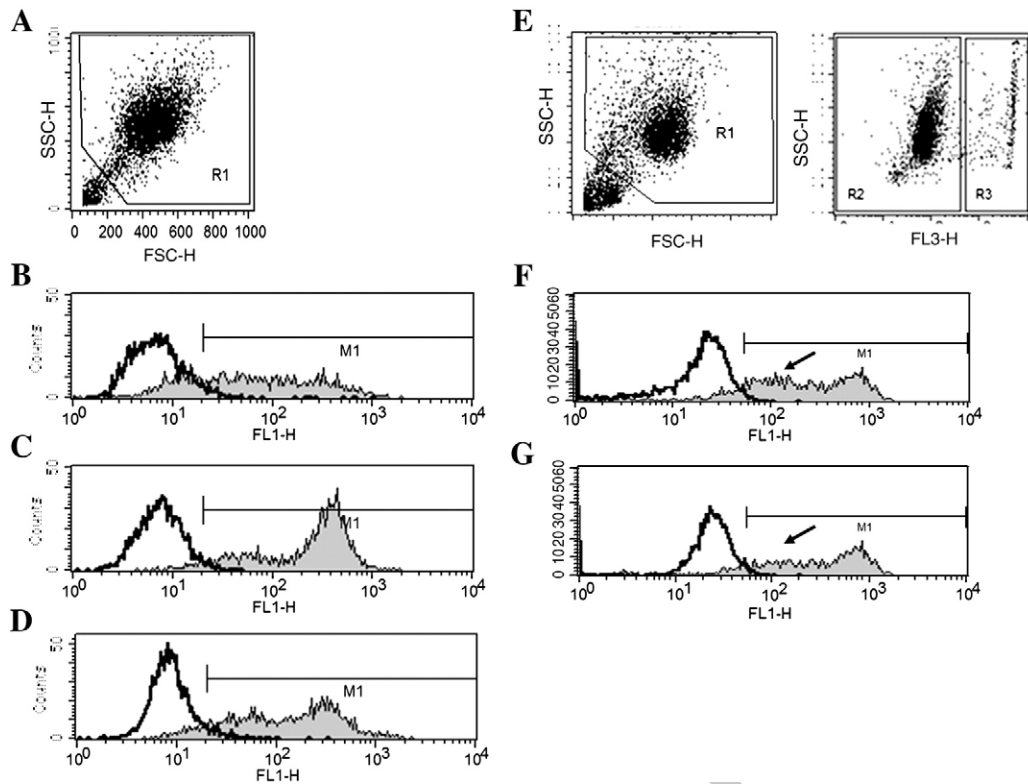


Fig. 1. Analysis of mono-DC activation by flow cytometry. (A) Linear side scatter (SSC-H) versus linear forward scatter (FSC-H) dot plot of untreated cells. The region R1 defines the gated homogeneous cell subpopulation analyzed in the log FITC histogram. (B) Log FITC histograms of untreated cells labeled with isotype control antibody (black histogram) or with anti-CD86 (filled grey histogram). (C and D) Log FITC histograms of cells exposed to LPS at 100 ng/ml (C) or exposed to thimerosal at 5 μ M (D) labeled with isotype control antibody (black histogram) or with anti-CD86 (filled grey histogram). (E) SSC-H versus FSC-H and SSC-H versus log PI (FL3-H) dot plots of thimerosal (5 μ M)-treated cells. (F and G) Log FITC histograms of cells exposed to thimerosal at 5 μ M labeled with isotype control antibody (black histogram) or with anti-CD86 (filled grey histogram) analyzed from the cell subpopulation R1 (F) or cell subpopulation R2 (PI negative cells).

Q1

207 with MFI of untreated cells, corresponding to the fold increase over
208 the control with untreated cells at 100.

209 **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).** IL-8 and tumour necrosis
210 factor (TNF)- α secretion were measured in cell supernatants collected
211 after a 48-h incubation from untreated mono-DCs or mono-DCs
212 treated with chemicals as described above. Cytokine concentration
213 was assessed by ELISA (Abcys, France) according to **manufacturer's**
214 instructions. The concentrations of IL-8 and TNF- α were calculated
215 from standard curves using human recombinant IL-8 (from 31.2 to
216 2000 pg/ml) and human recombinant TNF- α (from 7.8 to 500 pg/ml)
217 with a limit detection of 62.5 pg/ml for IL-8 and 15.6 pg/ml for TNF- α .

218 **Measurement of intracellular ROS.** Intracellular ROS were detected
219 using an intracellular specific dye, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein
220 diacetate (H_2DCFDA), purchased from FluoProbes (Interchim, Mon-
221 tluçon, France). Mono-DCs were seeded at 10^6 cells/ml in X-Vivo
222 medium, treated or not with chemicals for different lengths of time
223 (from 5 min to 6 h) and then loaded with 2 μ M final H_2DCFDA for
224 30 min in the dark as described previously (Royall and Ischiropolous,
225 1993). The fluorescence intensity was immediately analyzed by flow
226 cytometry. Green fluorescence of 2',7'-dichlorofluorescein oxidation
227 product was detected using the FL1-H wavelength band. For each
228 sample, 5000 cells were acquired and analyzed using Cell QuestTM
229 software.

230 **Measurement of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$).** After
231 chemical exposure, the changes in $\Delta\Psi_m$ were measured by flow
232 cytometry based on the uptake of the cationic carbocyanine dye, JC-1
233 (FluoProbes). Briefly, mono-DCs were seeded at 10^6 cells/ml in X-Vivo
234 medium and treated with chemicals for 30 min to 6 h. At several time

points, untreated cells (control) or treated cells were incubated with
235 5 μ g/ml final JC-1 for 20 min in the dark. The fluorescence intensity
236 was immediately analyzed by flow cytometry. The ratio of fluores-
237 cence intensities at 595 nm and 535 nm (ratio red/green) determined
238 the level of mitochondrial membrane polarization ($\Delta\Psi_m$). The
239 aggregate red form had an absorption/emission maximum at 585/
240 590 nm (FL2-H wavelength band) and the green monomeric form had
241 a maximum at 510/527 nm (FL1-H wavelength band). For each
242 sample, 5000 cells were acquired and analyzed using Cell QuestTM
243 software.
244

Statistical analysis. Results are given as mean \pm standard deviation
245 (SD). Data analyzed using Student's *t*-test are considered to be
246 significant at $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)
247

248 Results

**Chemicals induced overexpression of phenotypic markers and cytokine
249 release**
250

Chemicals were tested in a dose-response experiment and after a
251 treatment for 48 h, cell viability and DC activation markers expression
252 were assessed. Each chemical induced a dose-dependent effect on
253 mono-DC viability and activation marker expression (Table 1). Thimer-
254 osal was tested in a range from 2.5 to 7.5 μ M, and mono-DCs viability
255 decreased to $70 \pm 8.5\%$ after treatment with the highest concentration
256 as for DNCB ($71.2 \pm 23.7\%$). Because of a high cytotoxicity of EtHgCl, it
257 was tested at 2.5 μ M to preserve a cell viability greater than 70%.
258

After treatment with LPS or with the sensitizers, NiSO₄ and DNCB
259 (used as positive controls), mono-DCs derived from nine different
260 donors showed CD86, CD54 and HLA-DR overexpression; in contrast,
261

Table 1
Expression of CD86, CD54 and HLA-DR in mono-DC after 48 h exposure to chemicals. Values are the mean of nine independent experiments in cells obtained from nine separate donors. Each chemical was tested at least twice on each donor.

Chemicals	Concentration	Viability (% mean \pm SD)	CD86 (RFI, mean \pm SD)	CD54 (RFI, mean \pm SD)	HLA-DR (RFI, mean \pm SD)
LPS	100 ng/ml	94.7 \pm 7.60	210.3 \pm 47.5	239.9 \pm 63.0	220.4 \pm 48.8
DNCB	15 μ M	82.5 \pm 16.3	158.8 \pm 23.7	179.8 \pm 18.9	147.0 \pm 10.9
	30 μ M	71.2 \pm 23.7	215.8 \pm 31.4	250.5 \pm 89.7	203.7 \pm 38.9
NiSO ₄	0.5 mM	90.5 \pm 6.30	261.2 \pm 74.3	285.5 \pm 75.5	184.0 \pm 25.1
Thimerosal	2.5 μ M	85.3 \pm 10.9	156.1 \pm 44.9	93.8 \pm 33.7	124.8 \pm 9.50
	5 μ M	73.0 \pm 9.90	217.1 \pm 33.4	99.6 \pm 10.5	151.8 \pm 15.9
	7.5 μ M	70.0 \pm 8.50	269.4 \pm 71.1	97.21 \pm 12.2	211.6 \pm 48.3
EthHgCl	1 μ M	98.0 \pm 5.40	185.4 \pm 34.3	103.9 \pm 55.6	121.4 \pm 25.5
	2.5 μ M	85.5 \pm 6.50	219.8 \pm 42.4	111.9 \pm 37.5	138.0 \pm 17.2
MeHgCl	5 μ M	90.9 \pm 5.50	180.7 \pm 20.7	138.3 \pm 14.5	126.4 \pm 13.3
	7.5 μ M	80.3 \pm 4.70	222.6 \pm 70.6	121.5 \pm 13.3	180.6 \pm 25.1
HgCl ₂	2.5 μ M	86.0 \pm 5.70	139.9 \pm 27.2	99.2 \pm 17.3	167.9 \pm 23.8
	5.0 μ M	75.0 \pm 5.60	148.9 \pm 55.8	89.15 \pm 4.10	126.6 \pm 15.0
Hg(SCN) ₂	7.5 μ M	96.5 \pm 3.40	161.1 \pm 27.1	91.35 \pm 26.2	128.6 \pm 10.4
	15 μ M	70.0 \pm 6.90	175.7 \pm 48.9	107.9 \pm 10.7	163.1 \pm 35.3
TSA	15.0 μ M	91.6 \pm 8.30	121.1 \pm 19.7	94.99 \pm 18.0	98.41 \pm 11.3
DCNB	30.0 μ M	75.0 \pm 19.2	109.3 \pm 21.9	93.09 \pm 15.9	92.10 \pm 17.9
SDS	35.0 μ M	97.7 \pm 2.10	125.8 \pm 35.3	94.24 \pm 19.1	95.67 \pm 10.7

treatment with TSA, the non-mercury moiety of thimerosal, DCNB, a negative control for DNCB, and SDS, an irritant, had no significant effect. Data summarized in Table 1 show that thimerosal and other mercury derivatives such as MeHgCl, HgCl₂ and Hg(SCN)₂ essentially induced a dose-dependent expression of CD86 and expression of HLA-DR to a lesser extent but had no effect on CD54 expression. As no significant CD83 overexpression was observed after mono-DC exposure to thimerosal, these data were not reported in Table 1. Flow cytometry analysis performed only on PI negative cells confirmed that overexpression of activation markers appeared predominantly on viable cells (see Figs. 1E–G, arrows).

In correlation with the overexpression of DC phenotypic markers, secretion of IL-8 (Fig. 2A) and TNF- α (Fig. 2B) was high in response to LPS, NiSO₄ and DNCB but showed no response to TSA, DCNB or SDS. Thimerosal and EtHgCl also induced IL-8 and TNF- α secretion, but EtHgCl had a lesser effect than thimerosal. Among the other mercury compounds, only Hg(SCN)₂ induced TNF- α release.

Sensitizers and mercury compounds induced ROS

The induction of ROS after treatment of DCs with chemicals is summarized in Fig. 3. H₂O₂ was used as a positive control and produced intracellular ROS with a sharp rise from 5 min followed by down-regulation to a level below that of untreated cells. Similarly, exposure to DNCB, thimerosal and EtHgCl induced a transient induction of ROS which returned to the same level as untreated cells after 1 h. A dose effect was detected after 30 min treatment with DNCB whereas thimerosal induced similar ROS level whatever its concentration. In contrast, under our experimental conditions, NiSO₄, TSA, DCNB and SDS did not have any significant effect (data not shown).

Sensitizers and mercury compounds disrupt $\Delta\Psi_m$

After exposure to FCCP, a positive control, a decrease in $\Delta\Psi_m$ was detected in a time-dependent manner 2 h after treatment (Fig. 4). After 30 min, thimerosal and EtHgCl induced a dose-dependent progressive depolarization of $\Delta\Psi_m$ which returned to the value of untreated cells at 6 h, except for cells treated with 5 μ M thimerosal where an $\Delta\Psi_m$ hyperpolarization was detected at 6 h. Marked hyperpolarization of $\Delta\Psi_m$ was induced by H₂O₂ and DNCB, followed by a progressive depolarization which continued in DNCB-treated cells in a dose-dependent manner but returned to base level in H₂O₂-treated cells. In contrast, NiSO₄ did not induce any effect compared

with untreated cells (Fig. 4) as well as TSA, DCNB and SDS (data not shown).

CD86 expression induced by sensitizers and mercury compounds was inhibited by NAC

Under our experimental conditions, CD86 was the most frequently induced DC phenotypic marker; the role of oxidative stress on DC activation was demonstrated after cell pre-treatment with NAC, a thiol-dependent antioxidant. NAC was used at a non-toxic concentration and was controlled for its effect on CD86 expression in untreated cells (Fig. 5). H₂O₂ was used as a positive control for ROS and induced high CD86 expression which was markedly down-regulated by pre-treatment with NAC. Similar data were obtained with DNCB, NiSO₄, thimerosal and EtHgCl, which suggests that oxidative stress plays a key role in the induction of CD86 expression by these chemicals.

Discussion

DCs are known to play an important role in the induction of immune responses; however, the effect of thimerosal on these cells is not fully understood. These studies demonstrated that thimerosal and mercury compounds, such as MeHgCl, HgCl₂ and Hg(SCN)₂, markedly activated mono-DCs, as monitored by phenotype marker expression (essentially CD86 and HLA-DR) and cytokine secretion (IL-8 and TNF- α), as previously reported for thimerosal (Trompezinski et al., 2008) and well known sensitizers such as DNCB or NiSO₄ (Aiba et al., 1997; 2003; Coutant et al., 1999; Guironnet et al., 2000; Tuschl et al., 2000; Hulet et al., 2002; 2005). IL-8 and TNF- α were shown to be the main cytokines secreted after treatment with thimerosal and EtHgCl using a multiplex cytokine kit (CBA kit) from Becton Dickinson (data not shown).

The prediction of sensitizer potential based on changes in DC phenotype and cytokine secretion was previously reported using mono-DCs (for a review, see Welss et al., 2004; Ryan et al., 2005; 2007) or human cell lines such as U937 and THP-1 considered as DC surrogates (Sakaguchi et al., 2006; Ashikaga et al., 2006; Python et al., 2007). Under our experimental conditions, the response of DCs to mercury compounds was similar to their response to DNCB which has been classified as an extreme sensitizer according to the local lymph node assay (Gerberick et al., 2000) and from clinical observations, thimerosal was recently classified as the second most common allergen after nickel (Goon and Goh, 2006; Wattanakrai and Rajatanavin, 2007; Tudela et al., 2008; Cheng et al., 2008; Hammonds et al., 2009). However, as inter-

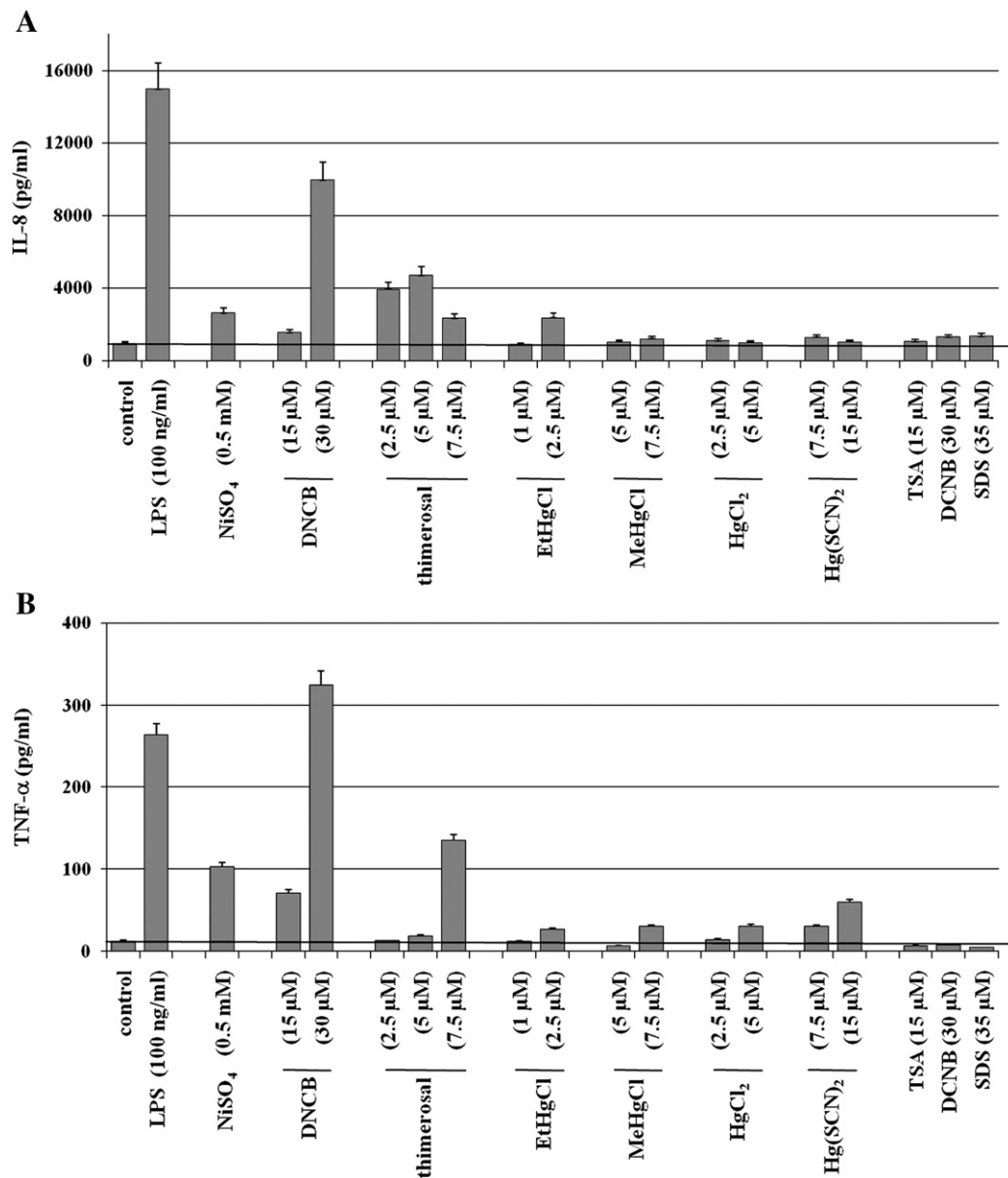


Fig. 2. Sensitizers and mercury compounds induced IL-8 (A) and TNF- α secretion (B). Cytokine release was quantified by ELISA in supernatants recovered after 48 h. The horizontal black line indicates IL-8 and TNF- α secretion in untreated cells. Data are mean \pm SD of at least three independent experiments for each chemical and are representative of IL-8 and TNF- α secretion in supernatant recovered from all nine donors.

342 donor variability was reported by Ryan et al. (2005) to be intrinsic to the
 343 current methods based on phenotypical changes (particularly with
 344 respect to weak and moderate sensitizers), our experiments were
 345 performed using mono-DCs derived from several donors. It should be
 346 noted that mono-DCs derived from nine of 10 healthy donors responded
 347 to thimerosal and mercury analogues in terms of DC activation via CD86
 348 overexpression, whereas TSA, the non-mercury part of thimerosal, had
 349 no effect. However, for the 10th donor, CD86 overexpression was
 350 induced by TSA but not by thimerosal. A lack of material and data from
 351 this one variant responder prevented us from reporting these studies
 352 which could not be validated statistically. These in vitro data are in
 353 agreement with clinical observations of several cases of cutaneous
 354 reactions or allergy to thimerosal, but also with a potential role of TSA as
 355 described by Goncalo et al. (1996). Other experimental studies reported
 356 the specific role of thimerosal metabolites and demonstrated that
 357 apoptosis was induced by both the mercuric metabolites of thimerosal
 358 in T cells (Lebrec et al., 1999). However, other data obtained in mice
 359 showed that thimerosal and mercury analogues induced autoimmunity

or toxicity but not TSA (for a review, see Clarkson and Magos, 2006).
 Because TSA was not systematically included in patch testing, few data
 were reported on this compound. As thimerosal and therefore TSA
 are currently included in several types of vaccines usually at 0.01%
 (247 μ M) corresponding to 25 μ g per doses of 0.5 ml, as reported
 (see www.afssaps.fr; www.eurosurveillance.org; www.fda.gov; www.vaccinesafety.edu). In our study, thimerosal was used at concentrations
 from 2.5 to 7.5 μ M, which is in a good range compared with doses
 included in vaccines. From these data, attention should be paid to
 allergic or atopic patients. Skin sensitization is relevant to different T cell
 reactivities, and patients with a particular T cell sensitivity could
 respond to either TSA or mercury compounds.

Toll-like receptors (TLR) have been reported to play a crucial role
 in contact hypersensitivity (Martin et al., 2008; Freudenberg et al.,
 2009). As thimerosal induced activation of DCs similarly to LPS, TLRs
 and in particular TLR4, activated by LPS and present in mono-DCs
 could play an essential role in sensitivity to thimerosal. The potential
 of thimerosal to activate TLR4 is currently under investigation.

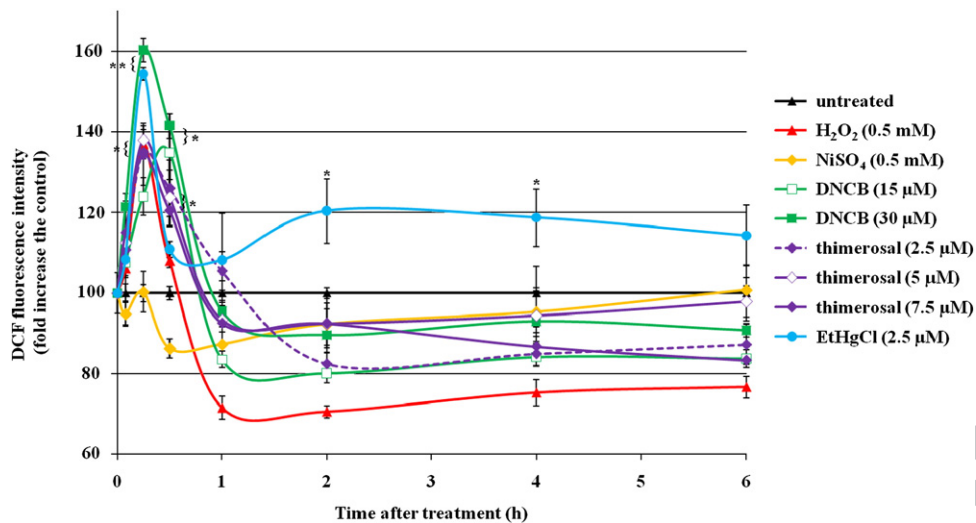


Fig. 3. Sensitizers and EtHgCl induced intracellular ROS production assessed by H₂DCFDA. Mono-DCs were untreated or treated with H₂O₂ as a positive control, NiSO₄, DNCB, thimerosal, EtHgCl, TSA, DNCB or SDS, then incubated for the indicated time (5 min to 6 h) and loaded with H₂DCFDA. Data are expressed as values of the MFI of treated cells compared with the MFI of untreated cells at 100. Experiments were carried out in triplicate (mean ± SD), and data are representative of ROS obtained from all nine donors.

Reactive oxygen species are important intracellular second messenger that control a broad range of physiological and pathological processes including proliferation, inflammation and apoptosis (Martindale and Holbrook, 2002; Forman et al., 2002). In our studies, thimerosal and mercury analogues induced ROS, as detected for DNCB and H₂O₂ used as positive controls. Kinetic studies show that ROS induction is an early event, as kinase signaling previously reported (Trompezinski et al., 2008). The role of oxidative stress in DC activation has previously been reported by several authors (Rutault et al., 1999; Fuchs et al., 2001; Becker et al., 2003; Kantengwa et al., 2003; Mizuashi et al., 2005; Trompezinski et al., 2008; Kagatani et al., 2010). In correlation with the induction of ROS, changes in the polarization of mitochondrial membrane were induced by thimerosal and mercury compounds. Since mitochondria are a reservoir for ROS, it is probable that they play a key role in the activation of DCs. In T cells, thimerosal was reported to induce glutathione depletion and ROS production (Makani et al., 2002). The essential role of glutathione

redox imbalance in DC activation (Rutault et al., 1999; Fuchs et al., 2001; Mizuashi et al., 2005) suggests that a genetic polymorphism of glutathione S-transferase could be a potential factor that predisposes to allergic dermatitis (Lutz et al., 2001).

Since thimerosal possesses thiol groups (Santucci et al., 1998), the capacity of NAC, a thiol-dependent antioxidant, to markedly decrease CD86 expression induced by chemicals demonstrated that thiol groups play a direct role in DC activation as recently reported (Becker et al., 2003; Bruckhausen et al., 2003; Kagatani et al., 2010; Kantengwa et al., 2003; Mizuashi et al., 2005; Trompezinski et al., 2008). All these data highlight the link between chemical structure and activity (Lepoittevin, 1999) and more specifically the great interest in the development of hapten-protein binding assays based on thiol groups for chemical screening (Gerberick et al., 2004).

In conclusion, our studies prove that mono-DCs are a suitable tool to screen potential sensitizers and reflect observations from clinical patch testing. The characterization of early events implicated in DC

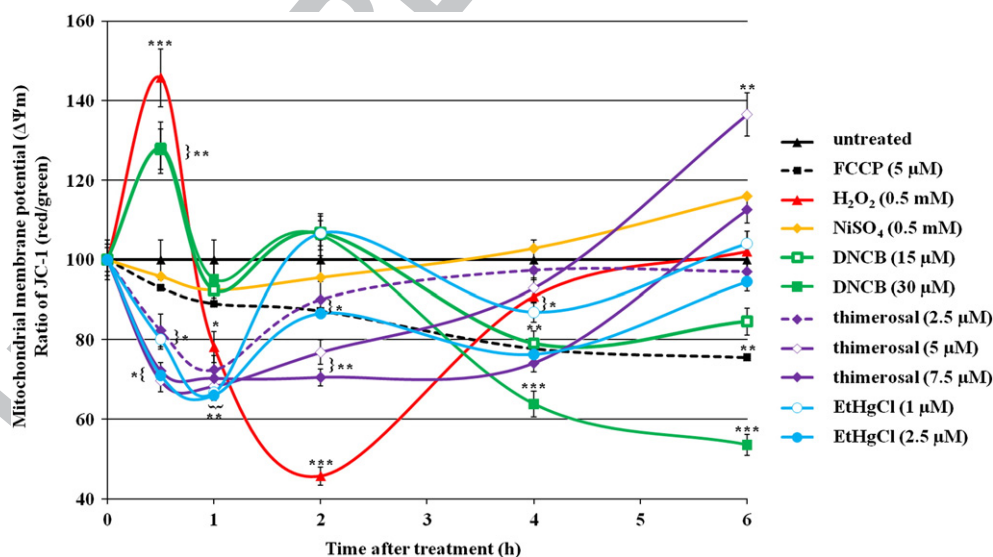


Fig. 4. Sensitizers and EtHgCl induced changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in a time-dependent manner. Cells were exposed to FCCP as a positive control, H₂O₂, NiSO₄, DNCB, thimerosal and EtHgCl for the indicated time (30 min to 6 h) and then the fluorescent probe JC-1 was added at 5 μ g/ml and incubated for 20 min at 37 °C. Changes in $\Delta\Psi_m$ were measured by flow cytometry (mean (red/green) fluorescence) and indicate the ratio of high/low mitochondrial membrane potential. Data are expressed as a percentage of the control (untreated cells) normalized to 100. Experiments were carried out in triplicate (mean ± SD), and data are representative of $\Delta\Psi_m$ modification obtained for three different donors. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

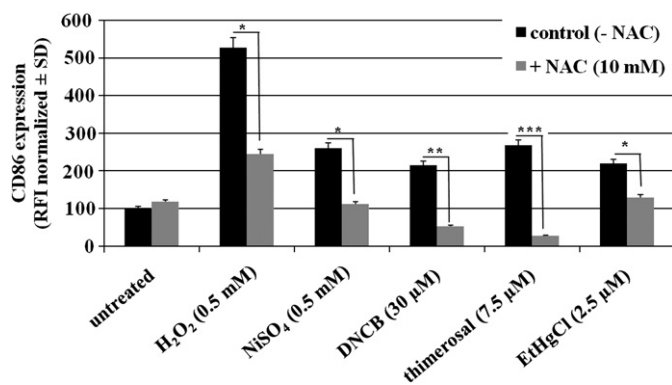


Fig. 5. The thiol-dependent antioxidant NAC markedly decreased CD86 expression induced by sensitizers and EtHgCl. Mono-DCs were pre-treated or not with NAC (10 mM) for 1 h before exposure to H₂O₂, NiSO₄, DNCB, thimerosal and EtHgCl, and CD86 expression was assessed by flow cytometry after 48 h. Experiments were carried out in triplicate and are mean ± SD. Data are representative of values obtained for three different donors.

activation, in particular the redox status of chemicals and the metabolic activity of DCs must be taken into account when screening chemicals for skin sensitization.

Acknowledgments

These studies were supported financially by a grant from LVMH Research without any conflict of interest. We particularly thank A. Rubod and S. Paris for technical assistance and are particularly indebted to Jane Mitchell for editing this manuscript.

References

- Agrawal, A., Kaushal, P., Agrawal, S., Gollapudi, S., Gupta, S., 2007. Thimerosal induces TH2 responses via influencing cytokine secretion by human dendritic cells. *J. Leukocyte Biol.* 81, 474–482.
- Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., Tagami, H., 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of costimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.* 27, 3031–3018.
- Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, Z.U., Mizuashi, M., Ohtani, T., Yoshino, Y., Tagami, H., 2003. p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and 2, 4-dinitrochlorobenzene. *J. Invest. Dermatol.* 120, 390–399.
- Ardeshtna, K.M., Pizzey, A.R., Devereux, S., Khwaja, A., 2000. The PI3 kinase, p38 SAPkinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96, 1039–1046.
- Arrighi, J.F., Rebsamen, M., Rousset, F., Kindler, V., Hauser, C., 2001. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J. Immunol.* 166, 3837–3845.
- Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Toyoda, H., 2006. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767–773.
- Becker, D., Valk, E., Zahn, S., Brand, P., Knop, J., 2003. Coupling of contact sensitizers to thiol groups is a key event for the activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 120, 233–238.
- Belsito, D.V., 2002. Thimerosal: contact (non) allergen of the year. *Am. J. Contact Dermatitis* 13, 1–2.
- Boislève, F., Kerdine-Römer, S., Pallardy, M., 2005. Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha. *Toxicology* 206, 233–244.
- Breithaupt, A., Jacob, S.E., 2008. Thimerosal and the relevance of patch-test reactions in children. *Dermatitis* 19, 275–277.
- Bruckhausen, S., Zahn, S., Valk, E., Knop, J., Becker, D., 2003. Thiol antioxidants block the activation of antigen-presenting cells by contact sensitizers. *J. Invest. Dermatol.* 121, 1039–1044.
- Cheng, T.Y., Tseng, Y.H., Sun, C.C., Chu, C.Y., 2008. Contact sensitization to metals in Taiwan. *Contact Dermatitis* 59, 353–360.
- Clarkson, T.W., Magos, L., 2006. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 609–662.
- Coutant, K.D., de Fraissinette, A.B., Cordier, A., Ulrich, P., 1999. Modulation of the activity of human monocyte-derived dendritic cells by chemical haptens, a metal allergen, and a staphylococcal superantigen. *Toxicol. Sci.* 52, 189–198.

- Denizot, F., Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89, 271–277.
- Forman, J.L., Torres, M., Fukuto, J., 2002. Redox signaling. *Mol. Cell. Biochem.* 234, 49–62.
- Freudenberg, M.A., Esser, P.R., Jakob, T., Galanos, C., Martin, S.F., 2009. Innate and adaptive immune responses in contact dermatitis – analogy with infections. *G. Ital. Dermatol. Venereol.* 144, 173–185.
- Fuchs, J., Zollner, T.M., Kaufmann, R., Podda, M., 2001. Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 337–353.
- Geier, D.A., Sykes, L.K., Geier, M.R., 2007. A review of thimerosal (merthiolate) and its ethylmercury breakdown product: specific historical considerations regarding safety and effectiveness. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 10, 575–596.
- Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kimber, I., Dearman, R.J., Lea, L.J., Basketter, D.A., 2000. Local lymph node assay: validation assessment for regulatory purposes. *Am. J. Contact Dermatitis* 11, 3–18.
- Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Bailey, R.E., Chaney, J.G., Morrall, S.W., Lepoittevin, J.P., 2004. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol. Sci.* 81, 332–343.
- Goncalo, M., Figueiredo, A., Goncalo, S., 1996. Hypersensitivity to thimerosal: the sensitizing moiety. *Contact Dermatitis* 34, 201–203.
- Goon, A.T., Goh, C.L., 2006. Patch testing of Singapore children and adolescents: our experience over 18 years. *Pediatr. Dermatol.* 23, 117–120.
- Goth, S.R., Chu, R.A., Gregg, J.P., Cherednichenko, G., Pessah, I.N., 2006. Uncoupling of ATP-mediated calcium signaling and dysregulated interleukin-6 secretion in dendritic cells by nanomolar thimerosal. *Environ. Health Perspect.* 114, 1083–1091.
- Guironnet, G., Dalbiez-Gauthier, C., Rousset, F., Schmitt, D., Péguet-Navarro, J., 2000. In vitro human T cell sensitization to haptens by monocyte-derived dendritic cells. *Toxicol. In Vitro* 14, 517–522.
- Hammonds, L.M., Hall, V.C., Yiannias, J.A., 2009. Allergic contact dermatitis in 136 children patch tested between 2000 and 2006. *Int. J. Dermatol.* 48, 271–274.
- Havarinasab, S., Lambertsson, L., Qvarnström, J., Hultman, P., 2004. Dose-response study of thimerosal-induced murine systemic autoimmunity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 194, 169–179.
- Hulette, B.A., Ryan, C.A., Gerberick, G.F., 2002. Elucidating changes in surface marker expression of dendritic cells following chemical allergen treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 226–233.
- Hulette, B.A., Ryan, C.A., Gildea, L.A., Gerberick, G.F., 2005. Relationship of CD86 surface marker expression and cytotoxicity on dendritic cells exposed to chemical allergen. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 209, 159–166.
- Kagatani, S., Sasaki, Y., Hirota, M., Mizuashi, M., Suzuki, M., Ohtani, T., Itagaki, H., Aiba, S., 2010. Oxidation of cell surface thiol groups by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 130, 175–183.
- Kantengwa, S., Jørnøt, L., Devenoges, C., Nicod, L.P., 2003. Superoxide anions induce the maturation of human dendritic cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167, 431–437.
- Kumar, S., Jiang, M.S., Adams, J.L., Lee, J.C., 1999. Pyridinylimidazole compound SB203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 825–831.
- Lebrec, H., Bachot, N., Gaspard, I., Kerdine, S., Guinépain, M.T., Laurent, J., Pallardy, M., 1999. Mechanisms of drug-induced allergic contact dermatitis. *Cell Biol. Toxicol.* 15, 57–62.
- Lee-Wong, M., Resnick, D., Chong, K., 2005. A generalized reaction to thimerosal from an influenza vaccine. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 94, 90–94.
- Lepoittevin, J.P., 1999. Development of structure–activity relationships (SARs) in allergic contact dermatitis. *Cell Biol. Toxicol.* 15, 47–55.
- Lutz, W., Tarkowski, M., Nowakowska, E., 2001. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase as a factor predisposing to allergic dermatitis. *Med. Pr.* 52, 45–51.
- Makani, S., Gollapudi, S., Yel, L., Chiplunkar, S., Gupta, S., 2002. Biochemical and molecular basis of thimerosal-induced apoptosis in T cells: a major role of mitochondrial pathway. *Genes Immun.* 3, 270–278.
- 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. *J. Exp. Med.* 205, 2151–2162.
- Martindale, J.L., Holbrook, N.J., 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* 192, 1–15.
- Matsuzawa, A., Ichijo, H., 2005. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 472–481.
- Mizuashi, M., Ohtani, T., Nakagawa, S., Aiba, S., 2005. Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 124, 579–586.
- Patrizi, A., Rizzoli, L., Vincenzi, C., Trevisi, P., Tosti, A., 1999. Sensitization to thimerosal in atopic children. *Contact Dermatitis* 40, 94–97.
- Python, F., Goebel, C., Aeby, P., 2007. Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220, 113–124.
- Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C.L., Gold, M.R., Ricciardi-Castagnoli, P., 1998. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J. Exp. Med.* 188, 2175–2180.
- Royall, J.A., Ischiropoulos, H., 1993. Evaluation of 2', 7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 302, 348–355.
- Rutault, K., Alderman, C., Chain, B.M., Katz, D.R., 1999. Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 232–238.
- Ryan, C.A., Gerberick, G.F., Gildea, L.A., Hulette, B.C., Betts, C.J., Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Kimber, I., 2005. Interactions of contact allergens with dendritic cells: opportunities and challenges for the development of novel approaches to hazard assessment. *Toxicol. Sci.* 88, 4–11.

- 550 Ryan, C.A., Kimber, I., Basketter, D.A., Pallardy, M., Gildea, L.A., Gerberick, G.F., 2007.
551 Dendritic cells and skin sensitization: biological roles and uses in hazard
552 identification. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 221, 384–394.
- 553 Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M.,
554 Itagaki, H., Toyoda, H., Suzuki, H., 2006. Development of an in vitro skin sen-
555 sitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT).
556 II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol. In Vitro* 20, 774–784.
- 557 Santucci, B., Cannistraci, C., Cristaudo, A., Camera, E., Picardo, M., 1998. Thimerosal
558 positivities: the role of SH groups and divalent ions. *Contact Dermatitis* 39,
559 123–126.
- 560 Silbergeld, E.K., Silva, I.A., Nyland, J.F., 2005. Mercury and autoimmunity: implications for
561 occupational and environmental health. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, S282–S292.
- 562 Slodownik, D., Ingber, A., 2005. Thimerosal is it really irrelevant? *Contact Dermatitis* 53,
563 324–326.
- 564 Suneja, T., Belsito, D.V., 2001. Thimerosal in the detection of clinically relevant allergic
565 contact reactions. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45, 23–27.
- Trompezinski, S., Migdal, C., Tailhardat, M., Le Varlet, B., Courtellemont, P., Haftek, M., 566
Serres, M., 2008. Characterization of early events involved in human dendritic cell 567
maturation induced by sensitizers: cross talk between MAPK signalling pathways. 568
Toxicol. Appl. Pharmacol. 230, 397–406. 569
- Tudela, E., MacPherson, C., Maibach, H.I., 2008. Long-term trend in patch test reactions: 570
a 32-year statistical overview (1970–2002), part II. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 27, 571
187–202. 572
- Tuschl, H., Kovac, R., Weber, E., 2000. The expression of surface markers on dendritic 573
cells as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Toxicol. In Vitro* 14, 574
541–549. 575
- Wattankrai, P., Rajatanavin, N., 2007. Thimerosal allergy and clinical relevance in 576
Thailand. *J. Med. Assoc. Thai.* 90, 1775–1779. 577
- Welss, T., Basketter, D.A., Schröder, K.R., 2004. In vitro skin irritation: facts and future. 578
State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol. In Vitro* 18, 231–243. 579
- Zenarola, P., Gimma, A., Lomuto, M., 1995. Systemic contact dermatitis from thimerosal. 580
Contact Dermatitis 32, 107–108. 581

UNCORRECTED PROOF

ARTICLE 2

Sensitization effect of thimerosal is mediated in vitro via reactive oxygen species and calcium signaling.

Migdal C, Foggia L, Tailhardat M, Courtellemont P, Haftek M, Serres M.

Toxicology 2010

➤ In press. Available on line.

En vu de palier à la variabilité inter-donneurs observée avec les mono-DCs (article 1), mais également d'éviter la génération de DCs à partir de précurseurs sanguins, les travaux de ce deuxième article ont été réalisés sur la lignée promyélocytaire humaine U937. Ce travail a pour but de caractériser les mécanismes intracellulaires à l'origine de la surexpression du CD86 et de la sécrétion d'IL-8 induits par le thimerosal et le DNCB et s'est particulièrement intéressé au rôle du stress oxydant et à la signalisation calcique induit par ces composés chimiques dans cette lignée.

Ce travail montre que le thimerosal, l'EtHgCl et les autres composés mercuriques induisent l'activation des U937, confirmant les résultats obtenus avec les mono-DCs (article 1). Cette activation est directement liée à l'induction d'ERO et à une déplétion des groupements thiols. La production radicalaire est détectée au niveau cytoplasmique et mitochondriale par l'utilisation de sondes spécifiques de ces compartiments. La chute du potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) est également détectée après traitement des U937 par les composés mercuriques (thimerosal et EtHgCl) et le DNCB.

L'implication des ERO dans l'initiation du processus d'activation a été mise en évidence en prétraitant les U937 par différents antioxydants (thiols et non thiols dépendant). Les résultats obtenus montrent que seuls les antioxydants thiol-dépendants sont capables d'inhiber l'activation des U937 induite par les composés mercuriques et le DNCB, et confirment l'effet protecteur des groupements thiols. Le rôle de l'oxydation des groupements thiols dans l'activation des U937 est confirmé par l'effet inhibiteur de l'agent réducteur dithiothréitol (DTT). Un effet partiel de la vitamine E (non thiol-dépendante) est observé sur l'expression du CD86 et suggère que, bien que l'oxydation des protéines thiols semble être un mécanisme déterminant, l'oxydation des lipides membranaires participe aussi au processus d'activation.

Enfin une relation entre l'influx calcique intracellulaire induit par les composés mercuriques et le DNCB et le stress oxydant est démontrée.

Ce travail démontre l'importance du stress oxydant comme évènement précoce de la signalisation cellulaire responsable de l'activation des U937 et met en avant l'importance des groupements thiols dans la réponse des DCs aux allergènes.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicol

Sensitization effect of thimerosal is mediated in vitro via reactive oxygen species and calcium signaling

Camille Migdal^a, Lucie Foggia^a, Magalie Tailhardat^b, Pascal Courtellemont^b,
Marek Haftek^a, Mireille Serres^{a,*}

^a EA 41-69, Université Lyon 1, Pavillon R, Hôpital Edouard Herriot, 69437 Lyon Cedex 03, France

^b LVMH Recherche, St Jean de Braye, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 March 2010
Received in revised form 14 April 2010
Accepted 28 April 2010
Available online xxx

Keywords:

Thimerosal
U937 activation
Reactive oxygen species
Calcium influx
Mitochondrial membrane potential

ABSTRACT

Thimerosal, a mercury derivative composed of ethyl mercury chloride (EtHgCl) and thiosalicylic acid (TSA), is widely used as a preservative in vaccines and cosmetic products and causes cutaneous reactions. Since dendritic cells (DCs) play an essential role in the immune response, the sensitization potency of chemicals was studied in vitro using U937, a human promyelomonocytic cell line that is used as a surrogate of monocytic differentiation and activation. Currently, this cell line is under ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) validation as an alternative method for discriminating chemicals. Thimerosal and mercury derivatives induced in U937 an overexpression of CD86 and interleukin (IL)-8 secretion similarly to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB), a sensitizer used as a positive control for DC activation. Non-sensitizers, dichloronitrobenzene (DCNB), TSA and sodium dodecyl sulfate (SDS), an irritant, had no effect. U937 activation was prevented by cell pretreatment with N-acetyl-L-cysteine (NAC) but not with thiol-independent antioxidants except vitamin E which affected CD86 expression by preventing lipid peroxidation of cell membranes. Thimerosal, EtHgCl and DNCB induced glutathione (GSH) depletion and reactive oxygen species (ROS) within 15 min; another peak was detected after 2 h for mercury compounds only. MitoSOX™, a specific mitochondrial fluorescent probe, confirmed that ROS were essentially produced by mitochondria in correlation with its membrane depolarization. Changes in mitochondrial membrane permeability induced by mercury were reversed by NAC but not by thiol-independent antioxidants. Thimerosal and EtHgCl also induced a calcium (Ca²⁺) influx with a peak at 3 h, suggesting that Ca²⁺ influx is a secondary event following ROS induction as Ca²⁺ influx was suppressed after pretreatment with NAC but not with thiol-independent antioxidants. Ca²⁺ influx was also suppressed when culture medium was deprived of Ca²⁺ confirming the specificity of the measure. In conclusion, these data suggest that thimerosal induced U937 activation via oxidative stress from mitochondrial stores and mitochondrial membrane depolarization with a primordial effect of thiol groups. A cross-talk between ROS and Ca²⁺ influx was demonstrated.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Thimerosal is an organomercury product, composed of ethyl mercury (EtHgCl) and thiosalicylic acid (TSA) with sulfhydryl-reactive properties (Elferink, 1999). Because of its antimicrobial properties, thimerosal is frequently found in topical antiseptic solutions and is used as a preservative in cosmetics, ophthalmic medication, consumer and pharmaceutical products. Thimerosal, named also thiomersal or merthiolate in clinical studies, is widely

added to several types of vaccines (for review, see Geier et al., 2007). Despite several cases of generalized cutaneous reactions and a high frequency of sensitization in atopic children (Goncalo et al., 1996; Suneja and Belsito, 2001), few in vitro studies have investigated dendritic cells (DCs) which play an essential role in immune response. Due to the potential allergic effect of mercury compounds, it is important to understand better the mechanisms by which these compounds modulate the immune system. The toxicity of mercury derivatives was reported to be associated with oxidative stress (for review, see Clarkson and Magos, 2006), which is mainly implicated in skin diseases (Fuchs et al., 2001). Indeed, a change in redox glutathione (GSH/GSSG) imbalance caused by sensitizers was reported to play a crucial role in triggering DC maturation (Kantengwa et al., 2003; Mizuashi et al., 2005; Yamada et al., 2006). However, although DC maturation was recently reported to be relevant to reactive oxygen species (ROS) and in particular to

Abbreviations: TSA, thiosalicylic acid; DCs, dendritic cells; NAC, N-acetyl-L-cysteine; ROS, reactive oxygen species; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 72 11 02 88; fax: +33 4 72 11 02 90.

E-mail address: mireille.serres@univ-lyon1.fr (M. Serres).

thiol groups (Rutault et al., 1999; Bruchhausen et al., 2003; Becker et al., 2003; Hirota et al., 2009; Suzuki et al., 2009; Kagatani et al., 2010), few studies have investigated the direct effect of thimerosal on DCs (Goth et al., 2006; Agrawal et al., 2007; Trompezinski et al., 2008).

The aim of this study was to identify more accurately the role of oxidative stress induced by thimerosal and mercury derivatives in U937 activation (CD86 overexpression and interleukin (IL)-8 secretion) through the measurement of glutathione (GSH) depletion and ROS. Since the response of monocyte-derived DCs (mono-DCs) to sensitizers is donor-dependent (Ryan et al., 2005), as we also observed in previous studies (Migdal et al., in press), these investigations were performed on U937, a human promyelomonocytic cell line considered to be a suitable model for studying monocytic differentiation and activation. This cell line is currently under validation by ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) for discriminating allergenic potency of chemicals as U937 respond similarly as DCs towards major of sensitizers versus non-sensitizers and irritants by overexpression of CD86 and IL-8 secretion (Ashikaga et al., 2006; Sakaguchi et al., 2006; Python et al., 2007).

Mitochondria are an important source of ROS (for review, see Dröge, 2002) and are implicated in DC differentiation (Del Prete et al., 2008); therefore, changes in mitochondrial membrane permeability after exposure to mercury derivatives were investigated. Because thimerosal can also induce calcium (Ca^{2+}) influx (Elferink, 1999; Bultynick et al., 2004), the cross-talk between U937 activation, ROS and Ca^{2+} signaling is discussed.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Hydrogen peroxide (H_2O_2), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB), thimerosal, ethyl mercury chloride (EtHgCl), methyl mercury(II) chloride (MeHgCl), mercury(II) chloride (HgCl_2), mercury(II) thiocyanate ($\text{Hg}(\text{SCN})_2$), thiosalicylic acid (TSA), dichloronitrobenzene (DCNB), sodium dodecyl sulfate (SDS), N-acetyl-L-cysteine (NAC), D,L-dithiothreitol (DTT), glutathione (GSH), L-cysteine, L-serine, α -tocopherol (vitamin E), ascorbic acid (vitamin C), acetylsalicylic acid (aspirin), N-ethylmaleimide (NEM), buthionine sulfoximide (BSO), carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), ionomycin, 1,2-bis-(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester (BAPTA-AM) and ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) were all purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

2.2. Cell culture

The human monocytic cell line U937 was grown in RPMI 1640 medium with GlutamaxTM and 25 mM HEPES (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (Abcys, Paris, France) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen), at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 as described previously (Ashikaga et al., 2006; Sakaguchi et al., 2006; Python et al., 2007).

2.3. Cell treatment with chemicals

For all treatments with chemicals, U937 cells were cultured in X-Vivo serum-free medium (Lonza, Verviers, Belgium). Thimerosal, $\text{Hg}(\text{SCN})_2$, HgCl_2 and SDS were dissolved in culture medium, DNCB and DCNB were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (at 0.04%), TSA and EtHgCl in ethanol (at 0.1%), and MeHgCl in culture medium containing 1% dichloromethane (final concentration at 0.0001%). All of these solvents were verified as negative controls. Cells were seeded at 1×10^6 cells/ml and exposed to H_2O_2 (at 1 mM), DNCB (at 15 μM and 30 μM), thimerosal (at 2.5–7.5 μM), EtHgCl (at 1 μM and 2.5 μM), MeHgCl (at 2.5–7.5 μM), HgCl_2 (at 2.5–7.5 μM), $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ (at 7.5 μM and 15 μM), TSA (at 15 μM), DCNB (at 30 μM) or SDS (at 35 μM). After 1 h of treatment with H_2O_2 , DNCB and mercury compounds, cells were rinsed in phosphate buffered saline (PBS) and X-Vivo medium was added.

To evaluate the role of oxidative stress and more specifically the role of thiol oxidation in U937 activation, cells were preincubated for 1 h with NAC (at 10 mM), DTT (at 50 μM), GSH (at 10 mM), L-cysteine (at 10 μM), L-serine (at 10 μM), vitamin E (at 10 μM), vitamin C (at 10 μM) or aspirin (at 10 μM) prior to chemical exposure. These antioxidants were present at the same concentration during all the incubation times

2.4. Cell viability

The viability of U937 was assessed by propidium iodide (PI) dye exclusion. Briefly, treated cells were washed in cold PBS, stained with 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PI and analysed from 10,000 cells using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Pont de Claix, France) with the FL3-H wavelength band and CellQuestTM software (Becton Dickinson).

2.5. Immunofluorescent staining and flow cytometry analysis

Changes in U937 phenotype were detected by flow cytometry. Treated cells were harvested and incubated for 30 min at 4 °C with the following monoclonal antibodies: human fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human CD86 (clone Fun-1) from BD-Pharmingen (Pont de Claix, France), FITC-conjugated anti-human CD54 (clone 84H10) and their corresponding isotype control FITC-labeled mouse IgG1 from Beckman Coulter (Villepinte, France). After incubation, cells were washed at 4 °C in PBS containing 1% bovine serum albumin and fixed with 1% formaldehyde in PBS. Samples were stored at 4 °C in the dark until analysis. For each sample, 10,000 cells were acquired from a gated homogenous population of cells and analysed using CellQuestTM software. The induction index of 120% ((mean fluorescence intensity (MFI) of treated cells/MFI of untreated cells) x 100) was used as a positive criterion for evaluating CD86 expression as reported in the human cell line activation test protocol (Ashikaga et al., 2006).

2.6. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

IL-8 secretion was measured in cell supernatants collected after 24 h and 48 h of exposure to chemicals. Cytokine concentration was assessed by ELISA (Abcys) according to the manufacturer's instructions. The concentration of IL-8 was calculated from standard curves using human recombinant IL-8 (from 31.2 pg/ml to 2000 pg/ml), with a limit of detection of 62.5 pg/ml.

2.7. GSH analysis

GSH was measured using a specific probe, monobromobimane (mBBR) from FluoProbes (Interchim, Montluçon, France), which produced a fluorescent signal after interaction with all intracellular thiols (Hedley and Chow, 1994). Cells ($1 \times 10^6/\text{ml}$ in X-Vivo medium) were exposed to chemicals and then incubated with 40 μM mBBR for 30 min at 37 °C in the dark. The fluorescent intensity was detected through a 470-nm band pass filter using a FACS vantage SE (Becton Dickinson). For each experiment, 10,000 cells were acquired and analysed using CellQuestTM software.

2.8. Measurement of intracellular ROS

Intracellular ROS were detected using the specific dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) from FluoProbes (Interchim), as described by Royall and Ischiropoulos (1993). H_2DCFDA , a membrane-permeable probe, was de-acetylated to a non-fluorescent product, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (H_2DCF) by cellular esterases and was oxidized by ROS to a fluorescent product, 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Briefly, cells were seeded at 2×10^6 cells/ml in X-Vivo medium and loaded for 30 min in the dark with 2 μM H_2DCFDA before treatment with chemicals. After incubation, cells were rinsed with culture medium. At several times after treatments (after 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h and 6 h), green DCF fluorescence oxidation was analysed by flow cytometry using the FL1-H wavelength band. Just before FACS acquisition, PI was added to the cells at a final concentration of 0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$. DCF fluorescence was analysed in a FL1/SSC dot plot gated on 10,000 PI-negative cells using CellQuestTM software.

2.9. Mitochondrial superoxide generation assay (MitoSOXTM)

Mitochondrial superoxide generation was detected using MitoSOXTM (Molecular Probes, Invitrogen), a specific mitochondrial superoxide indicator and a quantitative method for the detection of mitochondrial ROS generation by flow cytometry (Mukhopadhyay et al., 2007). MitoSOXTM is a modified cationic dihydroethidium probe which is cell permeable, reacts with superoxide to form ethidium and upon binding to nucleic acids gives a bright red fluorescence. Briefly, cells were seeded at 1×10^6 cells/ml in X-Vivo medium and treated with chemicals for 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h or 6 h. After treatments, cells were loaded for 10 min at 37 °C in the dark with 5 μM MitoSOXTM. The fluorescence intensity was immediately analysed by flow cytometry using the FL2-H wavelength band. For each sample, 10,000 cells were acquired and analysed using CellQuestTM software.

2.10. Measurement of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)

After chemical exposure, the changes in $\Delta\Psi_m$ were measured by flow cytometry based on the uptake of the cationic carbocyanine dye, JC-1 (FluoProbes, Interchim). Briefly, cells were seeded at 1×10^6 cells/ml in X-Vivo medium and treated with chemicals for 30 min, 1 h, 2 h, 4 h or 6 h. Cells were then incubated at 37 °C

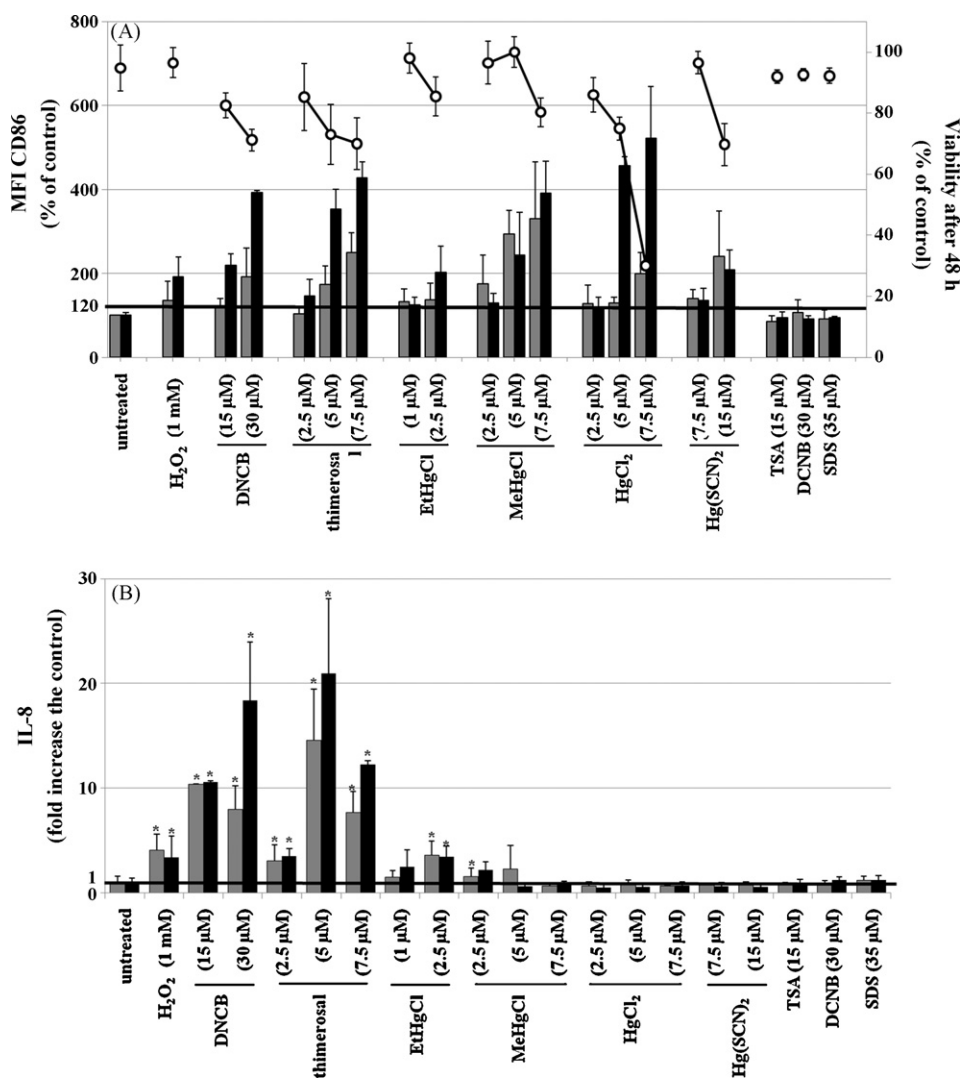


Fig. 1. Sensitizers and mercury compounds overexpressed CD86 expression (A) and IL-8 secretion (B). Dose–response experiments after 24 h (grey histogram) and 48 h (black histogram) of treatment with chemicals compared with control (untreated cells). (A) CD86 expression assessed by flow cytometry was reported as CD86 MFI and was calculated as a percentage of the control ((MFI of treated cells/MFI of untreated cells) × 100). The horizontal black line indicates the induction index of 120% used as a positive criterion for CD86 expression. Data are the mean of at least six independent experiments. Cell viability after 48 h of exposure, reported on the y second axis (open circles), was assessed by PI dye exclusion. (B) IL-8 secretion (quantified by ELISA) was expressed as the fold increase relative to the control (IL-8 secretion in treated cells compared with untreated cells). The horizontal black line indicates IL-8 secretion in untreated cells normalized at 1. Data are the mean of three independent experiments.

with 5 μg/ml JC-1 for 20 min in the dark. The fluorescence intensity was immediately analysed by flow cytometry. The ratio of green fluorescence intensities at 595 nm and 535 nm (ratio red/green) determined the level of ΔΨ_m. The aggregate red form had an absorption/emission maximum at 585/590 nm (FL2-H wavelength band) and the green monomeric form at 510/527 nm (FL1-H wavelength band). For each sample, 10,000 cells were acquired and analysed using CellQuest™ software.

To determine whether ROS induction and thiol oxidation explained the changes in ΔΨ_m, cells were preincubated for 1 h with NAC (10 mM), vitamin E (10 μM) or vitamin C (10 μM) prior to chemical exposure. These antioxidants were present at the same concentration during all the incubation times. After 30 min of treatment with chemicals, cells were harvested and ΔΨ_m was measured.

2.11. Measurement of calcium influx

For calcium measurement, cells (2 × 10⁶/ml) cultured in X-Vivo medium, were loaded with 2.5 μM Fluo-8™ AM (Fluorobes) for 30 min at 37 °C in the dark and were rinsed twice with culture medium after incubation. The cells were then resuspended at 1 × 10⁶ cells/ml and treated with chemicals for 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h and 6 h. Cytosolic calcium was detected by flow cytometry using the FL1-H wavelength band. Just before FACS acquisition, PI was added to the cells at a final concentration of 0.625 μg/ml. Calcium influx was analysed in a FL1/SSC dot plot gated on 10,000 PI-negative cells using CellQuest™ software.

In order to determine the source of calcium, cells were preincubated for 1 h in X-Vivo medium containing EGTA (0.5 mM) or BAPTA-AM (1 μM) prior chem-

ical exposure. Calcium chelators were present during all the experiments at the same concentration. After 3 h of treatment with chemicals, cells were harvested and calcium measurements were performed.

2.12. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the Wilcoxon signed-rank test. A *p*-value of 0.05 (*) was selected as the limit of statistical significance.

3. Results

3.1. Thimerosal, mercury derivatives and DNCB induced CD86 overexpression and IL-8 release

CD86 overexpression was induced by thimerosal and other mercury compounds such as EtHgCl, MeHgCl, HgCl₂ and Hg(SCN)₂ in a time- (24 h in grey and 48 h in black) and dose-dependent manner (Fig. 1A), in comparison with DNCB, which is classified as an extreme sensitizer, and H₂O₂, which was used as a positive control for oxidative stress studies. As expected, TSA, the non-mercury part of thimerosal, DCNB, an inactive analogue of DNCB, and SDS, an irritant, had no effect. Each chemical was tested

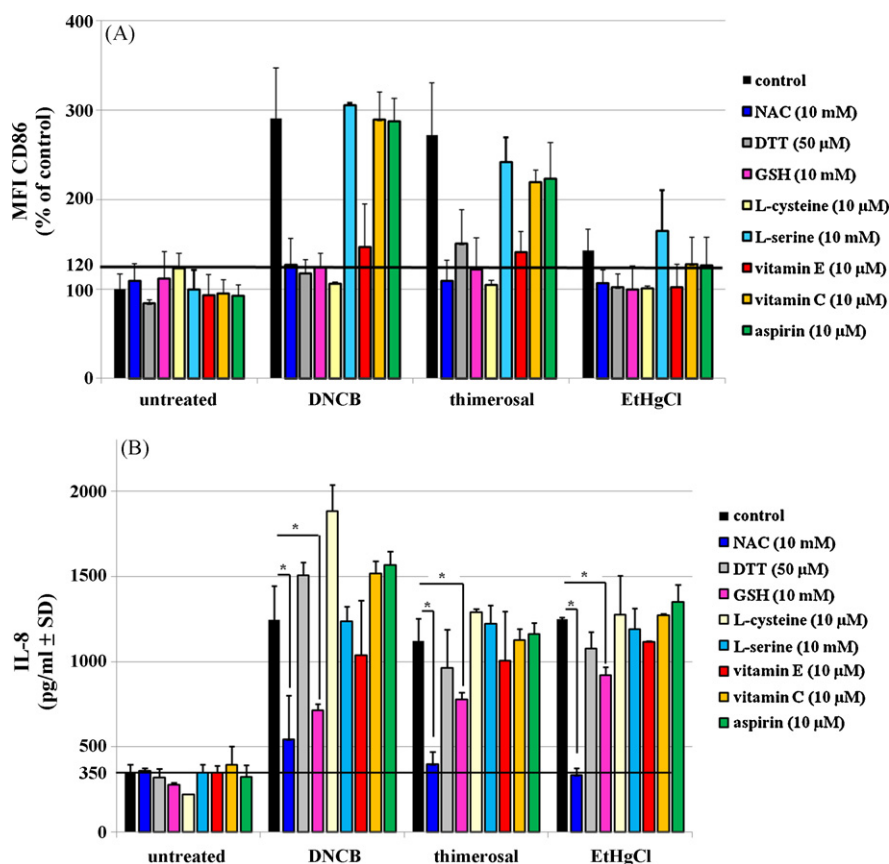


Fig. 2. CD86 expression (A) and IL-8 release (B) after 48 h in the presence or absence of thiol-dependent antioxidants (NAC, GSH, L-cysteine), the reducing agent D, L-dithiothreitol (DTT) or thiol-independent radical scavengers (vitamin E, vitamin C and aspirin). Cells were pretreated with these compounds or L-serine (used as a negative control) for 1 h before exposure to DNCB (at 15 μM), thimerosal (at 5 μM) and EtHgCl (at 2.5 μM). (A) CD86 expression, assessed by flow cytometry, was reported as previously described. The horizontal black line indicates the induction index of 120% used as a positive criterion for CD86 expression. Data are the mean of at least three independent experiments. (B) IL-8 secretion (quantified by ELISA) was expressed in pg/ml and the horizontal black line indicates IL-8 secretion in untreated cells (353 pg/ml). Data are the mean of at least three independent experiments.

at several concentrations and cell viability was determined by PI staining.

IL-8 release was also markedly induced by thimerosal and DNCB in a time-dependent manner (Fig. 1B, 24 h in grey and 48 h in black), and, to a lesser but significant extent by H₂O₂ and EtHgCl. IL-8 secretion was not detected after exposure to the other mercury derivatives, MeHgCl, HgCl₂ and Hg(SCN)₂, or the non-sensitizers, TSA, DNCB and SDS. The toxic effect of mercury derivatives prevented us from using these compounds at higher concentrations which would be necessary for IL-8 secretion. In the same way, due to the toxicity of thimerosal at 7.5 μM, IL-8 release was lower but still significant. Therefore, from these data, all other experiments were performed using thimerosal at 5 μM, EtHgCl at 2.5 μM and DNCB at 15 μM, concentrations at which cell viability was greater than 70%.

3.2. Effect of thiol-dependent and -independent antioxidants on CD86 expression and IL-8 secretion

In order to evaluate the role of oxidative stress in U937 activation (CD86 overexpression and IL-8 release) induced by thimerosal and EtHgCl in comparison with that induced by DNCB, cells were pretreated with different thiol-containing compounds that have reducing activity or with the radical scavengers, vitamin E, vitamin C and aspirin. All of these pretreatments were performed at non-toxic concentrations and verified as having no significant effect on CD86 expression or IL-8 secretion. As shown in Fig. 2A, CD86 expression induced by sensitizers was inhibited by NAC,

a thiol-dependent antioxidant, GSH and L-cysteine whereas L-serine, which was used as a negative control, did not modify CD86 expression induced by sensitizers. These data suggest that CD86 expression is dependent on free thiol groups as confirmed by cell pretreatment with DTT, a reducing agent that maintains thiol groups in a reduced state (Fig. 2A). Because of its action against lipid peroxidation of cell membranes, vitamin E prevented CD86 overexpression, a cell surface marker, whereas vitamin C and aspirin had no effect. Taken together, these results indicate that protein and lipid oxidation could play an important role in CD86 overexpression induced by DNCB, thimerosal and EtHgCl.

In parallel with CD86 overexpression, the marked release of IL-8 induced by DNCB, thimerosal and EtHgCl was essentially inhibited by cell pretreatment with NAC and GSH, but not with vitamin C, vitamin E or aspirin, and, unexpectedly, it was not inhibited after a pretreatment with DTT or L-cysteine (Fig. 2B).

3.3. Thiol content was depleted after exposure to mercury compounds and DNCB

As oxidative stress is generally associated with a reduced antioxidant defence, thiol content was assessed by mBBR after exposure to the chemicals for 30 min (Fig. 3). This probe interacted with all thiol groups without any specificity to GSH. Thiol content was completely depleted after cell treatment with NEM, a thiol-alkylating agent, whereas BSO, an inhibitor of GSH synthesis, induced a 24% decrease in mBBR fluorescence, corresponding to GSH-dependent depletion. DNCB, thimerosal and EtHgCl but not TSA markedly

Table 1

Buthionine sulfoximide (BSO) induced U937 activation. U937 cells were untreated or treated with BSO (5 mM) for 48 h. Cell viability was assessed by PI dye exclusion, CD86 expression by flow cytometry and IL-8 release quantified by ELISA, as described in Section 2. Data are the mean of three independent experiments.

	Viability after 48 h (% of PI ⁻ cells)	CD86 (MFI ± SD)	IL-8 (pg/ml ± SD)
Untreated	94.8 ± 7.5	100 ± 9.8	364.9 ± 15.9
BSO	91.5 ± 9.4	212.3 ± 53.7*	428.4 ± 23.7

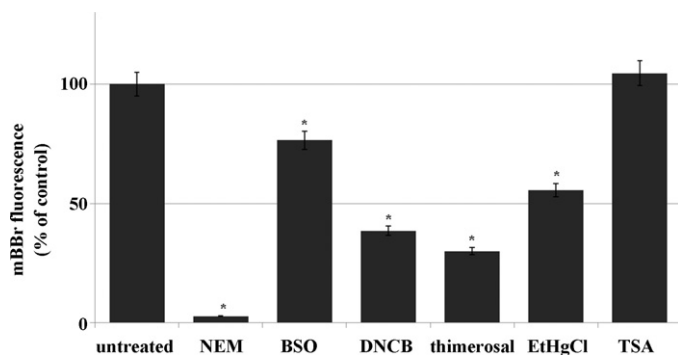


Fig. 3. Intracellular thiol content after 30 min of exposure to chemicals. Cells treated with NEM (at 1 mM), BSO (at 1 mM), DNCB (at 15 μM), thimerosal (at 5 μM), EtHgCl (at 2.5 μM) or TSA (at 15 μM) or untreated cells (control) were incubated with the fluorescent dye mBBR and the level of thiol was analysed by flow cytometry. Thiol content was expressed as a percentage of the control (MFI of treated cells compared with MFI of untreated cells normalized to 100%). Data are the mean of three independent experiments.

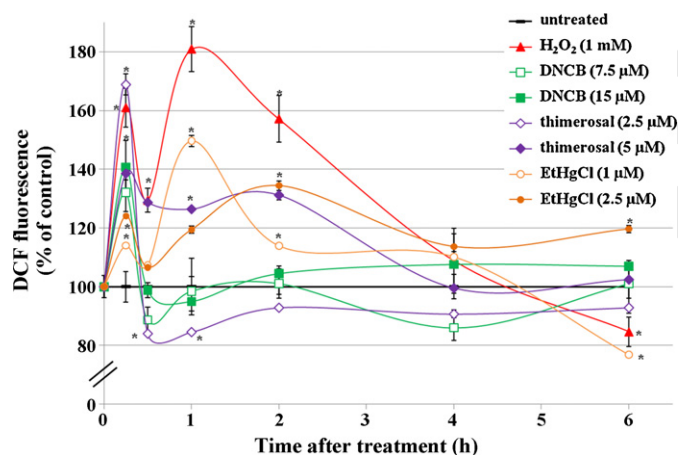


Fig. 4. Mercury compounds and DNCB induced ROS production assessed by H₂DCFDA. Cells were loaded with H₂DCFDA prior to treatments with H₂O₂, DNCB, thimerosal or EtHgCl for the indicated time (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h and 6 h). ROS induction, assessed by flow cytometry, was expressed as a percentage of the control (MFI of treated cells compared with MFI of untreated cells normalized to 100%). Data are the mean of three independent experiments.

decreased mBBR fluorescence. It should be noted that BSO also induced CD86 overexpression and, to a lesser extent, IL-8 secretion (Table 1) without affecting U937 cell viability.

3.4. Mercury compounds and DNCB induced intracellular ROS

Intracellular ROS were assessed by the oxidation-sensitive fluorescent probe H₂DCFDA in a dose- and time-response experiment. ROS were analysed only on PI-negative cells selected by flow cytometry. ROS were induced within 15 min by mercury compounds, DNCB and H₂O₂, used as a positive control. All of these chemicals induced ROS in a dose-dependent manner except thimerosal at 15 min which at 2.5 μM induced more ROS than at 5 μM ([revised] Fig. 4). Another peak was detected after 1 h in H₂O₂-treated cells, or after 1 h and 2 h in cells exposed to EtHgCl

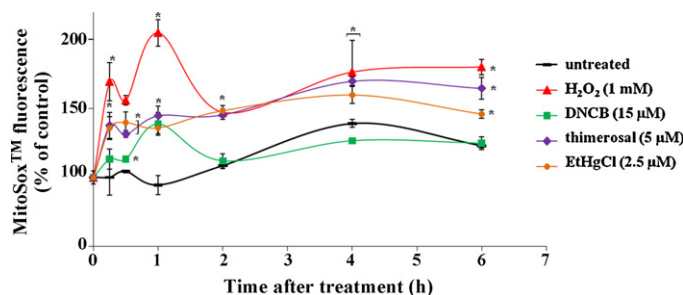


Fig. 5. Mercury compounds and DNCB induced mitochondrial superoxide generation assessed by MitoSOXTM. Untreated (control) or cells treated with H₂O₂, DNCB, thimerosal and EtHgCl were incubated for the indicated times (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h and 6 h) and then loaded with MitoSOXTM. Mitochondrial superoxide generation was expressed as a percentage of the control (MFI of treated cells compared with the MFI of untreated cells normalized to 100%). Data are the mean of three independent experiments.

at 1 μM and 2.5 μM, respectively (Fig. 4). After 24 h of exposure to chemicals, ROS were no longer detected (data not shown).

3.5. Mercury compounds and DNCB induced mitochondrial superoxide generation

MitoSOXTM, a mitochondrial targeted ROS-specific fluorescent probe, allowed the evaluation of the role of mitochondria in the production of superoxides (O₂^{•-}). Data from Fig. 5 show a significant increase in MitoSOXTM fluorescence detected 15 min after exposure to mercury compounds, DNCB and H₂O₂ in correlation with H₂DCFDA fluorescence detection. Another peak was detected 1 h after exposure to H₂O₂ and DNCB, whereas thimerosal and EtHgCl induced progressive O₂^{•-} generation. As expected, TSA, DNCB and SDS had only a slight or no effect on MitoSOXTM fluorescence (data not shown).

3.6. Mitochondrial membrane potential (ΔΨ_m)

After exposure to mercury compounds, DNCB and the uncoupler of oxidative phosphorylation, FCCP, which was used as a positive control, ΔΨ_m was decreased in a time-dependent manner within 30 min after chemical treatment (Fig. 6A). Interestingly, thimerosal induced ΔΨ_m depolarization followed 1 h later by strong hyperpolarization until 6 h. In contrast, the depolarization induced by DNCB was still detected after 6 h as was that induced by FCCP. TSA, DNCB and SDS had no effect (data not shown). In order to determine whether ROS induction and thiol oxidation explained the changes in ΔΨ_m, pretreatment with thiol-dependent or -independent antioxidants was assessed (Fig. 6B). At 30 min, the disruption of ΔΨ_m induced by mercury compounds was completely restored by NAC while vitamins E and C had no protective effect. DNCB-induced ΔΨ_m depolarization was not inhibited by either thiol-dependent or thiol-independent antioxidants, which suggests differences in the effect of DNCB and that of mercury compounds.

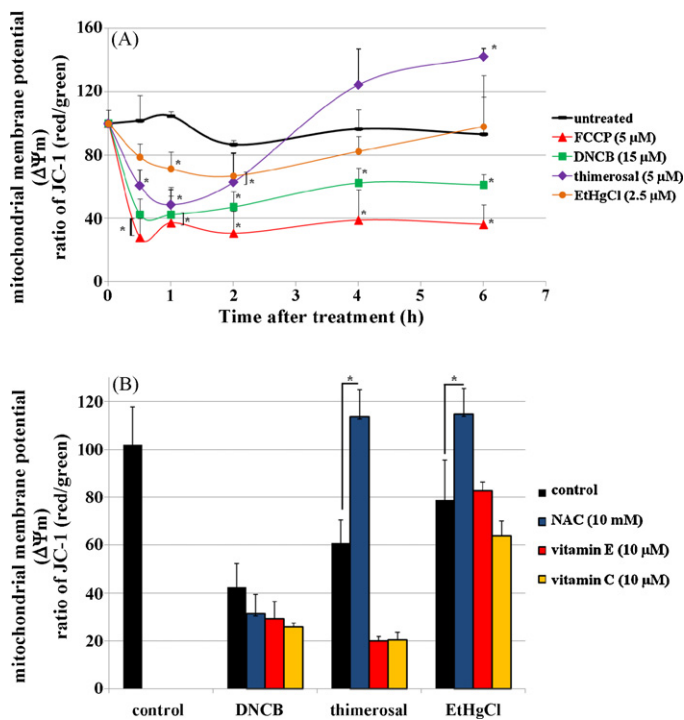


Fig. 6. Mercury compounds and DNCB induced changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). (A) Untreated (control) or cells treated with FCCP, DNCB, thimerosal and EtHgCl were incubated for the indicated times (30 min, 1 h, 2 h, 4 h and 6 h) and then exposed to the fluorescent probe, JC-1. Changes in $\Delta\Psi_m$ were measured by flow cytometry. Mean (red/green) fluorescence, expressed as a percentage of the control normalized to 100, indicated the ratio of high/low $\Delta\Psi_m$. (B) Cells were pretreated with NAC, vitamin E or vitamin C for 1 h before exposure to DNCB (at 15 μM), thimerosal (at 5 μM) and EtHgCl (at 2.5 μM). $\Delta\Psi_m$ was assessed by flow cytometry after 30 min. Data are the mean of three independent experiments. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

3.7. Mercury compounds and DNCB induced intracellular calcium increase

The calcium ionophore, ionomycin, was used as a positive control for induction of intracellular free calcium concentration (Ca^{2+}_i). Thimerosal, EtHgCl and DNCB were able to induce a transient increase in Ca^{2+}_i with a maximum at around 3 h, whereas TSA, DNCB and SDS had no effect (Fig. 7A). DNCB was the most powerful inducer of Ca^{2+}_i release with a 6.5-fold increase over the control (untreated cells) compared with thimerosal and EtHgCl (2-fold and 1.5-fold increase, respectively). These kinetic data suggest that ROS were induced before Ca^{2+} influx. After cell pretreatment with thiol-dependent and -independent antioxidants, only NAC was able to prevent the Ca^{2+} increase induced by thimerosal and EtHgCl, but not that induced by DNCB (Fig. 7B) as reported above for $\Delta\Psi_m$ depolarization.

The calcium chelator, BAPTA-AM, that was used to prevent intracellular Ca^{2+} increase, was only effective on the Ca^{2+} influx induced by DNCB (Fig. 7C). In contrast, extracellular Ca^{2+} depletion from culture medium using EGTA (Fig. 7C) markedly reduced the Ca^{2+} influx induced by DNCB (56%) and thimerosal (42%) but only weakly affected the Ca^{2+} influx induced by EtHgCl. It should be noted that calcium assessment by flow cytometry cannot monitor a rapid calcium influx induced within a few minutes which is only detectable by calcium imagery. Therefore, because U937 cells were not able to adhere to supports, this procedure was only used for assessment in DCs isolated from monocytes (data not shown).

4. Discussion

Contact allergy to metals is frequently encountered and can be the cause of significant skin sensitization. However, the in vitro effects of thimerosal and mercury derivatives (HgCl_2 , EtHgCl and MeHgCl) have essentially been reported in dental and neuronal investigations and only a few studies were carried out on DCs (Goth et al., 2006; Agrawal et al., 2007; Trompezinski et al., 2008). Because of the inter-donor variability observed with mono-DCs and $\text{CD}34^+$ -DCs (Ryan et al., 2005), these investigations were performed on U937, a human promyelomonocytic cell line considered to be a suitable model for studying monocytic differentiation and activation. This cell line is currently used by the cosmetic industry as it is easy to obtain and responds similarly to DCs (Ashikaga et al., 2006; Sakaguchi et al., 2006; Python et al., 2007).

In our study, the role of mercury compounds in the U937 activation process was compared with that of DNCB, which is classified as an extreme sensitizer and was used as a positive control for U937 activation. In this study, thimerosal and other mercury derivatives induced CD86 overexpression which is considered to be a hallmark for both DC and U937 activation (Aiba et al., 1997; Rousset et al., 2002; Ryan et al., 2005; Ade et al., 2006; Ashikaga et al., 2006; Sakaguchi et al., 2006; Python et al., 2007). However, as previously reported (Manome et al., 1999; Hulette et al., 2005; Ade et al., 2006), optimal DC and U937 activation requires that the degree of cytotoxicity be limited to 30% for data validation as reported in the h-CLAT protocol (Ashikaga et al., 2006; Sakaguchi et al., 2006). Therefore, in this study, sensitizers were only used at concentrations for which cell viability was above 70% in comparison with the untreated cells in order to avoid unspecific effects related to cytotoxicity. It should be noted that, under our experimental conditions, most of the chemicals had no effect on CD54 expression even after 48 h of exposure (data not shown) in contrast with studies performed with THP1, another human cell line frequently studied as a DC surrogate in the h-CLAT protocol (Ashikaga et al., 2006; Sakaguchi et al., 2006). In correlation with CD86 overexpression, a high level of IL-8 secretion induced by mercury compounds and DNCB was confirmed using a human Cytometric Bead Array, a multiplex inflammatory cytokine kit (from Becton Dickinson). No significant secretion of tumour necrosis factor (TNF)- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 or IL-12p70 was detected in the supernatants of any of the chemical-treated cells (data not shown).

From our studies, U937 activation was directly correlated with the presence of the mercury group; EtHgCl was found to be responsible for the allergic properties of thimerosal since TSA, the non-mercury part of thimerosal, had no effect. However, our studies performed on mono-DCs isolated from 10 donors showed that one of the donors responded to TSA and not to thimerosal (Migdal et al., in press). These in vitro studies correlated with clinical observations reported by Goncalo et al. (1996). However, as the clinical relevance of thimerosal is still under discussion (Belsito, 2002; Breithaupt and Jacob, 2008), its presence at 0.01% (247 μM) corresponding to 25 μg per dose of 0.5 ml in several types of vaccines (hepatitis B, influenza A H1N1) calls for particular attention in relation to allergic or atopic patients.

Pretreatment of U937 with the thiol compounds NAC, DTT, GSH and L-cysteine markedly reduced the CD86 overexpression and IL-8 secretion induced by sensitizers whereas other thiol-independent antioxidants such as vitamin C and aspirin had no effect. The reduction of CD86 overexpression, a membrane surface marker induced by sensitizers, by vitamin E could be mediated by its capacity to protect against lipid peroxidation of cell membranes. The protective effect of vitamin E was previously reported in mono-DCs (Tan et al., 2005) by an inhibition of surface marker expression and cytokine release induced by LPS and TNF- α . It was also able to inhibit superoxide release in the THP1 cell line (Venugopal

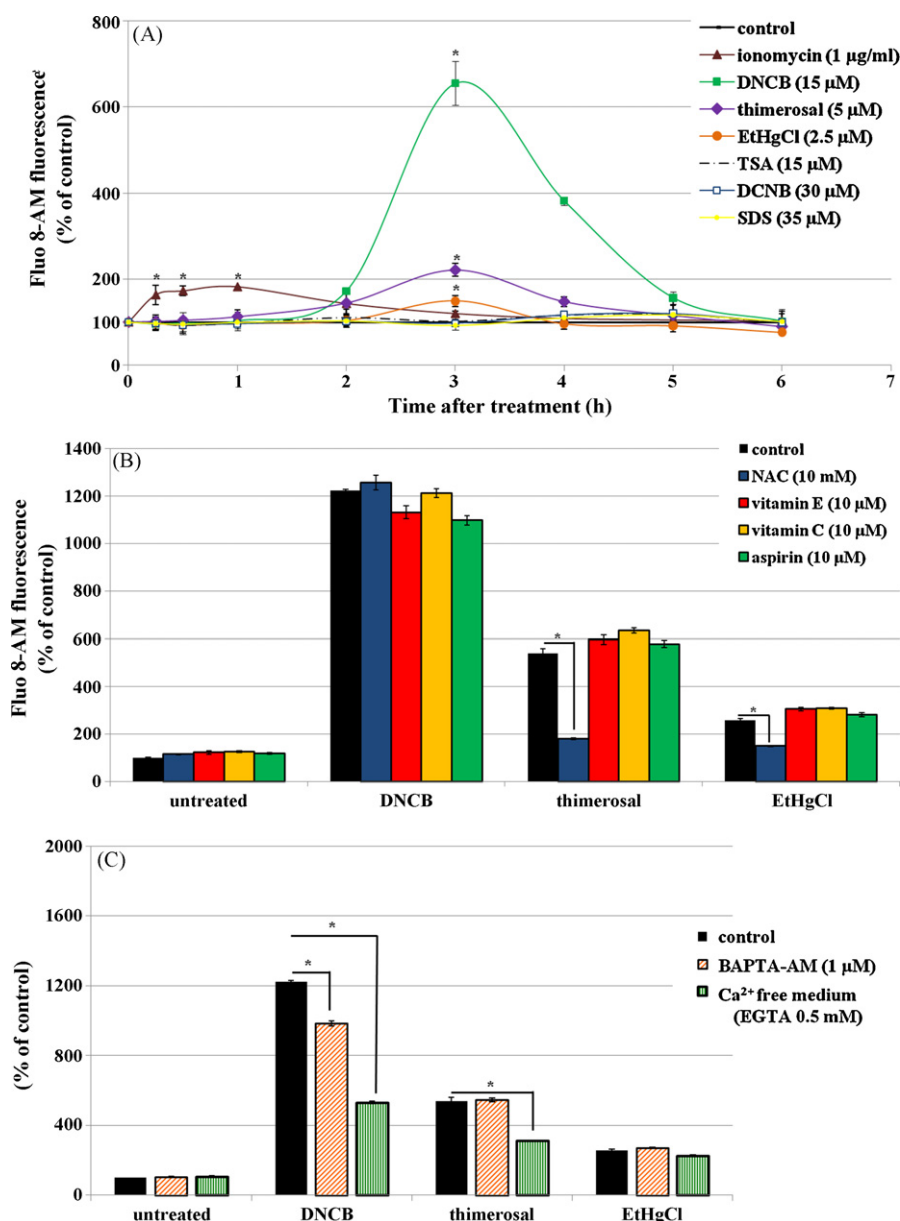


Fig. 7. Mercury compounds and DNCB increased intracellular free calcium concentration (Ca^{2+}_i).

(A) Cells were loaded with the Fluo-8TM AM probe prior to treatment with the Ca^{2+} ionophore, ionomycin, DNCB, thimerosal, EtHgCl, TSA, DCNB or SDS for the indicated time (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h and 6 h). Changes in Ca^{2+}_i were detected by flow cytometry.

(B) Cells were pretreated or not with NAC, vitamin E, vitamin C or aspirin for 1 h before exposure to DNCB (at 15 μM), thimerosal (at 5 μM) and EtHgCl (at 2.5 μM). Ca^{2+}_i was assessed after 3 h.

(C) Cells were pretreated or not with calcium chelators (BAPTA-AM or X-Vivo with EGTA at 0.5 mM) for 1 h before exposure to DNCB (at 15 μM), thimerosal (at 5 μM) and EtHgCl (at 2.5 μM). Ca^{2+}_i was assessed after 3 h. Data are expressed as a percentage of controls (MFI of treated cells compared with the MFI of untreated cells normalized to 100).

et al., 2002) and to protect cells against metal-induced toxicity (Mattie and Freedman, 2001). Despite its antioxidant properties, vitamin E was reported to affect cellular activation through signaling cascades that implicate the activities of protein kinase C (Venugopal et al., 2002) and p38 mitogen-activated protein kinase (Tan et al., 2005) but failed to inhibit tyrosine phosphorylation induced by the strong contact sensitizer methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone (Bruchhausen et al., 2003).

Reduced GSH and thiol groups are potent antioxidants that protect cells from oxidative stress. The depletion of intracellular thiol content, as detected with the mBBR fluorescent probe, was induced by thimerosal, EtHgCl and DNCB. However, using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, specific GSH depletion was detected after exposure to DNCB but not

to thimerosal, which suggests that GSH depletion mediated by thimerosal is less effective and is in competition with thiol groups included in the thimerosal structure (Elferink, 1999). Redox GSH (GSH/GSSG) imbalance has been shown to play a central role in the DC activation process (Mizuashi et al., 2005). This imbalance is a key event in DC maturation and is involved in the up-regulation of cell surface molecules in lipopolysaccharide-stimulated DCs (Yamada et al., 2006). Moreover, BSO, a potent inhibitor of γ -glutamyl-cysteine synthetase, which is a rate-limiting step in GSH synthesis, also induced CD86 overexpression, which also suggests that the GSH/GSSG ratio plays a role in U937 activation. The GSH/GSSG balance is dependent on the activity of glutathione S-transferase (GST), and it would be interesting to determine whether this enzymatic activity is modulated by mercury compounds. A genetic polymor-

phism of GST was reported by Lutz et al. (2001), which suggests that this enzyme could be a potential factor that predisposes to allergic dermatitis.

To identify better the mechanisms by which chemicals induced ROS, several specific fluorescent probes were assessed for the measurement of ROS production in the cytoplasm or, specifically, in mitochondrial compartments. Our data show that, at concentrations that induce U937 activation, H₂O₂ (used as a positive control), DNCB and mercury compounds induced ROS in the cytoplasm and, more specifically, in the mitochondrial compartment (MitoSOXTM probe). Dose–response experiments showed that, even at a low concentration (1 μM), thimerosal, which did not induce cytotoxicity (data not shown), was able to induce ROS without inducing CD86 overexpression. Altogether, these data demonstrate that ROS induced by chemicals are specific and do not correlate with a cytotoxic effect. As expected, TSA, DCNB and SDS did not have any effect. These data were confirmed with the dihydroethidium probe whereas rhodamine 123 had no significant effect (data not shown) as previously reported (Salvioli et al., 1997).

An inter-relationship between ROS production and changes in ΔΨ_m has previously been reported (InSug et al., 1997). Under our experimental conditions, the cationic carbocyanine dye, JC-1, allowed assessment of ΔΨ_m but DiOC₆ did not (data not shown) as also reported by Salvioli et al. (1997). Furthermore, mercury compounds induced a rapid depolarization of ΔΨ_m with two biphasic changes in thimerosal-treated cells. Pretreatment with NAC but not with thiol-independent antioxidants prevented the loss of ΔΨ_m.

It is probable that U937 activation is mediated by cysteine oxidation or by a direct coupling of sensitizers to thiol groups, as has already been described for mono-DCs (Becker et al., 2003). Moreover, thiol groups, and in particular cysteine residues included in signaling proteins such as mitogen-activated protein kinases or transcription factors, are sensitive to oxidation which leads to conformational changes and results in intracellular signaling. The essential role of thiol groups in DC maturation has been widely reported (Becker et al., 2003; Kantengwa et al., 2003; Hirota et al., 2009; Suzuki et al., 2009; Kagatani et al., 2010).

Recent studies showed that the activation of mono-DCs or the THP-1 cell line is controlled by the Nrf2 pathway (Ade et al., 2009). In other cell lines, the IL-8 gene was reported to be regulated by oxidative stress and controlled by Nrf2 (Zhang et al., 2005). The predominant role of Nrf2 in biology and antioxidant response has been well documented in a special issue of Toxicology and Applied Pharmacology, particularly in a review reported by Zhang et al. (2010). Therefore, the potential role of the Nrf2 pathway should be determined and could be an interesting tool to evaluate the sensitization potential of chemicals (Natsch and Emter, 2008) as also reported in a recent review (Natsch, 2010).

Because ROS signaling was correlated with calcium which plays a key role in immune cell function (for review, see Vig and Kinet, 2009), the potency of thimerosal to induce a calcium influx in U937 was investigated. Data show that thimerosal-induced Ca²⁺ influx was blocked by NAC, suggesting that Ca²⁺ influx is a secondary event initiated by ROS. It was induced by mercury compounds and reversed by depleting the culture medium with EGTA but not with BAPTA-AM, which was effective for DNCB. These data suggest that extracellular calcium plays a key role in Ca²⁺ influx induced by mercury compounds. The cell stores responsible for calcium influx can be identified using specific calcium channel inhibitors or activators (Bultynick et al., 2004; Vukcevic et al., 2008) and Rhod-2 AM, a calcium probe specific for mitochondria. It should be noted that Ca²⁺ influx detected with Fluo-8TM AM is relative to Ca²⁺ but not to Zn²⁺ as no influx was detected with a FluoZinTM-1, AM probe from Molecular Probes (data not shown) (Haase et al., 2009).

To conclude, these studies allow better identification of the early events that initiate U937 activation and demonstrate that the

redox status of chemicals and the presence of thiol groups could be of great interest in discriminating between sensitizers and non-sensitizers or irritants. Moreover, induction of ROS in association with thiol depletion and changes in the ΔΨ_m induced by sensitizers may be suitable tools in addition to other assays for predicting skin sensitization. All of these events were prevented by NAC, a thiol-dependent antioxidant, which demonstrates that thiol groups play a direct role in DC activation and in calcium influx initiated by thiol-dependent oxidation. These data highlight the great interest in the development of a hapten–protein binding assay based on thiol groups for chemical screening (Gerberick et al., 2004). More generally, a better understanding of the role of cell metabolism, which is under investigation in several laboratories, will be essential to study the potential of in vitro assays to predict skin sensitization.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

These studies were supported by LVMH Research. We are particularly grateful to Drs. J.P. Steghens, K. Arab and A. Rossary and all the technical assistants of the Laboratory of Biochemistry for their technical advice on oxidative stress studies. We are particularly indebted to Jane Mitchell for editing this manuscript.

References

- Ade, N., Martinuzzi-Teissier, S., Pallardy, M., Rousset, F., 2006. Activation of U937 by contact sensitizers: CD86 expression is independent of apoptosis. *J. Immunotoxicol.* 3, 1–9.
- Ade, N., Leon, F., Pallardy, M., Peiffer, J.L., Kerdine-Romer, S., Tissier, M.H., Bonnet, P.A., Fabre, I., Ourlin, J.C., 2009. HMOX1 and NQO1 genes are upregulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: role of the Keap1/Nrf2 pathway. *Toxicol. Sci.* 107, 451–460.
- Agrawal, A., Kaushal, P., Agrawal, S., Gollapudi, S., Gupta, S., 2007. Thimerosal induces TH2 responses via influencing cytokine secretion by human dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 81, 474–482.
- Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., Tagami, H., 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.* 27, 3018–3031.
- Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Toyoda, H., 2006. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767–773.
- Becker, D., Valk, E., Zahn, S., Brand, P., Knop, J., 2003. Coupling of contact sensitizers to thiol groups is a key event for the activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 120, 233–238.
- Belsito, D.V., 2002. Thimerosal: contact (non) allergen of the year. *Am. J. Contact Dermat.* 13, 1–2.
- Breithaupt, A., Jacob, S.E., 2008. Thimerosal and the relevance of patch-test reactions in children. *Dermatitis* 19, 275–277.
- Bruchhausen, S., Zahn, S., Valk, E., Knop, J., Becker, D., 2003. Thiol antioxidants block the activation of antigen-presenting cells by contact sensitizers. *J. Invest. Dermatol.* 121, 1039–1044.
- Bultynick, G., Szlufcik, K., Kasri, N.N., Assefa, Z., Callewaert, G., Missiaen, L., Parys, J.B., De Smedt, H., 2004. Thimerosal stimulates Ca²⁺ flux through inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1, but not type 3, via modulation of an isoform-specific Ca²⁺-dependent intramolecular interaction. *Biochem. J.* 381, 87–96.
- Clarkson, T.W., Magos, L., 2006. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 609–662.
- Del Prete, A., Zaccagnino, P., Di Paola, M., Saltarella, M., Oliveros Celis, C., Nico, B., Santoro, G., Lorusso, M., 2008. Role of mitochondria and reactive oxygen species in dendritic cell differentiation and functions. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1443–1451.
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.
- Elferink, J.G.R., 1999. Thimerosal: a versatile sulfhydryl reagent, calcium mobilizer, and cell function-modulating agent. *Gen. Pharmacol.* 33, 1–6.
- Fuchs, J., Zollner, T.M., Kaufmann, R., Podda, M., 2001. Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 337–353.
- Geier, D.A., Sykes, L.K., Geier, M.R., 2007. A review of thimerosal (merthiolate) and its ethylmercury breakdown product: specific historical considerations regarding safety and effectiveness. *J. Toxicol. Environ. Health B: Crit. Rev.* 10, 575–596.
- Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Bailey, R.E., Chaney, J.G., Morrall, S.W., Lepoittevin, J.P., 2004. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol. Sci.* 81, 332–343.

- 572 Goncalo, M., Figueiredo, A., Goncalo, S., 1996. Hypersensitivity to thimerosal: the
573 sensitizing moiety. *Contact Dermatitis* 34, 201–203.
- 574 Goth, S.R., Chu, R.A., Gregg, J.P., Cherednichenko, G., Pessah, I.N., 2006. Uncoupling
575 of ATP-mediated calcium signaling and dysregulated interleukin-6 secretion
576 in dendritic cells by nanomolar thimerosal. *Environ. Health Perspect.* 114,
577 1083–1091.
- 578 Haase, H., Hebel, S., Engelhardt, G., Rink, L., 2009. Zinc ions cause the thimerosal-
579 induced signal of fluorescent calcium probes in lymphocytes. *Cell Calcium* 45,
580 185–191.
- 581 Hedley, D.W., Chow, S., 1994. Evaluation of methods for measuring cellular glu-
582 thathione content using flow cytometry. *Cytometry* 15, 349–358.
- 583 Hirota, M., Suzuki, M., Hagino, S., Kagatani, S., Sasaki, Y., Aiba, S., Itagaki, H., 2009.
584 Modification of cell-surface thiols elicits activation of human monocyte cell line
585 THP-1: possible involvement in effect of haptens 2,4-dinitrochlorobenzene and
586 nickel sulfate. *J. Toxicol. Sci.* 34, 139–150.
- 587 Hulet, B.A., Ryan, C.A., Gildea, L.A., Gerberick, G.F., 2005. Relationship of CD86 sur-
588 face marker expression and cytotoxicity on dendritic cells exposed to chemical
589 allergen. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 209, 159–166.
- 590 InSug, O., Datar, S., Koch, C.J., Shapiro, I.M., Shenker, B.J., 1997. Mercuric compounds
591 inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: evidence for formation
592 of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane perme-
593 ability transition and loss of reductive reserve. *Toxicology* 124, 211–224.
- 594 Kagatani, S., Sasaki, Y., Hirota, M., Mizuashi, M., Suzuki, M., Ohtani, T., Itagaki, H., Aiba,
595 S., 2010. Oxidation of cell surface thiol groups by contact sensitizers triggers the
596 maturation of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 130, 175–183.
- 597 Kantengwa, S., Jornot, L., Devenoges, C., Nicod, L.P., 2003. Superoxide anions induce
598 the maturation of human dendritic cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167,
599 431–437.
- 600 Lutz, W., Tarkowski, M., Nowakowska, E., 2001. Genetic polymorphism of glu-
601 thathione S-transferase as a factor predisposing to allergic dermatitis. *Med. Prac.*
602 52, 45–51.
- 603 Manome, H., Aiba, S., Tagami, H., 1999. Simple chemicals can induce maturation and
604 apoptosis of dendritic cells. *Immunology* 98, 481–490.
- 605 Mattie, M.D., Freedman, J.H., 2001. Protective effects of aspirin and vitamin E (alpha-
606 tocopherol) against copper- and cadmium-induced toxicity. *Biochem. Biophys.*
607 *Res. Commun.* 285, 921–925.
- 608 Q1 Migdal, C., Tailhardat, M., Courtellemont, P., Haftek, M., Serres, M., in press. Respon-
609 siveness of human monocyte-derived dendritic cells to thimerosal and mercury
610 derivatives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*
- 611 Mizuashi, M., Ohtani, T., Nakagawa, S., Aiba, S., 2005. Redox imbalance induced by
612 contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.*
613 124, 579–586.
- 614 Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Yoshihiro, K., Hasko, G., Pacher, P., 2007. Simple quan-
615 titative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem.*
616 *Biophys. Res. Commun.* 358, 203–208.
- 617 Natsch, A., Emter, R., 2008. Skin sensitizers induce antioxidant response element
618 dependent genes: application to the in vitro testing of the sensitization potential
619 of chemicals. *Toxicol. Sci.* 102, 110–119.
- 620 Natsch, A., 2010. The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin
621 sensitizers—functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin
622 sensitizers. *Toxicol. Sci.* 113, 284–292.
- 623 Python, F., Goebel, C., Aeby, P., 2007. Assessment of the U937 cell line for the detec-
624 tion of contact allergens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220, 113–124.
- 625 Rousset, F., Verda, D., Garrigue, J.L., Mariani, M., Leclaire, J., 2002. In vitro prediction
626 of contact sensitivity with human cell lines. *Contact Dermatitis* 46 (s4), 6.
- 627 Royall, J.A., Ischiropoulos, H., 1993. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihy-
628 drochlorodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured
629 endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 302, 348–355.
- 630 Rutault, K., Alderman, C., Chain, B.M., Katz, D.R., 1999. Reactive oxygen species acti-
631 vate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 232–238.
- 632 Ryan, C.A., Gerberick, G.F., Gildea, L.A., Hulet, B.C., Betts, C.J., Cumberbatch, M.,
633 Dearman, R.J., Kimber, I., 2005. Interactions of contact allergens with dendritic
634 cells: opportunities and challenges for the development of novel approaches to
635 hazard assessment. *Toxicol. Sci.* 88, 4–11.
- 636 Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota,
637 M., Itagaki, H., Toyoda, H., Suzuki, H., 2006. Development of an in vitro skin
638 sensitization test using human cell lines; human cell line activation test (h-CLAT)
639 II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol. In Vitro* 20, 774–784.
- 640 Salvio, S., Ardizzone, A., Franceschi, C., Cossarizza, A., 1997. JC-1, but not DiOC₆(3)
641 or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\Psi$ changes in intact
642 cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis.
643 *FEBS Lett.* 411, 77–82.
- 644 Suneja, T., Belsito, D.V., 2001. Thimerosal in the detection of clinically relevant aller-
645 gic contact reactions. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45, 23–27.
- 646 Suzuki, M., Hirota, M., Hagino, S., Itagaki, H., Aiba, S., 2009. Evaluation of changes of
647 cell-surface thiols as a new biomarker for in vitro sensitization test. *Toxicol. In*
648 *Vitro* 23, 687–696.
- 649 Tan, P.H., Sagoo, P., Chan, C., Yates, J.B., Campbell, J., Beutelspacher, S.C., Foxwell, B.M.,
650 Lombardi, G., George, A.J., 2005. Inhibition of NF-kappa B and oxidative pathways
651 in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells.
652 *J. Immunol.* 174, 7633–7644.
- 653 Trompezinski, S., Migdal, C., Tailhardat, M., Le Varlet, B., Courtellemont, P., Haftek,
654 M., Serres, M., 2008. Characterization of early events involved in human den-
655 dritic cell maturation induced by sensitizers: cross talk between MAPK signaling
656 pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 230, 397–406.
- 657 Venugopal, S.K., Devaraj, S., Yang, T., Jialal, I., 2002. Alpha-tocopherol decreases
658 superoxide anion release in human monocytes under hyperglycemic conditions
659 via inhibition of protein kinase C-alpha. *Diabetes* 51, 3049–3054.
- 660 Vig, M., Kinet, J.P., 2009. Calcium signaling in immune cells. *Nat. Immunol.* 10, 21–27.
- 661 Vukcevic, M., Spagnoli, G.C., Iezzi, G., Zorzato, F., Treves, S., 2008. Ryanodine recep-
662 tor activation by Ca v 1.2 is involved in dendritic cell major histocompatibility
663 complex class II surface expression. *J. Biol. Chem.* 283, 34913–34922.
- 664 Yamada, H., Arai, T., Endo, N., Yamashita, K., Fukuda, K., Sasada, M., Uchiyama, T.,
665 2006. LPS-induced ROS generation and changes in glutathione level and their
666 relation to the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Life Sci.*
667 78, 926–933.
- 668 Zhang, X., Chen, X., Song, H., Chen, H., Rovin, B., 2005. Activation of the
669 Nrf2/antioxidant response pathway increases IL-8 expression. *Eur. J. Immunol.*
670 35, 3258–3267.
- 671 Zhang, Q., Pi, J., Woods, C.G., Andersen, M.E., 2010. A systems biology perspective on
672 Nrf2-mediated antioxidant response. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244, 84–97.

ARTICLE 3

U937 apoptosis induced by sensitizers is independent of CD86 expression and is elicited by mitochondrial ROS pathway: Protecting effect of thiol-containing antioxidants.

Migdal C, Tailhardat M, Courtellemont P, Haftek M, Serres M.

➤ En révision pour *Toxicology Letters*.

Plusieurs auteurs ont noté que l'augmentation de l'expression du CD86 induite par les allergènes est corrélée à une diminution de la viabilité cellulaire ou, sous un autre point de vue, que les allergènes doivent être testés à des concentrations légèrement toxiques afin d'induire l'expression du CD86.

Au vu de ces données et afin de poursuivre la caractérisation des effets des composés mercuriques (thimerosal et EtHgCl) et du DNCB sur le modèle de lignée cellulaire U937, le but de ce travail a été de déterminer les mécanismes de mort cellulaire induits par ces molécules chimiques et chercher à comprendre le rôle du stress oxydant et du calcium dans ces mécanismes apoptotiques.

Les résultats montrent que les composés mercuriques et le DNCB induisent la mort des U937 par apoptose associée à l'activation des caspases 3 et 7. L'induction de l'apoptose et des caspases est dépendante de l'induction d'ERO, démontré en prétraitant les U937 par des antioxydants, et de la voie p38 MAPK, mis en évidence en prétraitant les U937 par son inhibiteur, SB283580. Comme pour l'induction de l'activation (article 2), l'apoptose est sous le contrôle de mécanismes dépendants de l'oxydation des groupements thiols.

L'apoptose est un mécanisme régulé par deux principales voies d'activation, différentes mais interconnectées : la voie extrinsèque qui dépend de l'activation de récepteurs membranaires par des ligands spécifiques et la voie intrinsèque activée en réponse à un « stress » cellulaire. La voie intrinsèque ou mitochondriale passe par la génération d'ERO et la modulation de l'activité de certaines caspases. De plus, la mitochondrie joue un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie calcique. Le calcium, qui régule aussi bien la vie que la mort cellulaire, est capté et séquestré par la mitochondrie, jouant ainsi un rôle de tampon calcique. Dans ce travail, la production d'ERO et l'influx calcique induits par les composés mercuriques et le DNCB ont été détectés par des sondes spécifiques du compartiment mitochondriale, supportant l'hypothèse de l'implication de la mitochondrie dans l'apoptose détectée en réponse aux composés mercuriques et au DNCB.

D'autre part, l'expression du CD86 induite par les composés mercuriques et le DNCB est indépendante de l'augmentation de l'apoptose. En effet, en inhibant l'apoptose à l'aide du peptide

anti-apoptotiques BID, ou à l'inverse, en l'induisant avec l'agent non peptidique HA1A-1 qui inactive Bcl2/Bcl-X_L, l'expression du CD86 induite par ces composés n'est pas altérée.

Ce travail éclaire les mécanismes impliqués dans l'apoptose induite par le thimerosal et le DNCB et, en s'appuyant sur d'autres, montre que la détection de l'augmentation du marqueur CD86 en réponse aux allergènes n'est pas biaisé par l'induction concomitante d'apoptose.

U937 apoptosis induced by sensitizers is independent of CD86 expression and is elicited by mitochondrial ROS pathway: Protecting effect of thiol-containing antioxidants.

Camille Migdal^{*}, Magalie Tailhardat[†], Pascal Courtellemont[†], Marek Haftek^{*} and Mireille Serres^{*}

^{*}EA 41-69, Université Lyon 1, Pavillon R, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France; [†]LVMH Recherche, St Jean de Braye, France.

Corresponding author: Dr. Mireille SERRES, mireille.serres@univ-lyon1.fr

Address: Hôpital Edouard Herriot, Pavillon R, 69437 Lyon Cedex 03, France

Telephone: (33) 4 72 11 02 88; Fax: (33) 4 72 11 02 90

Abstract

The prediction of sensitizer potential of chemicals is based *in vitro* upon changes in dendritic cell (DCs) marker expression, mainly CD86. Although CD86 overexpression was often correlated with cytotoxicity, the mechanisms implicated in DC apoptosis were poorly studied. Presently, thimerosal and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB) effects were investigated in mono-DCs and U937. In contact with sensitizers, CD86 was induced in both cell models. In U937, sensitizers induced apoptosis and caspase 3 and 7 activation *via* mitochondrial ROS. These processes were prevented only by thiol antioxidants, N-acetyl-L-cysteine (NAC), D, L-dithiothreitol (DTT) and glutathione (GSH) but not by vitamin E showing a specific role of thiol groups in apoptosis and activation of caspase 3 and 7 induced by sensitizers. Sensitizer-induced apoptosis was decreased by SB203580 (p38 MAPK inhibitor). In parallel, sensitizers induced mitochondrial calcium (Ca^{2+}_m) influx. NAC pretreatment abolished Ca^{2+}_m influx, while BAPTA-AM and EGTA (Ca^{2+} chelators) were ineffective on ROS indicating that mitochondrial ROS induced by sensitizers was upstream Ca^{2+}_m influx. Using specific inhibitor and inductor of apoptosis, our data demonstrate that U937 apoptosis induced by sensitizers was independent of CD86 overexpression.

Keywords: mono-DCs, U937, thiol antioxidants, reactive oxygen species, calcium, apoptosis, caspases.

1. Introduction¹

Dendritic cells (DCs) display a crucial role in the initiation of contact hypersensitivity to chemicals. After contact to sensitizers, DCs acquire a mature phenotype characterized by an increase of HLA-DR, CD83, CD54 and CD86 phenotypic markers and the secretion of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-8 and TNF α). *In vitro* studies reported that immature DCs generated from human monocytes (mono-DCs) acquire a mature phenotype after 48 h exposure to sensitizers such as 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB) and nickel sulfide (NiSO₄) whereas non-sensitizers or irritant, sodium dodecyl sulfate (SDS) had no significant effect (Aiba et al., 1997; Guironnet et al., 2000; Tuschl et al., 2000; Hulette et al., 2002; 2005). From these data, the prediction of chemical sensitizer potential based upon changes in the expression of DC surface markers was proposed but since the response of mono-DCs to sensitizers is donor-dependent (Ryan et al., 2005), U937, a promyelomonocytic human cell line, is currently considered as a suitable model for studying monocytic differentiation and activation (Rousset et al., 2002; Sakaguchi et al., 2006; Python et al., 2007). As U937 respond similarly as DCs towards major of sensitizers versus non-sensitizers and irritants (Sakaguchi et al., 2006; Python et al., 2007), these cells were presently under validation by the ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) for discriminating allergenic potency of chemicals.

Among all phenotypic changes induced by sensitizers, CD86 overexpression was reported as a hallmark for both DC and U937 activation and was often associated with slight to moderate cytotoxicity (Manome et al., 1999; Hulette et al., 2005; Straube et al., 2005; Sakaguchi et al., 2006; Ade et al. 2006), even correlated with the induction of apoptosis in mono-DCs (Manome et al., 1999) or U937 cells (Ade et al., 2006). However, the general mechanism of apoptosis process induced by sensitizers required to be more identified. The link between apoptosis and DC activation was discussed.

Apoptosis, or programmed cell death, is characterized by morphological and biochemical modifications including loss of membrane asymmetry and attachment, cell shrinkage, nuclear fragmentation, chromatin condensation and DNA fragmentation. Apoptosis can be triggered by many different stimuli involving three major signaling pathways including death receptors, mediated by endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria. In mitochondria, Bcl-2 family proteins directly control mitochondrial permeability and regulate the release of apoptotic proteins from the inter-membrane space to the cytoplasm. These proteins were classified into two subfamilies which have opposite effect on apoptosis regulation: Bcl-2, Bcl-XL and Bcl-w subfamily was related to cell survival, whereas Bax, Bid and Bak subfamily was related to cell death (Tsujimoto, 2002). In addition to the release of lethal proteins from the mitochondria, a key initiative step in apoptosis mediated by mitochondria is the generation and release of reactive oxygen species (ROS). They are implicated in a wide variety of

physiological and pathological processes where they regulate several cellular metabolic processes by activation of various signaling cascades such as stress-activated protein kinases (SAPKs) as well as several transcriptional factors (for a review, Dröge, 2002). Mitochondrial ROS are one of the very early events initiating apoptosis (Kroemer et al., 2007).

In addition to ROS production, mitochondria play a crucial role in the regulation of intracellular calcium (Ca^{2+}) homeostasis, a key regulator of not only cell survival but also cell death in response to a variety of cellular signals (Giacomello et al., 2007). Mitochondrial Ca^{2+} uptake induces drastic changes in mitochondria morphology and functional activity owing to the opening of a nonspecific pore in its inner membrane. Therefore, oxidative stress and impaired Ca^{2+} homeostasis contribute both to mitochondria-mediated cellular damages (Kowaltowski et al., 1996).

The purpose of this study was to identify more accurately the mechanisms by which sensitizers induced apoptosis. To achieve this goal, the role of sensitizers in mitochondrial oxidative stress and Ca^{2+} influx induction were studied. Because ROS are involved in DC activation (Rutault et al., 1999; Becker et al., 2003; Bruchausen et al., 2003; Mizuashi et al., 2005; Trompezinski et al., 2008), the specific role of thiol-containing antioxidants versus non-thiol antioxidants on apoptosis process induced by sensitizers was precised. These studies were performed on mono-DCs and U937 cell line using thimerosal and its metabolites, ethyl mercury (EtHgCl) and thiosalicylic acid (TSA) and DNCB as a sensitizer positive control. Thimerosal is frequently found in topical antiseptic solutions and ointments due to its antimicrobial properties. Thimerosal, named also merthiolate or thiomersal in clinical assays is widely used as a preservative in several types of vaccines such as influenza A (H1N1), acellular pertussis and diphtheria and tetanus toxoids. It is also found in ophthalmic products and cosmetics (for a review, see Geier et al., 2007). Although several cases of cutaneous reactions and skin sensitization were reported in atopic children (Zenarola et al., 1995; Goncalo et al., 1996; Patrizi et al., 1999; Suneja and Belsito, 2001) and its classification as the second most common allergen after nickel (Wattanakrai and Rajatanavin, 2007), the effect of thimerosal and its metabolites on DCs required to be more accurately investigated.

¹Abbreviations

DC: dendritic cells; mono-DCs: monocytes-derived dendritic cell; ROS: reactive oxygen species.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and reagents

Hydrogen peroxide (H_2O_2), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB), thimerosal, ethyl mercury chloride (EtHgCl), thiosalicylic acid (TSA), dichloronitrobenzene (DCNB), sodium dodecyl sulfate

(SDS), N-acetyl-L-cysteine (NAC), D,L-dithiothreitol (DTT), glutathione (GSH), α -tocopherol (vitamin E), ionomycin, 1,2-bis-(o-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester (BAPTA-AM) and ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) were all purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). HA14-1 (ethyl 2-amino-6-bromo-4-(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethyl)-4H-chromene-3-carboxylate) and BIP (Bax-Inhibiting Peptide, V5) were from Calbiochem (Meudon, France).

2.2. Cell cultures

- Generation of DCs from monocytes.

DCs were generated *in vitro* from human monocytes purified from heparinized peripheral blood of healthy donors. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by centrifugation on Lymphoprep™ (Abcys, Paris, France) as previously described (Gironnet et al., 2000). Monocytes were further isolated by magnetic positive selection using CD14 microbeads separated with a magnetic cell separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The resulting suspension routinely contained more than 80% of CD14⁺ cells. Mono-DCs were generated from monocytes after culture for 5 days in six-well tissue culture plates (10⁶ cells/ml) in RPMI 1640 medium with Glutamax™, 25 mM HEPES and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (Abcys) and recombinant human cytokines such as granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) at 500 units/ml (Immunotools, Friesoythe, Germany) and interleukin (IL)-4 at 50 units/ml (R&D System, Lille, France). Mono-DCs were generated from five different healthy donors and only preparations that contained more than 80% of CD1a-positive cells (a specific marker of immature DCs) were selected.

- U937 cell line.

The human monocytic cell line U937 was grown in RPMI 1640 medium with Glutamax™ and 25 mM HEPES (Invitrogen), supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (Abcys) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen), at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ as described previously (Sakaguchi et al., 2006; Python et al., 2007).

2.3. Cell treatment with chemicals

For all treatment with chemicals, immature mono-DCs obtained at day 5 and U937 cells were cultured in X-Vivo serum-free medium (Cambrex, Belgium), supplemented for mono-DCs with cytokines, GM-CSF (500 units/ml) and IL-4 (50 units/ml). Thimerosal and SDS were dissolved in culture medium, DNCB and DCNB (a negative control) in DMSO (final concentration at 0.04 %) and

TSA and EtHgCl in ethanol (final concentration at 0.1 %). All these solvents were checked as negative controls.

Cells were exposed to DNCB (15 μM and 30 μM), thimerosal (5 μM and 7.5 μM), EtHgCl (2.5 μM), TSA (15 μM), DCNB (30 μM) or SDS (35 μM). H_2O_2 (1 mM) was used as a positive control for the induction of ROS and ionomycin (1 $\mu\text{g/ml}$) as a positive control for the induction of calcium influx. Briefly, cells were seeded at 10^6 cells/ml and treated with chemicals for 15 min to 48 h. After 1 h of treatment with H_2O_2 , DNCB and mercury compounds (thimerosal and EtHgCl), cells were rinsed in phosphate buffered saline (PBS) and X-Vivo medium was added.

In some experiments, cells were pre-incubated for 1 h with thiol-containing antioxidants, NAC (at 10 mM), DTT (at 50 μM), GSH (at 10 mM), or non thiol containing antioxidants, vitamin E (at 10 μM), and then treated for 1 h with chemicals, rinsed in PBS and re-suspended in X-Vivo medium supplemented with these compounds at the same concentration. After different times of treatment, cells were harvested and specific stainings were performed.

2.4. Determination of CD86 expression

CD86 expression was detected by flow cytometry using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Pont de Claix, France). For this purpose, treated cells were harvested and incubated for 30 min at 4°C with the monoclonal antibody fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human CD86 (clone Fun-1) from BD-Pharmingen (Pont de Claix, France) or its corresponding isotype control FITC-labeled mouse IgG1 from Beckman Coulter (Villepinte, France). After incubation, cells were washed at 4°C in PBS containing 1% bovine serum albumin and fixed with 1% formaldehyde in PBS. Samples were stored at 4°C in the dark until analysis. For each sample, 10,000 and 5,000 cells were acquired respectively for U937 and mono-DCs on a gated homogenous population of cells (cell debris were gated out) and analysed using CellQuestTM software (Becton Dickinson). The Mean Fluorescence Intensity (MFI) induced by each chemical was determined according to the IgG1 isotype control as previously described (Python et al., 2007). MFI of each chemical, corresponding to CD86 expression, was calculated as follows: MFI of treated cells compared with MFI of untreated cells (normalized to 100%).

2.5. Detection of apoptosis by Annexin V-PI double staining

Cell viability was assessed using propidium iodide (PI) dye exclusion and viable cells were analysed as annexin V/PI. Briefly, treated cells were washed once in cold PBS, stained with 12.5 $\mu\text{g/ml}$ PI and analysed using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) using the FL3-H

wavelength band. Data are collected from 10,000 cells for U937 and 5,000 mono-DCs and analysed using Cell Quest Pro software (Becton Dickinson).

Cell apoptosis was assessed using Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Immunotech, Beckman Coulter, France) according to the manufacture's protocol. Briefly, treated cells were harvested, rinsed once in cold PBS, re-suspended in Annexin V-binding buffer, and then labeling with 5 μ l of Annexin V (dilution 1/5) and 5 μ l PI for 10 min. Cells incubated with 3% formaldehyde-containing PBS for 30 min were used as a positive control. Unlabeled cells, annexin V-FITC-stained cells (FL1-H wavelength band) and PI-stained cells (FL2-H wavelength band) were run first to optimize the settings. Then, cells (10,000 and 5,000 cells, for respectively U937 and mono-DCs) were directly analysed by a FACScan flow cytometer using CellQuestTM software and classified as viable (annexin V/PI, bottom left quadrant), apoptotic (annexin V⁺/PI, upper left quadrant) or necrotic/late apoptotic (Annexin V⁺/PI⁺, upper right quadrant) as determined on dot plots.

In order to induce or inhibit apoptosis for positive or negative controls, U937 were treated prior to chemical exposure either with HA14-1 (90 μ M), a non-peptidic agent able to bind and to inactivate Bcl2/Bcl-X_L inducing apoptosis (Wang et al., 2000), or with Bax-Inhibiting Peptide (BIP, at 100 μ M), a cell permeable peptide able to protect against apoptosis (Sawada et al., 2003).

2.6. Caspase activity assay

Firstly, caspase-dependent apoptosis was assessed using CaspACE FITC-VAD-FMK *in situ* Marker (Promega, France), a FITC-conjugate of the cell permeable caspase inhibitor VAD-FMK. After treatments, cells were loaded for 20 min at room temperature in the dark with 5 μ M CaspACE FITC-VAD-FMK. After incubation, cells were rinsed twice in PBS before analysis. CaspACE staining was detected using the FL1-H wavelength band of a FACScan flow cytometer. Data were analyzed from 10,000 and 5,000 cells respectively for U937 and mono-DCs using Cell Quest Pro software.

To identify more accurately the nature of caspases, Caspases 3&7 FLICA Apoptosis Detection Kit Caspase Assay (AbCys) was used. Compared to CaspACE FITC-VAD-FMK which contained the caspase inhibitor VAD which is an amino acid sequence targeted by all caspases, Caspases 3&7 FLICA (sulfo-rhodamine, SR-DEVD-FMK) is only targeted by caspases 3 and 7. It was used according to the manufacture's protocol. Before analysis, cells were rinsed twice in PBS and caspases 3 and 7 stainings were immediately detected using the FL2-H wavelength band of a FACScan flow cytometer.

2.7. Mitochondrial superoxide measurement

Mitochondrial superoxide generation was detected using MitoSOXTM (Molecular Probes, Invitrogen), a specific mitochondrial superoxide indicator and a quantitative method for the detection of mitochondrial ROS generation by flow cytometry (Mukhopadhyay et al., 2007). MitoSOXTM is a modified cationic dihydroethidium probe which is cell permeable and is rapidly and selectively targeted to the mitochondria where it reacts with superoxide and gives a bright red fluorescence upon binding to nucleic acids. Briefly, cells were seeded at 10⁶ cells/ml and treated with chemicals for 15 min to 6 h. After treatments, cells were loaded for 10 min at 37°C in the dark with 5 µM MitoSOXTM. The fluorescence intensity was immediately analysed by flow cytometry using the FL2-H wavelength band. For each sample, 10,000 and 5,000 cells were acquired respectively for U937 and mono-DCs. Data were analysed using CellQuestTM software and mitochondrial ROS induction, expressed as percent of the control, was calculated as follows: MFI of treated cells compared with MFI of untreated cells (normalized to 100% for each time).

In some experiments, cells were pre-incubated for 1 h with antioxidants, NAC (10 mM) or vitamin E (10 µM) before exposure to chemicals. Cells were harvested after 1 h of treatment with chemicals and mitochondrial superoxide measurements were performed.

2.8. Mitochondrial calcium measurement

For mitochondrial calcium assays, cells (2 x 10⁶/ml) were loaded with 2.5 µM Rhod-2 AM (FluoProbes, Interchim) for 30 min at 37°C in the dark and were rinsed twice with culture medium after incubation. The cells were then resuspended at 10⁶ cells/ml and treated with chemicals for 15 min to 6 h. Mitochondrial calcium (Ca²⁺_m) was detected by flow cytometry using the FL2-H wavelength band. For each sample, 10,000 and 5,000 cells were acquired respectively for U937 and mono-DCs. Data are analysed using CellQuestTM software and Ca²⁺_m, expressed as percent of the control, was calculated as follows: MFI of treated cells compared with MFI of untreated cells (normalized to 100% for each time).

In some experiments, cells (after Rhod-2 AM loading) were incubated for 1 h before chemical treatments with calcium chelators (BAPTA-AM at 1 µM or in X-Vivo medium containing EGTA at 0.5 mM) or with antioxidants (NAC at 10 mM, vitamin E at 10 µM) to precise the role of ROS in calcium influx induction. Then, cells were treated for 1 h with chemicals, rinsed in PBS and re-suspended in X-Vivo medium supplemented with antioxidants and calcium chelators at the same concentration. After 3 h, cells were harvested and mitochondrial calcium measurements were assessed.

2.9 Statistical analysis

Results were analysed using Student's T-test and data are considered to be significant at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).

3. Results and Discussion

3.1. Induction of CD86 overexpression, apoptosis and caspase activation.

Dose-response studies of CD86 expression and apoptosis were performed on mono-DCs and U937 cell line after 48 h of treatment with thimerosal and its mercury metabolites, EtHgCl and TSA, in comparison with DNCB used as a positive control. As shown in Table 1, DNCB, thimerosal and EtHgCl induced CD86 overexpression in a dose-dependent manner in mono-DCs and U937 whereas TSA, the non-mercury metabolite of thimerosal, DNCB, the inactive analogous of DNCB and the irritant SDS had no effect. Although the chemical concentrations used for U937 and mono-DC activation were identical, mercury compounds and DNCB were more toxic (less viable cells, annexin V/PI⁺ cells) towards U937 cell line than mono-DCs (Table 1). In parallel, early (annexin V⁺/PI⁻ cells) and late apoptosis (annexin V⁺/PI⁺ cells) induced by sensitizers were detected in a higher amount in U937 compared with mono-DCs. Data summarized in Table 1 show that in untreated U937 cells, apoptotic cells were detected at 3% but at 11.5 to 24.3% after exposure to DNCB (30 μ M) or thimerosal (7.5 μ M), respectively. In mono-DCs, apoptotic cells were only increased from 8% to 12.1% and 15.4% after treatment with DNCB (30 μ M) or thimerosal (7.5 μ M), respectively. We have to notice that in U937, EtHgCl was less effective than thimerosal in inducing CD86 overexpression and apoptosis, whereas similar effects were detected in mono-DCs. In U937, EtHgCl displayed a high toxicity preventing us to use higher concentrations (data not shown). In parallel, caspase activation, assessed using the caspase inhibitor FITC-VAD-FMK kit, was detected at a high level in U937 exposed to thimerosal and DNCB but only in a lesser extent in mercury-treated mono-DCs (Table 1). As expected, non-sensitizers and irritant displayed no significant apoptosis and caspase activation in both cell types.

Previous studies on U937 cells reported caspase-dependent apoptosis induction by thimerosal (Woo et al., 2006) and DNCB (Ade et al., 2006). Thimerosal was also shown to induce apoptosis in other cell types (Makani et al., 2002; Liu et al., 2007; Mian et al. 2008) but no reports were published on mono-DCs. In all our experiments, CD86 overexpression was induced by thimerosal and EtHgCl but not by TSA, supporting the idea that mercury group is responsible of allergic properties of thimerosal according to clinical reports (Goncalo et al., 1996; Geier et al., 2007).

Under our experimental conditions, the differential toxicity observed between mono-DCs and U937 towards sensitizers could explain why only DNCB was able to induce significant apoptosis

process in U937 cells, as previously reported (Ade et al. 2007) but not in mono-DCs (Manome et al. 1999).

3.2. Role of antioxidants on apoptosis induction

Because the induction of apoptosis and caspase activation are higher detected in U937 cells compared with mono-DCs, several further experiments were performed essentially using U937 cells. The ability of thiol-containing antioxidants (NAC, DTT and GSH) and non-thiol antioxidant as vitamin E to protect U937 cells against sensitizer-induced apoptosis were investigated. In these experiments, DNCB, thimerosal and EtHgCl were used at 30 μ M, 7.5 μ M and 2.5 μ M respectively according to the dose required for CD86 overexpression and apoptosis induction (see Table 1). Early apoptosis (annexin V⁺/PI cells) induced by sensitizers, DNCB, thimerosal and EtHgCl (Table 2) was completely suppressed by a pre-treatment with thiol-containing antioxidants, NAC, DTT and GSH as well as L-cysteine versus L-serine, used as a negative control (data not shown). In contrast, the radical scavenger vitamin E had no effect. Other thiol-independent antioxidants such as the radical scavenger vitamin C and aspirin had no effect (data not shown),

Considering late apoptosis or necrosis (annexin V⁺/PI⁺ cells), NAC and GSH were more effective than DTT or vitamin E on DNCB- and thimerosal-treated U937 cells. As previously discussed, EtHgCl being less effective than thimerosal, all antioxidants were without any effect. These data demonstrate a strong protective effect of thiol antioxidants such as NAC in sensitizer-induced apoptosis (Fig. 1).

3.3. Caspase 3 and 7 activation

As described previously (see Table 1), caspase activation was detected in U937 exposed to DNCB and thimerosal, as also reported in DNCB-treated U937 (Ade et al., 2006). The potential implication of caspases 3 and 7, as key executor of mitochondria-mediated apoptosis, was assessed. The cell permeable caspase inhibitor SR-DEVD-FMK, specific for caspase 3 and 7 activation, was used and cells containing activated caspases are discriminated by flow cytometry according to their high fluorescence.

As shown in representative dot blots in Fig. 2A, thimerosal and DNCB induced caspase 3 and 7 activation but to a lesser extent by EtHgCl, whereas TSA, DCNB and SDS had no effect. A pretreatment of U937 cells with antioxidants showed that thiol antioxidants, NAC and GSH, completely inhibited caspase activation induced by thimerosal and DNCB whereas DTT reduced only partially the effect of thimerosal (Fig. 2B). In a lesser extent, vitamin E partially reduced caspase

activation. According to a weak inducing effect of EtHgCl on caspase activation, caspase 3 and 7 were not significantly activated.

In mono-DCs, in agreement with a weak effect of sensitizers to induce apoptosis and caspase activation (see Table 1), no activation of caspase 3 and 7 was detected (data not shown).

3.4. Mitochondrial ROS induction

Mitochondria being a main effector of apoptosis and caspase activation, and because of the protecting effect of thiol antioxidant, the capacity of mitochondria to induce ROS was assessed using MitoSOXTM, a specific fluorescent probe for the detection of superoxides. Data from Fig. 3A show that thimerosal, EtHgCl and DNCB induced U937 mitochondrial superoxide production in a time-dependent manner, such as the oxidative stressor H₂O₂ used as a positive control. DNCB and H₂O₂ displayed a similar kinetic for superoxide induction which is more progressive after exposure to thimerosal and EtHgCl.

In mono-DCs, mitochondrial ROS induction was also detected after chemical exposure but in a reduced and more transient manner (Fig. 3B).

In both cell models, the increase of MitoSOXTM fluorescence was detected since 15 min suggesting that sensitizers induced early mitochondrial superoxide production. As expected, TSA, DCNB and SDS had no effect on MitoSoxTM fluorescence whatever the cell model.

ROS and caspase activation are specific markers of mitochondria-dependent apoptosis. Mitochondrial ROS play an important role in apoptosis process under both physiological and pathological conditions (Dröge, W. 2002). ROS participate in early and late steps of apoptosis process and mitochondria are both source and target of ROS and metal-induced toxicity by ROS is a well known mechanism (for review, see Valko et al., 2002). Thimerosal was reported to induce ROS-dependent apoptosis in other cell types as T cells and HeLa cells (Makani et al., 2002; Mian et al., 2008).

3.5. Role of mitochondrial calcium influx induced by sensitizers

Alternatively to mitochondrial ROS measurement, mitochondrial calcium (Ca²⁺_m) influx was assessed using a specific fluorescent probe, Rhod-2 AM. Ca²⁺_m influx was detected in U937 (Fig. 4A) and mono-DCs (Fig. 4B) after exposure to ionomycin, a calcium ionophore used as a positive control, thimerosal and DNCB, but not after exposure to EtHgCl, non sensitizers and SDS. We have to notice that, in U937 cells, all sensitizers induced a rapid decrease of Rhod-2 AM fluorescence in comparison with untreated cells and, conversely to mitochondrial ROS induction, Ca²⁺_m influx was significantly detected after 1 h of treatment with thimerosal but after 2 h with DNCB (Fig. 4A).

In mono-DCs (Fig. 4B), Ca^{2+}_m influx was rapidly increased from 15 min to 2 h in a higher level for thimerosal compared with DNCB for which Ca^{2+}_m influx was less induced in comparison with U937 cells.

The thiol group antioxidants, NAC, DTT and GSH significantly reduced thimerosal- and DNCB-induced Ca^{2+}_m influx in U937 whereas the thiol-independent antioxidant vitamin E had only a partial protecting effect on DNCB-treated cells (Fig. 5). Similar results were obtained on mono-DCs, with a strong inhibitory effect of NAC and a partial effect of vitamin E on both DNCB- and thimerosal-induced Ca^{2+}_m influx (data not shown).

Calcium is a ubiquitous second messenger, involved in the control of a broad variety of physiological events including apoptosis (Giacomello et al., 2007). Thimerosal, a calcium inducer (for review see Elferink, 1999), induced intracellular calcium mobilization in U937 (Woo et al., 2006).

3.6. Cross talk between mitochondrial ROS and Ca^{2+}_m

In U937 cells, a pretreatment with NAC before exposure to sensitizers, markedly reduced mitochondrial ROS induction whereas a pretreatment with the calcium chelators, BAPTA-AM (preventing from intracellular Ca^{2+} increase), and EGTA (depleting extracellular Ca^{2+} from the culture medium) did not inhibit ROS induction (Fig. 6). These data suggest that chemical-induced mitochondrial ROS was an upstream event, Ca^{2+}_m influx being inhibited by NAC as previously shown (see Fig. 5). In mono-DCs, thimerosal and DNCB induced similar Ca^{2+}_m influx inhibited only by NAC (data not shown).

The relationship between mitochondrial oxidative stress and calcium influx was previously reported (for review see Chakraborti et al., 1999).

It is likely that in mitochondria, oxidation of thiol groups contained in mitochondrial membrane proteins was associated with the regulation of Ca^{2+} dynamics (Fagian et al., 1990), suggesting that these events were implicated in apoptosis process (Richter et al., 1991).

3.7. Role of Stress Activated Protein Kinases (SAPKs)

SAPKs are known to be activated by ROS (for review see McCubrey et al., 2006). They have been described to actively participate to the intracellular signaling pathways leading both to DC activation in response to sensitizers such as DNCB and NiSO_4 (Rescigno et al., 1998; Ardeshtna et al., 2000; Arrighi et al., 2001; Aiba et al., 2003; Boislève et al., 2005; Trompezinski et al., 2008) and to apoptosis (for review see Tibbles et al., 1999). As shown in Figures 7A and 7B, the specific p38 MAPK inhibitor SB203580 significantly decreased early and late apoptosis (annexin V^+ / PI^- and annexin V^+ / PI^+ positive cells) induced by mercury compounds and DNCB after 48 h of exposure.

Moreover, SB203580 was able to inhibit caspases 3 and 7 (Figs. 7C and 7D). Unexpectedly, the specific JNK inhibitors SP600125 and curcumin had no effect on sensitizer-induced apoptosis (data not shown). Other specific kinase inhibitors, U0126 and LY294002 for Erk1/2 and PI3K, respectively, were without any significant effect suggesting that p38 MAPK activation was the main kinase pathway implicated in chemical-induced apoptosis and caspase 3 and 7 activation.

Previous studies had demonstrated that, in U937 cells, thimerosal induced p38 MAPK-dependent apoptosis (Liu et al., 2007) and in mono-DCs, p38 MAPK phosphorylation was reported to be induced by thimerosal (Trompezinski et al., 2008). A pretreatment with the thiol antioxidant NAC markedly reduced thimerosal-induced CD86 overexpression and p38 MAPK phosphorylation in mono-DCs (Bruchausen et al., 2003; Trompezinski et al., 2008) suggesting an essential role of thiol groups in DC activation.

3.8. CD86 overexpression and apoptosis?

Is there a link between CD86 overexpression and apoptosis induced by chemicals? To assess this purpose, the anti-apoptotic peptide BIP (Bax-Inhibiting Peptide) was used to prevent U937 from apoptosis (Sawada et al., 2003) and in opposite, the non-peptidic agent HA14-1, which binds and inactivates Bcl2/Bcl-X_L (Wang et al., 2000), was used as an apoptosis inducer.

A pretreatment of U937 with BIP before exposure to sensitizers significantly decreased mercury compound- and DNCB-induced apoptosis (Fig. 8A) whereas as expected, HA14-1 pretreatment exhibited a 3-fold increase of apoptotic cells in untreated cells.

Similar experiments for monitoring CD86 expression showed that pretreatments for inducing or inhibiting apoptosis did not modify CD86 expression induced by sensitizers (Fig. 8B).

These data suggest that CD86 overexpression induced by sensitizers is independent of apoptosis induction as previously reported on U937 (Ade et al., 2006). This comment could be extended to mono-DCs where CD86 overexpression is markedly induced by sensitizers despite they are, at the same concentration, unable to induce apoptosis process.

4. Conclusion

In the present study, our data demonstrate that sensitizers such as thimerosal and DNCB induced apoptosis and caspase 3 and 7 activation essentially in U937 cells in comparison with mono-DCs. These processes were markedly inhibited by thiol-containing antioxidants but not by thiol non-dependent antioxidants confirming the essential role of thiol groups in such processes. ROS induced by sensitizers were mediated by mitochondria as well as mitochondrial calcium influx induced downstream mitochondrial ROS.

A pretreatment with SB205103, a specific p38 MAPK inhibitor reduced apoptosis induction and caspase 3 and 7 activation while others MAPK inhibitors such as for JNK and Erk1/2 as well as for PI3K were without any effect.

Using specific apoptosis inductor or inhibitor, our data demonstrated that there is no correlation between CD86 overexpression and apoptosis process induced by sensitizers in U937 as previously reported (Ade et al., 2006). These conclusions could be extended to mono-DCs for which no apoptosis was reported despite several studies relating overexpression of CD86 induced by sensitizers.

From these studies, the high protecting effect of thiol antioxidants, namely NAC, could be explained by the binding of sensitizers to protein thiol group, as previously reported by Becker et al. (2003). Indeed, thiol groups, and in particular cysteine residues included in signaling proteins such as SAPKs or transcription factors, are sensitive to oxidation which leads to conformational changes implicated in intracellular cell signaling (for review see Winterbourn et al., 2008). Organic mercury compounds have a strong affinity for thiol-containing compounds (Rabenstein and Fairhurst, 1975). Thimerosal has been shown to react with cysteine and GSH (Wu et al., 2008). GSH decrease induced by DNCB was reported to be involved in DC activation (Mizuashi et al., 2005) or in TH2 response induced by thimerosal (Agrawal et al., 2007).

The role of oxidative stress and thiol chemistry in DC and monocytic cell line activation has previously been reported by several authors (Rutault et al., 1999; Becker et al., 2003; Kantengwa et al., 2003; Bruchausen et al., 2003; Mizuashi et al., 2005; Trompezinski et al., 2008; Hirota et al., 2009; Suzuki et al., 2009; Katagani et al., 2010).

In summary, all these data confirm the link between chemical structure and activity (Lepoittevin, 1999) and highlight the great interest in the development of hapten-protein binding assays based on thiol groups for chemical screening (Gerberick et al., 2004). However, the precise role of mitochondria in sensitizer-induced apoptosis remains to be completed with the study of pro-apoptotic protein release such as cytochrome c and, more generally, a better understanding of the role of cell metabolism will be essential to study the potential of *in vitro* assays to predict skin sensitization.

Conflict of interest

The authors declare that there no conflicts of interest.

Acknowledgments

These studies were supported financially by a grant from LVMH Research. We are particularly indebted to Jane Mitchell for editing this manuscript.

References

- Ade, N., Martinozzi-Teissier, S., Pallardy, M., Rousset F., 2006. Activation of U937 by contact sensitizers : CD86 expression is independent of apoptosis. *J. Immunotox.* 3, 1-9.
- Agrawal, A., Kaushal, P., Agrawal, S., Gollapudi, S., Gupta, S., 2007. Thimerosal induces TH2 responses via influencing cytokine secretion by human dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 81, 474-482.
- Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., Tagami, H., 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.* 27, 3031-3018.
- Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, Z.U., Mizuashi, M., Ohtani, T., Yoshino, Y., Tagami, H., 2003. p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and 2,4-dinitrochlorobenzene. *J. Invest. Dermatol.* 120, 390-399.
- Ardehsna, K.M., Pizzey, A.R., Devereux, S., Khwaja, A., 2000. The PI3 kinase, p38 SAPkinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96, 1039-1046.
- Arrighi, J.F., Rebsamen, M., Rousset, F., Kindler, V., Hauser, C., 2001. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J. Immunol.* 166, 3837-3845.
- Becker, D., Valk, E., Zahn, S., Brand, P., Knop, J., 2003. Coupling of contact sensitizers to thiol groups is a key event for the activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 120, 233-238.
- Boislève, F., Kerdine-Römer, S., Pallardy, M., 2005. Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha. *Toxicol.* 206, 233-244.
- Bruchhausen, S., Zahn, S., Valk, E., Knop, J., Becker, D., 2003. Thiol antioxidants block the activation of antigen-presenting cells by contact sensitizers. *J. Invest. Dermatol.* 121, 1039-1044.
- Chakraborti, T., Das, S., Mondal, M., Roychoudhury, S., Chakraborti, S., 1999. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal.* 11, 77-85.
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47-95.
- Elferink, J.G.R., 1999. Thimerosal: a versatile sulfhydryl reagent, calcium mobilizer, and cell function-modulating agent. *Gen. Pharmacol.* 33, 1-6.
- Fagian, M.M., Pereira-da-Silva, L., Martins, I.S., Vercesi, A.E., 1990. Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ plus prooxidants. *J. Biol. Chem.* 265, 19955-19960.

- Geier, D.A., Sykes, L.K., Geier, M.R., 2007. A review of thimerosal (merthiolate) and its ethylmercury breakdown product: specific historical considerations regarding safety and effectiveness. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* 10, 575-596.
- Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Bailey, R.E., Chaney, J.G., Morrall, S.W., Lepoittevin, J.P., 2004. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol. Sci.* 81, 332-343.
- Giacomello, M., Drago, I., Pizzo, P., Pozzan, T., 2007. Mitochondrial Ca^{2+} as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ.* 14, 1267-1274.
- Goncalo, M., Figueiredo, A., Goncalo, S., 1996. Hypersensitivity to thimerosal: the sensitizing moiety. *Contact Dermatitis* 34, 201-203.
- Guironnet, G., Dalbiez-Gauthier, C., Rousset, F., Schmitt, D., Péguet-Navarro, J., 2000. In vitro human T cell sensitization to haptens by monocyte-derived dendritic cells. *Toxicol. in Vitro* 14, 517-522.
- Hirota, M., Suzuki, M., Hagino, S., Kagatani, S., Sasaki, Y., Aiba, S., Itagaki, H., 2009. Modification of cell-surface thiols elicits activation of human monocytic cell line THP-1: possible involvement in effect of haptens 2,4-dinitrochlorobenzene and nickel sulfate. *J. Toxicol. Sci.* 34, 139-150.
- Hulette, B.A., Ryan, C.A., Gerberick, G.F., 2002. Elucidating changes in surface marker expression of dendritic cells following chemical allergen treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 226-233.
- Hulette, B.A., Ryan, C.A., Gildea, L.A., Gerberick, G.F., 2005. Relationship of CD86 surface marker expression and cytotoxicity on dendritic cells exposed to chemical allergen. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 209, 159-166.
- Kagatani, S., Sasaki, Y., Hirota, M., Mizuashi, M., Suzuki, M., Ohtani, T., Itagaki, H., Aiba, S., 2010. Oxidation of cell surface thiol groups by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 130, 175-183.
- Kantengwa, S., Jornot, L., Devenoges, C., Nicod, L.P., 2003. Superoxide anions induce the maturation of human dendritic cells. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 167, 431-437.
- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 1996. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Lett.* 378, 150-152.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C., 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* 87, 199-163.
- Lepoittevin, J.P., 1999. Development of structure-activity relationships (SARs) in allergic contact dermatitis. *Cell Biol. Toxicol.* 15, 47-55.
- Liu, S.I., Huang, C.C., Huang, C.J., Wang, B.W., Chang, P.M., Fang, Y.C., Chen, W.C., Wang, J.L., Lu, Y.C., Chu, S.T., Chou, C.T., Jan, C.R., 2007. Thimerosal-induced apoptosis in human SCM1

- gastric cancer cells: activation of p38 MAP kinase and caspase-3 pathways without involvement of $[Ca^{2+}]_i$ elevation. *Toxicol. Sci.* 100, 109-117.
- Makani, S., Gollapudi, S., Yel, L., Chiplunkar, S., Gupta, S., 2002. Biochemical and molecular basis of thimerosal-induced apoptosis in T cells: a major role of mitochondrial pathway. *Genes Immun.* 3, 270-278.
- Manome, H., Aiba, S., Tagami, H., 1999. Simple chemicals can induce maturation and apoptosis of dendritic cells. *Immunology* 98, 481-490.
- McCubrey, J.A., Lahair, M.M., Franklin, R.A., 2006. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1775-1789.
- Mian, M.F., Kang, C., Lee, S., Choi, J.H., Bae, S.S., Kim, S., Kim, Y., Ryu, S.H., Suh, P., Kim, J., Kim E., 2008. Cleavage of focal adhesion kinase is an early marker and modulator of oxidative stress-induced apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* 171, 57-66.
- Mizuashi, M., Ohtani, T., Nakagawa, S., Aiba, S., 2005. Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 124, 579-586.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Yoshihiro, K., Hasko, G., Pacher, P., 2007. Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 203-208.
- Patrizi, A., Rizzoli, L., Vincenzi, C., Trevisi, P., Tosti, A., 1999. Sensitization to thimerosal in atopic children. *Contact Dermatitis* 40, 94-97.
- Python, F., Goebel, C., Aeby, P., 2007. Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220, 113-124.
- Rabenstein, D.L., Fairhurst, M.T., 1975. Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes. XI. The binding of methylmercury by sulfhydryl-containing amino acids and by glutathione. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 2086-2092.
- Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C.L., Gold, M.R., Ricciardi-Castagnoli, P., 1998. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J. Exp. Med.* 188, 2175-2180.
- Richter, C., Kass, G.E., 1991. Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular Ca^{2+} homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation. *Chem. Biol. Interact.* 77, 1-23.
- Rousset, F., Verda, D., Garrigue, J.L., Mariani, M., Leclaire, J., 2002. In vitro prediction of contact sensitivity with human cell lines. *Contact Dermatitis* 46(s4), 6.
- Rutault, K., Alderman, C., Chain, B.M., Katz, D.R., 1999. Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 232-238.
- Ryan, C.A., Gerberick, G.F., Gildea, L.A., Hulette, B.C., Betts, C.J., Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Kimber, I., 2005. Interactions of contact allergens with dendritic cells: opportunities and challenges for the development of novel approaches to hazard assessment. *Toxicol. Sci.* 88, 4-11.

- Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., Itagaki, H., Toyoda, H., Suzuki, H., 2006. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol. in Vitro* 20, 774-784.
- Sawada, M., Hayes, P., Matsuyama, S., 2003. Cytoprotective membrane-permeable peptides designed from the Bax-binding domain of Ku70. *Nat. Cell. Biol.* 5, 352-357.
- Straube, F., Grenet, O., Bruegger, P., Ulrich, P., 2005. Contact allergens and irritants show discrete differences in the activation of human monocyte-derived dendritic cells: Consequences for in vitro detection of contact allergens. *Arch. Toxicol.* 79, 37-46.
- Suneja, T., Belsito, D.V., 2001. Thimerosal in the detection of clinically relevant allergic contact reactions. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45, 23-27.
- Suzuki, M., Hirota, M., Hagino, S., Itagaki, H., Aiba, S., 2009. Evaluation of changes of cell-surface thiols as a new biomarker for in vitro sensitization test. *Toxicol. in Vitro* 23, 687-696.
- Tibbles, L.A., Woodgett, J.R., 1999. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 1230-1254.
- Trompezinski, S., Migdal, C., Tailhardat, M., Le Varlet, B., Courtellemont, P., Haftek, M., Serres, M., 2008. Characterization of early events involved in human dendritic cell maturation induced by sensitizers: cross talk between MAPK signalling pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 230, 397-406.
- Tsujimoto, Y., 2002. Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. *Biosci. Rep.* 22, 47-58.
- Tuschl, H., Kovac, R., Weber, E., 2000. The expression of surface markers on dendritic cells as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Toxicol. in Vitro* 14, 541-549.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161-1208.
- Wang, J.L., Liu, D., Zhang, Z.J., Shan, S., Han, X., Srinivasula, S.M., Croce, C.M., Alnemri, E.S., Huang, Z., 2000. Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 7124-7129.
- Wattanakrai, P., Rajatanavin N., 2007. Thimerosal allergy and clinical relevance in Thailand. *J. Med. Assoc. Thai.* 90, 1775-1779.
- Winterbourn, C.C., Hampton, M.B., 2008. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 549-561.
- Woo, K.J., Lee, T.J., Bae, J.H., Jang, B.C., Song, D.K., Cho, J.W., Suh, S.I., Park, J.W., Kwon, T.K., 2006. Thimerosal induces apoptosis and G2/M phase arrest in human leukemia cells. *Mol. Carcinog.* 45, 657-666.

- Wu, X., Liang, H., O'Hara, K.A., Yalowich, J.C., Hasinoff, B.B., 2008. Thiol-modulated mechanisms of the cytotoxicity of thimerosal and inhibition of DNA topoisomerase II alpha. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 483-493.
- Zenarola, P., Gimma, A., Lomuto, M., 1995. Systemic contact dermatitis from thimerosal. *Contact Dermatitis* 32, 107-108.

Mono-DCs						U937					
Chemicals and concentrations (μM)		CD86 (MFI ± SD)	Viable (%) (annexin V/PI)	Apoptotic (%) (annexin V ⁺ /PI)	Late apoptotic /necrotic (%) (annexin V ⁺ /PI ⁺)	Caspases	CD86 (MFI ± SD)	Viable (%) (annexin V/PI)	Apoptotic (%) (annexin V ⁺ /PI)	Late apoptotic /necrotic (%) (annexin V ⁺ /PI ⁺)	Caspases
untreated		100.0 ± 14.9	75.1 ± 3.2	7.9 ± 5.3	13.8 ± 1.2	11.6 ± 3.9	100.0 ± 7.3	78.5 ± 11.5	3.0 ± 2.4	14.9 ± 9.7	10.8 ± 3.1
DNCB	15	145.9 ± 8.4*	76.7 ± 2.5	7.9 ± 6.9	12.5 ± 2.2	12.3 ± 2.9	150.4 ± 25.7**	70.0 ± 3.5*	6.6 ± 4.8*	20.9 ± 5.7**	19.2 ± 3.9*
	30	173.5 ± 37.3**	76.5 ± 8.5	12.1 ± 8.7	10.6 ± 0.3	13.9 ± 1.1	233.1 ± 27.2***	63.6 ± 2.6**	11.5 ± 10.1**	24.9 ± 0.6**	41.1 ± 36.9**
thimerosal	5	191.1 ± 9.6**	70.0 ± 0.9	13.2 ± 5.2*	14.8 ± 4.1	19.6 ± 3.7*	251.1 ± 49.5***	59.3 ± 2.9**	11.6 ± 11.1**	15.9 ± 6.2*	50.7 ± 3.9***
	7.5	199.9 ± 0.1**	66.4 ± 0.6*	15.4 ± 5.0*	16.5 ± 4.2	19.4 ± 3.7*	280.9 ± 22.6***	57.4 ± 10**	21.7 ± 2.8***	24.3 ± 2.8**	48.3 ± 4.7***
EtHgCl	2.5	192.2 ± 5.1**	70.2 ± 2.0	12.7 ± 4.9	15.2 ± 4.1	17.9 ± 3.5*	176.1 ± 43.4**	71.3 ± 8.8*	15.2 ± 13.0**	12.6 ± 3.2	19.6 ± 2.7*
TSA	15	120.1 ± 9.4	73.0 ± 2.9	14.8 ± 7.2	11.3 ± 3.5	11.2 ± 5.6	94.5 ± 13.5	79.3 ± 6.5	2.5 ± 1.6	13.6 ± 7.0	16.2 ± 7.8
DCNB	30	133.8 ± 16.2	72.6 ± 2.2	12.7 ± 3.3	13.0 ± 0.3	13.9 ± 2.9	92.1 ± 7.1	80.7 ± 5.3	2.3 ± 1.7	12.5 ± 5.9	17.9 ± 12.0
SDS	35	115.9 ± 16.4	71.6 ± 4.7	12.8 ± 9.4	14.4 ± 4.8	16.6 ± 7.6	93.8 ± 4.4	80.9 ± 6.2	2.3 ± 1.8	12.6 ± 7.4	16.9 ± 8.9

Table 1: Differential apoptotic effect of chemicals on mono-DCs and U937. Mono-DCs and U937 were treated for 48 h with graded concentrations of the indicated chemicals and apoptosis was assessed according to annexin V/propidium iodide double staining and caspase-specific activity assessed with FITC-VAD-FMK as described in Materials and Methods. CD86 expression monitored by flow cytometry after 48 h exposure, was shown as a positive control of DC and U937 activation. Data are representative of at least three independent experiments, carried out for mono-DCs with five different donors.

U937

		Apoptotic (%) (annexin V ⁺ /PI ⁻)					Late apoptotic /necrotic (%) (annexin V ⁺ /PI ⁺)				
		control	NAC	DTT	GSH	Vitamin E	control	NAC	DTT	GSH	Vitamin E
untreated		3.95 ± 1.3	4.9 ± 0.8	3.7 ± 0.8	3.3 ± 0.1	3.9 ± 1.2	15.5 ± 0.1	13.5 ± 2.9	13.1 ± 1.8	13.2 ± 3.3	15.5 ± 0.2
DNCB	30 μM	15.4 ± 0.2	5.4 ± 0.9**	5.7 ± 0.5**	3.9 ± 0.2**	18.1 ± 0.1	25.4 ± 5.6	15.9 ± 2.1**	24.1 ± 2.7	14.5 ± 1.9**	21.4 ± 6.1
thimerosal	7.5 μM	22.6 ± 1.0	5.1 ± 0.8**	8.1 ± 2.6**	3.8 ± 0.1**	19.4 ± 3.8	22.4 ± 5.5	10.1 ± 0.4**	18.6 ± 2.8	12.3 ± 1.8**	18.1 ± 0.1
EtHgCl	2.5 μM	15.2 ± 1.2	6.6 ± 2.7**	6.4 ± 0.4**	3.9 ± 1.6**	16.5 ± 0.8	12.6 ± 3.2	13.1 ± 3.6	12.9 ± 1.1	11.9 ± 0.9	13.2 ± 0.1

Table 2. Effect of thiol-dependent and -independent antioxidants on chemical-induced apoptosis. U937 were pretreated or not with the thiol-dependent antioxidants NAC and GSH (10 mM), the reducing agent DTT (50 μM) or the thiol-independent radical scavenger vitamin E (10 μM) before chemical exposure. Annexin V/propidium iodide double staining was performed after 48 h of chemical exposure. Data were obtained from three independent experiments showing the mean percentage ± SD of early and late apoptotic cells.

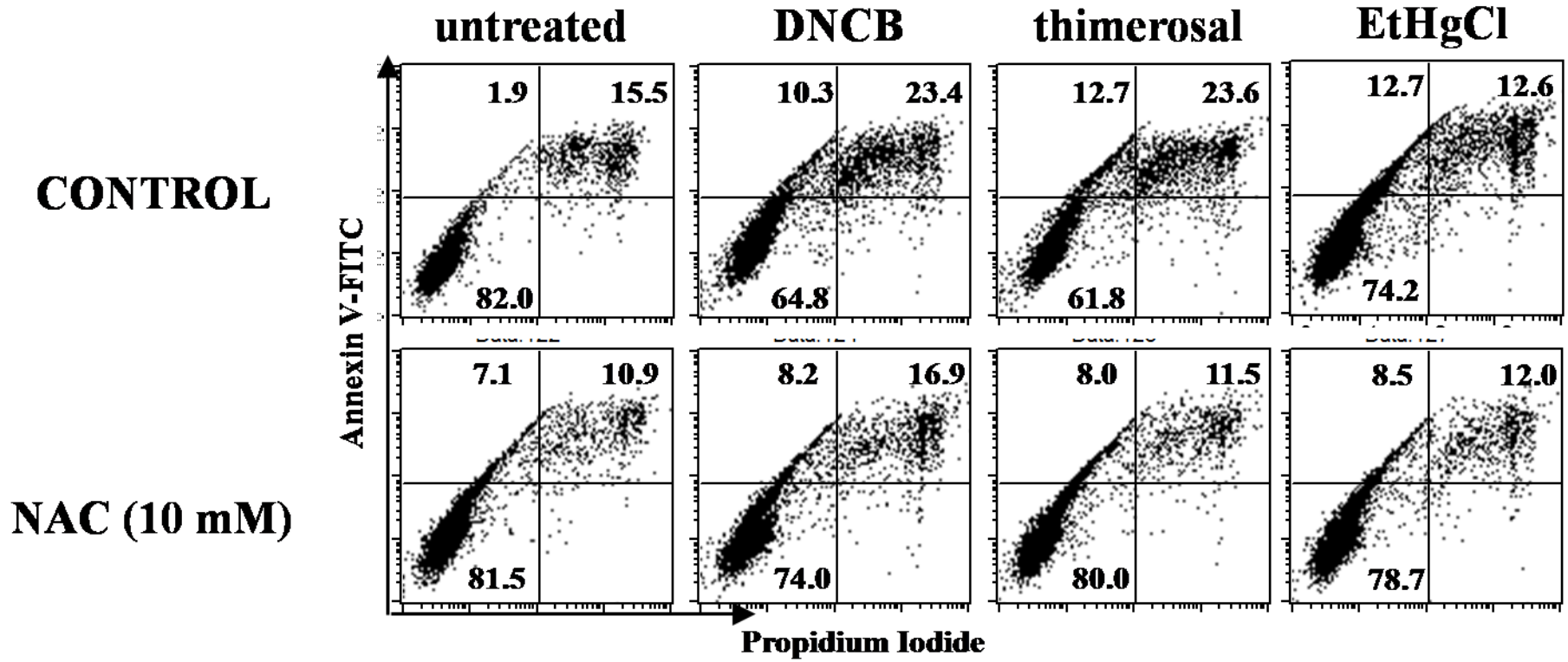


Fig. 1. Representative dot blots of NAC antioxidant effect on DNCB (30 μ M)-, thimerosal (7.5 μ M)-, and EtHgCl (2.5 μ M)-induced apoptosis. Viable cells were located in bottom left quadrant, early apoptotic cells in the upper left quadrant and necrotic/late apoptotic cells in the upper right quadrant as described in Materials and Methods.

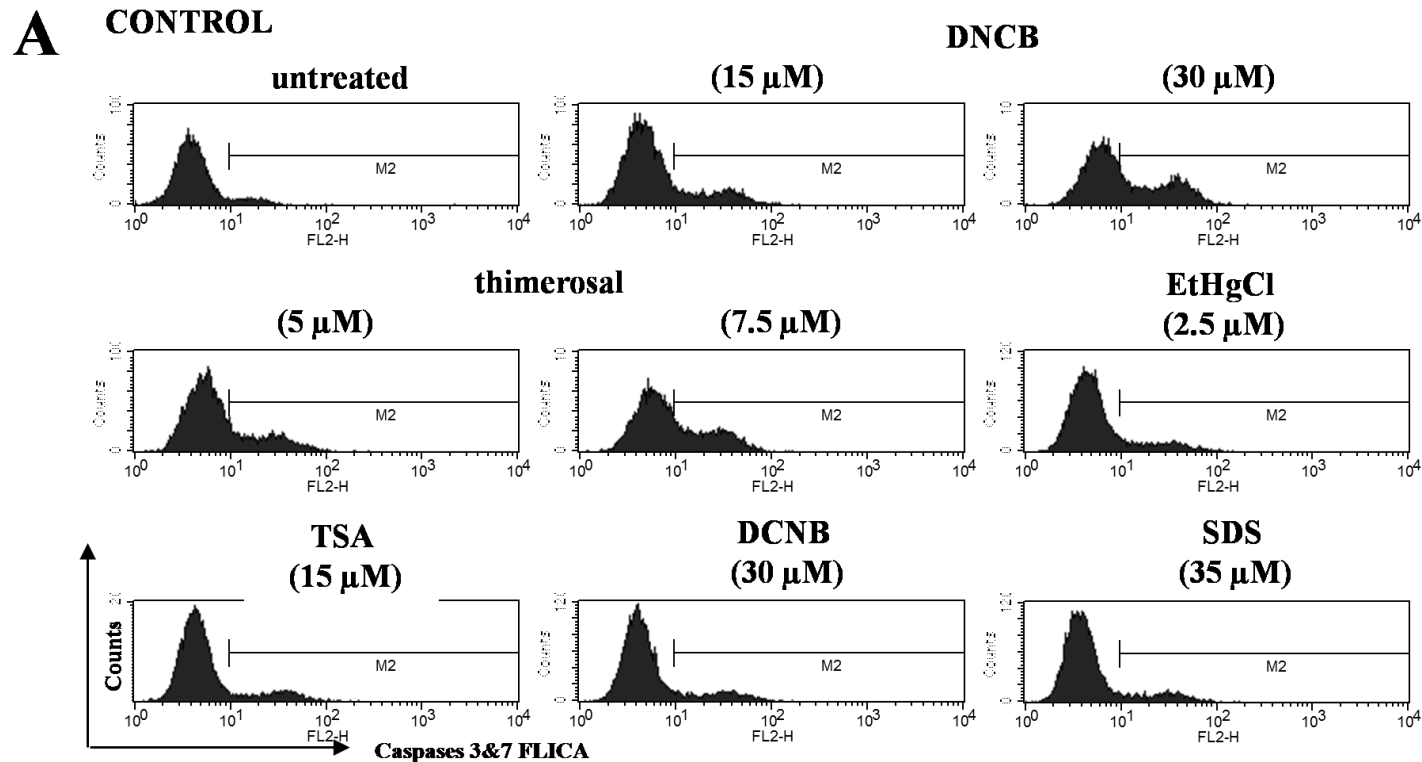
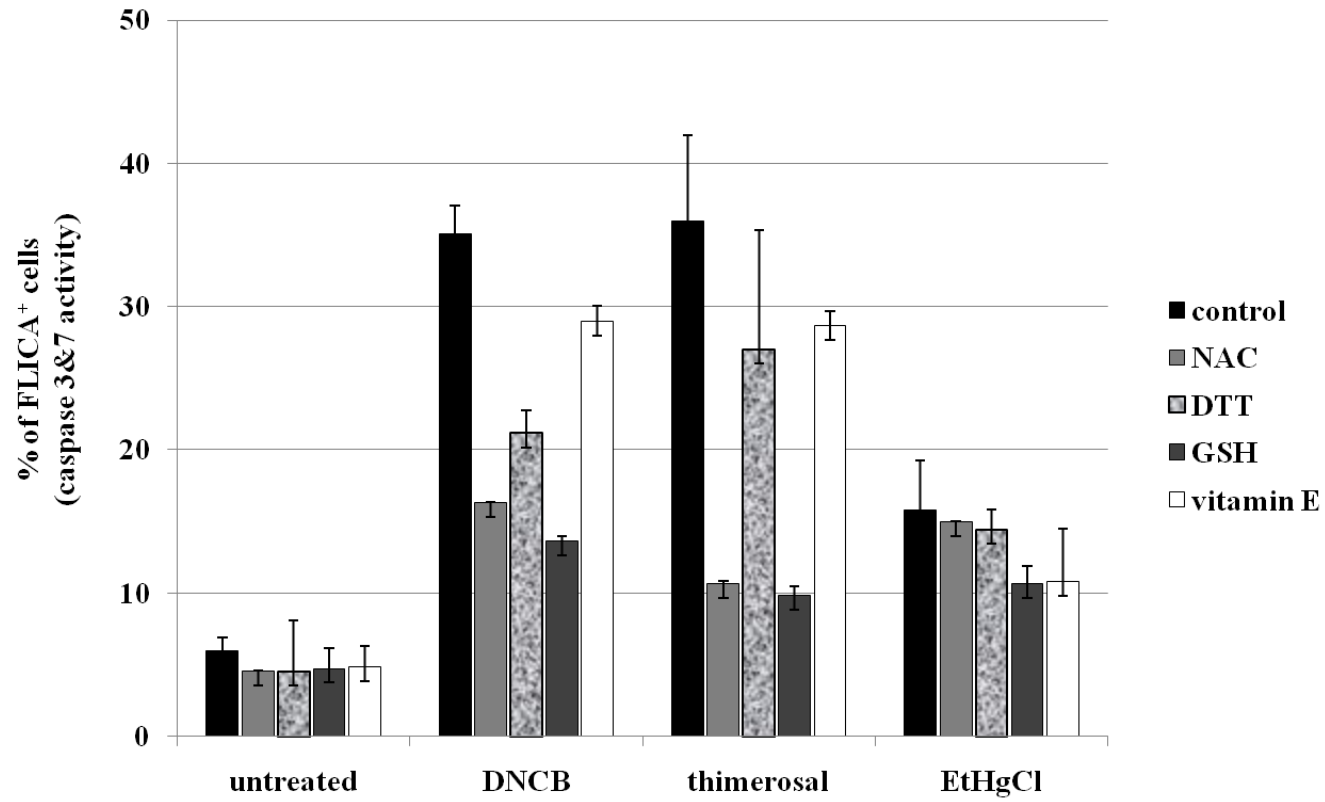


Fig. 2. In U937 cells, mercury compounds and DNCB activated caspases 3 and 7 line. (A) Data show representative histograms of the fluorescence distribution of caspases 3 and 7 specific activities after 48 h exposure to DNCB, thimerosal, EtHgCl, TSA, DCNB and SDS, assessed with the fluorescent caspase inhibitor (FLICA). Inset line (M2) determined the percentage of U937 with high fluorescence staining and indicated numbers corresponding to the percent of cells with active caspases 3 and 7. (B) Effect of thiol-dependent and -independent antioxidants on chemical-induced apoptosis. U937 were pretreated or not with the thiol-dependent antioxidants NAC and GSH (10 mM), the reducing agent DTT (50 μM) or the thiol-independent radical scavenger vitamin E (10 μM) before chemical exposure (DNCB at 30 μM , thimerosal at 7.5 μM , EtHgCl at 2.5 μM). Data are obtained from three independent experiments showing the mean percentage \pm SD of cells positively stained with FLICA as defined in Fig. 2A.

B



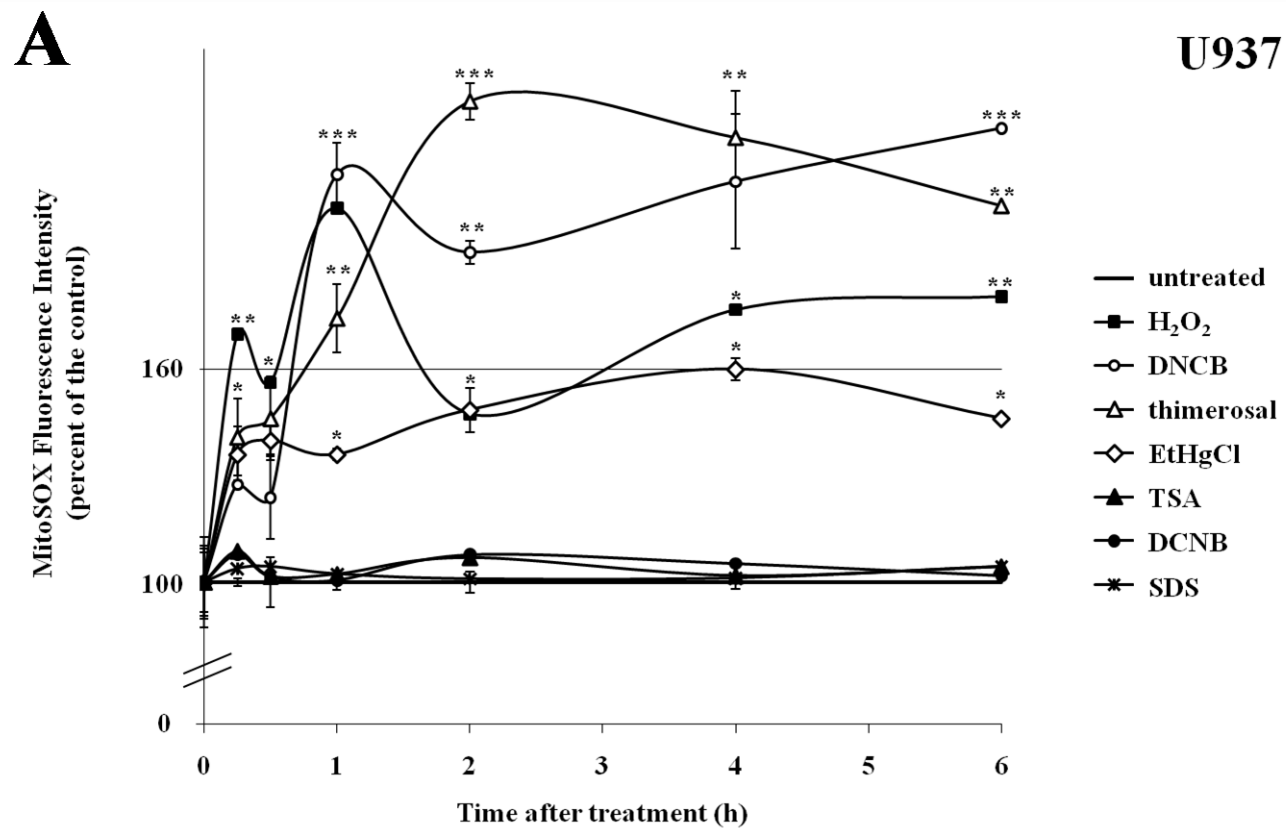
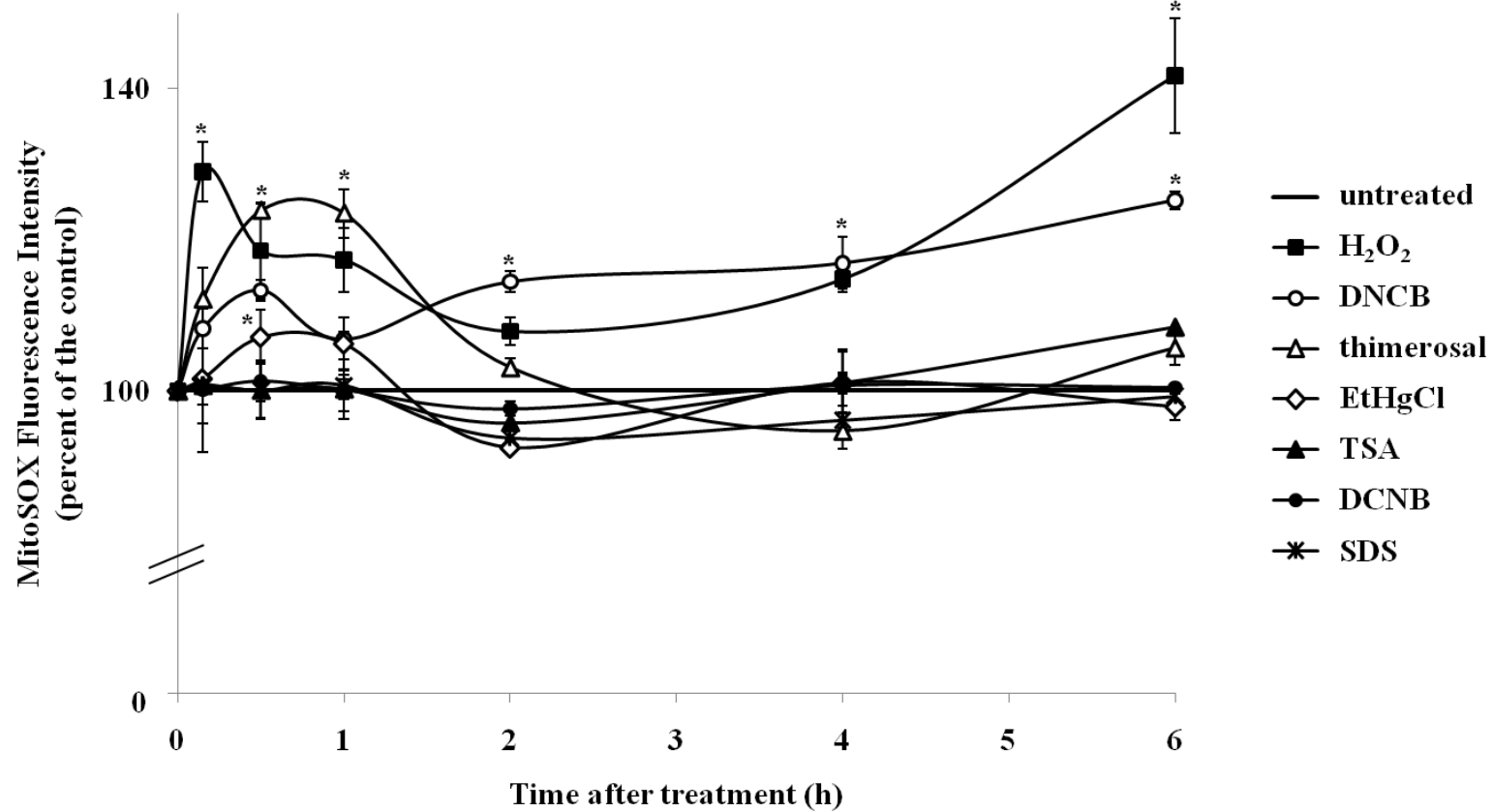
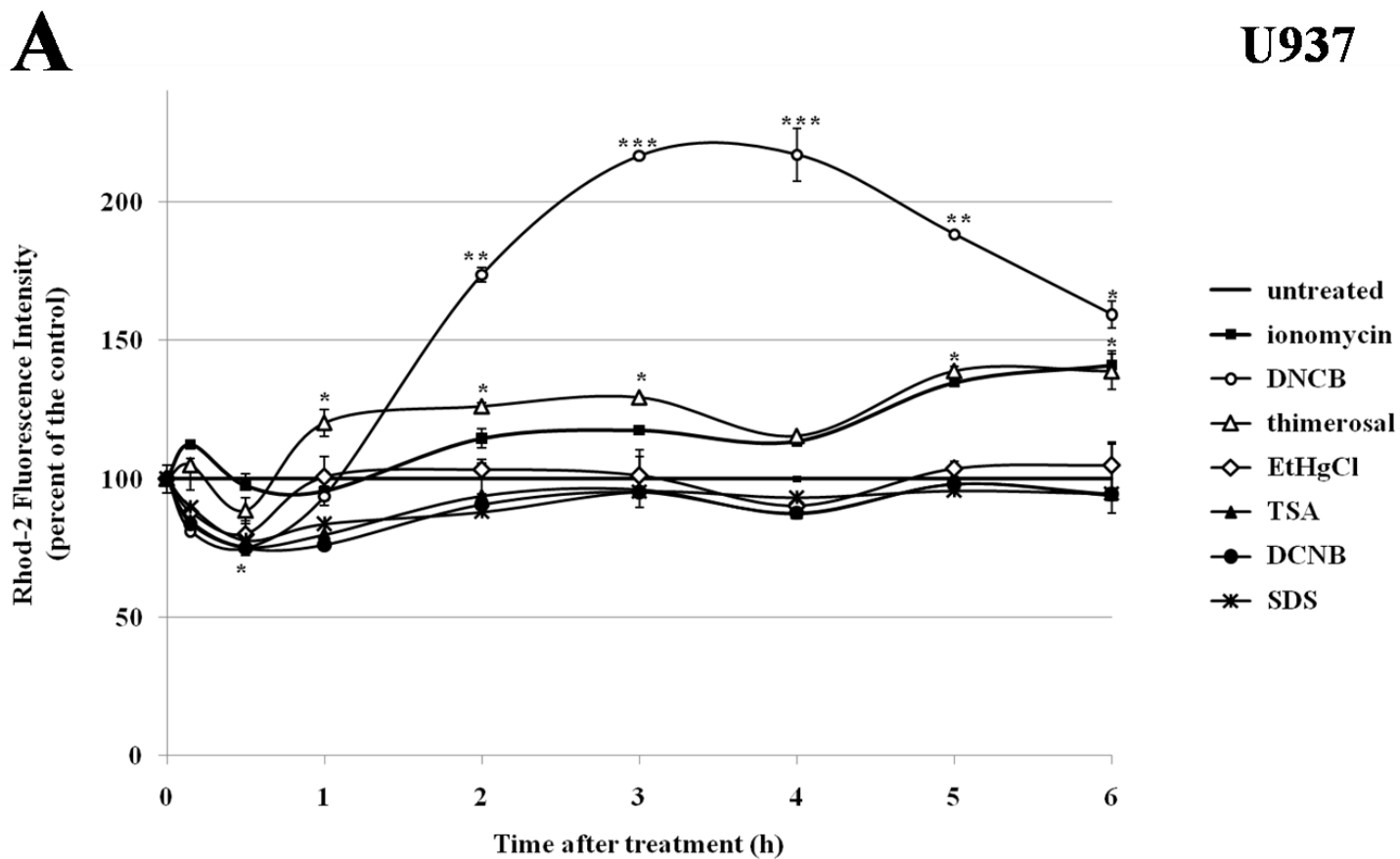
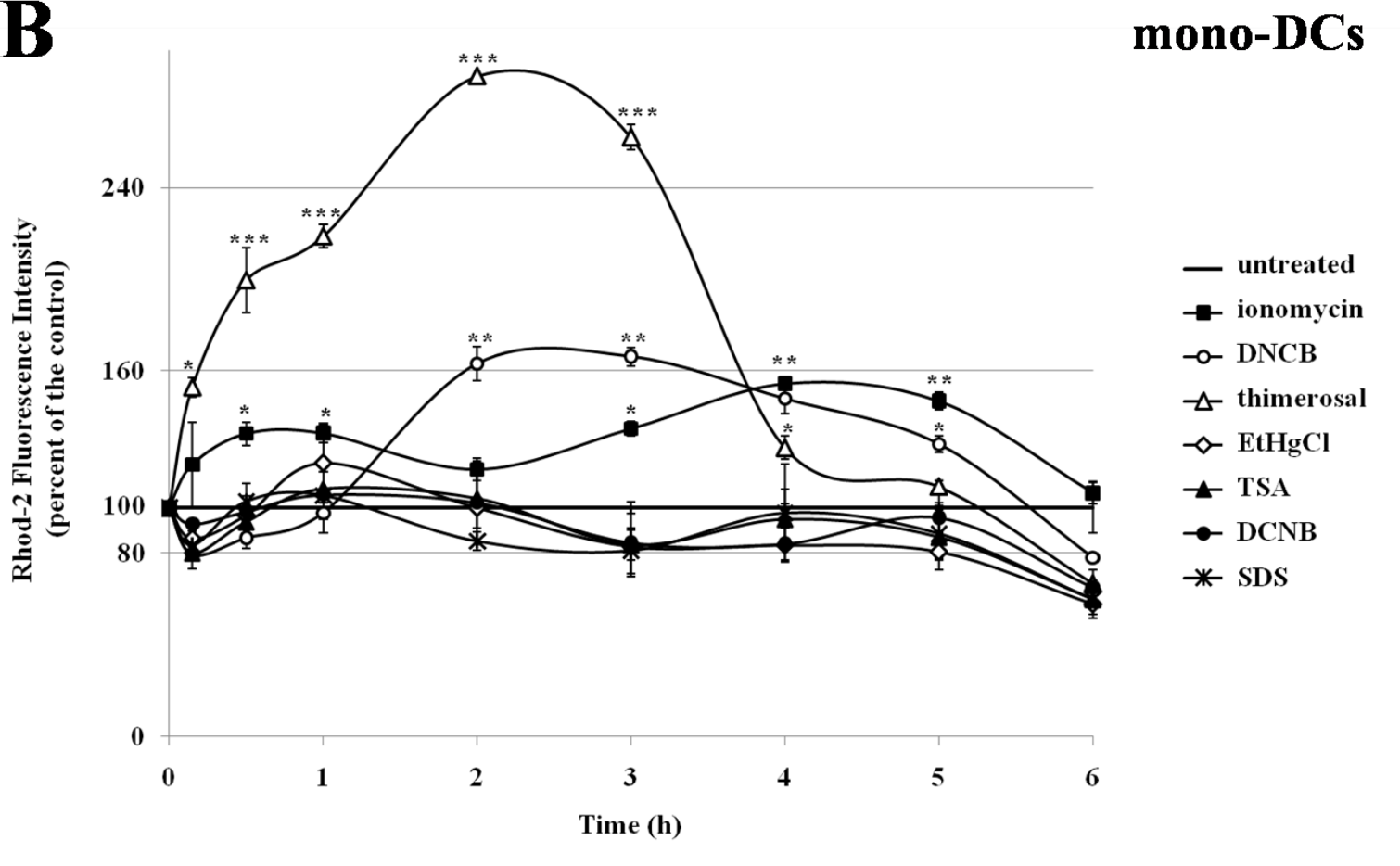


Fig. 3. Mercury compounds and DNCB induced mitochondrial ROS in U937 (A) and mono-DCs (B). Untreated cells or treated with H₂O₂ (1 mM), DNCB (30 μM), thimerosal (7.5 μM), EtHgCl (2.5 μM), TSA (15 μM), DCNB (30 μM) and SDS (35 μM) were incubated for the indicating time (15 min to 6 h) and then loaded with MitoSOXTM. Data are representative of the mean of three independent experiments performed in triplicate.

B



(p135-136) **Fig. 4.** Thimerosal and DNCB induced an increase of mitochondrial calcium (Ca^{2+}_m) influx detected in U937 (A) and mono-DCs (B). Cells were loaded with the Rhod-2 AM probe prior to treatment with the Ca^{2+} ionophore, ionomycin (1 $\mu\text{g/ml}$), DNCB (30 μM), thimerosal (7.5 μM), EtHgCl (2.5 μM), TSA (15 μM), DCNB (30 μM) and SDS (35 μM) for the indicated time (15 min to 6 h). Changes in Ca^{2+}_m were detected by flow cytometry. Data are representative of the mean of three independent experiments performed in triplicate.

B

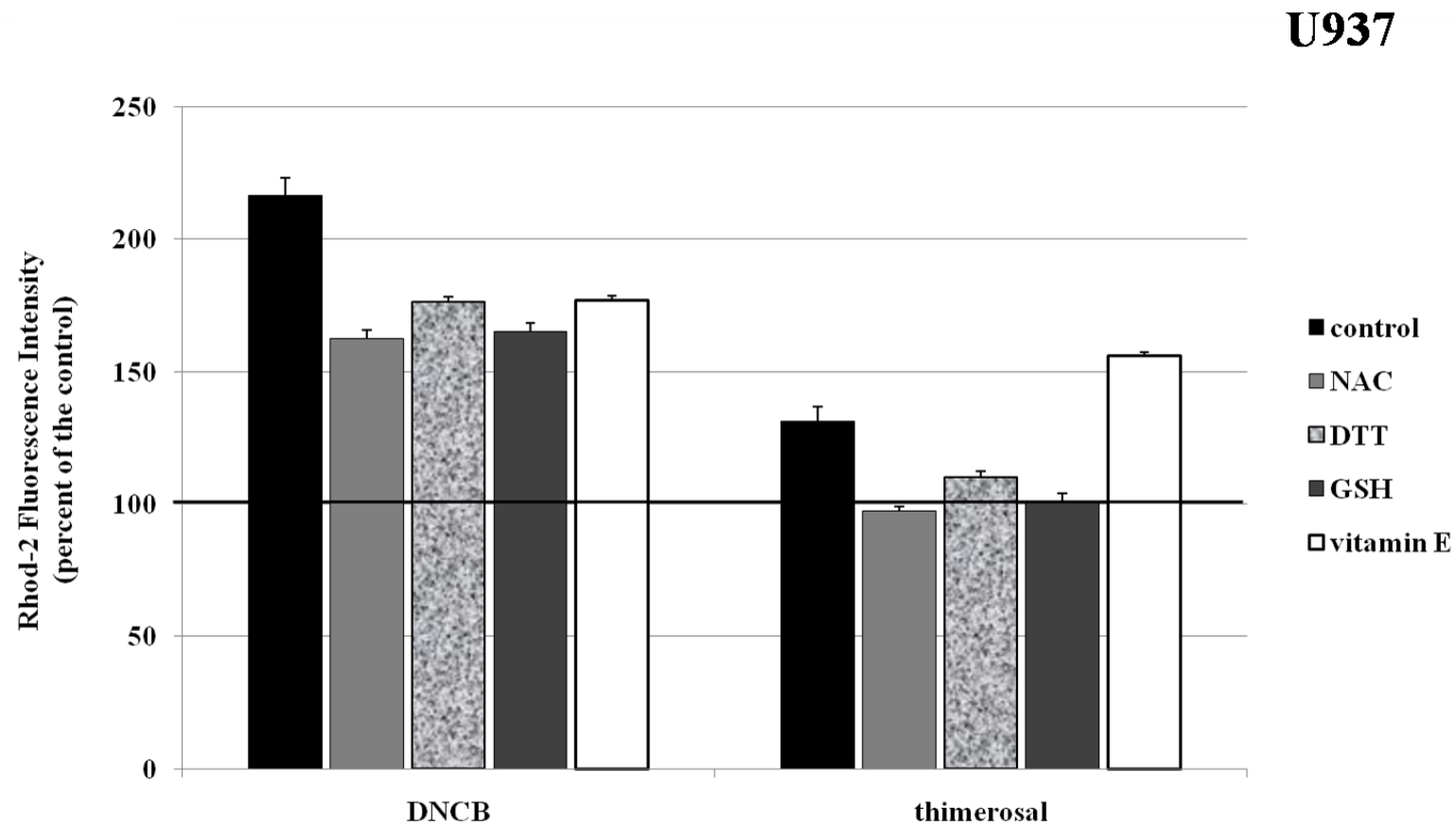


Fig. 5. Effect of thiol-dependent and -independent antioxidants on sensitizer-induced mitochondrial calcium (Ca^{2+}_m) influx. U937 were loaded with the Rhod-2 AM probe prior to pretreatment or not with the thiol-dependent antioxidants NAC and GSH (10 mM), the reducing agent DTT (50 μ M) or the thiol-independent radical scavenger vitamin E (10 μ M) for 1 h. Cells were then exposed to DNCB (at 30 μ M) and thimerosal (at 7.5 μ M), and Ca^{2+}_m was assessed after 3 h of treatment.

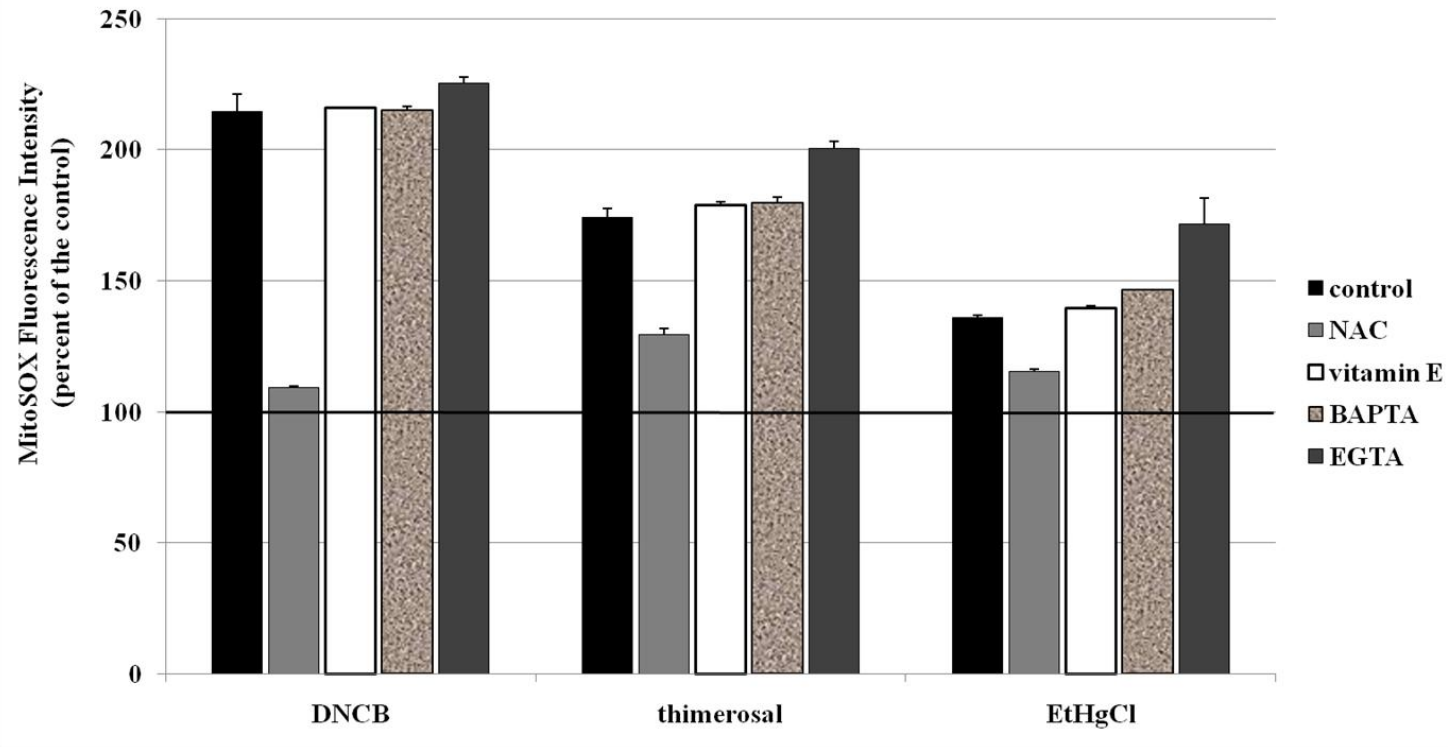


Fig. 6. Mitochondrial ROS preceded mitochondrial calcium (Ca^{2+}_m) influx. U937 were pretreated or not with the thiol-dependent antioxidant NAC (10 mM), the radical scavenger vitamin E (10 μM) or the calcium chelators BAPTA-AM (1 μM) and EGTA (0.5 mM) before chemical exposure (DNCB at 30 μM , thimerosal at 7.5 μM and EtHgCl at 2.5 μM). After 1 h of treatment, cells were harvested and loaded with MitoSOXTM. Data are representative of the mean of three independent experiments performed in triplicate.

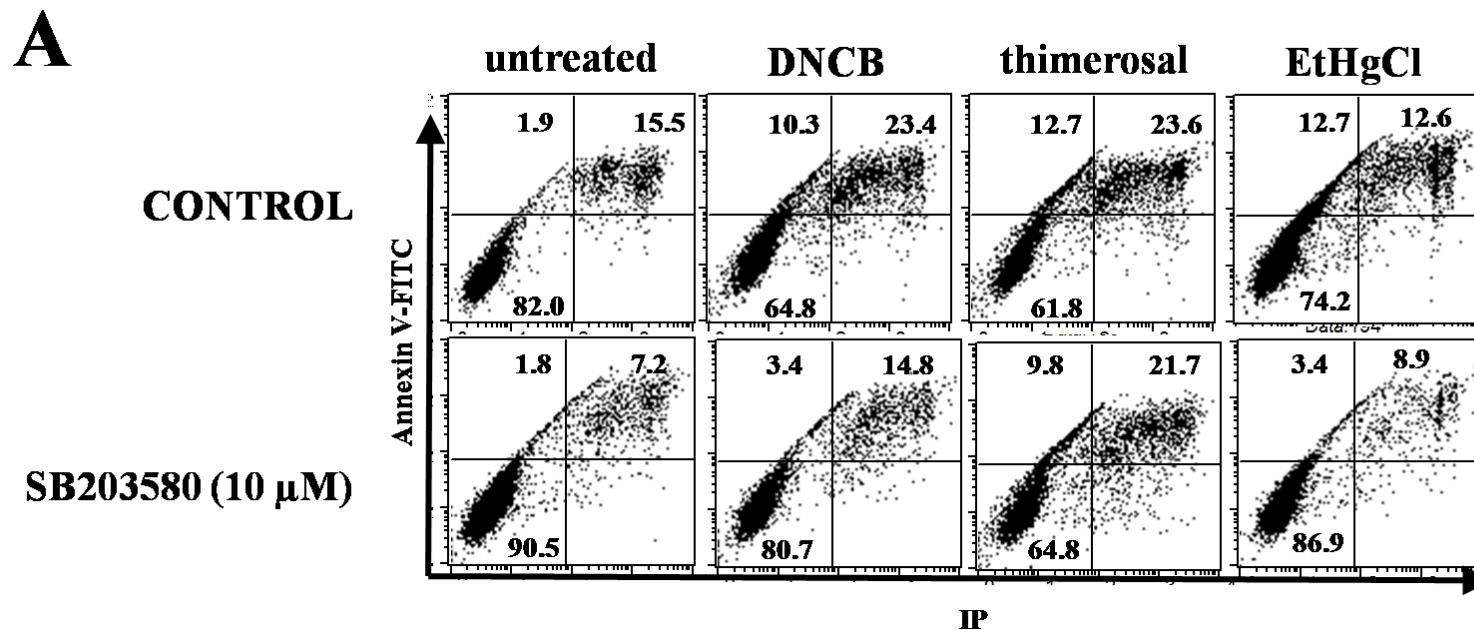
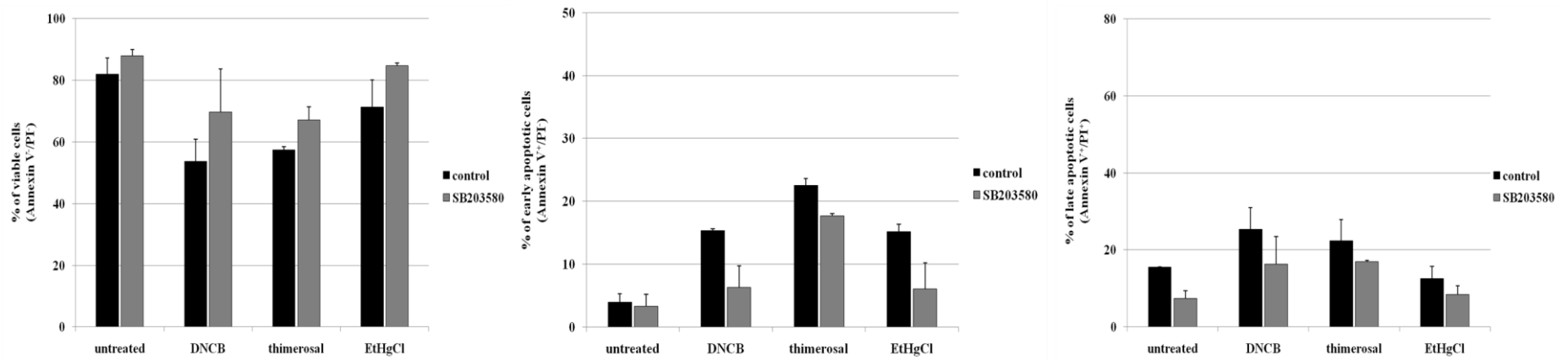
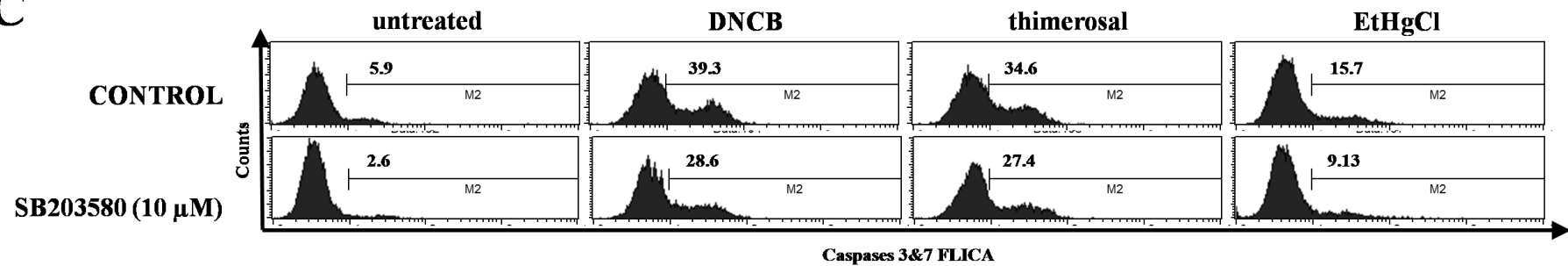
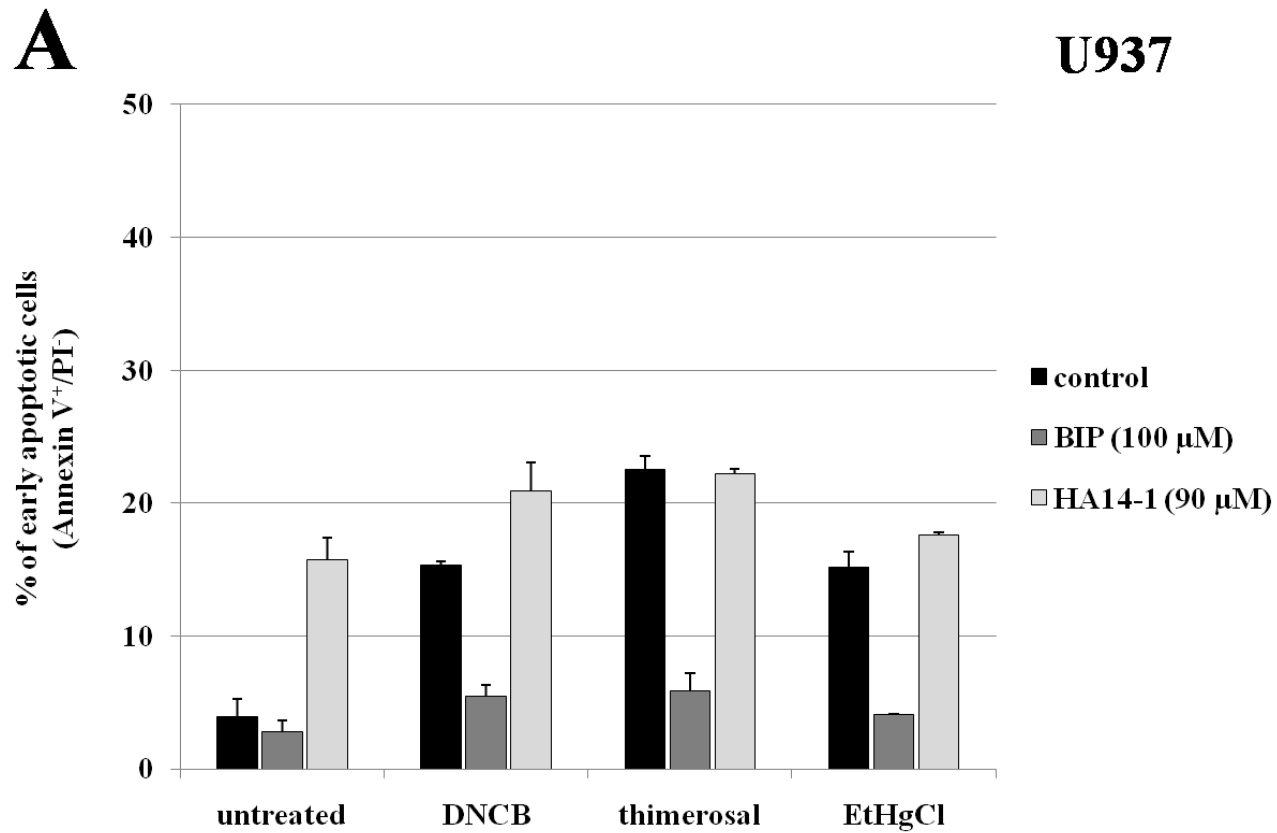
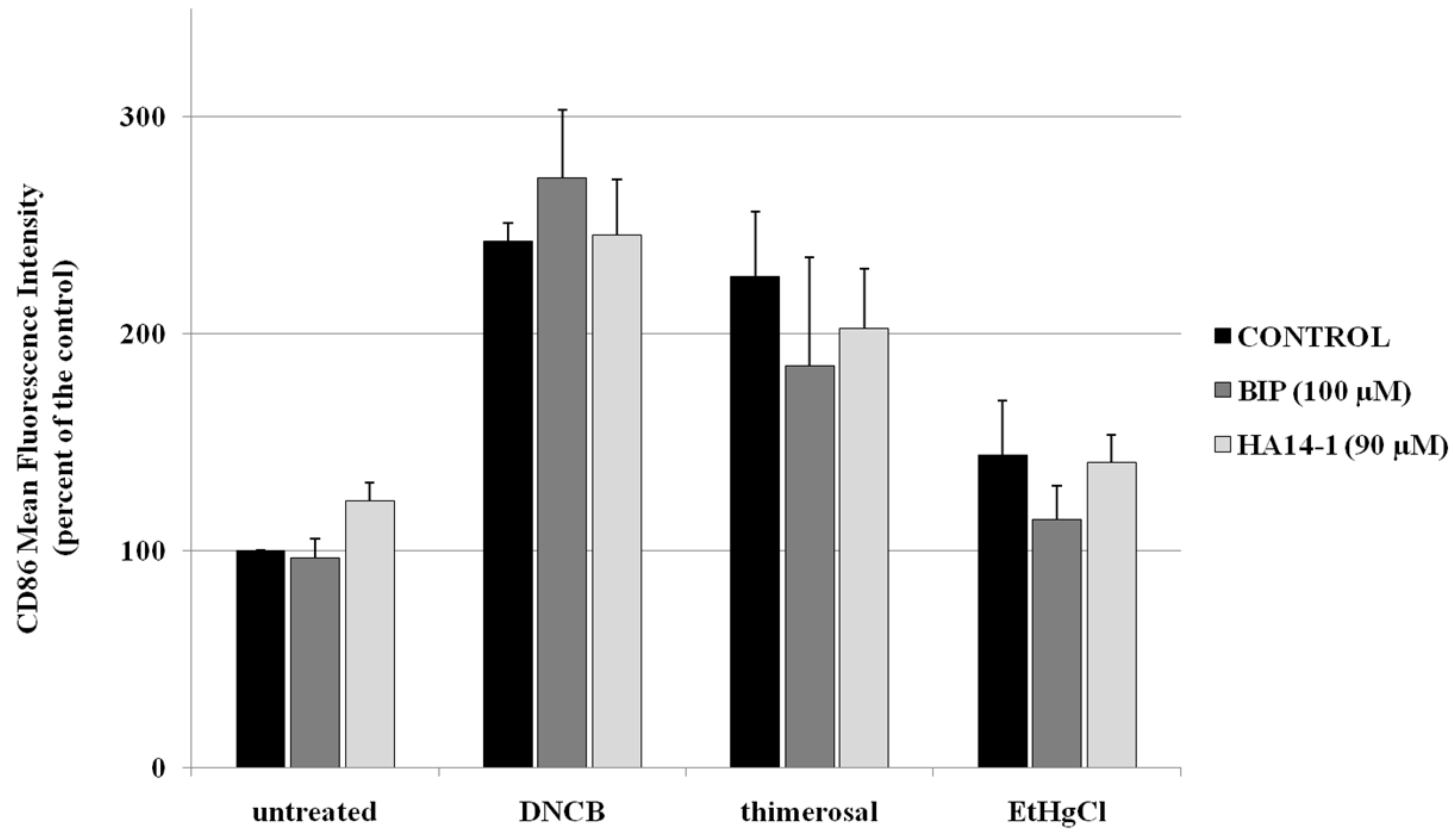


Fig. 7. p38 MAPK inhibition decreased chemical-induced apoptosis. U937 were pretreated 1 h with the specific p38 MAPK inhibitor SB203580 prior to exposure to DNCB (30 μ M), thimerosal (7.5 μ M) and EtHgCl (2.5 μ M). After 48 h of treatment, annexin V/propidium iodide double staining (A and B) and detection of activated caspases using the fluorescent caspase inhibitor FLICA (C and D) were performed. (A) Representative dot blots of the effect of SB203580 pretreatment on chemical-induced apoptosis. Viable cells were located in bottom left quadrant, early apoptotic cells in the upper left quadrant and necrotic/late apoptotic cells in the upper right quadrant as described in Materials and Methods. (B) Data obtained from three independent experiments showing the mean percentage \pm SD of viable cells, early and late apoptotic cells. (C) Representative histograms of the fluorescence distribution of caspases 3 and 7 specific activities. Inset line (M2) determines the percentage of U937 with high fluorescence staining and indicated numbers corresponding to the percentage of cells presenting active caspases 3 and 7. (D) Data obtained from three independent experiments showing the mean percentage \pm SD of cells positively stained with FLICA as determined in Fig. 7C.

B**C**



(p141-142) **Fig. 8.** Link between apoptosis and CD86 expression induced by sensitizers. U937 were pretreated for 1 h with BIP (100 μM) or HA14-1 (90 μM) prior to treatment with DNCB (30 μM), thimerosal (7.5 μM) and EtHgCl (2.5 μM). After 48 h of exposure to sensitizers, apoptosis according to with annexin V/propidium iodide double staining (A), and CD86 expression (B), were assessed. Data are representative of the mean of three independent experiments performed in triplicate.

B**U937**

DISCUSSION

L'ensemble des travaux présentés ici a permis de mettre en évidence des mécanismes intracellulaires spécifiquement activées en réponse au thimerosal, à l'EtHgCl et au DNCB versus l'irritant SDS et le TSA non mércurique. L'induction d'un stress oxydant par ces allergènes est un évènement induit précocement qui participe de manière directe à l'initiation du processus d'activation et à l'apoptose dans les cellules dendritiques (DCs).

Le stress oxydant, caractérisé ici par une production d'ERO (cytoplasmique et mitochondriale) associée à une chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) et une déplétion en glutathion (GSH) intracellulaire, est un acteur majeur de la signalisation induite par les allergènes et notamment dans la réponse au thimerosal et au DNCB. Plus spécifiquement, l'oxydation des groupements thiols est un mécanisme déterminant dans l'initiation de l'expression du CD86 et la sécrétion d'IL-8. Cependant, l'absence d'utilisation d'un plus grand nombre d'allergènes de classes différentes ne permet pas de conclure quant à la qualité discriminante de l'induction d'ERO et de la mesure du potentiel membranaire mitochondriale. Néanmoins, ces résultats mettent en valeur l'importance de l'étude de la réactivité des allergènes vis-à-vis des groupements thiols et de la nécessité de tenir compte du potentiel oxydant (rédox) des haptènes. Plus généralement, une meilleure compréhension du métabolisme cellulaire est essentielle au développement de modèles *in vitro* prédictifs du pouvoir sensibilisant.

Ces travaux mettent également en évidence une signalisation calcique induite par les allergènes, qui, bien qu'elle ne semble par directement impliquée dans le processus d'activation, est sous le contrôle de l'induction d'ERO.

En parallèle, ces travaux démontrent que, *in vitro*, les effets du thimerosal sur les cellules dendritiques sont comparables à ceux induits par le DNCB. Ces résultats confirment l'effet potentiellement sensibilisant de ce conservateur ou plus généralement, des composés mercuriques.

Enfin, ce travail, réalisé principalement sur la lignée U937, confirme que ce modèle est un bon candidat pour les tests de discrimination. La mesure de l'expression du CD86 reste le marqueur de référence induit par les allergènes dans cette lignée et n'est pas influencée par l'augmentation concomitante de la proportion de cellules apoptotiques.

Ensemble, ces travaux apportent des résultats prometteurs quant au développement de modèles biologiques prédictifs du potentiel sensibilisant d'une substance, et plus particulièrement, à l'utilisation de DCs ou de lignées cellulaires. Par ailleurs, les différentes stratégies d'approche, basées sur des modèles cellulaires ou acellulaires, donnent des résultats encourageants quant au développement non pas d'un seul test, mais d'une batterie de tests complémentaires modélisant *in vitro* la réaction d'eczéma allergique de contact (EAC).

PARTIE 2

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 3 : Impact de nanoparticules hybrides organiques-inorganiques (TiO₂/PABA) sur les cellules dendritiques humaines

I. Les nanoparticules

1. Introduction

Les nanomatériaux sont présents partout dans notre environnement, dans les pneus, les articles de sport, les composants électroniques, les peintures, les additifs et colorants alimentaires, les cosmétiques, et sont très attendus pour leur utilisation en médecine notamment pour le diagnostic, l'imagerie et la délivrance de drogues (Tableau 4). L'échelle caractéristique des nanomatériaux est le nanomètre. A de telles dimensions, la matière acquiert des propriétés inattendues et souvent totalement différentes de celles des mêmes matériaux à l'échelle micro ou macroscopique, notamment en terme de résistance mécanique, de réactivité chimique, de conductivité électrique ou de fluorescence.

Parmi les nanomatériaux, on peut distinguer 3 grandes familles :

- les nanoparticules (NPs) ou particules ultra-fines (PUF) sont par définition des nanomatériaux qui ont un diamètre inférieur à 100 nm dans au moins une de leur dimension bien que leurs agrégats puissent atteindre des tailles plus grandes. L'appellation « nanoparticules » est plutôt réservée aux particules manufacturées et destinées à des usages industriels comme le dioxyde de titane ou la silice.
- les nanofibres, les nanotubes, les nanofilaments et les nanobâtonnets, dont une des dimensions est supérieure à 100 nm.
- les nanofilms, les nanocouches et les nanorevêtements dont deux des dimensions sont supérieures à 100 nm.

SECTEUR D'ACTIVITE	EXEMPLES D'APPLICATIONS ACTUELLES ET ENVISAGEES
Automobile, aéronautique et espace	Matériaux renforcés et plus léger ; peintures extérieures avec effet de couleur, plus brillante, anti-rayures, anticorrosion et anti-salissures ; capteurs optimisant les performances des moteurs ; détecteur de glace sur les ailes d'avion ; pneumatique plus durables et recyclables.
Electronique et communications	Mémoire a haute densité et processeurs miniaturisés ; cellules

	solaires ; bibliothèques électronique de poche ; ordinateurs et jeux électroniques ultra-rapides ; technologies sans fil ; écrans plats.
Chimie et matériaux	Pigments ; poudres céramiques ; inhibiteurs de corrosion ; catalyseurs multi-fonctionnels ; vitres anti-salissures et autonettoyantes ; textiles et revêtements antibactériens et ultra-résistants ; membranes pour la séparation des matériaux (traitement de l'eau) ; couches ou multicouches fonctionnelles : isolation thermique.
Cosmétique	Crèmes solaires transparentes ; pâtes à dentifrice plus abrasives ; maquillage et notamment rouge à lèvres avec une meilleure tenue.
Santé	Appareils et moyens de diagnostic miniaturisés et nano-détection ; tissus et implants munis de revêtements améliorant la biocompatibilité et la bio-activité ; capteurs multifonctionnels ; analyse d'ADN ; membrane pour dialyse ; destruction de tumeurs par chauffage ; thérapie génique ; nanovecteurs pour transfert de gènes ; microchirurgie et médecine réparatrice ; nano-implants et prothèses.
Energie	Cellules photovoltaïques nouvelle génération ; nouveaux types de batteries ; fenêtres intelligentes ; matériaux isolants plus efficace ; photosynthèse artificielle (énergie « verte ») ; entreposage d'hydrogène combustible.
Environnement et écologie	Diminution des émissions de dioxyde de carbone ; production d'eau ultrapure à partir d'eau de mer ; pesticides et fertilisants plus efficaces et moins dommageables ; couches non toxiques fonctionnelles de capteurs pour la dépollution environnementale ; récupération et recyclage des ressources existantes ; analyseurs chimiques spécifiques.
Défense	Détecteurs et correcteurs d'agents chimiques et biologiques ; systèmes de surveillance miniaturisés ; système de guidage plus précis ; textiles légers et qui se réparent d'eux-mêmes.
Secteur manufacturier	Ingénierie de précision pour la production de nouvelles générations de microscopes et d'instruments de mesure et de nouveaux outils pour manipuler la matière au niveau atomique.

Tableau 4 : Principaux domaines d'applications des nanoparticules.

(D'après l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS))

2. Procédé de fabrication des nanoparticules

Les NPs peuvent être synthétisées selon deux approches (Figure 7) :

➤ l'approche ascendante (en anglais « bottom-up ») qui consiste à construire les NPs atome par atome, molécule par molécule ou agrégat par agrégat. L'assemblage ou le positionnement des atomes, des molécules ou des agrégats s'effectue de façon précise et contrôlée permettant l'élaboration de NPs dont la structure est complètement maîtrisée.

➤ l'approche descendante (en anglais « top-down ») qui consiste à réduire et plus précisément à miniaturiser les systèmes actuels en optimisant les technologies industrielles existantes.

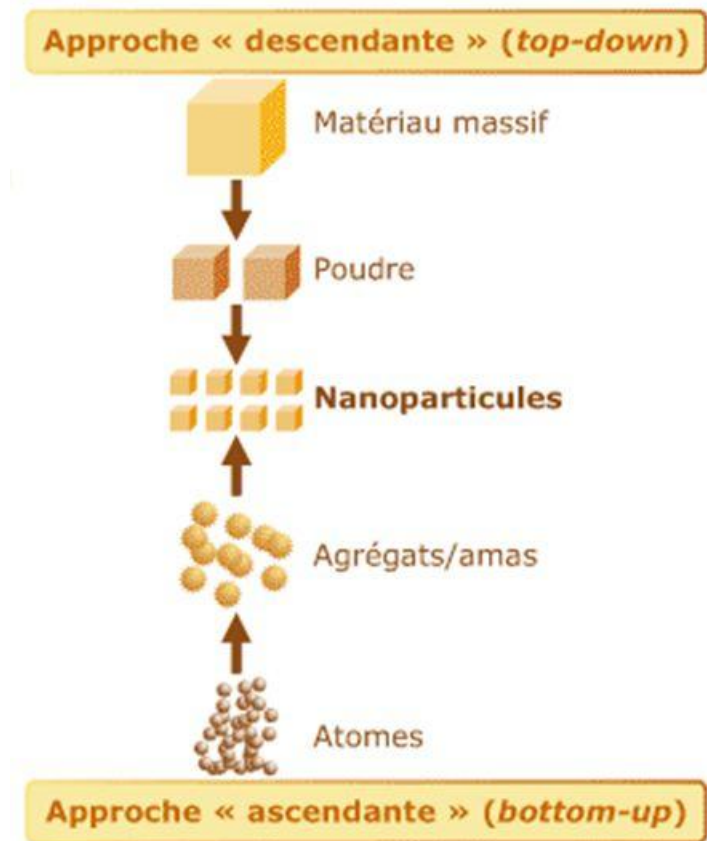


Figure 7 : Les deux approches d'élaboration des nanoparticules.

3. Risques pour la santé

Les NPs peuvent pénétrer dans l'organisme par 3 voies :

- l'appareil respiratoire qui constitue la voie majeure de pénétration des NPs.
- le système gastro-intestinal où les NPs peuvent se retrouver après avoir été ingérées ou après déglutition lorsqu'elles ont été inhalées.
- la pénétration transcutanée.

Plusieurs facteurs déterminent la toxicité des NPs. En plus des facteurs liés à l'organisme (susceptibilité individuelle) et à l'exposition (durée, site de pénétration), des facteurs inhérents aux NPs participent à leur caractère toxique : leur composition chimique, leur taille, leur forme, leur structure, leur

nombre, leur solubilité, leur degré d'agrégation et leur surface. La « surface spécifique » d'une particule est inversement proportionnelle à sa taille. Or la réactivité chimique d'une particule dépend de sa surface. Ainsi, une diminution de la taille des particules induit une augmentation de leur surface spécifique et donc de leur réactivité chimique.

II. Les nanoparticules d'oxyde de titane

1. Oxyde de titane et rayonnement ultra-violet

Le dioxyde de titane de formule TiO_2 provient de différents minerais (rutile, anatase, brookite, illménite...). Il est rare à l'état naturel et représente environ 0,6% de la croûte terrestre.

En cosmétique, les NPs d'oxyde de titane (TiO_2 -NPs) ou d'oxyde de zinc (ZnO -NPs) sont principalement utilisées comme filtres ultra-violet (UV) ajoutés aux crèmes solaires. Ce sont des pigments blancs, responsables des traces blanches laissées sur la peau par ces crèmes, qui reflètent et diffusent le rayonnement visible. Ces NPs sont insolubles, biologiquement inertes, et leurs performances dépendent de leur taille (Popov et coll., 2005). En plus des NPs d'oxyde métallique, ces crèmes contiennent des ingrédients de taille nanométrique « traditionnels » comme les nano-émulsions, les nanocapsules, les nanosomes et les liposomes (Nohynek et coll., 2008).

L'utilisation de TiO_2 -NPs dans les crèmes solaires et autres cosmétiques soulève plusieurs questions : Sont-elles toxiques ? Les NPs, de par leur petite taille, sont-elles capables de traverser la couche cornée de l'épiderme ? Et atteindre les tissus vivants sous jacents où se trouvent les cellules immunocompétentes ? Peuvent-elles alors être disséminées de manière systémique *via* le sang ?

2. Les rayonnements ultra-violet : rappel

Le rayonnement solaire peut être divisé en plusieurs zones (Figure 8). Les rayonnements ultraviolets (UV) sont des rayonnements électromagnétiques d'une longueur d'onde intermédiaire entre celle de la lumière visible et celle des rayons X. Le nom signifie « au-delà du violet », le violet étant la couleur de longueur d'onde la plus courte de la lumière visible. On distingue 3 « gammes » parmi les UV : les rayons UVA (400-320nm), UVB (320-280 nm) et UVC (280-10 nm). La totalité des UVC est arrêtée par la couche d'ozone. La quasi totalité des UVA (95%) et 5% des UVB atteignent la surface terrestre. Au niveau cutané, les UVA traversent l'épiderme et environ 30% atteint le derme, alors que les UVB traversent seulement la couche cornée et sont presque totalement absorbés par l'épiderme. Les rayonnements UV peuvent avoir un effet bénéfique, comme la synthèse de la vitamine D.

Les UVA sont responsables du hâle immédiat. Cependant ils attaquent les fibres d'élastine et de collagène de la peau et sont à l'origine du photovieillissement et provoquent 1/3 des cancers cutanés.

Les UVB sont responsables des coups de soleil et du bronzage durable, en stimulant la mélanine. Ils participent à la synthèse de la vitamine D et sont à l'origine de 2/3 des cancers cutanés.

Les UVA et les UVB sont immunosuppresseurs. Les UVA attaquent préférentiellement les lipides membranaires, générant des radicaux libres, et les UVB sont directement absorbés par l'ADN, entraînant des mutations.

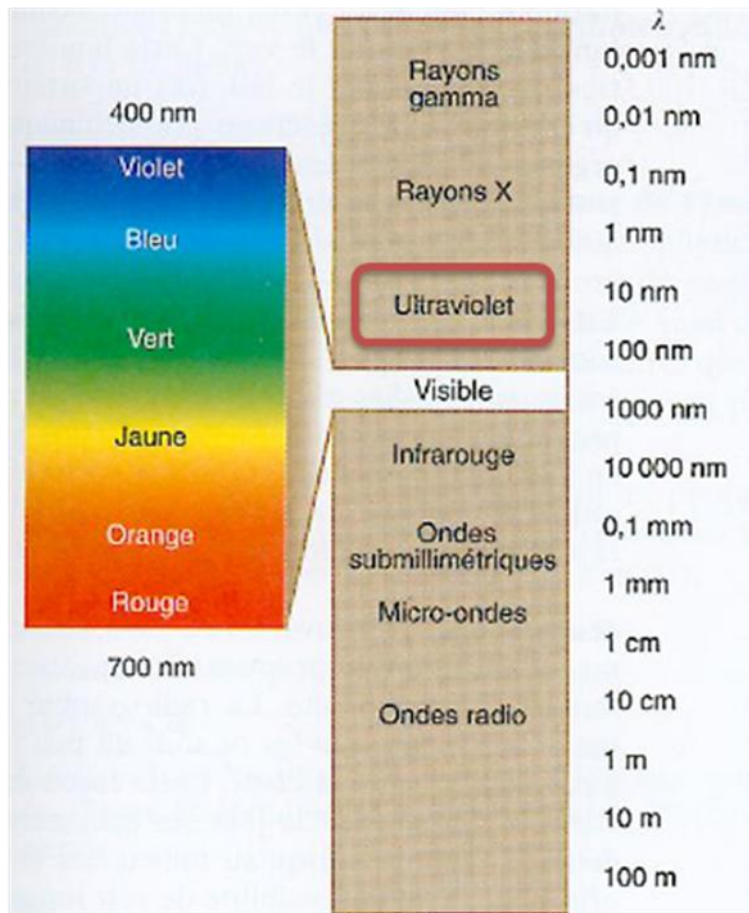


Figure 8 : Représentation du spectre solaire.

3. Pénétration cutanée des TiO₂-NPs

La pénétration des TiO₂-NPs dépend, bien entendu, de leur taille, de leur forme, de leurs propriétés de surface mais également du temps d'exposition. De nombreux travaux ont tenté de répondre à la question d'une éventuelle pénétration des TiO₂-NPs au travers de la peau et les résultats ne permettent pas de conclure quant au potentiel d'absorption cutanée des NPs (Nohynek et coll., 2008).

La plupart des travaux, réalisés soit sur de la peau de porc (Gamer et coll., 2006; Sadrieh et coll., 2010) soit sur de la peau humaine (Schulz et coll., 2002; Kertész et coll., 2005; Kiss et al., 2008), démontrent que la couche cornée est bien une barrière efficace (Pflücker et coll., 1999) et que les TiO₂-NPs sont détectées uniquement dans les couches supérieures mortes et ne pénètrent ni dans les couches profondes de l'épiderme ni dans le derme. Néanmoins, les TiO₂-NPs peuvent s'accumuler aux niveaux des follicules pileux où elles sont alors éliminées par le sébum (Lademann et coll., 1999; Lekki et coll., 2007; Alvarez-Román et coll., 2004).

A l'inverse, d'autres travaux évoquent la possibilité de la pénétration des TiO₂-NPs dans les couches vivantes de l'épiderme. Wu et coll., (2009) montrent *in vivo* la pénétration de TiO₂-NPs dans les couches basales de l'épiderme de peau de porc. Tinkle et coll., (2003) démontrent la pénétration de fluorosphères dans l'épiderme humain, phénomène également retrouvé pour certaines NPs métalliques (Baroli et coll., 2007).

Bien qu'une partie de ces travaux supportent l'hypothèse de l'absence de pénétration des TiO₂-NPs, notamment grâce à la couche cornée, il reste la question de la pénétration des TiO₂-NPs dans la peau dont la barrière cutanée est endommagée (Kiss et al., 2008; Larese et coll., 2009). En effet, l'exposition de NPs par le biais des cosmétiques et notamment des crèmes solaires, peut se faire dans des conditions de peau lésée (coup de soleil, petites plaies) et du coup, les TiO₂-NPs peuvent entrer en contact direct avec les cellules cutanées.

4. Toxicité des TiO₂-NPs

L'innocuité des NPs est à ce jour encore un sujet controversé. Le risque que des NPs pénètrent dans l'organisme *via* la peau et se répandent de manière systémique a été évoqué (Hoet et coll., 2004; Oberdorster et coll., 2005).

Les TiO₂-NPs seraient plus toxiques que les microparticules de TiO₂ (Stone et coll., 2007). Cependant, une étude comparative *in vitro* de la toxicité de différentes NPs (Yamamoto et coll., 2004), réalisée sur des fibroblastes et des macrophages murins suggèrent que ce n'est pas tant la taille de la NPs qui compte mais plutôt le volume totale de NPs phagocytées par les cellules. En effet, il semblerait que la toxicité des NPs soit liée à leur capacité à entrer en contact et/ou à être capté par les cellules. Cependant, à ce jour, aucune étude n'a étudié le mécanisme d'entrée des NPs dans les cellules.

Bien que des travaux récents (Warheit et coll., 2007) démontrent l'innocuité des TiO₂-NPs en utilisant une batterie de tests incluant l'évaluation de la génotoxicité, des tests de sensibilisation et

d'irritation dermique et oculaire, des tests de toxicité pulmonaire et orale et l'étude de leur impact sur l'environnement (écotoxicité), la principale inquiétude réside dans le fait que les TiO₂-NPs peuvent induire une phototoxicité et une photogénotoxicité. En effet, le TiO₂ est un photocatalyseur capable de produire des ERO (Long et coll., 2006; 2007; Vileno et coll., 2007) qui vont altérer/modifier les protéines et les constituants cellulaires (Wamer et coll., 1997; Lu et coll., 2008). Wu et coll., (2009) montrent que des souris soumises à une application topique de TiO₂-NPs ont une activité de l'enzyme antioxydante SOD diminuée et une augmentation du malonedialdéhyde (MDA). L'implication du stress oxydant dans la toxicité induite par les TiO₂-NPs a également été mis en évidence dans des cellules épithéliales bronchiques (Park et coll., 2008), dans les lignées U937 et THP-1 (Vamanu et coll., 2008; Morishige et coll., 2010) mais également *in vivo* chez la souris (Trouiller et coll., 2009).

III. TiO₂-NPs et cellules dendritiques

Leur capacité à phagocyter des corps étrangers (Figure 9), leur position au sein de l'épiderme et surtout leur rôle clé dans l'immunité inné et spécifique font des cellules dendritiques (DCs) de bonnes candidates pour l'étude de la toxicité et du pouvoir sensibilisant des TiO₂-NPs.

L'impact des NPs sur les DCs a été tout particulièrement étudié dans un contexte médical où les applications des NPs sont nombreuses : vectorisation de médicaments, thérapie génique, imagerie médicale, traitement des tumeurs mais aussi dans la stratégie de vaccination (pour revue, Reddy et coll., 2006). Cependant peu de travaux ont étudié l'impact des TiO₂-NPs sur les DCs, notamment dans un contexte de sensibilisation.

En utilisant le test d'irritation cutanée sur lapins et le LLNA, Warheit et coll. (2007) démontrent que les TiO₂-NPs ne sont ni des irritants, ni des sensibilisants. Cependant, les TiO₂-NPs ont un effet adjuvant et favorisent la sensibilisation à l'ovalbumine chez la souris (de Haar et coll., 2006; Larsen et coll., 2010).

Dans le but de développer, ici aussi, des méthodes alternatives à l'expérimentation animale, des modèles d'étude *in vitro* de la toxicité des NPs se sont développés (Rothen-Rutishauser et coll., 2007; 2008; Schanen et coll., 2009). Ces systèmes de coculture intégrant plusieurs types cellulaires et notamment des DCs, reproduisent les fonctions barrière et immunologiques d'un épithélium et permettent d'étudier les effets des TiO₂-NPs. Les travaux de Rothen-Rutishauser et coll., (2007; 2008) montrent que les DCs internalisent efficacement les TiO₂-NPs et ces dernières sont détectées au niveau du cytoplasme, soit sous forme de TiO₂-NPs libres, soit sous forme d'agrégats dans des vésicules membranaires. La capacité des DCs à internaliser des NPs a également été démontré avec des NPs magnétiques à base de fer (Goya et coll., 2008). De plus, l'exposition des DCs à différentes formes de TiO₂-NPs (anatase, rutil et nanotube) entraîne leur activation, déterminée par l'augmentation d'expression du CD86, CD83 et du récepteur CCR7 et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, INF- γ et TNF- α . Par contre, seules les TiO₂-NPs (versus microparticules de TiO₂) sont capables d'induire une prolifération lymphocytaire par les DCs

(Schanen et coll., 2009) confirmant que les nano et les microparticules ont des propriétés différentes. Ces résultats sont retrouvés dans des DCs murines (Palomäki et coll., 2010).

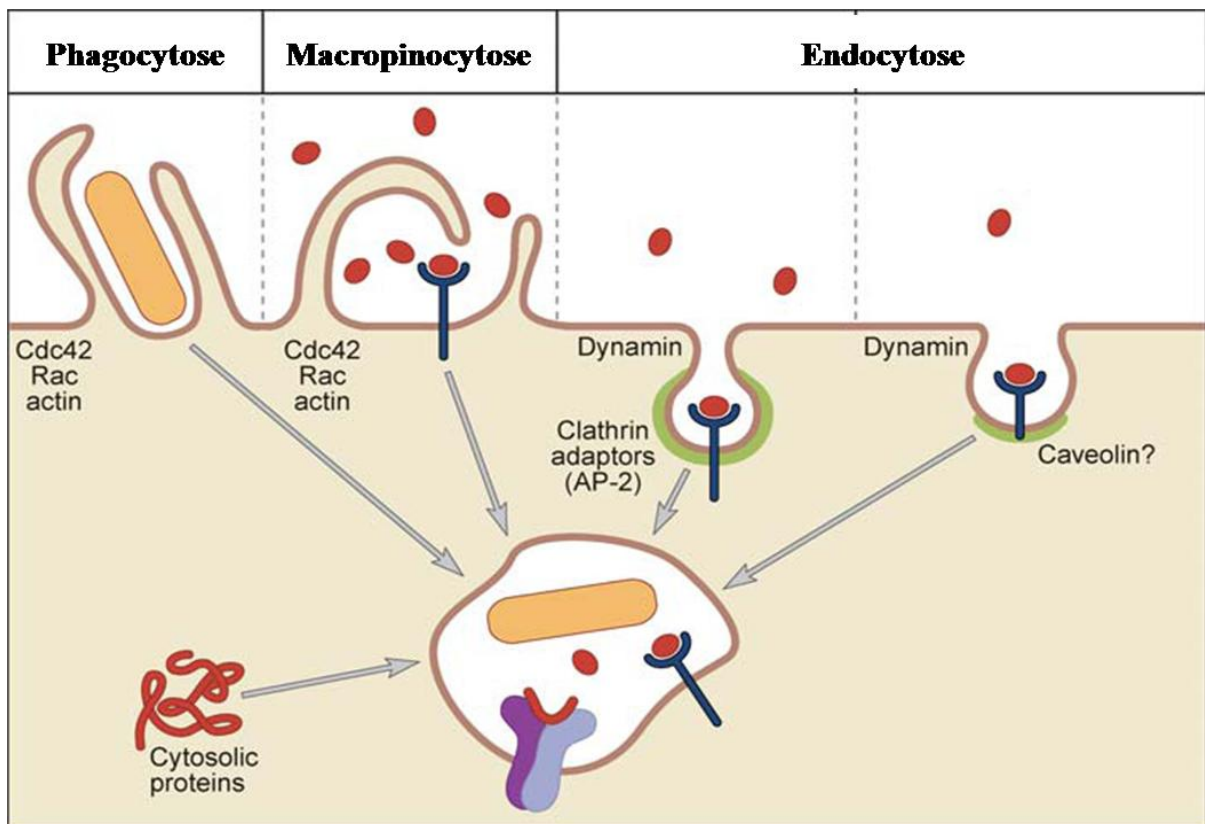


Figure 9 : Les mécanismes de capture de corps étrangers par les cellules dendritiques.

(D'après Trombetta et Mellman, 2005)

La phagocytose permet l'ingestion de particules supérieures à 1 μm . La macropinocytose est un mécanisme constitutif des cellules dendritiques et résulte de l'invagination de la membrane plasmique et l'endocytose fait intervenir des récepteurs.

IV. Nanoparticules hybrides organiques/inorganiques

1. Définition

Les NPs utilisées dans les travaux présentés ci-après sont dites « hybrides ». Ce sont des NPs d'oxyde métallique inorganique (TiO_2) sur lesquelles ont été greffées, en surface et de manière covalente, des molécules organiques choisies pour leur propriété intrinsèque d'agent protecteur contre les UV (filtre solaire organique). Ces filtres organiques absorbent la lumière en agissant comme la mélanine, le filtre naturel de la peau. Les filtres organiques peuvent être absorbés par l'épiderme et même provoquer des allergies, des irritations ou des réactions photoallergiques.

Le PABA (acide para-aminobenzoïque) est l'un des plus répandus filtres organiques existants d'origine synthétique. Il est soluble dans l'eau et absorbe efficacement les UVB. Les filtres solaires à base de PABA sont relativement résistants à l'eau et à la transpiration car il se lie aux cellules de l'épiderme dans la couche cornée.

2. TiO_2 /PABA NPs

Le Dr. Stéphane Danièle et son équipe de l'Institut de Recherches sur la Catalyse et l'Environnement de Lyon (IRCELYON, CNRS-UMR5256) a synthétisé des NPs hybrides organique/inorganique cristallisées (Figure 10) composées d'oxyde de titane et de PABA (TiO_2 /PABA NPs). Ces NPs sont fabriquées en une seule étape, en milieu aqueux (procédé éco-conceptuel), à partir de précurseurs moléculaires définis, permettant de moduler et de combiner les propriétés organiques et inorganiques (approche « bottom-up and one pot »).

Ces TiO_2 /PABA NPs répondent à un besoin de photoprotection efficace sur la totalité du spectre, et notamment efficace contre le rayonnement UVA (Figure 11), tout en limitant la pénétration des filtres organiques à travers la peau.

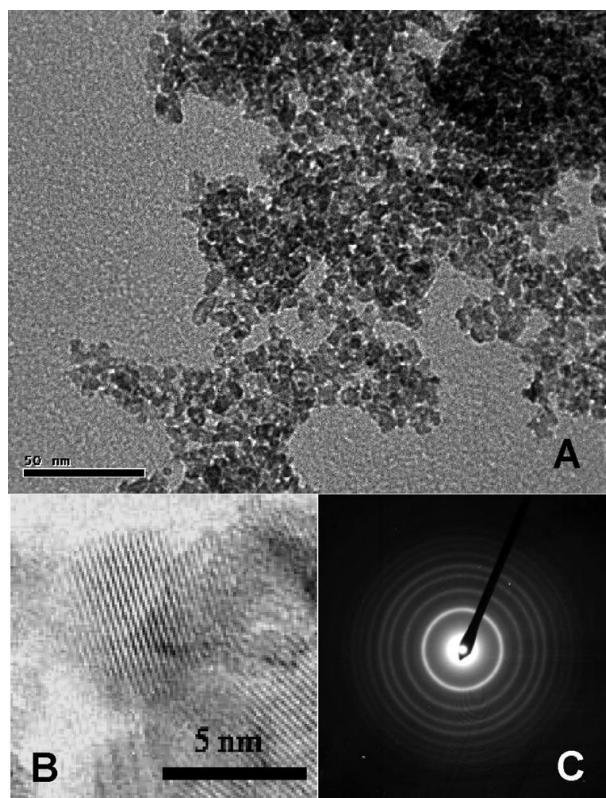


Figure 10 : Nanoparticles hybrides TiO_2/PABA (extrait de Rahal et coll., 2008).

A) TEM, (B) HRTEM et (C) images SAED

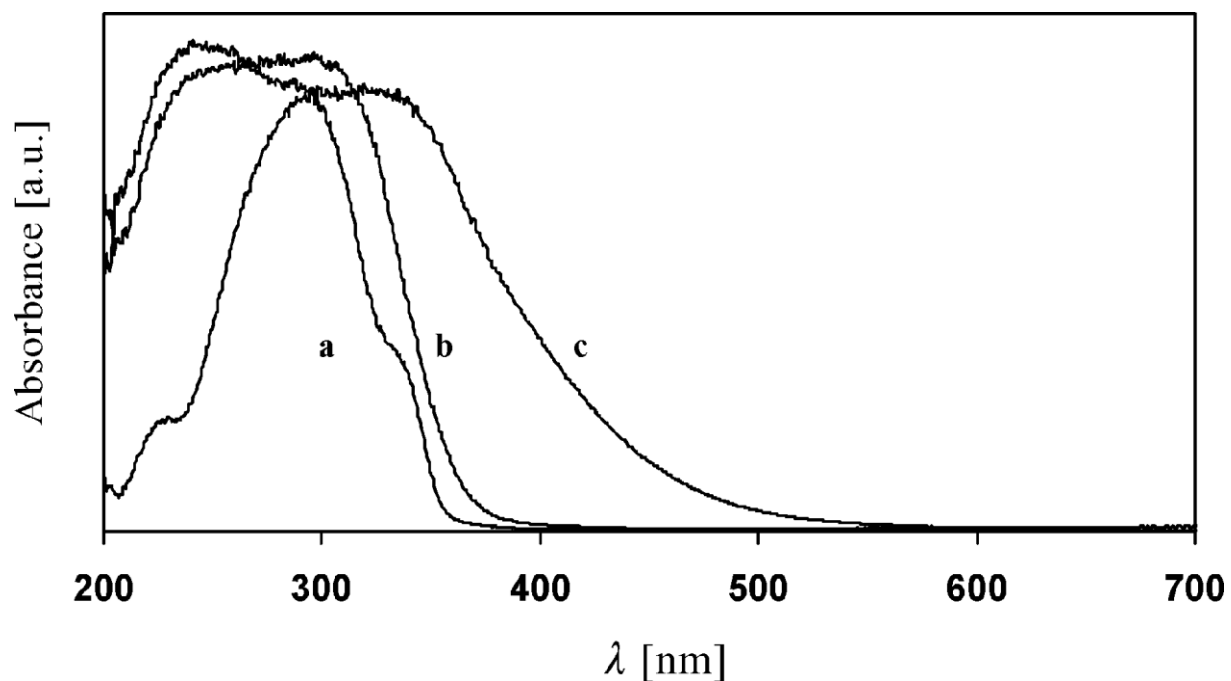


Figure 11 : Spectre d'absorption des TiO_2/PABA NPs (extrait de Rahal et coll., 2008).

A) PABA, B) TiO_2 et C) PABA/TiO_2

OBJECTIFS DES TRAVAUX

Les nanoparticules (NPs) sont présentes dans un grand nombre de produits destinés à la consommation, comme dans les additifs et les colorants alimentaires, mais aussi dans les cosmétiques et notamment les crèmes solaires. L'innocuité des ces NPs, et plus particulièrement des NPs d'oxyde de titane (TiO₂-NPs) ajoutées dans ces crèmes, n'est à ce jour pas démontré. La pénétration des NPs à travers la peau est un sujet controversé, qui, selon les modèles d'études et le type de NPs utilisées, aboutit à des résultats contradictoires. De ces travaux émergent néanmoins le concept que la couche cornée de l'épiderme est bien une barrière effectrice à la pénétration des NPs, sauf en condition de peau lésée. Dans ce cas, les NPs sont prédisposées à pénétrer l'épiderme et à être captées par les DCs résidentes pouvant éventuellement entraîner une sensibilisation.

En utilisant des TiO₂-NPs hybrides (TiO₂/PABA) très bien caractérisées (Rahal et coll., 2008), ces travaux ont pour but de déterminer leurs effets sur des mono-DCs notamment en terme de toxicité, directe ou après irradiations ultra-violettes (UV). Afin de déterminer un éventuel effet sensibilisant de ces TiO₂/PABA NPs, ce travail applique les modèles et techniques mis au point dans les articles précédents utilisant des allergènes de contact tels que le thimérosal et le DNCB. Ainsi la réponse des mono-DCs a été évaluée par la mesure des marqueurs d'activation, la sécrétion de cytokines et la production d'espèces dérivées de l'oxygène (ERO).

ARTICLE 4

Internalisation of hybrid titanium dioxide/*para*-amino benzoic acid nanoparticles in human dendritic cells did not induce toxicity and changes in their functions.

Migdal C, Rahal R, Rubod A, Callejon S, Colomb E, Atrux-Tallau N, Haftek M, Vincent C, Serres M, Daniele S.

➤ Soumis à *Toxicology Letters*

Ce travail a pour but d'étudier les effets de NPs hybrides organique/inorganique composées d'oxyde de titane et de PABA (TiO₂/PABA NPs) sur des cellules dendritiques (DCs) et leurs fonctions.

Premièrement, l'innocuité des TiO₂/PABA NPs a été démontrée *in vitro* par l'évaluation de leur toxicité sur des mono-DCs. La capacité des mono-DCs à phagocyter les TiO₂/PABA NPs a été déterminée par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques et leur localisation intracellulaire par microscopie électronique et confocale. Les résultats montrent que les TiO₂/PABA NPs sont très rapidement phagocytées par macropinocytose (dès 15 min) et se retrouvent localisées au niveau cytoplasmique, principalement sous forme d'agrégats, dans des vésicules membranaires ou sous forme libres.

Deuxièmement, l'impact des TiO₂/PABA NPs sur les fonctions des DCs a été évalué. Les mono-DCs traitées par les NPs n'expriment pas le marqueur d'activation CD86 ni le HLA-DR, nécessaires respectivement à l'activation des lymphocytes T naïfs et à la présentation antigénique, et ne produisent pas d'IL-8 (cytokine pro-inflammatoire). De plus, les mono-DCs prétraitées par les TiO₂/PABA NPs ne montrent pas de différence significative dans leur réponse aux allergènes comparées à des mono-DCs sans NPs et, dans nos conditions expérimentales, aucune production d'ERO n'est détectée.

Les TiO₂/PABA NPs sont reconnues pour être photoprotectrices et sont utilisées pour cette propriété dans les crèmes solaires. La dernière partie de ce travail porte ainsi sur l'effet des TiO₂/PABA NPs sur les DCs après irradiation UV. Les résultats montrent que les TiO₂/PABA NPs ne sont pas phototoxiques pour les mono-DCs en présence d'UVA ou d'un simulateur solaire. A l'inverse, un rôle protecteur des TiO₂/PABA NPs est démontré. Les mono-DCs prétraitées par les TiO₂/PABA NPs ont une meilleure viabilité et induisent moins d'ERO après irradiation UVA que les cellules non prétraitées.

Internalisation of hybrid titanium dioxide/*para*-amino benzoic acid nanoparticles in human dendritic cells did not induce toxicity and changes in their functions.

Camille Migdal*, Raed Rahal[†], Alain Rubod[‡], Sylvie Callejon*, Evelyne Colomb*, Nicolas Atrux-Tallau*, Marek Haftek*, Claude Vincent*, Mireille Serres* and Stéphane Daniele[†]

*EA 41-69, Université Lyon 1, Pavillon R, Hôpital Edouard Herriot, 69437 Lyon, France;

†CNRS-UMR5256, Université Lyon 1, Institut de Recherches sur la Catalyse et l'Environnement de Lyon, IRCELYON, 69100 Villeurbanne, France

‡CNRS-UMR146, Institut Curie, 75248 Orsay, France.

Corresponding author: Dr. Mireille SERRES, mireille.serres@univ-lyon1.fr

Address: Hopital Edouard Herriot, Pavillon R, 69437 Lyon Cedex 03, France

Telephone: (33) 4 72 11 02 88; Fax: (33) 4 72 11 02 90

Abstract

Nanoparticles (NPs) have been reported to penetrate into human skin through lesional skin or follicular structures. Therefore, their ability to interact with dendritic cell (DCs) was investigated using DCs generated from monocytes (mono-DCs). Hybrid titanium dioxide/*para*-amino benzoic acid (TiO₂/PABA) NPs did not induce any toxicity. NPs were internalised into DCs through macropinocytosis and not by a receptor-mediated mechanism. Confocal microscopy showed that NPs were not detected in the nucleus. These data are confirmed by electronic microscopy which demonstrated that hybrid NPs were rapidly in contact with cellular membrane and localised into cytoplasmic vesicles without colocalisation with clathrin-coated vesicles. Hybrid NPs did not induce CD86 or HLA-DR overexpression or cytokine secretion (IL-8 and TNF- α) indicating no DC activation. Internalisation of hybrid NPs did not modify DC response towards sensitisers such as nickel and thimerosal or LPS used as positive controls. Moreover, hybrid NPs did not induce any oxidative stress implicated in DC activation process. After mono-DC irradiation by ultraviolet A (UVA), hybrid NP-treated cells did not produce UVA-induced reactive oxygen species (ROS) and exhibited a better cell viability compared with UVA-irradiated control cells, suggesting a protecting effect of hybrid TiO₂/PABA NPs against UVA-induced ROS.

Keywords: hybrid TiO₂/PABA nanoparticles, human dendritic cells, UV irradiation, reactive oxygen species.

1. Introduction

Titanium dioxide (TiO₂) materials are used ubiquitously as inorganic protective agents to sunscreens and cosmetic products. In order to adjust the sun protection factor (SPF), organic selective agents are added such as *p*-amino benzoic acid (PABA), which absorbs UVB radiation (290–320 nm) while letting UVA radiation (320–400 nm) pass through to produce a tan.

Currently, quests about nanoparticles (NPs) disturbance of cell functions through direct contact are of great importance in relation to public health, occupational safety, environmental protection, and societal expectations.

With regard to the potency of NPs to penetrate the skin, several studies reported a lack of penetration of NPs in human epidermis or reconstructed human skin models (Baroli et al., 2007; Cross et al., 2007; Kiss et al., 2008; Kuntsche et al., 2008), and in non-follicular structures of porcine skin (Alvarez-Roman *et al.*, 2004). However, studies performed with micronized TiO₂ particles in human skin xenografts provided evidence that the stratum corneum of epidermis is indeed an effective barrier, but NPs may significantly disturb cell functions through direct contact, when the skin barrier is disrupted (Kiss et al., 2008) or through hair follicles, reaching the viable epidermis (Baroli et al., 2007; Lademann et al., 2007; Larese et al., 2009). These data were confirmed by transmission electron microscopy (Cross et al., 2007).

It was noteworthy that one possible pathway for NPs cutaneous penetration, through damaged skin or hair follicles, can be done *via* epidermal cells such as keratinocytes and/or Langerhans cells (dendritic cells; DCs). Since recent studies reported the interactions of NPs with human epidermal keratinocytes (Ryman-Rasmussen et al., 2007; Zhang et al., 2008), this prompted us to focus our work on the effect of well-characterised TiO₂ and surface-modified TiO₂ NPs on DCs, very efficient antigen-presenting cells playing an important role in initiating and regulating immune responses.

The aim of our study was then to investigate potential toxicity of our home made NPs which could be associated with DC function disturbance. Until now, only few studies were reported on the internalisation and localisation of NPs in DCs (Goya et al., 2008) and on their toxicity (Teeguarden et al., 2007).

For this purpose, the mechanisms by which NPs will penetrate into DCs, their distribution and if, in contact with NPs, DC viability will be decreased or their functions changed were discussed. In this study, DCs were generated *in vitro* from monocyte differentiation (mono-DCs). The toxicity of NPs was evaluated by their effect on cell viability. The capacity of NPs to penetrate into mono-DCs was assessed using several specific markers to determine the mechanisms by which NPs could be internalised such as macropinocytic process or a mechanism mediated by receptors. If NPs were able to penetrate into the cell, their precise localisation and distribution in mono-DCs were assessed by confocal and electronic microscopies. As NPs are able to induce tissue inflammation, their capacity to induce pro-inflammatory cytokine secretion such as IL-8 and TNF- α , main cytokines secreted by activated mono-DCs, was assessed (Aiba et al., 1997; Hulette et al., 2002). In parallel, the changes in

phenotypical marker expression, essentially CD86 and HLA-DR, both hallmark of DC activation, were measured.

This work was performed using well-characterised and home made TiO₂ (Goutailler et al., 2003) and analogues hybrid TiO₂/PABA NPs (Rahal et al., 2008, Rahal et al., 2009). Their ability to generate oxidative stress (Vileno et al., 2007) was quantified, since it is well known that oxidative stress induces DC activation in response towards sensitisers (Alderman et al., 2002; Rutault et al., 1999; Migdal et al., 2010).

Finally, since our hybrid NPs can be used as additives in sunscreens formulations (Rahal et al., 2008), their potential photo-toxicity and effect on DCs were evaluated after ultraviolet (UV) irradiation. For this purpose, solar-simulated UV irradiation was used and compared with direct irradiation with UVA.

2. Materials and Methods

2.1. Nanoparticles

Anatase TiO₂/PABA NPs (5-6nm) were synthesized *via* a molecular approach by hydrolysis of [Ti(OiPr)₃(PABA)]_m precursor according to the method described by Rahal *et al.* (2008). This synthetic methodology appeared to be an efficient functionalisation-controlled method for the synthesis of hybrid TiO₂ nanoparticles that could be used to adjust the organic/inorganic balance and thus the combined properties of the hybrid. Hence two fully and well-characterised nanomaterials were studied depending on the amount of PABA (about 7% or 20% in weight) anchored onto the TiO₂ surface (see Rahal *et al.*, 2008 and Rahal *et al.*, 2009 for C,H,N elemental analyses, FT-IR spectroscopy, ¹³C solid state NMR, UV-visible spectroscopy, transmission electron microscopy (TEM), nitrogen adsorption-desorption Isotherms (BET), TGA/TDA, powder X-ray diffraction (XRD), X-ray Photoelectron spectroscopy (XPS) and Inelastic Neutron Scattering data). For sake of comparison, similar anatase TiO₂ nanoparticles (5-7 nm) without PABA were elaborated according the method described by Goutailler et al., (2003). For some experiments, hybrid TiO₂/PABA at 7% NPs were labeled by direct coupling of -NH₂ surface chemical groups with 0.1 equivalent (towards PABA content) of fluorescein isothiocyanate (FITC) or with N-hydroxysuccinimidyl ester of the fluorophore Alexa488 in water free DMF.

2.2. Chemicals and fluorescent probes

The chemicals such as monensin, chloroquine, phenylarsine oxide (PAO), glutaraldehyde, sodium cacodylate, hydrogen peroxide (H₂O₂), thimerosal, nickel sulfate (NiSO₄), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB), sodium dodecyl sulphate (SDS), lipopolysaccharide (LPS), poly-L-lysine were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Uranyl acetate and lead citrate were purchased from Prolabo (Paris, France) and osmium tetroxide and Epon were from Electron Microscopy Sciences (EMS, Hatfield, USA).

Fluorescent probes such as 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA), Dextran-FITC and Lucifer Yellow were purchased from Molecular Probes (Interchim, France),

2.3. Purification and culture of human peripheral blood monocyte-derived DCs

DCs were generated *in vitro* from human mononuclear cells (CD14⁺, monocytes). Monocytes were purified by magnetic selection of CD14⁺ cells, using a specific antibody and a magnetic cell separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The resulting suspension routinely contained more than 80% CD14⁺ cells. Mono-DCs were generated from monocytes after culture for 5 days in six-well tissue culture plates (1x10⁶ cells/ml) in RPMI 1640 medium with GlutamaxTM, 25 mM HEPES and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS; Abcys, Paris, France) and with the recombinant human cytokines, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) at 500 units/ml (Immunotools, Friesoythe, Germany) and interleukin (IL)-4 at 50 units/ml (R&D System, Lille, France). Only preparations containing more than 80% of CD1a-positive cells (a specific marker of immature DCs) were used.

2.4. Mono-DC treatment

The cultured immature DCs, seeded at 1 x 10⁶ cells/ml, were treated in X-Vivo serum-free medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with the recombinant cytokines GM-CSF at 500 units/ml and IL-4 at 50 units/ml. Hybrid TiO₂/PABA at 7% or 20% and TiO₂ alone were suspended at 1 mg/ml in X-Vivo medium (stock suspension). The resulting suspensions were sonicated or filtered at 0.22 μm. To verify if hybrid NPs can induced DC activation, mono-DCs were exposed, for 48 h, to hybrid TiO₂/PABA NPs, TiO₂ or PABA at 100 μg/ml, in comparison with LPS (at 100 ng/ml), used as a positive control, and the irritant SDS (at 10 μg/ml), used as a negative control.

In order to determine if NPs modified DC response towards sensitizers, mono-DCs were pre-incubated for 6 h with PABA, TiO₂ or hybrid TiO₂/PABA NPs before treatment with sensitizers such as thimerosal (at 3 μg/ml) and NiSO₄ (at 263 μg/ml).

For ROS assessment, DNCB (at 6 μg/ml) and the oxidative stressor H₂O₂ (at 1 mM) were used as positive controls.

PABA, thimerosal, NiSO₄, LPS, SDS and H₂O₂ were dissolved in culture medium and DNCB in dimethyl sulfoxide (DMSO) which did not exceed 0.04% and was used as a negative control. Cells treated with DNCB, thimerosal and H₂O₂ were rinsed in phosphate buffered saline (PBS) after 1 h of treatment to prevent from their toxic effect.

2.5. Nanoparticle cytotoxicity

The cytotoxic effect of PABA, TiO₂ and hybrid NPs was assessed with the colorimetric assay WST-1 (Cook and Mitchell, 1989), as described by Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). WST-1 measures mitochondrial activity in living cells, is more stable than MTT reagent and can be used without an additional solubilisation step. The optical densities were read using a microplate spectrophotometer (ELX 800, Bio-Tek Instruments, Vermont, USA).

Cell viability was also assessed with propidium iodide (PI) dye exclusion and analysed by flow cytometry. PI negative cells were considered as viable cells. Briefly, treated cells were washed in cold PBS, stained with 12.5 µg/ml PI and 5,000 cells were analysed using the FL3-H wavelength band of a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Pont de Claix, France) and with CellQuest™ software (Becton Dickinson).

2.6. Internalisation assays

To determine by which pathway hybrid TiO₂/PABA NPs were internalised into DCs, hybrid TiO₂/PABA NPs at 7% labeled with FITC (NP-FITC) were used, and to determine the mechanism implicated, several fluorescent probes such as Dextran-FITC and Lucifer Yellow were used as control markers, as previously described (Noirey *et al.*, 2000). Briefly, cells (at 0.5x10⁵/ml) were washed with RPMI containing 10% fetal calf serum, then 20 µl of specific markers were added to the cell pellet and incubated at 37°C or 4°C for several times and at various concentrations. Data are analysed by flow cytometry. Marker release was evaluated in the presence of specific inhibitors such as 25 µM monensin, 250 µM chloroquine and 50 µM phenylarsine oxide (PAO) which were pre-incubated for 1 h at 37°C before addition of fluorescent markers for 15 min at 37°C. We have to notice that these inhibitors were present during all incubation time with fluorescent markers. After marker internalisation, the intracellular pH in endosomes and lysosomes was neutralised by addition of monensin at 4°C for 30 min. Fluorescence was analysed on a FACScan flow cytometer. A calibration curve was constructed with DAKO QIFIKIT (Dako, France) and data are analysed using Cell Quest™ software.

2.7. Determination of nanoparticle uptake by confocal laser fluorescence microscopy

DCs were seeded onto poly-L-lysine coated slides at a density of 1x10⁶ cells/ml for 2 h prior exposure to NPs (hybrid TiO₂/PABA NPs at 7% labeled with Alexa488). After 15 min of incubation with fluorescent-labeled hybrid NPs, the cover slips were washed twice with PBS and fluorochrome 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was added at 0.2 µg/ml for 15 min. Cells were then washed, fixed with 2% paraformaldehyde solution, and mounted on glass slides using Vectashield® Hard-Set™ mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, USA). The fluorescent images were obtained using a Leica TCS-SP2 (Mannheim, Germany) using an Argon laser. Background fluorescence was determined by analysis of untreated cells. Image acquisition and analysis was performed using the Leica Confocal Software (LCS Lite).

2.8. Determination of intracellular distribution by transmission electron microscopy

After incubation with TiO₂ NPs (from 15 min to 4 h), mono-DC suspensions were fixed in 2% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer for at least 4 h at 4°C. After washing, they were post-fixed in 1% osmium tetroxide for 1 h, washed again and dehydrated in graded ethanol series and then embedded in Epon. Ultrathin sections were counter-stained with uranyl acetate and lead citrate before observation in a transmission electron microscope equipped with a digital camera (Philips CM120).

2.9. Immunofluorescent staining and FACS analysis

Changes in mono-DC phenotypes (CD86 and HLA-DR) were detected using a FACScan flow cytometer. After 48 h of exposure to TiO₂, hybrid NPs or positive controls, mono-DCs were harvested and incubated for 30 min at 4°C with human FITC-conjugated anti-CD86 or anti-HLA-DR monoclonal antibodies and their corresponding isotype controls. Anti-human CD86 (clone Fun-1) was from BD-Pharmingen (Becton Dickinson) and its corresponding isotype control IgG1 was from Biolegend (Ozyme, Saint Quentin, France). Anti-human HLA-DR (clone B8.12.2) and its corresponding isotype control IgG2b were from Immunotech (Marseille, France). After washing at 4°C in PBS containing 1% BSA and fixation in PBS with 1% formaldehyde, cells were stored at 4°C in the dark until analysis. For each sample, 5,000 cells were selected as a homogeneous population (excluding cellular fragments) gated from the control cell population (untreated) in a side versus forward scatter dot plot. Data are analysed using Cell QuestTM software. The Mean Fluorescence Intensity (MFI) induced by each chemical was determined according to the IgG isotype control and was calculated by the following formula: MFI of treated cells compared with MFI of untreated cells, normalised at 100.

2.10. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

With regard to pro-inflammatory cytokines, IL-8 and tumor necrosis factor (TNF)- α secretion was monitored as both cytokines are the main cytokines associated with mono-DC activation. Their secretion was measured in mono-DC supernatants collected after 48 h of incubation with PABA, TiO₂, hybrid TiO₂/PABA NPs or controls. Cytokine concentration was assessed by ELISA (Abcys) according to manufacturer's instructions. The concentrations of IL-8 and TNF- α were calculated from standard curves using human recombinant IL-8 (from 31.2 to 2000 pg/ml) and human recombinant TNF- α (from 7.8 to 500 pg/ml) with a limit detection of 62.5 pg/ml for IL-8 or 15.6 pg/ml for TNF- α .

2.11. Measurement of intracellular reactive oxygen species (ROS)

As ROS are implicated in mono-DC activation process induced by sensitizers, intracellular ROS were assessed following cell contact with NPs, using the intracellular specific dye 2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) as described (Royall and Ischiropoulos, 1993). It is a membrane-permeable probe able to penetrate into the cell where it is deacetylated by cellular esterases to a non fluorescent product, 2'-7'-dichlorodihydrofluorescein (H₂DCF) and then can be oxidized by ROS to a fluorescent product, 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF). Mono-DCs were untreated or exposed to PABA, TiO₂, hybrid TiO₂/PABA NPs or H₂O₂ and DNCB used as positive controls. Cells were then loaded with 2 μM H₂DCFDA for 30 min in the dark. The fluorescence intensity was immediately analysed using a FACScan flow cytometer. For each sample, 5,000 cells were obtained and data are analysed using Cell Quest™ software.

2.12. Mono-DC irradiation

Because hybrid TiO₂/PABA NPs were added in sunscreens, the effects of UV irradiation on NP-treated mono-DCs were investigated. For this purpose, mono-DCs were irradiated with UVA irradiation or with a solar-simulated UV radiation apparatus (Suntest®, CPS+/XLS+, Atlas, France), and CD86 expression and ROS induction were monitored. Immature DCs, seeded at 1x10⁶ cells/ml, were treated with PABA, TiO₂ or hybrid TiO₂/PABA NPs before or after irradiations. UVA irradiation tubes (a Biosun system RMx 3W, Vilber Lourmat, France) emitted a light ranging from 320 to 400 nm, with a peak of emission at 365 nm. The total energy applied was respectively between 2 and 12 J/cm² and a UVC filter was used. Solar-simulated UV radiation was assessed using a 1,000 W Xenon arc solar simulator. The dose applied was 15 kJ/m² corresponding to 1 min of irradiation. ROS induction was assessed 1 h after irradiation, using H₂DCFDA probe, and CD86 expression was assessed by flow cytometry after 48 h.

2.13. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the Wilcoxon signed-rank test. A *p*-value of 0.05 (*) was selected as the limit of statistical significance.

3. Results

3.1. Effect of hybrid TiO₂/PABA NPs on mono-DC viability

Immature DCs were exposed to PABA, TiO₂ or hybrid TiO₂/PABA NPs with increasing concentrations of PABA: TiO₂/PABA at 7% or TiO₂/PABA at 20%. Cell viability was assessed by WST-1 after 48 h treatment. Data summarized in Table 1 show that the viability of DCs exposed to

TiO₂ or hybrid TiO₂/PABA NPs at 100 µg/ml remained unchanged (regardless of the percentage of PABA anchored).

3.2. Uptake characteristics of hybrid TiO₂/PABA NPs by mono-DCs

Kinetics of internalization experiment were studied with hybrid TiO₂/PABA at 7% coupled with FITC (NP-FITC) in comparison with Dextran-FITC (DX-FITC) as a positive control for receptor endocytosis and Lucifer yellow (LY) as a positive control for macropinocytosis. Kinetic data indicated that all markers were internalised in a time-dependent manner and 100% of DCs were labeled at 24 h (Fig. 1A). DX-FITC reached a plateau after 10 min whereas LY and NP-FITC, with continuous increase, presented kinetic data characteristics of micropinocytosis.

A set of inhibitors was used to investigate the mechanism of marker entry. Phenylarsine oxide (PAO), which blocked internalisation by receptors, was inefficient on LY and NP-FITC but blocked internalisation of DX-FITC (Fig. 1B). Monensin and chloroquine blocked the transfer from endosomes to lysosomes in receptor-mediated endocytosis, and monensin also acted in the recycling of pinocytotic vesicles. Both molecules were inactive on LY and NP-FITC whereas internalisation of DX-FITC was decreased.

The intracellular pathway by which markers were internalised was analysed by means of cell incubation for 15 min at 37°C with fluorescent markers. A first acquisition was performed with FACScan, then monensin was added, and a second acquisition was performed after 30 min of incubation at 4°C. Monensin neutralised the pH of acidic vesicles, resulting in suppression of FITC quenching by acidic pH. Addition of monensin only enhanced the fluorescence detected with DX-FITC (Fig. 1C).

Pulse-chase experiments were performed by incubation of mono-DCs for 15 min with markers; cells were then washed in cold medium and incubated for various periods of time in marker-free medium at 37°C or at 4°C as control (Fig. 1D). LY and NP-FITC presented similar kinetics, and a 50% decrease occurred within 2 h. In contrast, DX-FITC was completely retained for long periods of time (up to 48 h), whereas LY and NP-FITC were rapidly lost. All these data are consistent with NP capture *via* macropinocytosis but not *via* a receptor-mediated mechanism.

3.3. Confocal microscopy

The effective internalisation of hybrid NPs into DCs was also detected by confocal laser scanning fluorescence microscopy (Fig. 2) using hybrid TiO₂/PABA at 7% labeled with Alexa488, a more stable probe for this type of imaging. Mono-DCs cultured for 4 h (Figs. 2A to 2C) showed internalised hybrid NPs localised into the cytoplasm and outside of the nucleus as demonstrated by DAPI staining.

3.4. Electron microscopy

TiO₂ NPs were detected close to the membrane and into the cytoplasm of mono-DCs within 15 min of exposure (Figs. 3A to 3C) but they were not detected in active clathrin-coated vesicles (Fig. 3C). However, NPs were concentrated in vesicles where they appeared as particle aggregates (Figs. 3D, 3E). After 1 h of incubation, TiO₂ NPs, in the peripheral cytoplasm, underwent clustering into huge aggregates (Fig. 3F). This situation persisted after 4 h (Fig. 3G).

3.5 Effect of Hybrid TiO₂/PABA NPs on mono-DC activation

As immature DCs efficiently internalised hybrid NPs, their potency to induce DC activation *via* phenotypical changes and cytokine secretion was evaluated. Data (Table 2) show that hybrid NPs did not induce DC activation monitored by overexpression of co-stimulatory molecule CD86 and major histocompatibility complex (CMH) class II antigen, HLA-DR as reported with LPS. Moreover, no pro-inflammatory cytokines such as IL-8 and TNF- α were released in contrast to treatment of DCs with LPS, used as a positive control.

3.6. Effect of Hybrid TiO₂/PABA NPs on sensitiser-induced DC activation

As NPs did not induce mono-DC activation by themselves, a direct effect of hybrid NPs on mono-DC functions was assessed. Sensitisers, such as NiSO₄ and thimerosal, and the positive control LPS, induced mono-DC activation according to CD86 overexpression monitored after 48 h of exposure (Fig. 4). In order to verify whether mono-DCs could still be activated by these compounds after pre-treatment with NPs, DCs were incubated for 6 h in the presence of PABA, TiO₂ or hybrid NPs and then exposed to chemicals. Results (Fig. 4) show that NPs (TiO₂ alone or hybrid TiO₂/PABA NPs) did not modify DC activation induced by sensitisers or LPS whereas pre-treatment with PABA increased CD86 expression induced by thimerosal (Fig. 4).

3.7. Effect of hybrid TiO₂/PABA NPs on ROS induction

Because NPs can generate an oxidative stress which is a main mechanism occurring during mono-DC activation process, mono-DCs were exposed to PABA, TiO₂ or hybrid TiO₂/PABA NPs and cells were harvested at different times after exposure to chemicals. H₂O₂, an oxidative inductor, was used as a positive control for ROS induction. Results (Fig. 5) show that PABA, TiO₂ or hybrid NPs did not induce ROS, even after 6 h. A slight but not significant increase in DCF fluorescence was detected after 1 h of exposure to TiO₂. Moreover, in comparison with untreated cells, hybrid TiO₂/PABA NPs displayed a protective effect against endogenous ROS induction after 2 h of exposure (Fig. 5).

3.8. Effect of UVA irradiation on hybrid NP-treated cell viability

As hybrid TiO₂/PABA NPs are added in sunscreens, their eventual toxicity after DC exposure to UV irradiation was assessed. As expected, in absence of NPs, UVA irradiation (Fig. 6) induced a decrease in mono-DC viability in a dose-dependent manner after 48 h of incubation (from 95.9 ± 2.23% viability at 0 J/cm² to 36.03 ± 2.97 % at 12 J/cm²). Interestingly, after their irradiation with UVA ranging from 4 to 8 J/cm², irradiated cells incubated with PABA, TiO₂ or hybrid TiO₂/PABA NPs at 7% or 20% displayed a better cell viability compared with untreated cells. At 12 J/cm², only TiO₂/PABA at 7% NPs prevented from a toxic effect of UVA irradiation.

3.9. UV Irradiation, Hybrid TiO₂/PABA NPs, CD86 Expression and ROS Induction

Because UVA irradiation, at doses higher than 4 J/cm², significantly affected the viability of mono-DCs after 48 h, the effect on CD86 expression was measured on DCs irradiated by UVA at 2 J/cm² in comparison with solar-simulated irradiation using a Suntest® apparatus (15 kJ/m²). Mono-DCs were exposed to PABA, TiO₂ or hybrid TiO₂/PABA NPs and then irradiated. After 48 h, CD86 expression was no significantly increased (Table 3), but UVA and solar-simulated UV radiation impaired the capacity of mono-DCs to respond to LPS.

UV irradiations were also performed before exposure to hybrid TiO₂/PABA NPs (mono-DCs were irradiated and then exposed to hybrid NPs) or hybrid NPs were irradiated alone and then incubated with non-irradiated mono-DCs. All these experimental conditions did not induce any CD86 expression after 48 h (data not shown).

ROS induction was also determined 1 h after irradiation of NP-treated DCs. Data from Table 4 show that mono-DCs incubated with hybrid NPs and then irradiated with a solar simulator displayed no increase in ROS induction compared with non-irradiated cells. At this time point, solar radiation did not induce any ROS induction in control cells, but significantly decreased ROS induced by DNCB, used as a positive control.

It should be noted that UVB irradiation at 500 J/m² did not affect mono-DC viability and did not induce CD86 expression (data not shown).

3.10. Protective effect of hybrid TiO₂/PABA at 20% on ROS production induced by UVA irradiation

Photo-oxidative damages induced by UV irradiation-induced ROS is a well-known phenomenon, and have been implicated in several pathological processes such as photo-aging and photo-carcinogenesis. In order to study the potent effect of UV-induced ROS on mono-DCs in contact with hybrid NPs, cells were exposed to PABA, TiO₂ or hybrid TiO₂/PABA NPs and then irradiated with UVA at 12 J/cm² for inducing ROS, detected 1 h after irradiation (Table 5). In cells exposed to PABA and hybrid TiO₂/PABA NPs at 20% before irradiation, ROS induction was lower than that in irradiated control cells or cells incubated with TiO₂ alone. In parallel, a higher cell viability assessed

by PI staining was detected in mono-DCs incubated with NPs before irradiation, confirming the protective effect of hybrid TiO₂/PABA NPs.

4. Discussion

NPs have been promoted as a revolutionary technology. Because of their small size and large active/reactive surface they are widely added in many products including cosmetics and sunscreens. Effectively, by their small size, they can easily penetrate the damaged skin or through hair follicles (Baroli *et al.*, 2007; Cross *et al.*, 2007; Kiss *et al.*, 2008; Kuntsche *et al.*, 2008; Lademann *et al.*, 2007; Larese *et al.*, 2009). In this case, NPs can directly reach epidermal cells and in particular DCs which play an essential role in the immune process.

Our studies demonstrated that under our experimental conditions, no toxicity was generated by hybrid TiO₂/PABA NPs or TiO₂ NPs towards mono-DCs. Their cell viability was not changed in presence of NPs whatever the procedure used for its monitoring such as IP staining or WST-1 colorimetric assay. These data are in opposite to others studies reporting induction of toxicity by TiO₂ NPs (Vileno *et al.*, 2007; Teeguarden *et al.*, 2007; Warheit *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008; Vamanu *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009) and discussed by Warheit *et al.*, 2007. However, as the toxicity of NPs may be related, in large part, to the surface reactivity of the particles (Warheit 2008) and to the presence or not of serum in the culture medium (Murdock *et al.*, 2008), it is likely that some discrepancy in cytotoxic effect of NPs could be correlated with the components included into the culture medium where they are incubated and their own characterisation in medium.

With regard to the penetration of NPs into mono-DCs, our data show that within 15 min, hybrid TiO₂/PABA NPs were internalised into mono-DCs *via* macropinocytosis but not through receptors. From confocal microscopy imagery, data show that hybrid NPs were detected into the cell cytoplasm but not into the nucleus. Electron microscopy imagery confirmed that NPs were rapidly in contact with DCs, as described for THP1, a DC-like human cell line (Bregoli *et al.*, 2009), and showed that NPs were specifically localised in vesicles where they were concentrated. Similar data were reported using other types of NPs (Chen *et al.*, 2009; Goya *et al.*, 2008; Zhang and Monteiro-Rivière, 2009). Electron microscopy imagery showed that NPs were not included in clathrin-coated vesicles as reported for keratinocytes (Zhang and Monteiro-Rivière, 2009). All our data are in agreement with a capture of NPs by macropinocytosis but not *via* specific receptors. Kinetic experiments showed that NP release was markedly detected since 2 h (data not shown) and did not accumulate into the cell after a long period (48 h, see Fig. 1D), which is a good factor to prove NP innocuity and suggesting a lack of toxicity of these NPs.

Under our experimental conditions, hybrid TiO₂/PABA NPs did not induce DC activation monitored by HLA-DR expression (antigen presentation), CD86 expression (co-stimulatory molecule) and inflammatory cytokine release. As DC activation is a necessary condition for T cell sensitisation, our results suggest that NPs failed to induce T cell priming. In addition, NP-treated mono-DCs did not

induce autologous T cell proliferation in mixed lymphocyte reaction (MLR) detected with sensitisers (data not shown).

Hybrid TiO₂/PABA NPs did not induce ROS, a main process implicated in mono-DC activation induced by sensitisers (Alderman et al., 2002; Rutault et al., 1999, Migdal et al., 2010). Moreover, in contrast, a decrease in ROS level was detected when untreated DCs were exposed to hybrid NPs with PABA at 7% (cf. Fig. 5).

Sunscreens used as UV filters contained opaque inorganic oxides, especially titanium, zinc and cerium, and organic reagents, such as PABA. As TiO₂, the most popular inorganic sunscreen agent, is known to be a photo-catalyser (Fujishima et al., 1972) with toxic effects (Teeguarden et al., 2007; Vileno et al., 2007; Warheit et al., 2007; Jańczyk et al., 2008; Park et al., 2008; Vamanu et al., 2008; Wu et al., 2009), it is therefore imperative to coat NP surface with an organic substance in order to minimise catalytic activities and adjust the sun protection factor (Imanaka et al., 2003). In this context, PABA has shown promising properties as a candidate for UVA and UVB filters (Daniele et al., 2006). Under our experimental conditions, the innocuity of TiO₂ NPs with or without PABA was highlighted.

As previously discussed, NP protection against loss of DC viability due to endogenous ROS induction or consecutive to UVA damages, in a dose-dependent manner, would allow to add in a complete innocuity these hybrids nanoparticles in sunscreen filters as they did not accumulate into the cell as reported from confocal and electronic microscopy data. Because UVB did not induce ROS, UVB irradiation had only a moderate effect on mono-DC viability (data not shown).

At the end, under our experimental conditions, hybrid TiO₂/PABA NPs were not toxic, did not modify the response of DCs towards sensitisers and did not induce DC activation as reported for diesel particles (Braun et al., 2010).

Because hybrid nanoparticles effects were not modified by the presence of proteins into the culture medium (data not shown), they could be used as a model for drug delivery in a reduced amounts leading to limited secondary effects and efficient treatments as reported (Moffatt and Cristiano, 2006; Manolova et al., 2008).

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

We are particularly grateful to Dr. N. Bechetoille from BASF Company for his help to perform experiments using a solar-simulated UV radiation apparatus and to S. Bakkouche and J. Pelisse for initiating these studies. We particularly thank D. Ressenkoff from the “Centre de Quantimétrie” for his help for confocal microscopy imagery and particularly indebted to Jane Mitchell for editing this manuscript.

References

- Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., Tagami, H., 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.* 27, 3031-3038.
- Alderman, C.J., Shah, S., Foreman, J.C., Chain, B.M., Katz, D.R., 2002. The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function. *Free Rad. Biol. Med.* 32, 377-385.
- Alvarez-Román, R., Naik, A., Kalia, Y.N., Guy, R.H., Fessi, H., 2004. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J. Control Release* 99, 53-62.
- Baroli, B., Ennas, M.G., Loffredo, F., Isola, M., Pinna, R., López-Quintela, M.A., 2007. Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin. *J. Invest. Dermatol.* 127, 1701-1712.
- Braun, A., Bewersdorff, M., Lintelmann, J., Matuschek, G., Jakob, T., Göttlicher, M., Schober, W., Buters, J.T., Behrendt, H., Mempel, M., 2010. Differential impact of diesel particle composition on pro-allergic dendritic cell function. *Toxicol. Sci.* 113, 85-94.
- Bregoli, L., Chiarini, F., Gambarelli, A., Sighinolfi, G., Gatti, A.M., Santi, P., Martelli, A.M., Cocco, L., 2009. Toxicity of antimony trioxide nanoparticles on human hematopoietic progenitor cells and comparison to cell lines. *Toxicology* 262, 121-129.
- Chen, K., Preuss, A., Hackbarth, S., Wacker, M., Langer, K., Röder, B., 2009. Novel photosensitizer-protein nanoparticles for photodynamic therapy: photophysical characterization and in vitro investigations. *J. Photochem. Photobiol. B.* 96, 66-74.
- Cook, J.A., Mitchell, J.B., 1989. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal. Biochem.* 179, 1-7.
- Cross, S.E., Russell, M., Southwell, I., Roberts, M.S., 2007. Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin Pharmacol. Physiol.* 20, 148-154.
- Daniele, S., Hubert-Pfalzgraf, L.G., Guyot-Ferreol, V., Tranchant, J.F., 2006. Patent PCT/FR2006-001904.
- Fujishima, A., Honda, K., 1972. Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Nature* 238, 37-38.
- Goya, G.F., Marcos-Campos, I., Fernández-Pacheco, R., Sáez, B., Godino, J., Asín, L., Lambea, J., Tabuenca, P., Mayordomo, J.I., Larrad, L., Ibarra, M.R., Tres, A., 2008. Dendritic cell uptake of iron-based magnetic nanoparticles. *Cell Biol. Int.* 32, 1001-1005.
- Hulette, B.A., Ryan, C.A., Gerberick, G.F., 2002. Elucidating changes in surface marker expression of dendritic cells following chemical allergen treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 226-233.
- Imanaka, N., Masui, T., Hirai, H., Adachi, G.Y., 2003. Amorphous cerium_titanium solid solution phosphate as a novel family of band gap tunable sunscreen materials. *Chem. Mater.* 15, 2289-2291.

- Jańczyk, A., Wolnicka-Głubisz, A., Urbanska, K., Kisch, H., Stochel, G., Macyk, W., 2008. Photodynamic activity of platinum (IV) chloride surface-modified TiO₂ irradiated with visible light. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1120-1130.
- Kiss, B., Bíró, T., Czifra, G., Tóth, B.I., Kertész, Z., Szikszai, Z., Kiss, A.Z., Juhász, I., Zouboulis, C.C., Hunyadi, J., 2008. Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells. *Exp. Dermatol.* 17, 659-667.
- Kuntsche, J., Bunjes, H., Fahr, A., Pappinen, S., Rönkkö, S., Suhonen, M., Urtti, A., 2008. Interaction of lipid nanoparticles with human epidermis and an organotypic cell culture model. *Int. J. Pharm.* 354, 180-195.
- Lademann, J., Otberg, N., Richter, H., Meyer, L., Audring, H., Teichmann, A., Thomas, S., Knüttel, A., Sterry W., 2007. Application of optical non-invasive methods in skin physiology: a comparison of laser scanning microscopy and optical coherent tomography with histological analysis. *Skin Res. Technol.* 13, 119-132.
- Larese, F.F., D'Agostin, F., Crosera, M., Adami, G., Renzi, N., Bovenzi, M., Maina, G., 2009. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology* 255, 33-37.
- Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P., Bachmann, M.F., 2008. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur. J. Immunol.* 38, 1404-1413.
- Migdal, C., Tailhardat, M., P. Courtellemont, P., Haftek, M., Serres, M., 2010. Responsiveness of human monocyte-derived dendritic cells to thimerosal and mercury derivatives. *Toxicol App Pharmacol.* in press.
- Moffatt, S., Cristiano, R.J., 2006. Uptake characteristics of NGR-coupled stealth PEI/pDNA nanoparticles loaded with PLGA-PEG-PLGA tri-block copolymer for targeted delivery to human monocyte-derived dendritic cells. *Int. J. Pharm.* 321, 143-154.
- Murdock, R.C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A.M., Schlager, J.J., Hussain, S.M., 2008. Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to *In Vitro* Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. *Toxicol. Sci.* 101, 239-253
- Noirey, N., Rougier, N., André, C., Schmitt, D., Vincent, C., 2000. Langerhans-like dendritic cells generated from cord blood progenitors internalize pollen allergens by macropinocytosis, and part of the molecules are processed and can activate autologous naïve T lymphocytes. *J. All. Clin. Immunol.* 105, 1194-1201.
- Park, E-J., Yi, J., Chung, K.H., Ryu, D.Y., Choi, J., Park, K., 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol. Lett.* 180, 222-229.
- Rahal, R., Daniele, S., Hubert-Pfalzgraf, L.G., Guyot-Ferréol, V., Tranchant, J-F., 2008. Synthesis of para-amino benzoic acid-TiO₂ hybrid nanostructures of controlled functionality by an aqueous one-step process. *Eur. J. Inorg. Chem.* 208, 980-987.
- Rutault, K., Alderman, C., Chain, B.M., Katz, D.R., 1999. Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 232-238.

- Royall, J.A., Ischiropoulos, H., 1993. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 302, 348-355.
- Ryman-Rasmussen, J.P., Rivière, J.E., Monteiro-Rivière, N.A., 2007. Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 127, 143-453.
- Teeguarden, J.G., Hinderliter, P.M., Orr, G., Thrall, B., Pounds, J.G., 2007. Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicol. Sci.* 95, 300-312.
- Vamanu, C.I., Cimpan, M.R., Hol, P.J., Sornes, S., Lie, S.A., Gjerdet, N.R., 2008. Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: studies on human monoblastoid cell line. *Toxicol. In Vitro* 22, 1689-1696.
- Vileno, B., Lekka, M., Sienkiewicz, A., Jeney, S., Stoessel, G., Lekki, J., Forró, L., Stachura, Z., 2007. Stiffness alterations of single cells induced by UV in the presence of nanoTiO₂. *Env. Sci. Technol.* 41, 5149-5153.
- Wu, J., Liu, W., Xue, C., Zhou, S., Lan, F., Bi, L., Xu, H., Yang, X., Zeng, F.D., 2009. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol. Lett.* 191, 1-8.
- Warheit, D.B., Hoke, R.A., Finlay, C., Donner, E.M., Reed, K.L., Sayes, C.M., 2007. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol. Lett.* 171, 99-110.
- Warheit, D.B., 2008. How Meaningful are the Results of Nanotoxicity Studies in the Absence of Adequate Material Characterization? *Toxicol. Sci.* 101, 183-185.
- Zhang, L.W., Yu, W.W., Colvin, V.L., Monteiro-Rivière, N.A., 2008. Biological interactions of quantum dot nanoparticles in skin and in human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228, 200-211.
- Zhang, L.W., Monteiro-Rivière, N.A., 2009. Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. *Toxicol. Sci.* 110, 138-155.

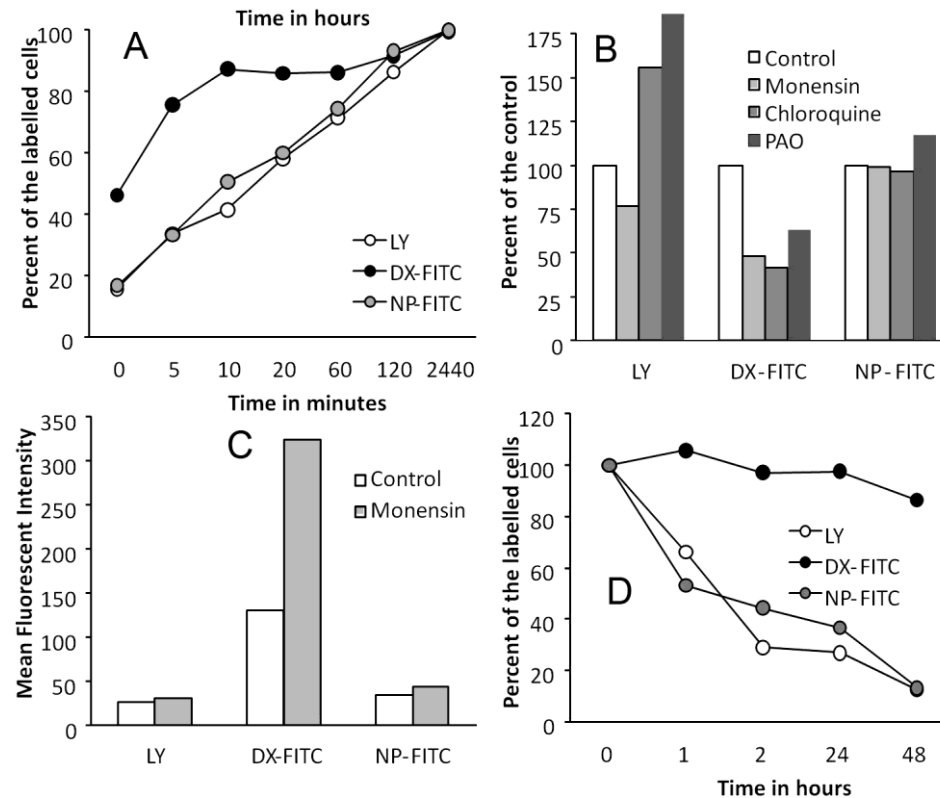


Fig. 1. TiO₂/PABA at 7% NPs labeled with FITC (NP-FITC) were internalised into mono-DCs by macropinocytosis. (A) Internalisation kinetic of NP-FITC into mono-DCs, in comparison with Dextran-FITC (DX-FITC, a control positive of receptor-mediated endocytosis) and Lucifer Yellow (LY, a positive control of macropinocytosis). (B) Monensin, chloroquine and phenylarsine oxide (PAO), three metabolic inhibitors of internalisation by receptors were added 1 h before addition of the specific markers. Results are expressed as the percentage of cell uptake without drugs. (C) DX-FITC was internalised into acidic vesicles, but not NP-FITC or LY. After 15 min of incubation of DCs with tagged molecules, cells were washed and a first FACS acquisition was performed. Monensin was then added in order to neutralise acidic vesicles, and a second acquisition was performed after 30 min of incubation at 4°C (D).

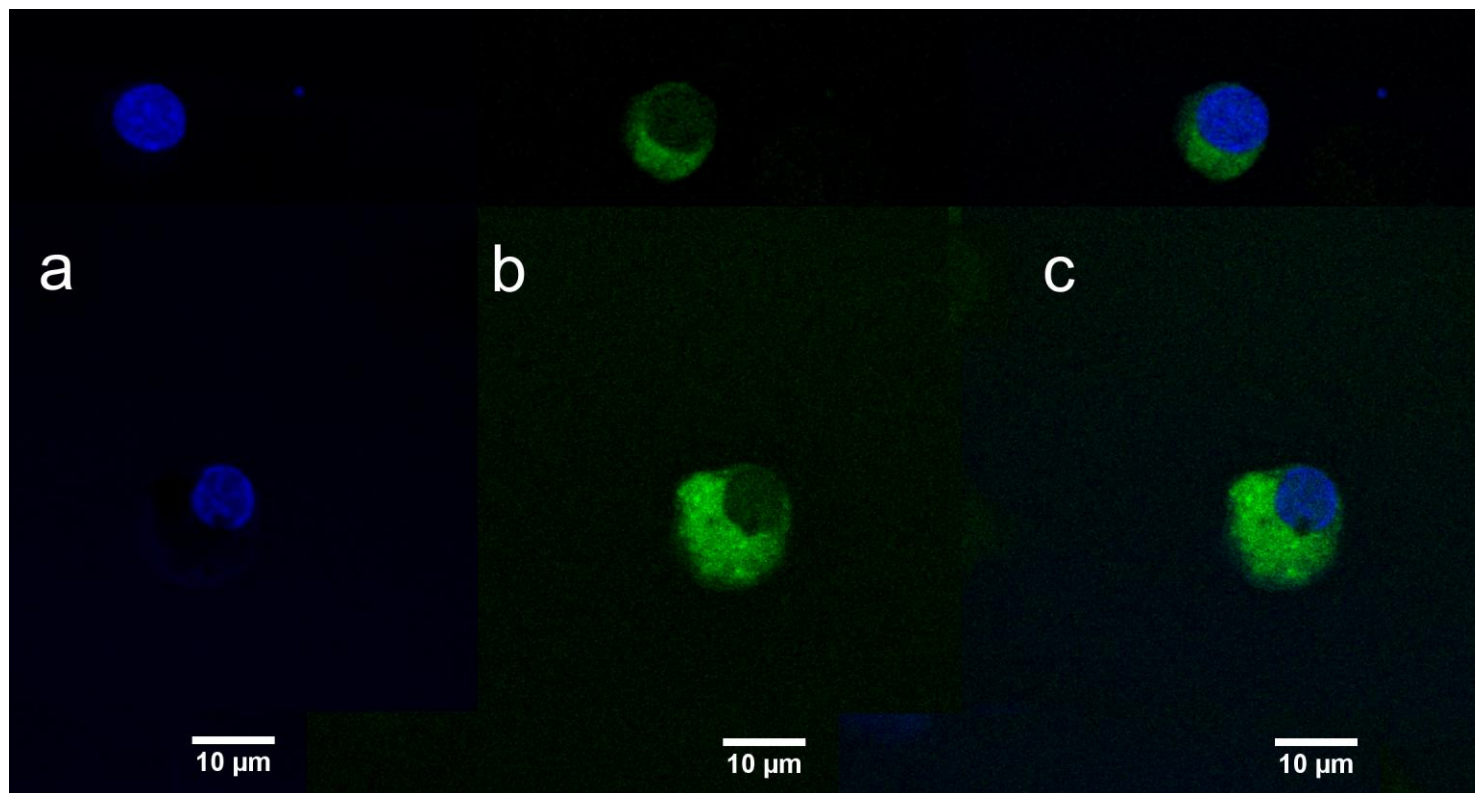


Fig. 2. Confocal fluorescence microscopy. Mono-DCs were analysed after incubation for 4 h at 37 C in the presence of hybrid TiO_2/PABA at 7% labeled with Alexa488 at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (A) Cells stained with the fluorochrome 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), a nucleic acid-specific dye which is used for staining nuclei and chromatin selectively. (B) Cells exposed to hybrid TiO_2/PABA at 7% labeled with Alexa488 (C) Overlay image of hybrid NP-treated mono-DCs labeled with DAPI. Blue: DAPI, green: hybrid NPs.

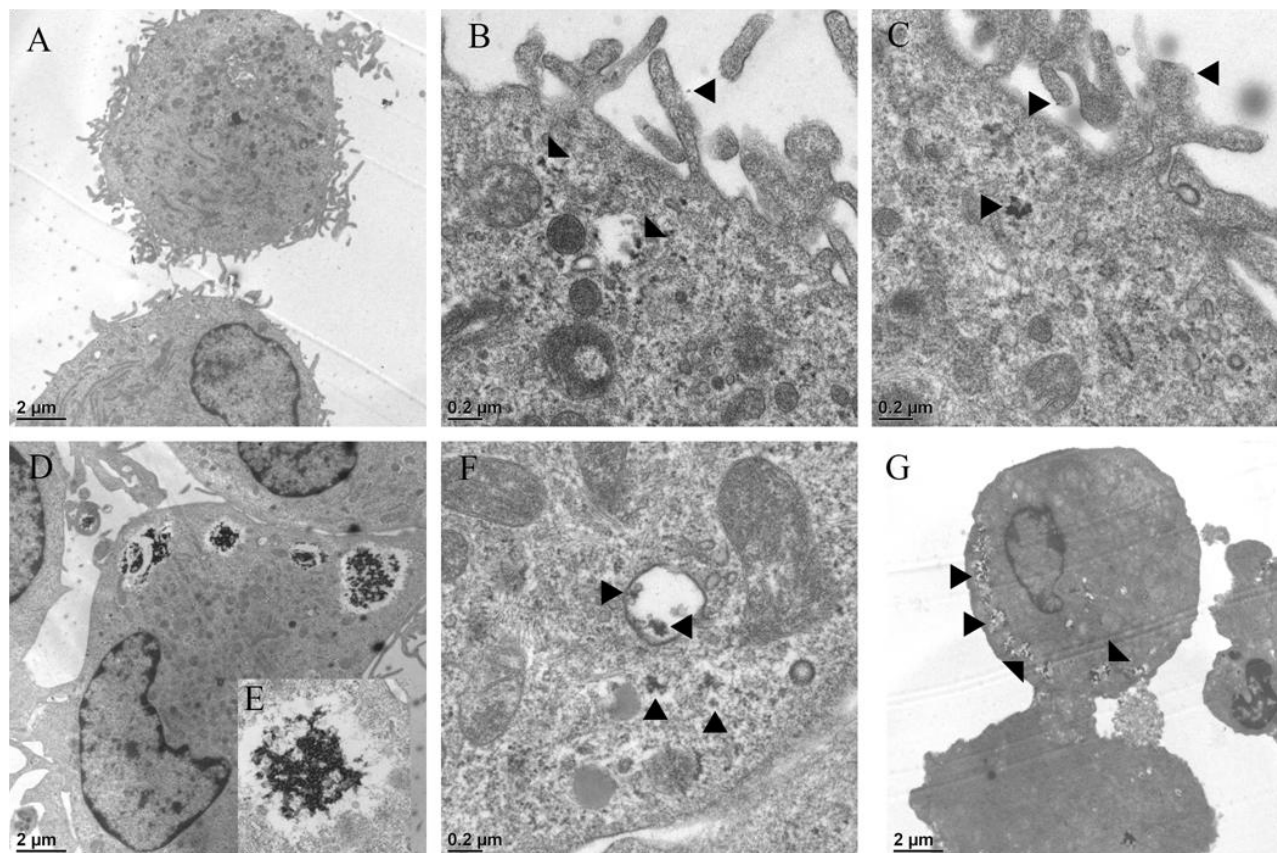


Fig. 3. Electronic microscopy imagery. Ultrastructural observation of mono-DCs exposed to TiO₂ showed a rapid capture of NPs at the cell surface (A-C) and their passage through the membrane into the cytoplasm (B-C). NPs were not visualised in clathrin-coated vesicles but underwent intracytoplasmic clustering (C). Aggregates of NPs were localised in the peripheral cytoplasm (E, G). Nevertheless, occasional small clusters of 2-3 TiO₂ NPs could also be visualised into vesicles were they were concentrated (E and F).

A-C: 15 min of contact with NPs; D-F: 1 h; G: 4 h.

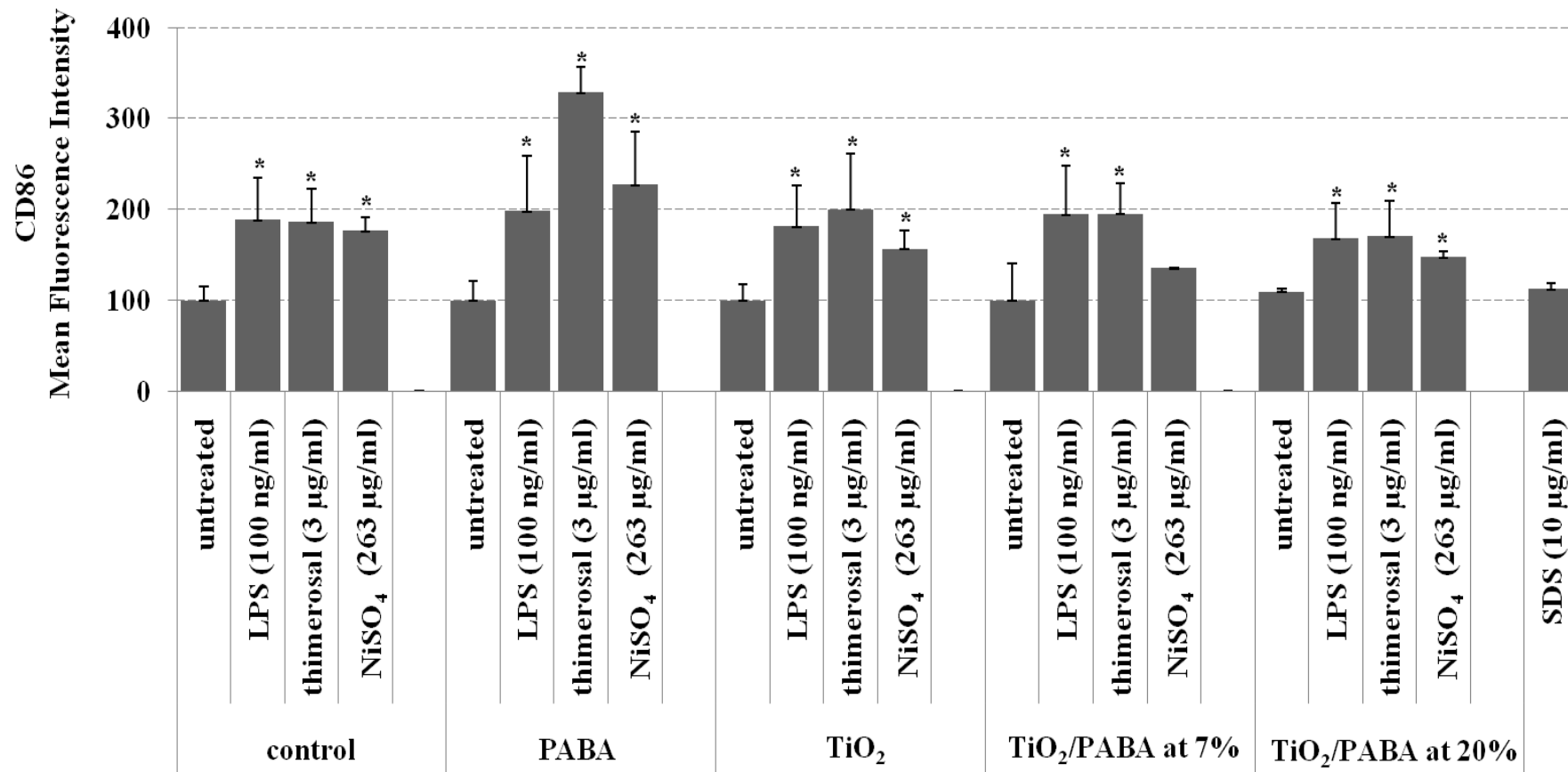


Fig. 4. Effect of TiO₂ and hybrid TiO₂/PABA NPs on sensitiser-induced mono-DC activation. Mono-DCs were pre-incubated for 6 h with PABA (100 µg/ml), TiO₂ (100 µg/ml) or hybrid NPs (TiO₂/PABA at 7% and 20% at 100 µg/ml) before treatment with sensitisers, thimerosal and nickel (NiSO₄) or the positive control, LPS. CD86 expression was assessed by flow cytometry after 48 h and reported as mean fluorescence intensity (MFI) as described above.

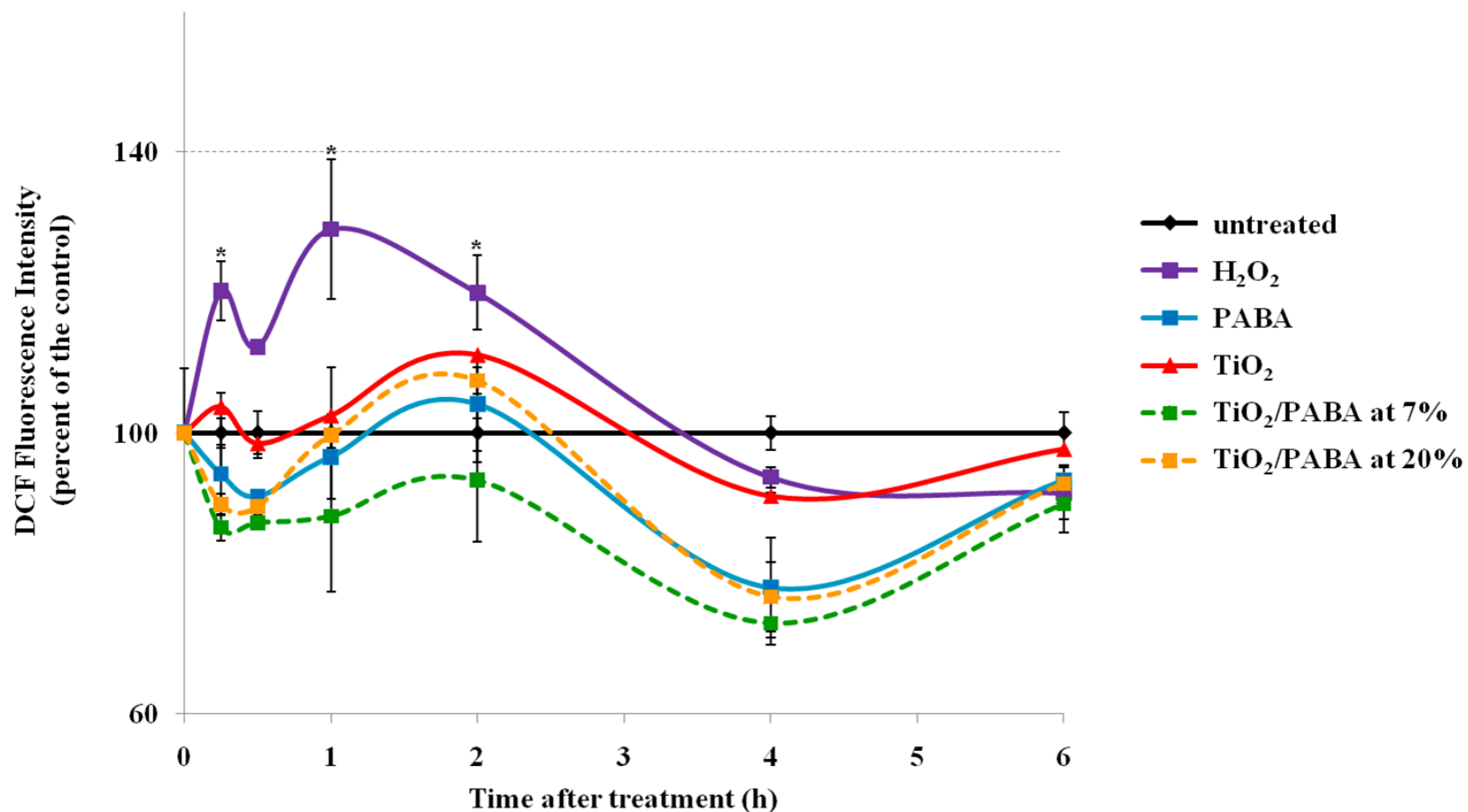


Fig. 5. Effect of TiO₂ and hybrid TiO₂/PABA NPs on ROS induction. Cells were loaded with H₂DCFDA prior to treatment with H₂O₂ (at 1 mM), a positive control for oxidative stress induction. Cells were exposed or not to PABA (at 100 μg/ml), TiO₂ (at 100 μg/ml) or hybrid NPs (TiO₂/PABA at 7% and 20% at 100 μg/ml) for the indicated time (15 min to 6 h). ROS induction, assessed by flow cytometry, was expressed as a percentage of controls (MFI of treated cells compared with MFI of untreated cells normalised to 100%). Data are the mean ± SD of three independent experiments.

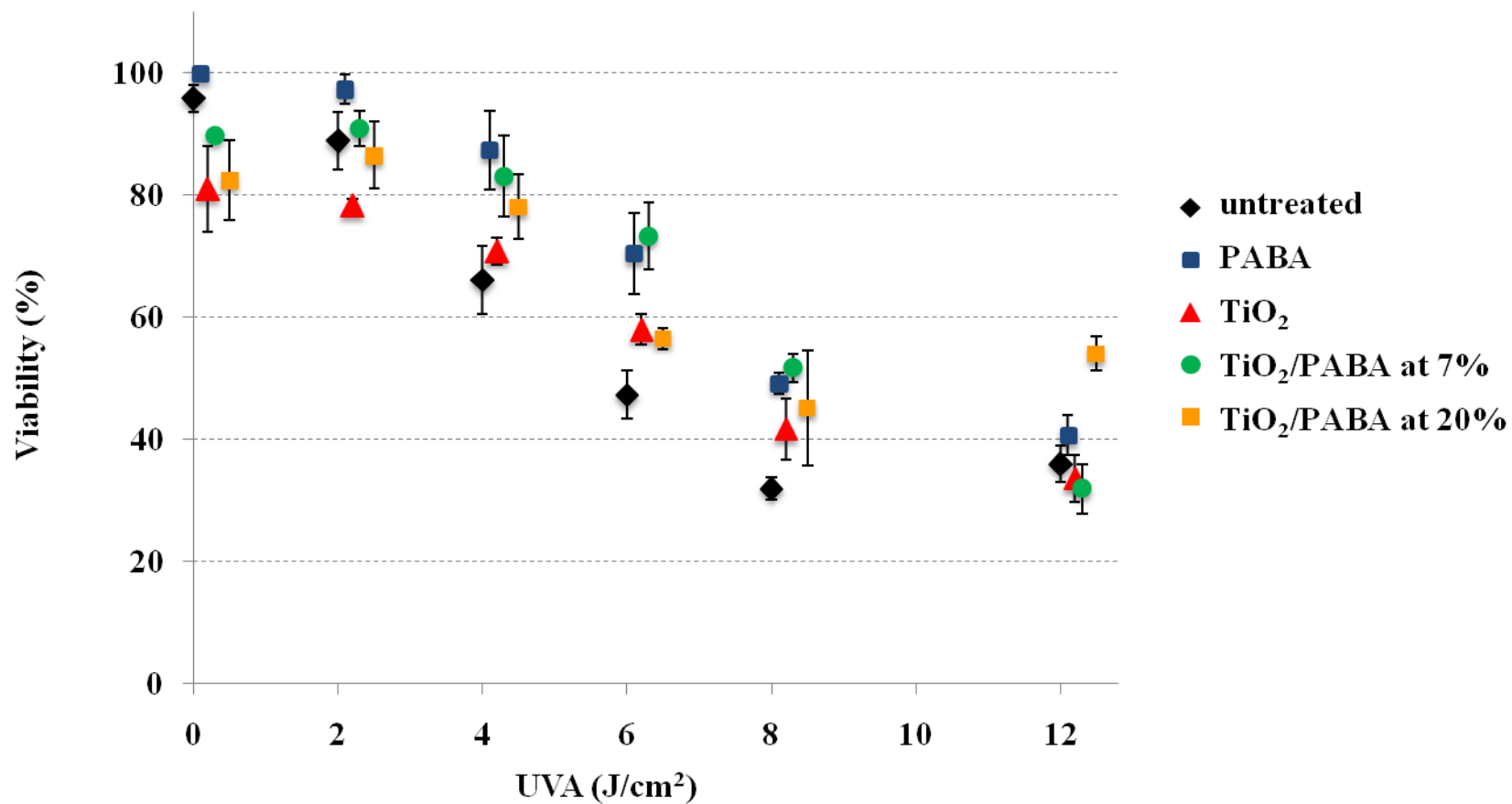


Fig. 6. Effect of UVA irradiation on mono-DC viability after exposure to TiO₂ and hybrid TiO₂/PABA NPs. Cells were exposed to PABA (at 100 µg/ml), TiO₂ (at 100 µg/ml) or hybrid NPs (TiO₂/PABA at 7% and 20% at 100 µg/ml) and then irradiated or not with UVA in a range of 2–12 J/cm². Cells were incubated for 48 h in X-Vivo medium and cell viability was assessed by WST-1. Data are mean ± SD of three independent experiments.

	Concentration	Viability (%)
untreated		100 ± 4.7
PABA	100 µg/ml	92.3 ± 9.6
TiO₂	100 µg/ml	98.7 ± 5.9
TiO₂/PABA at 7%	100 µg/ml	96.4 ± 9.1
TiO₂/PABA at 20%	100 µg/ml	88.9 ± 4.8

Table 1: Mono-DC viability 48 h after exposure to PABA, TiO₂ or hybrid NPs (TiO₂/PABA at 7% and 20%) assessed by WST-1 colorimetric assay.

	Concentration	CD86 (MFI, mean ± SD)	HLA-DR (MFI, mean ± SD)	IL-8 (pg/ml ± SD)	TNF-α (pg/ml ± SD)
untreated		100 ± 18.8	100 ± 5.6	440.9 ± 257.5	389.9 ± 50.3
LPS	100 ng/ml	340.9 ± 152.7*	278.9 ± 19.7*	2628.4 ± 603.6*	1931.8 ± 322.5*
PABA	100 µg/ml	94.6 ± 15.5	97.4 ± 28.7	496.5 ± 211.3	116.9 ± 60.2
TiO₂	100 µg/ml	118.9 ± 7.4	123.8 ± 25.7	493.6 ± 255.4	228.1 ± 147.1
TiO₂/PABA at 7%	100 µg/ml	104.8 ± 18.1	99.6 ± 4.6	437.3 ± 216.6	251.5 ± 91.6
TiO₂/PABA at 20%	100 µg/ml	112.8 ± 16.1	122.6 ± 22.8	438.9 ± 174.1	226.1 ± 116.1
SDS	10 µg/ml	99.1 ± 13.8	116.8 ± 26.4	466.4 ± 249.7	350.9 ± 68.1

Table 2: Mono-DC phenotype 48 h after exposure to PABA, TiO₂ or hybrid NPs (TiO₂/PABA at 7% and 20%). LPS was used as a positive control and the irritant, SDS as a negative control. CD86 and HLA-DR expression, assessed by flow cytometry, were reported as mean fluorescence intensity (MFI) and was calculated as a percentage of controls (MFI of treated cells compared with MFI of untreated cells normalised to 100%). Cytokine secretion was quantified by ELISA and expressed in pg/ml. Data are mean ± SD of five independent experiments corresponding to five different donors.

		CD86 (MFI, mean ± SD)		
	Concentration	Control (non-irradiated)	UVA (2 J/cm²)	Solar-simulated irradiation
untreated		100 ± 5.7	102.2 ± 4.1	100 ± 5.1
LPS	100 ng/ml	440.3 ± 136.1	205.5 ± 24.3*	212.4 ± 10.6*
PABA	100 µg/ml	104.5 ± 8.1	123.1 ± 25.8	99.2 ± 4.9
TiO₂	100 µg/ml	107.2 ± 1.7	122.1 ± 15.9	107.1 ± 5.4
TiO₂/PABA at 7%	100 µg/ml	112.4 ± 11.9	123.8 ± 19.2	92.9 ± 4.6
TiO₂/PABA at 20%	100 µg/ml	112.9 ± 11.1	120.1 ± 21.4	129.2 ± 6.5
SDS	10 µg/ml	104.5 ± 4.6	125.6 ± 17.7	129.3 ± 13.5

Table 3: Effect of irradiated TiO₂ and hybrid TiO₂/PABA NPs on CD86 expression. Cells were exposed to PABA, TiO₂, hybrid NPs (TiO₂/PABA at 7% and 20%), the irritant SDS and LPS (positive control) and then irradiated or not with UVA (at 2 J/cm²) or with solar-simulated UV radiation (15 kJ/m²). CD86 expression was assessed by flow cytometry after 48h incubation and reported as MFI as described previously.

	Concentration	ROS (DCF fluorescence \pm SD)	
		Control (non-irradiated)	Solar-simulated irradiation
		untreated	
DNCB	6 μ g/ml	200.4 \pm 15.2*	127.1 \pm 22.3*
PABA	100 μ g/ml	97.2 \pm 2.4	99.7 \pm 1.2
TiO₂	100 μ g/ml	87.1 \pm 3.3	94.9 \pm 6.5
TiO₂/PABA at 7%	100 μ g/ml	83.1 \pm 2.3	96.2 \pm 3.3
TiO₂/PABA at 20%	100 μ g/ml	85.9 \pm 2.9	88.9 \pm 1.6
SDS	10 μ g/ml	86.1 \pm 4.2	87.9 \pm 3.3

Table 4: Effect of solar-simulated UV irradiated TiO₂ and hybrid TiO₂/PABA NPs on ROS induction. Cells were exposed to PABA, TiO₂, hybrid NPs (TiO₂/PABA at 7% and 20%) and treated with DNCB (a positive control) or the irritant, SDS. Then, mono-DCs were irradiated or not with solar-simulated UV radiation (15 kJ/m²). After 1 h, cells were harvested, loaded with H₂DCFDA and ROS induction, assessed by flow cytometry, was expressed as described previously.

	Concentration	ROS (DCF fluorescence \pm SD)		Viability - PI dye exclusion (%)	
		Control (non-irradiated)	UVA (12 J/cm ²)	Control (non-irradiated)	UVA (12 J/cm ²)
untreated		100 \pm 9.3	145.6 \pm 0.8*	90 \pm 1.9	87.1 \pm 1.5
PABA	100 μ g/ml	96.6 \pm 4.9	128.7 \pm 1.1*	93.1 \pm 2.3	100 \pm 0.3*
TiO₂	100 μ g/ml	102.4 \pm 6.3	141.4 \pm 4.4	95.4 \pm 0.7	99.4 \pm 1.7*
TiO₂/PABA at 7%	100 μ g/ml	88.1 \pm 10.8	131.6 \pm 1.1	82.9 \pm 3.8	97.9 \pm 1.1*
TiO₂/PABA at 20%	100 μ g/ml	99.7 \pm 1.8	117.1 \pm 2.1*	95.1 \pm 1.9	100 \pm 1.4*

Table 5: Effect of TiO₂ and hybrid TiO₂/PABA NPs on UVA-induced ROS production. Cells were loaded with H₂DCFDA prior to exposure to PABA, TiO₂ or hybrid NPs (TiO₂/PABA at 7% and 20%). Cells were then irradiated or not with UVA at 12 J/cm² in order to induce ROS. After 1 h, cells were harvested and ROS induction was assessed by flow cytometry. Cell viability was assessed by PI dye exclusion. Viability was expressed as the percentage of viable cells (PI negative cells). Data are expressed as described previously and are representative of the mean \pm SD of three independent experiments.

DISCUSSION

Les travaux présentés dans cette deuxième partie montrent que les TiO₂/PABA NPs sont efficacement captées par les DCs, et que cette phagocytose n'induit ni l'activation des DCs immatures ni la production d'ERO. Les TiO₂/PABA NPs ne modifient pas la fonction des DCs en terme de réponse aux allergènes et confèrent même aux cellules une protection vis-à-vis des UVA.

Bien que l'utilisation du PABA soit aujourd'hui remise en question notamment du fait de son fort potentiel sensibilisant (Directive européenne 2008-123-CE), les travaux *in vitro* présentés ici sur un modèle de mono-DCs montrent l'innocuité de NPs hybrides organique/inorganique composées d'oxyde de titane et de PABA ainsi que l'absence d'activation de ces cellules induite par ces NPs ou par le PABA seul.

Ces résultats démontrent l'innocuité des TiO₂/PABA NPs sur les DCs. Leur utilisation au sein des crèmes solaires est supportée par un effet protecteur observé *in vitro* vis-à-vis des rayonnements UVA. La capacité des DCs à phagocyter les NPs, sans s'activer, peut permettre leur utilisation notamment dans la vectorisation de médicaments et dans les stratégies de vaccination.

ANNEXE

TRAVAUX COLLABORATIFS

Les résultats présentés dans la première partie de ce mémoire ont été complétés par des travaux ayant toujours pour but une meilleure compréhension des mécanismes responsables de l'activation des cellules dendritiques (DCs) induite *in vitro* par des allergènes de contact.

Parmi les voies de signalisation impliquées dans ce processus d'activation, celle des MAPKs semble être particulièrement importante. Ainsi, dans un deuxième axe de recherche parallèle à l'étude du stress oxydant, le rôle des voies MAPKs en réponse aux allergènes a été exploré au sein de notre équipe.

Un premier travail a été réalisé sur des mono-DCs exposées au DNCB, au nickel mais aussi au thimerosal en comparaison avec l'irritant SDS. Bien que l'activation des MAPKs (p38 MAPK, JNK et Erk1/2) induite par le DNCB et le nickel est déjà été démontrée, l'effet du thimerosal n'a été que très peu étudié. L'originalité de ces travaux repose surtout sur l'utilisation de deux nouvelles méthodes de screening : le FaceTM chemiluminescence assay ou FaceTM Method et le Cytometric Bead Array (CBA) phosphoflexTM, qui permettent une détection *in situ* de la phosphorylation des protéines avec une grande sensibilité. Le FaceTM Method nécessite très peu de cellules et la chimiluminescence permet de détecter des picomoles de protéines phosphorylées. Le Cytometric Bead Array (CBA) phosphoflexTM permet la mesure de la phosphorylation de p38 MAPK, JNK et Erk1/2 dans un même lysat cellulaire.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication (article 5 « Characterization of early events involved in human dendritic cell maturation induced by sensitizers: cross talk between MAPK signalling pathways. » Trompezinski S, Migdal C, Tailhardat M, Le Varlet B, Courtellemont P, Haftek M, Serres M. 2008. *Toxicol Appl Pharmacol* 230 : 397-406 ; ci-après) et démontrent que l'activation des DCs induite par des allergènes est corrélée à des modifications de l'activité des MAPKs. Ces modifications correspondent à un événement précoce impliqué dans le processus d'activation. Plus particulièrement, le DNCB et le thimerosal activent p38 MAPK et JNK et inhibent Erk1/2 alors que le nickel active les 3 voies. A l'inverse l'irritant SDS n'a pas d'effet. L'activation de JNK survient plus tardivement comparé à l'activation de p38 MAPK ce qui suppose la participation d'un mécanisme intermédiaire. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des MAPKs a permis de mettre en évidence une compétition entre les voies p38 MAPK et JNK, alors que la voie Erk1/2 semble distincte.

Comme les voies p38 MAPK et JNK appartiennent à la famille des SAPKs rédox-dépendante, le rôle du stress oxydant dans l'activation de ces voies a été mis en évidence par l'utilisation de l'antioxydant N-acetyl-L-cystéine (NAC). Un prétraitement par NAC inhibe l'activation de p38 MAPK induite par les allergènes et diminue l'expression du CD86, suggérant un rôle précoce des ERO dans l'activation des SAPKs et dans l'initiation du processus d'activation.

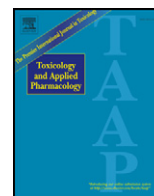
Ces travaux mettent ainsi en avant la signalisation MAPKs dans la réponse *in vitro* des mono-DCs aux allergènes. Ils présentent de nouvelles techniques de screening applicables à un grand nombre de substances à tester. Bien que l'activation des DCs en terme d'augmentation de marqueurs

d'activation et de sécrétion de cytokines soit soumise à une variabilité inter-donneur, la détection de l'activation des MAPKs en réponse aux allergènes n'est pas donneur dépendante. L'utilisation de l'antioxydant NAC a permis de révéler le rôle du stress oxydant dans l'activation de p38 MAPK et dans l'activation des DCs en réponse au DNCB, au nickel et au thimerosal. Chronologiquement, ces travaux ont été les premiers réalisés et les résultats obtenus concernant le thimérosal et le rôle du stress oxydant a ouvert la voie à l'étude plus complète présentée en première partie de ce mémoire.

Par la suite, la technique FaceTM Method a été optimisée dans le but d'être utilisée avec les lignées promyélocyaires U937 et THP-1, non adhérentes. Et afin de valider l'activation spécifique des MAPKs en réponse aux allergènes, un plus grand nombre de substances, notamment des allergènes de classe différentes ainsi que des non-sensibilisants, a été testé. L'activation de p38 MAPK et Erk1/2, détecté par le FaceTM Method, a donc été évaluée en réponse à quatre allergènes extrêmes (MCI, pBQ: para-benzoquinone, DNCB, NBB: 4-nitrobenzyle bromide), un fort (MBrG: methyldibromoglutaronitrile), quatre modérés (2-MBT: 2-mercaptobenzothiazole, CinAl: cinnamaldéhyde, TMTS: tetramethylthiuramdisulfide, DEM: diéthyle maleate) et deux faibles (Cital, CinOH: alcool cinnamique), comparés à trois non-sensibilisants (glycérol, LA: acide lactique, SA: acide salicylique) et un irritant (SDS) en corrélation avec l'activation du CD86 et du CD54 et la sécrétion d'IL-8. Ces travaux ont été réalisés dans des mono-DCs mais aussi dans des THP-1 et des U937 afin d'évaluer la sensibilité de chacun de ces modèles cellulaires.

Les résultats obtenus font l'objet d'un article en préparation (« Sensitizers induced kinase signaling in dendritic cells generated from monocytes in comparison with U937 and THP-1. » Foggia L, Ferrer A, Migdal C, Tailhardat M, Courtellemont P, Haftek M, Serres M. ; non présenté) qui montrent que l'activité de p38 MAPK et Erk1/2 est modulée dans les 3 modèles cellulaires (mono-DCs, THP-1 et U937) en réponse aux allergènes alors que les non sensibilisants et l'irritant n'ont pas d'effet. Les mono-DCs sont les plus sensibles et un « schéma d'activation » commun à la plupart des allergènes est détecté (activation de p38 MAPK, inhibition de Erk1/2). L'activation de p38 MAPK est également retrouvée dans les THP-1 et les U937 bien que pour les allergènes faibles, cette activation ne soit significativement positive que dans les mono-DCs. L'activité d'Erk1/2 est soumise à variabilité entre les 3 modèles, notamment en réponse au DNCB.

L'ensemble de ces travaux a permis de démontrer une modification de l'activité des voies MAPKs détectable dans les trois modèles cellulaires étudiés (mono-DCs, THP-1 et U937). Associée à une technique de détection facile, rapide et sensible, la modulation de la voie p38 MAPK et Erk1/2 semblent être de bons marqueurs pour l'évaluation du potentiel sensibilisant, capable de discriminer les allergènes faibles dans les mono-DCs.



Characterization of early events involved in human dendritic cell maturation induced by sensitizers: Cross talk between MAPK signalling pathways

Sandra Trompezinski^a, Camille Migdal^a, Magalie Tailhardat^b, Béatrice Le Varlet^{b,1}, Pascal Courtellemont^b, Marek Haftek^a, Mireille Serres^{a,*}

^a EA 41-69, Université Lyon 1, Pavillon R, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France

^b LVMH Recherche, St Jean de Braye, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 December 2007
Revised 29 February 2008
Accepted 22 March 2008
Available online 8 April 2008

Keywords:

Sensitizers
Dendritic cells
Signal transduction
Cross talk
MAPKs
Antioxidant

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs), efficient-antigen presenting cells play an important role in initiating and regulating immune responses. DC maturation following exposure to nickel or DNCB induced an up-regulation of phenotypic markers and inflammatory cytokine secretion. Early intracellular mechanisms involved in DC maturation required to be precise. To address this purpose, DCs derived from human monocytes were treated with sensitizers (nickel, DNCB or thimerosal) in comparison with an irritant (SDS). Our data confirming the up-regulation of CD86, CD54 and cytokine secretion (IL-8 and TNF α) induced by sensitizers but not by SDS, signalling transduction involved in DC maturation was investigated using these chemicals. Kinase activity measurement was assessed using two new sensitive procedures (Face™ and CBA) requiring few cells. SDS did not induce changes in signalling pathways whereas NiSO₄, DNCB and thimerosal markedly activated p38 MAPK and JNK, in contrast Erk1/2 phosphorylation was completely inhibited by DNCB or thimerosal and only activated by nickel. A pre-treatment with p38 MAPK inhibitor (SB203580) suppressed Erk1/2 inhibition induced by DNCB or thimerosal demonstrating a direct interaction between p38 MAPK and Erk1/2. A pre-treatment with an antioxidant, *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) markedly reduced Erk1/2 inhibition and p38 MAPK phosphorylation induced by DNCB and thimerosal, suggesting a direct activation of p38 MAPK via an oxidative stress and a regulation of MAPK signalling pathways depending on chemicals. Because of a high sensitivity of kinase activity measurements, these procedures will be suitable for weak or moderate sensitizer screening.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Dendritic cells (DCs) play an essential role in the initiation of Allergic Contact Dermatitis in humans (Banchereau and Steinman, 1998). After hapten binding, immature DCs internalize and process this complex and migrate from the epidermis to the skin draining lymph nodes where they present antigens to naive T cells and acquired a mature phenotype (for review see Banchereau et al., 2000; Divkovic et al., 2005; Ryan et al., 2007). The 7th Amendment to the EU Cosmetics Directive (Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. Official Journal of the European Union L66, 26–35), will ban the marketing of cosmetic products containing ingredients

that have been tested on animals for the prediction of skin sensitization. In response to this amendment, *in vitro* approaches to the prediction of skin sensitization are currently under development (for review see Welss et al., 2004; Ryan et al., 2005; Gerberick et al., 2004; Ryan et al., 2007). Several studies reported that DCs can be generated *in vitro* either from human monocytes (Aiba et al., 1997; Coutant et al., 1999; Guironnet et al., 2000; Tuschl et al., 2000; Hulette et al., 2002, 2005) or CD34⁺ cord blood progenitors (Caux et al., 1992; De Smedt et al., 2002; Noirey et al., 2003; Boislève et al., 2004). Immature DCs acquired a mature phenotype induced by sensitizers, such as DNCB and nickel, characterized by a decrease of E-cadherin expression and an increase of HLA-DR, CD83, CD54 and CD86 phenotypic markers, and the secretion of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-8 and TNF α). In contrast non-sensitizers such as SDS, benzalkonium chloride, and ZnCl₂ had no significant effect on DC maturation process (Coutant et al., 1999). From these data, several groups proposed that chemical sensitizer potential could be predicted based upon changes in the expression of DC surface markers (Guironnet et al., 2000; Tuschl et al., 2000). These approaches have not been validated for the prediction of sensitizer potential, however existing data sets would suggest that a high degree of inter-donor variability is intrinsic to the current

Abbreviations: CBA, Cytometric Bead Array; DNCB, 1-chloro-2,4 dinitrobenzene; NAC, *N*-acetyl-L-cysteine; NiSO₄, nickel (II) sulfate hexahydrate; RLU, relative light units.

* Corresponding author. Hôpital Edouard Herriot, Pavillon R, 69 437 Lyon Cedex 03, France. Fax: +33 4 72 11 02 90.

E-mail address: mireille.serres@univ-lyon1.fr (M. Serres).

¹ Present address: Links Ingénierie, Paris, France.

methods (particularly with respect to weak and moderate potency sensitizers). In addition, the molecular mechanism that underlies changes in DC phenotype following chemical sensitizer treatment has yet to be fully elucidated.

From the literature, signalling pathways such as MAPKs and NF- κ B were reported to be involved in DC maturation (Rescigno et al., 1998; Ardeshtina et al., 2000; Arrighi et al., 2001; Aiba et al., 2003; Boislève et al., 2005). JNK, p38 MAPK and Erk1/2 are involved in a wide variety of cellular responses, including proliferation, differentiation and apoptosis. Erk1/2 pathway is most commonly linked to the regulation of cell proliferation, whereas JNK and p38 MAPK pathways are primarily activated by various environmental stresses such as osmotic shock, UV radiation, heat shock, oxidative stress and proinflammatory cytokines. Therefore, JNK and p38 MAPK are together classified as stress-activated protein kinases (SAPKs). In response to sensitizers, Arrighi et al. (2001) demonstrated an important role for p38 MAPK during mono-DC maturation induced by NiSO₄ and DNFB as reported by Aiba et al. (2003) with an activation of JNK, Erk1/2 and NF- κ B. Results obtained with CD34⁺-DCs, demonstrated that all three MAPKs are involved in CD83, CD86 and CCR7 up-regulation induced by NiSO₄ (Boislève et al., 2004, 2005); however the role of each of the signalling pathways plays in the induction of DC maturation was not delineated within these studies.

Consequently in this analysis, performed on human DCs derived from monocytes, signalling pathways associated with DC maturation were investigated and JNK, p38 MAPK and Erk1/2 phosphorylation was quantified after treatment with NiSO₄, DNCB and thimerosal, and in comparison with SDS. If NiSO₄ and DNCB are both well-known to induce DC maturation, thimerosal, an organic mercury compound described to cause allergic disorders (Zenarola et al., 1995), is less well characterized. The phosphorylation of kinases was assessed using two new technologies based on a direct *in situ* phosphodetection (Face™ method and Cytometric Bead Array). The cross talk between MAPKs (JNK, p38 and Erk1/2), was demonstrated using a cell pre-treatment with specific kinase inhibitors before exposure to chemicals.

Reactive oxygen species are characterized as secondary messengers that control a broad range of physiological and pathological processes (Kumar et al., 1999) and in particular DC maturation via the phosphorylation of proteins after cysteine oxidation (Matsuzawa and Ichijo, 2005). In this context, the relationship between oxidative stress and MAPKs (JNK, p38 and Erk1/2), was investigated using *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) pre-treatment before cell exposure to chemicals.

Materials and methods

Chemicals

NiSO₄, DNCB, thimerosal and SDS were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). NiSO₄, thimerosal and SDS were dissolved in culture medium. Specific inhibitors of MAPKs such as for Erk1/2 U0126 and U0124 the negative control (Promega), for p38 MAPK, SKF86002, SB203580, SB202190 and the negative control (Calbiochem) and SP600125 (Calbiochem), specific inhibitor of JNK were dissolved in DMSO as well as DNCB (Aldrich) and the same final concentration of DMSO, which did not exceed 0.04%, was used as a negative control.

Purification and culture of human peripheral blood monocyte-derived DCs

DCs were generated *in vitro* from human mononuclear cell (CD14⁺, monocytes) as described (Guironnet et al., 2000). Monocytes were further purified by magnetic selection of CD14 positive cells, using a specific antibody and a magnetic cell separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The resulting suspension routinely contained more than 80% CD14⁺ cells. Monocyte-derived DCs (mono-DCs) were generated from monocytes cultured for 5 days in six-well tissue culture plates (10⁶ cells/ml) in RPMI 1640 medium with glutamax and 25 mM HEPES (Invitrogen, France), supplemented with 10% heat inactivated foetal bovine serum (Invitrogen, France) and recombinant human cytokines such as GM-CSF (500 U/ml, Immunotools, Germany) and IL-4 (50 U/ml, R&D Systems, Lille, France). At day 3, fresh medium was added and after 5 days of culture, only preparations containing more than 80% of CD1a positive cells were used. Immature DCs (10⁵ cells per well) were treated for 48 h with LPS (100 ng/ml) or TNF α (50 ng/ml) as positive controls or with chemicals, NiSO₄ (500 μ M), DNCB (30 μ M) or thimerosal (7.4 or 14.8 μ M) in comparison with SDS (10 μ g/ml) in X-Vivo

serum-free medium supplemented with GM-CSF (500 U/ml) and IL-4 (50 U/ml). Foetal bovine serum known to contain several growth factors susceptible of activating signalling pathways was removed.

Quantification of chemical cytotoxicity

The cytotoxic effect of chemicals was assessed on DCs using a colorimetric assay, MTT (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) measuring mitochondrial activity in living cells (Denizot and Lang, 1986). Because of a high toxicity of chemicals such as DNCB and thimerosal, for studies on DC phenotype and cytokine secretion, cells were treated with these chemicals for 30 min, then chemicals were removed and cells were incubated for 48 h in a fresh medium after several washings. Kinase studies requiring only a short treatment, cells were treated with chemicals for 30 min to 6 h. Then, MTT reagent (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was added and after incubation for 4 h, MTT is converted to colored formazan and following cell lysis, the absorbance was quantified at 540 nm.

Immunofluorescent staining and flow cytometric analysis

DC phenotype changes were detected by flow cytometric after 48 h exposure to chemicals or positive controls. For this purpose, cells were harvested and incubated for 30 min at 4 °C with human FITC-conjugated, monoclonal anti-CD86 IgG1 antibody (catalog number: 555657, Bioscience Pharmingen, France), monoclonal anti-CD54 IgG1 antibody (catalog number: 0726, Immunotech, France), monoclonal anti-HLA-DR IgG2b antibody (catalog number: 0463, Immunotech) or the corresponding isotype control (mouse IgG1-FITC, catalog number: 555748, Bioscience Pharmingen or mouse IgG2b-FITC, catalog number: 1267, Immunotech). After washed at 4 °C in PBS containing 1% of BSA and fixation in PBS with 1% formaldehyde, cells were stored at 4 °C in the dark until analysis with a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, France). For each sample, 5000 cells were acquired and data were analyzed on a gated homogenous population of living cells using Cell Quest software (Becton Dickinson).

Measurement of TNF α and IL-8 release by ELISA

Cell supernatants were collected after 48 h of DC treatment with sensitizers or irritant. Cell viability was confirmed by Trypan blue exclusion and was higher than 80% for each condition. TNF α and IL-8 concentration was measured by ELISA (R&D and Abcys Paris, France) according to manufacturer's instructions. The concentration of TNF α and IL-8 was calculated in each case using standard curves obtained with human recombinant TNF α (from 8 to 500 pg/ml) and IL-8 (from 16 to 1000 pg/ml).

Phosphodetection of MAPK signalling pathways

MAPK activities were detected using specific anti-phospho-antibodies and assessed using two new methods: Face™ chemiluminescence assay and Cytometric Bead Array (CBA).

Face™ chemiluminescent assay. JNK, p38 MAPK and Erk1/2 phosphorylation was detected using the fast activated cell-based ELISA method (FACE™, Active Motif, Rixensart, Belgium). Phospho-antibodies recognized specifically the phosphorylated forms of JNK (Thr183/Tyr185), p38 MAPK (Thr180/Tyr182) and Erk1/2 (Thr202/Tyr204 for Erk1 and Thr185/Tyr187 for Erk2). Immature mono-DCs at day 5 were seeded in 96-well plate (5 × 10⁴ cells per well) pre-coated with poly-L-Lysine (Le Pont de Claix, France) in a free serum medium (X-Vivo medium) supplemented with GM-CSF and IL-4. After adhesion, cells were treated in triplicate with sensitizers or non-sensitizer for 15 min, 30 min to 6 h and rapidly fixed with 8% formaldehyde in PBS. After incubation with primary p38 MAPK, JNK and Erk1/2 anti-phospho-antibodies, the detection was performed using HRP-conjugated secondary antibody revealed by chemiluminescence and read using a luminometer (Promega, Charbonnières, France). Cells incubated only with HRP-conjugated antibody were used as a negative control. Total p38 MAPK, JNK or Erk1/2 was determined using antibodies recognizing specifically these kinases regardless of their phosphorylation state. The results normalized by counting cell number using a crystal violet staining read at 595 nm, are expressed as the fold increase relative to the control (untreated cells). This procedure is highly sensitive (measuring picogrammes of phosphorylated proteins (values from Active Motif), therefore far fewer cells are required if compared to more classical methods (e.g. Western blotting) of phospho-protein detection, where microgrammes of protein are required.

Cytometric Bead Array (CBA) phosphoflex™. JNK, p38 MAPK and Erk1/2 activities were quantified with the CBA phosphoflex™ set (Becton Dickinson). This bead-based fluorescent immunoassay allowed to the quantification of kinases within the same cell lysate. Similarly as FACE™, phospho-antibodies specifically recognized the phosphorylated forms of JNK (Thr183/Tyr185), p38 MAPK (Thr180/Tyr182) and Erk1/2 (Thr202/Tyr204). Immature mono-DCs at day 5 were treated for 30 min in triplicate with sensitizers and non-sensitizers in X-Vivo medium supplemented with GM-CSF and IL-4. After treatment, cell pellets were resuspended in denaturation buffer (Becton Dickinson, France) and cell lysates were immediately boiled for 5 min. Total protein concentration was assessed using Bradford's (1976) assay. Immuno-stainings were performed on denaturated cell lysate, using mixed capture beads (p38 MAPK, Erk1/2 and JNK), and revealed with PE reagent according to Becton Dickinson's protocol. Then,

300 events of each capture bead population were acquired by flow cytometer (FACSCalibur™, Becton Dickinson, France) using CellQuest™ pro software. MAPK phosphorylation was quantified using standard curves obtained with human

recombinant phospho-p38 MAPK, phospho-JNK and phospho-Erk1/2 (from 3.9 to 1000 pg/ml). All experiments were performed in duplicate and data are analyzed with the FCAP Array™ software.

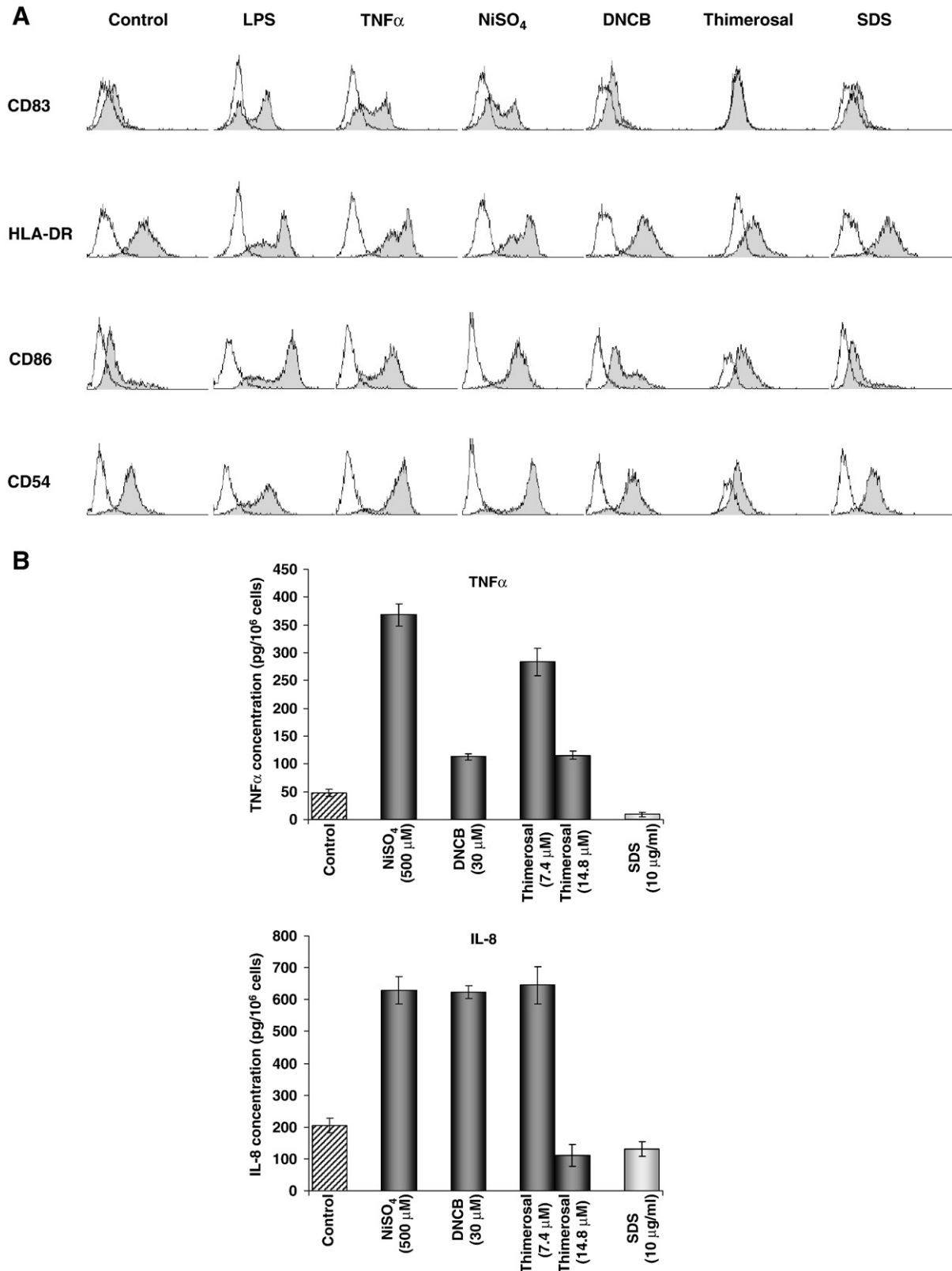


Fig. 1. Contact sensitizers induced DC maturation. Immature mono-DCs at day 5 were treated or not (control) for 48 h with contact sensitizers, NiSO $_4$ (500 μ M), DNCB (30 μ M) and thimerosal (14.8 μ M) or non-sensitizer, SDS (10 μ g/ml), in comparison with LPS (100 ng/ml) and TNF α (20 ng/ml), used as positive controls. (A) Contact sensitizers up-regulated CD86, CD54, CD83 and HLA-DR expression. Grey-filled histogram represents the specific marker staining and dotted lines of respective isotype control. (B) TNF α and IL-8 release in mono-DC supernatants recovered after 48 h treatment with chemicals was quantified by ELISA. Data represent mean of triplicate reading of three independent experiments.

Treatment with specific inhibitors

To evaluate the cross talk between JNK, p38 MAPK and Erk1/2 pathways, cells were incubated for 30 min with specific inhibitors prior to treatment with sensitizers or irritant. Specific inhibitors of JNK, p38 MAPK and Erk1/2 pathways were tested at pharmacologically-relevant concentrations (from 10 μ M to 25 μ M) and MTT assay was verified to be not modified by this treatment. Cells treated with the relevant solvent (DMSO) were used as a negative control.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation analyzed using Student's *T*-test considered to be significant at $p < 0.05$ *; $p < 0.01$ ***; $p < 0.001$.

Results

Contact sensitizers induced an up-regulation of DC maturation markers and cytokine release

After treatment for 48 h of immature mono-DCs with sensitizers (NiSO₄, DNCB and thimerosal) or with LPS or TNF α used as positive controls, a significant increase in the cell surface expression of CD54, CD83, CD86 and HLA-DR was shown, whereas SDS had no significant effect on each marker (Fig. 1A). These data are summarized in Table 1 expressing up-regulation of phenotypic markers with mean of fluorescence (MFI) and percentage of positive cells quantified from flow cytometry. The most reproducible CD83, HLA-DR, CD54 and CD86 up-regulation data was obtained with NiSO₄ which induced DC maturation in all experiments ($n = 10$), whereas minimal changes in these markers were detected in mono-DCs treated with DNCB and thimerosal, and this may be explained by the high level of inter-donor variability with respect to responsiveness to these chemicals, as reported by other authors (Gerberick et al., 2004). In response to sensitizers, TNF α and IL-8 release were also markedly induced by nickel, DNCB and thimerosal (Fig. 1B) whereas SDS had no significant effect.

Sensitizers differently regulated MAPKs (p38 MAPK, Erk1/2 and JNK)

In parallel with DC maturation induced by sensitizers, the phosphorylation of JNK, p38 MAPK and Erk1/2 was assessed using a new procedure, Face™ method. A kinetic experiment was carried out to evaluate JNK, p38 MAPK and Erk1/2 phosphorylation after 15 min to 6 h treatment with sensitizers such as NiSO₄, DNCB, thimerosal or irritant, SDS. In all experiments (Fig. 2), SDS has no significant effect on the phosphorylation of all three kinases. Regarding JNK, results (Fig. 2A) show that NiSO₄ induced JNK phosphorylation between 15 min and 4 h, whereas DNCB and thimerosal slightly decreased it between 15 and 30 min before inducing a later activation from 2 h onwards (Fig. 2A). With regard to DNCB, JNK phosphorylation was maintained after 4 h, however this effect was not observed with thimerosal due to its cell cytotoxicity after 3 h treatment as shown also with p38 MAPK and Erk1/2 (Figs. 2B and C, respectively). Data on p38 MAPK, show that all three sensitizers induced its phosphorylation between 15 min to 2 h (Fig. 2B)

Table 1
Up-regulation of CD83, HLA-DR, CD86 and CD54 expression after mono-DC exposure to chemicals

	CD83		HLA-DR		CD86		CD54	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI
Control	19	25 \pm 12.2	99	96 \pm 24.2	67	20 \pm 7.5	97	32 \pm 9.6
LPS (100 ng/ml)	65	49 \pm 20.2	96	148 \pm 21.1	98	106 \pm 26.4	95	58 \pm 4.8
TNF α (20 ng/ml)	63	33 \pm 4.4	96	149 \pm 8.4	98	61 \pm 15.9	98	133 \pm 2.6
NiSO ₄ (500 μ M)	53	39 \pm 12.3	97	120 \pm 18.9	99	74 \pm 14.2	97	187 \pm 61.9
DNCB (30 μ M)	44	16 \pm 1.8	99	101 \pm 10.9	98	26 \pm 8.2	97	40 \pm 4.7
Thimerosal (14.8 μ M)	4	43 \pm 15.2	73	49 \pm 6.6	71	24 \pm 6.8	52	16 \pm 7.5
SDS (10 μ g/ml)	18	15 \pm 2.8	98	89 \pm 11.4	53	15 \pm 4.3	98	28 \pm 3.9

Mean fluorescence intensity (MFI) and percentage of positive cells were quantified by flow cytometry.

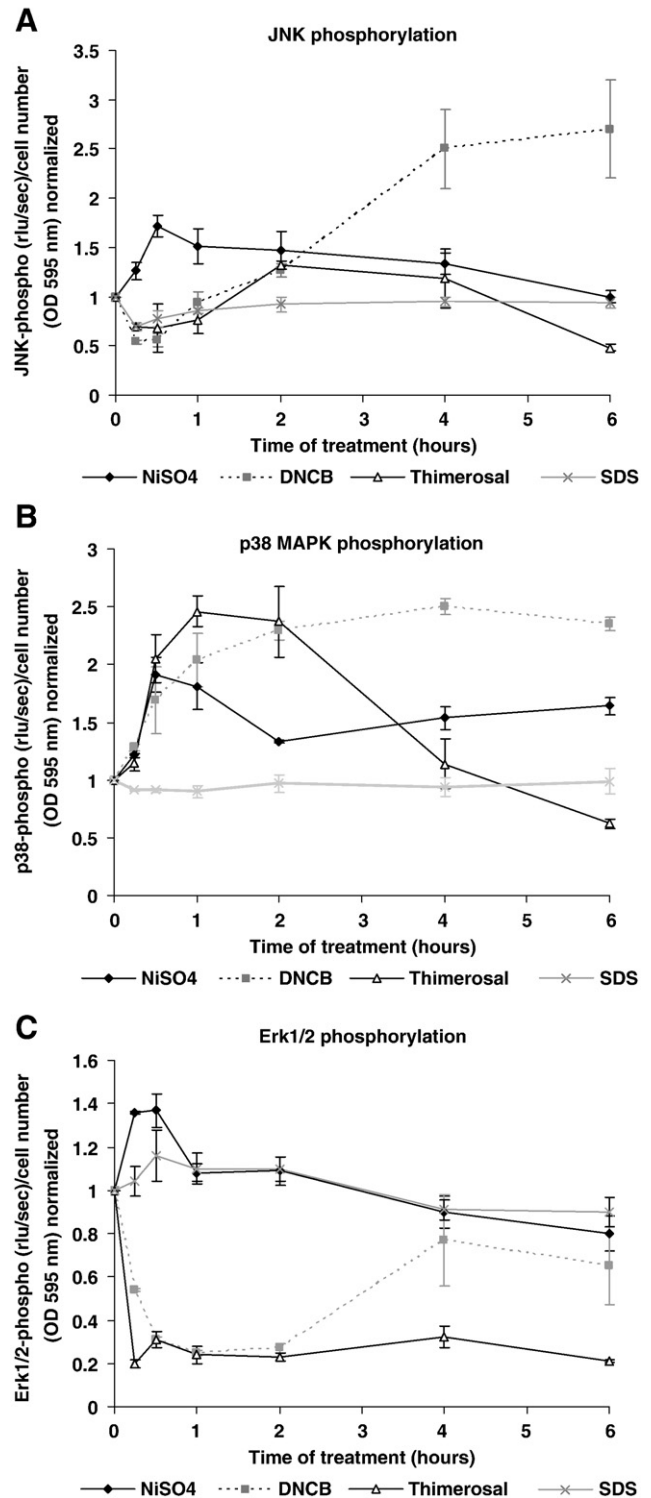


Fig. 2. Kinetics of MAPK phosphorylation. JNK (A), p38 MAPK (B) and Erk1/2 (C) phosphorylation after treatment of immature mono-DCs with NiSO₄ (500 μ M), DNCB (30 μ M), thimerosal (14.8 μ M) and SDS (10 μ g/ml) 15 min to 6 h. Data obtained by Face™ method are expressed as the fold increase relative to the control and represent mean of triplicate reading of three independent experiments.

which was maintained with NiSO₄ and DNCB up to 6 h treatment. Erk1/2 phosphorylation was differentially regulated by sensitizers (Fig. 2C). NiSO₄ induced a rapid phosphorylation from 15 to 30 min with a return to basal levels after 1 h. In contrast, DNCB and thimerosal induced a strong inhibitory effect which lessens after 4 h exposure to DNCB.

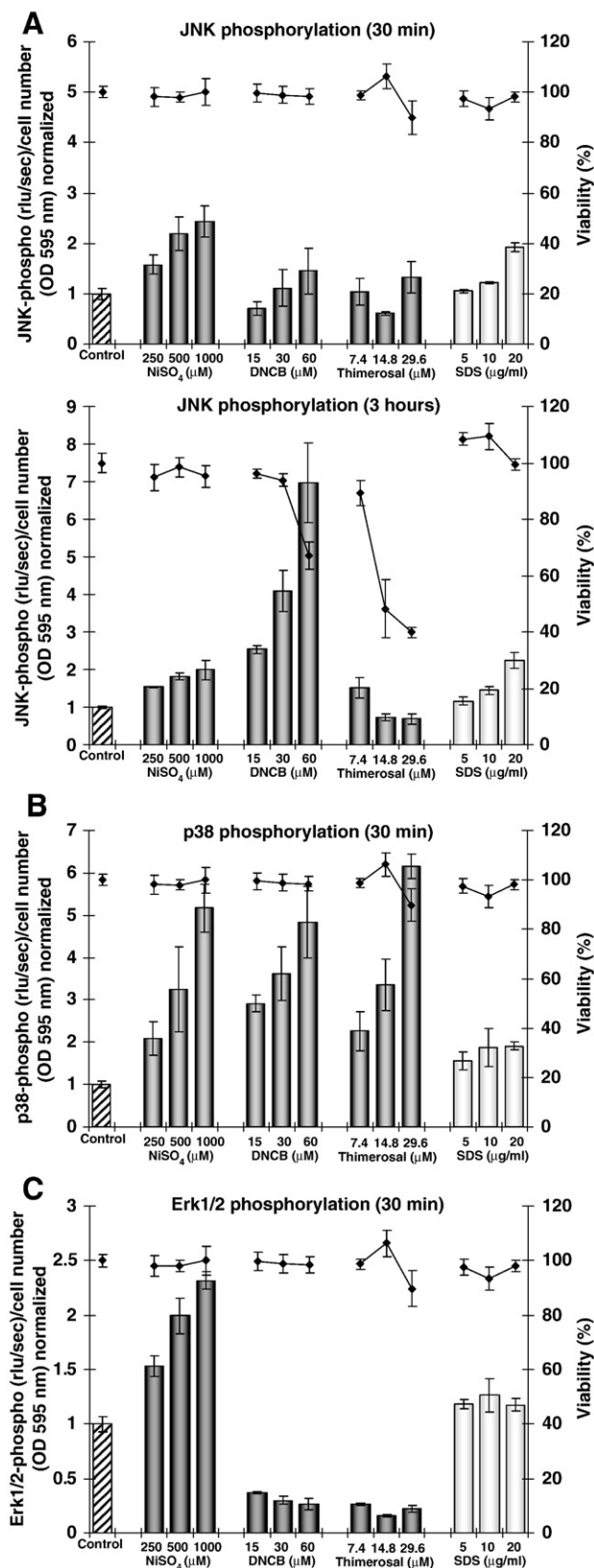


Fig. 3. Dose-response effect of chemicals on MAPK phosphorylation. After cell treatment with NiSO₄ (250, 500, 1000 μM), DNCB (15, 30, 60 μM), thimerosal (7.4, 14.8, 29.6 μM) or SDS (5, 10, 20 μg/ml). JNK (A), p38 MAPK (B) and Erk1/2 (C) phosphorylation was measured after exposure for 30 min or 3 h. Data expressed as the fold increase relative to control represent mean of triplicate reading of three independent experiments. Viability, reported on the y second axis was assessed using MTT assay.

Table 2
Inter-experimental variability

MAPKs	Conditions	N	Induction rate	Mean ± SD
JNK	NiSO ₄ (500 μM)	13	1.14 to 2.2	1.6 ± 0.4
	DNCB (30 μM)	10	0.7 to 1.2	0.86 ± 0.2
	Thimerosal (14.8 μM)	5	0.7 to 1.3	0.98 ± 0.2
	SDS (10 μg/ml)	7	0.7 to 1.6	1.2 ± 0.45
p38 MAPK	NiSO ₄ (500 μM)	14	1.3 to 3.7	2.2 ± 0.7
	DNCB (30 μM)	11	1.7 to 3.6	2.7 ± 0.7
	Thimerosal (14.8 μM)	5	2 to 3.7	2.8 ± 0.6
	SDS (10 μg/ml)	6	0.9 to 1.7	1.3 ± 0.4
Erk1/2	NiSO ₄ (500 μM)	13	1.2 to 2	1.4 ± 0.2
	DNCB (30 μM)	11	0.2 to 0.53	0.27 ± 0.11
	Thimerosal (14.8 μM)	5	0.2 to 0.3	0.21 ± 0.05
	SDS (10 μg/ml)	6	0.9 to 1.2	1.1 ± 0.2

Effect of NiSO₄ (500 μM), DNCB (30 μM), thimerosal (14.8 μM) and SDS (10 μg/ml) on JNK, p38 MAPK and Erk1/2 phosphorylation after 30 min treatment. N: number of independent experiments performed with 5 donors (untreated cells = 1).

In order to confirm the specificity of kinase phosphorylation, the amount of total JNK, p38 MAPK and Erk1/2 protein was assessed using Face™ method after exposure to chemicals. Total MAPK contents were determined using antibodies which specifically recognized JNK, p38 MAPK and Erk1/2 independently of their phosphorylation state. As expected, no significant change of total JNK, p38, MAPK and Erk1/2 was shown after NiSO₄, DNCB or thimerosal treatment (data not shown).

Dose-response effect

Due to the dynamics of JNK phosphorylation (Fig. 3A), measurements were performed after 30 min and 3 h treatment with chemicals. Each chemical was tested at three concentrations and cell viability was evaluated by MTT assay (Fig. 3). Data show that NiSO₄ induced JNK phosphorylation in a dose-dependent manner after 30 min and 3 h treatment. The strong phosphorylation of JNK induced by DNCB was confirmed after 3 h exposure and was dose-dependent, however this effect was not maintained with thimerosal due to its toxicity after 3 h (Fig. 3A). With regard to p38 MAPK, all the sensitizers tested (NiSO₄, DNCB and thimerosal) induced a strong, dose-dependent phosphorylation after cell treatment (Fig. 3B). With regard to Erk1/2 phosphorylation (Fig. 3C), NiSO₄ induced its phosphorylation in a dose-response manner. The strong inhibitory effect of DNCB and thimerosal was detected whatever their concentration.

Inter-donor variability

To address this issue, experiments were performed using mono-DCs derived from several donors. Results obtained on JNK, p38 MAPK and Erk1/2 phosphorylation after treatment with NiSO₄, DNCB, thimerosal and SDS are summarized in Table 2. Similar data on JNK, p38 MAPK and Erk1/2 phosphorylation are obtained with five different donors suggesting a minor inter-donor variability.

Quantification of MAPK phosphorylation by CBA phosphoflex™

To complete this analysis and to verify the results obtained by the Face™ method, CBA phosphoflex™ beads were used to quantify MAPK phosphorylation (Fig. 4). In untreated cells, human mono-DCs expressed higher basal levels of p38 MAPK and Erk1/2 phosphorylation (63 ± 3 and 76 ± 24 pg/mg of total protein respectively) than JNK (6.7 pg/mg of total protein ± 0.04), SDS was without effect (Fig. 4). The three sensitizers (NiSO₄, DNCB and thimerosal) significantly induced JNK (Fig. 4A) and p38 MAPK phosphorylation (Fig. 4B). With regard to Erk1/2, only NiSO₄ markedly increased its phosphorylation, in contrast DNCB and thimerosal markedly reduced its activity (Fig. 4C).

Cross talk between MAPK pathways

Signal transduction pathways are characterized by complex phosphorylation networks. All three MAPKs play an important role

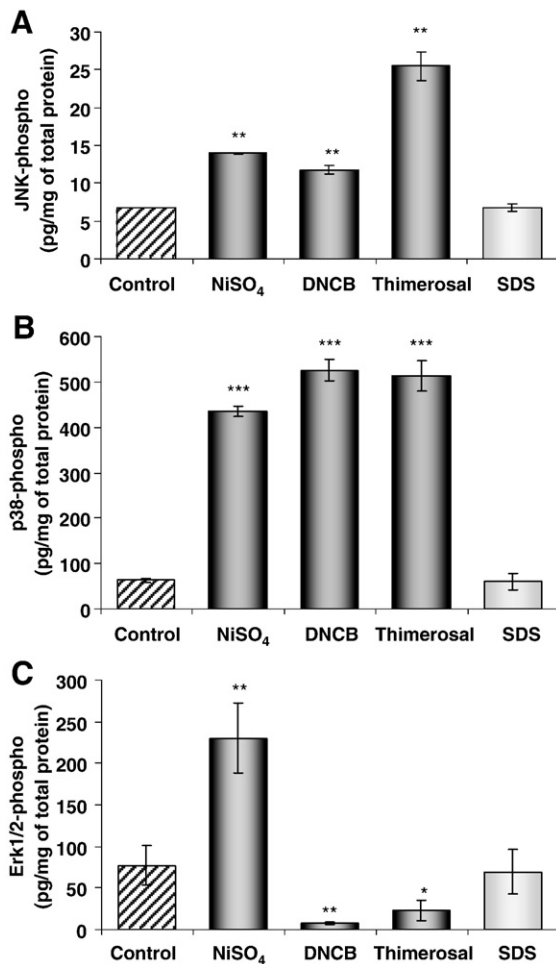


Fig. 4. Quantification of JNK, p38 MAPK and Erk1/2 phosphorylation by CBA phosphoflex™ procedure. Mono-DCs were treated for 30 min with sensitizers (NiSO₄ (500 μM), DNCB (30 μM), thimerosal (14.8 μM)) or SDS (10 μg/ml). Data are representative of triplicate reading of three independent experiments. Asterisks indicate statistical significance related to difference between treated and non-treated cells using Student's *T*-test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

in sensitizer-induced DC maturation, however their regulation appears to differ between chemicals. In order to better understand the inter-connections between these MAPK pathways, the effect of a pre-treatment with specific kinase inhibitors was evaluated on mono-DCs exposed to sensitizers.

Results on Erk1/2 phosphorylation (Fig. 5A) show that a pre-treatment with the p38 MAPK inhibitor, SB202190 significantly increased basal Erk1/2 phosphorylation levels and its subsequent activation by NiSO₄ whereas the JNK inhibitor, SP600125 was without any significant effect. These data suggested that p38 MAPK negatively regulated Erk1/2 pathway. In addition, a pre-treatment of mono-DCs with the Erk1/2 inhibitor, U0126 (Fig. 5A) markedly reduced Erk1/2 phosphorylation, confirming the specificity of the antibodies used. Conversely, p38 MAPK phosphorylation (Fig. 5B), was not significantly modified after pre-treatments with U0126 or SP600125 (JNK inhibitor) suggesting that Erk1/2 and JNK have no effect on p38 MAPK phosphorylation. Inhibitors of p38 MAPK (SB202190 and SB203580), which act on p38 MAPK activity but not on its phosphorylation (Kumar et al., 1999), increased its phosphorylation (data not shown), probably due to a cell regulatory mechanism which is compensating for p38 MAPK activity loss. With regard to JNK (Fig. 5C), pre-treatment with U0126 demonstrated that Erk1/2 has no significant effect on JNK phosphorylation, suggesting that both stress-activated MAPKs (p38 MAPK and JNK) were not regulated by Erk1/2. JNK phosphoryla-

tion was markedly reduced by a pre-treatment with SP600125 confirming the specificity of the anti-phospho-JNK antibody. With regard to p38 MAPK and JNK interaction, the JNK inhibitor had no significant effect on p38 MAPK phosphorylation, whereas p38 MAPK inhibitors and in particular SB203580, increased by three-fold JNK phosphorylation level induced by nickel, suggesting a competition existing between these two kinases, potentially with JNK occupying a secondary role as suggested by its later activation (2 h).

In summary, all these data indicate that Erk1/2 had no regulatory effect on SAP kinases, but they suggest a central role of p38 MAPK which negatively regulates the Erk1/2 pathway and competes with JNK phosphorylation.

Cross talk between oxidative stress and MAPK phosphorylation

In order to quantify the role of oxidative stress in sensitizer-induced mono-DC maturation, cells were pre-treated with the antioxidant, *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) prior exposure to chemicals. Data summarized in Table 3 demonstrate that NAC markedly reduced sensitizer-induced CD86 up-regulation and thereby suggest that oxidative stress is directly involved in DC maturation. Because p38 MAPK and Erk1/2 phosphorylation are rapidly and markedly modified after chemical exposure, the role of ROS in the phosphorylation of these two kinases was investigated. Results demonstrate that NAC reduced p38 MAPK phosphorylation in a dose-dependent manner (Fig. 6A), confirming that p38 MAPK activation is correlated with cell redox status. The inhibition of Erk1/2 phosphorylation (Fig. 6B) induced by DNCB and thimerosal, was markedly reduced by a pre-treatment of cells either with NAC or p38 MAPK inhibitor (SB203580), confirming that p38 MAPK negatively regulates Erk1/2 and suggesting that ROS could be indirectly involved in the negative regulation of Erk1/2 via an activation of p38 MAPK pathway.

Discussion

DCs are known to play an important role in the induction of immune responses, however the main cellular and molecular mechanisms that drive sensitizer-induced DC maturation are not fully clarified. In order to better characterize the role of sensitizers in DC maturation, the role of early events such as signalling pathways was investigated. Because kinetic of kinase activity is very different from that of DC maturation markers, firstly the role of sensitizers in inducing changes in phenotypic marker and cytokine secretion was verified. Under our experimental conditions, SDS was shown to be without any significant effect on mono-DC phenotype whereas LPS, TNFα and NiSO₄ consistently induced up-regulation of cell surface receptors for antigen presentation (HLA-DR and CD83), costimulatory (CD86) and adhesion (CD54), as previously reported (Guironnet et al., 2000; Tuschl et al., 2000; Hulette et al., 2005). In the majority of experiments CD86 expression was significantly up-regulated by DNCB and in a lesser extend with thimerosal for which a high variability between donors and inter-experiments was noticed. However, a recent study from Agrawal et al. (2007) demonstrate that thimerosal down-regulated CD86 expression induced by LPS. This discrepancy could be explained by the difference in culture conditions, time and concentration of this chemical. In parallel with DC phenotypic changes, TNFα secretion was up-regulated by both nickel and thimerosal whereas IL-8 secretion was up-regulated by all three sensitizers, without any significant effect of SDS. These data are in agreement with those reported previously with DNCB on mono-DCs (Aiba et al., 2003) and on CD34⁺-DCs (Ade et al., 2007).

In this paper, the potential effect of sensitizers on DC maturation is shown to be correlated with the modification of kinase activity corresponding to early events involved in such maturation. Kinase activation was demonstrated to be highly specific in correlation with chemicals such as a high activation of p38 MAPK induced by DNCB and

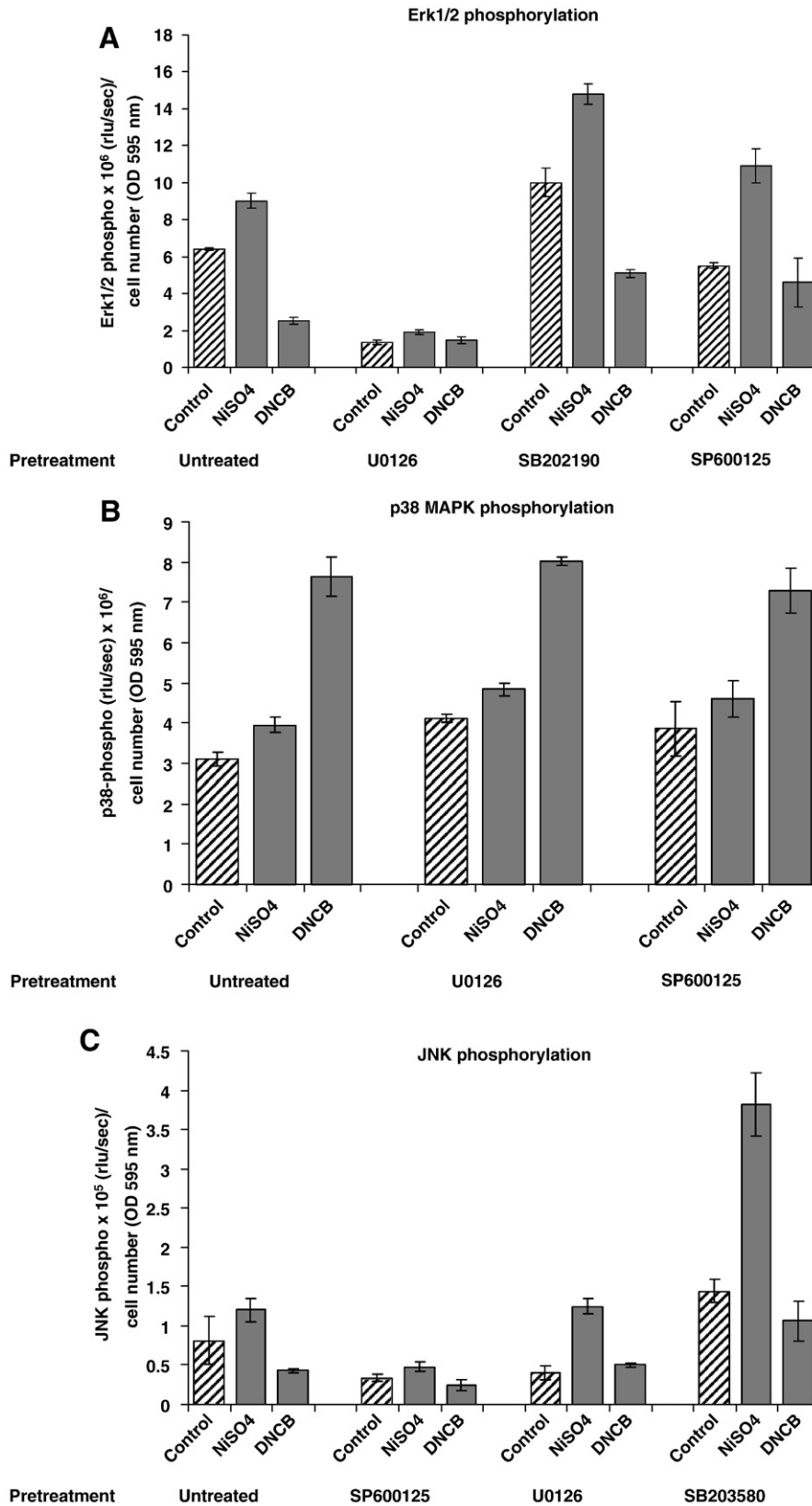


Fig. 5. Cross talk between MAPK pathways. Cells were pre-treated for 30 min with kinase inhibitors such as SB202190 (25 μM), SB202190 (25 μM), U0126 (25 μM) or SP600125 (25 μM) and exposed or not (control) to sensitizers (NiSO₄ at 500 μM or DNCB at 30 μM). Detection of kinase phosphorylation was assessed by FACE™ method and represents mean of triplicate reading of three independent experiments.

thimerosal correlated with a high decrease in Erk1/2 phosphorylation. A cross talk between these kinases is demonstrated. The originality of this study is a direct *in situ* measurement of kinase activities using two

new procedures well adapted to chemical screening because of their high sensitivity, without significant inter-donor variability. The Face™ method allowed to identify protein phosphorylation and is adapted to

Table 3
Effect of antioxidant pre-treatment on CD86 expression induced by sensitizers

	Untreated		NAC (25 mM)	
	%	MFI	%	MFI
Control	49.3	34.5	32.6	27.9
NiSO ₄ (500 μM)	80.3	46	37.3	26.5
DNCB (30 μM)	95.9	78.7	84.8	54
Thimerosal (14.8 μM)	75	33	14.6	49.5
SDS (10 μg/ml)	60	39.3	28.8	26.8

After 30 min pre-treatment with *N*-acetyl-L-cysteine (25 μM), mono-DCs were exposed to NiSO₄ (500 μM), DNCB (30 μM), thimerosal (14.8 μM) or SDS (10 μg/ml). CD86 expression was analyzed by flow cytometry after 48 h exposure to chemicals. Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) and percentage of positive cells.

measure kinase activities in few cells. The phospho-detection by chemiluminescence is highly sensitive and can detect picomoles of phosphorylated proteins (values given by Active Motif), whereas for Western blotting a minimum of 10 μg of proteins is generally required. For this purpose, chemiluminescence detection will be useful to evaluate the potency of moderate or weak sensitizers.

The particularity of CBA phosphoflex™ procedure is to quantify in the same cell lysate, JNK, p38 MAPK and Erk1/2 phosphorylation using recombinant phospho-MAPKs but it is still restricted to few kinases. These two procedures requiring few cells will be easily used to monitor a great number of chemicals on mono-DCs or CD34⁺-DCs.

With regard to chemical effects on intracellular signalling pathways, our studies were focused on three MAPK pathways, Erk1/2 (role in differentiation and cell survival), p38 MAPK and JNK (role in response to stress conditions). They show that only sensitizers markedly modulated MAPK signalling pathways whereas SDS had no significant effect, as previously described in mono-DCs (Arrighi et al., 2001; Aiba et al., 2003) or CD34⁺-DCs (Boislève et al., 2004, 2005). From our preliminary studies (data not shown), the involvement of MAPK pathways was demonstrated using specific kinase inhibitors which decreased the up-regulation of DC maturation markers induced by sensitizers as previously reported (Arrighi et al., 2001; Aiba et al., 2003; Boislève et al., 2005). In particular, Arrighi et al. (2001) and Aiba et al. (2003) reported a decrease of HLA-DR and CD83 expression consecutive to p38 MAPK inhibition but not for CD86 as also found under our experimental conditions (data not shown).

Regarding Erk1/2 pathway, a cell pre-treatment with its specific inhibitor, U0126 is able to down-regulate DC maturation induced by TNFα or nickel but not by LPS (Rescigno et al., 1998; Ardeshtna et al., 2000; Arrighi et al., 2001; Ishii et al., 2001; Aiba et al., 2003; Boislève et al., 2005). U0126 was reported to down-regulate CD83, CD86 and CCR7 expression induced by nickel in CD34⁺-DCs (Boislève et al., 2005) as also found under our experimental conditions for CD86 (data not shown). Erk1/2 phosphorylation was markedly inhibited after DNCB or thimerosal exposure, as reported for DNCB (Aiba et al., 2003) whereas, Matos et al. (2005) reported that DNCB induced Erk1/2 phosphorylation in a foetal mouse skin dendritic cell line, thereby suggesting a possible underlying difference in the response between human mono-DCs and mouse DC lines.

The involvement of JNK in DC maturation was reported by Boislève et al. (2005) on CD34⁺-DCs using a pre-treatment with SP600125 (JNK inhibitor) prior to sensitizer exposure, as confirmed by our preliminary studies (data not shown). Our data show that all three sensitizers tested (NiSO₄, DNCB and thimerosal) were able to activate JNK but later (from 2 h) with DNCB and thimerosal suggesting that these chemicals may have an indirect effect on JNK phosphorylation.

In summary, DNCB and thimerosal activated p38 MAPK and JNK but inhibited Erk1/2 pathways, whereas NiSO₄ activated all three MAPKs. In all experiments SDS was without any significant effect on the signalling pathways as previously reported (Arrighi et al., 2001; Aiba et al., 2003; Boislève et al., 2005).

A cross talk between MAP kinase pathways is demonstrated using cell pre-treatment with specific kinase inhibitors. In particular, p38 MAPK was found to negatively regulate Erk1/2 pathway, as previously reported (Aiba et al., 2003; Boislève et al., 2005) and mammalian cell lines (Zhang et al., 2001; Puig-Kröger et al., 2001). Moreover, our data show that p38 MAPK inhibition directly reduced the inhibitory effect of DNCB and thimerosal on Erk1/2 phosphorylation whereas U0126 was without any significant effect on p38 MAPK phosphorylation. With respect to JNK, this kinase was up-regulated in the presence of p38 MAPK inhibitor, whereas Erk1/2 inhibitor had no significant effect. These data suggest that p38 MAPK and JNK (both being SAPK kinases) are competing to induce DC maturation following DNCB and thimerosal treatment, while the role of Erk1/2 was distinct.

Reactive oxygen species are secondary messengers that control a broad range of physiological and pathological processes including proliferation, inflammation and apoptosis (Martindale and Holbrook, 2002; Forman et al., 2002). Regarding the role of redox imbalance induced by sensitizers on DC maturation and its abrogation by thiol antioxidant such as *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) as reported (Bruchhausen et al., 2003; Becker et al., 2003; Mitsuashi et al., 2005), a cross talk between oxidative stress and MAPKs was demonstrated. Our data show that NAC was able to reduce p38 MAPK phosphorylation as previously reported (Martindale and Holbrook, 2002), confirming that p38 MAPK is directly regulated *via* an oxidative stress. In addition, our results demonstrate that NAC did not reduce Erk1/2 phosphorylation induced by nickel but suppressed the inhibitory effect of DNCB and thimerosal, suggesting an indirect role of oxidative stress on Erk1/2 pathways *via* p38 MAPK inhibition. Therefore, differential activation of MAP kinase pathways by sensitizers could result directly from differences in their chemical structure. It is widely believed that strong contact sensitizers bind covalently to thiol or amino protein groups which are important for the initiation of mono-DC maturation (Bruchhausen et al., 2003; Mitsuashi et al., 2005). Thus, DNCB and thimerosal considered as thiol reactive chemicals, may interact with DCs *via* glutathione depletion (Lepoittevin 1999; Bruchhausen et al., 2003; Becker et al., 2003; Mitsuashi et al., 2005), whereas nickel has been described to form complexes with amino acids (Romagnoli et al., 1991). Under our experimental conditions, nickel was unable to induce an oxidative stress response (unpublished data) and up-regulated Erk1/2 phosphorylation in contrast to DNCB and thimerosal.

It is the first time that the role of thimerosal in DC maturation *via* the regulation of signalling pathways is reported. Recently Agrawal et al. (2007) reported the induction of TH2 responses mediated by thimerosal *via* the secretion of cytokines by mono-DCs. This chemical widely used as a preservative in vaccines and other products has been reported to reduce LPS-induced CD86 expression in mono-DCs (Agrawal et al., 2007). Under our experiments, thimerosal similarly as DNCB markedly modified MAPK phosphorylation although its effect is correlated with its toxicity after 3 h (JNK studies). From our data, it is of a particular interest to notice that similar results are obtained with sensitizers inducing an immune response of type 1 such as DNCB or type 2 such as thimerosal. However, this specificity in immune response required other studies such as cytokine secretion. Our present data and others unpublished suggest that thimerosal effect is mediated through the production of an oxidative stress measured with several specific probes and consequently glutathione depletion (unpublished data). The specific role of this chemical, as well as, the specific role of ROS production on DC maturation is still under investigation.

From our data, as nickel specifically induced Erk1/2 activation whereas DNCB and thimerosal were more specific of SAPK kinase activation, these sensitizers could be classified under two classes, one responsible for the activation of p38 MAPK *via* the induction of an oxidative stress as shown for thimerosal and DNCB, the other one (represented by nickel) driving the activation of Erk1/2. Moreover, our preliminary results (data not shown) suggest that NF-κB pathway is also activated by nickel as recently reported Ade et al. (2007), and

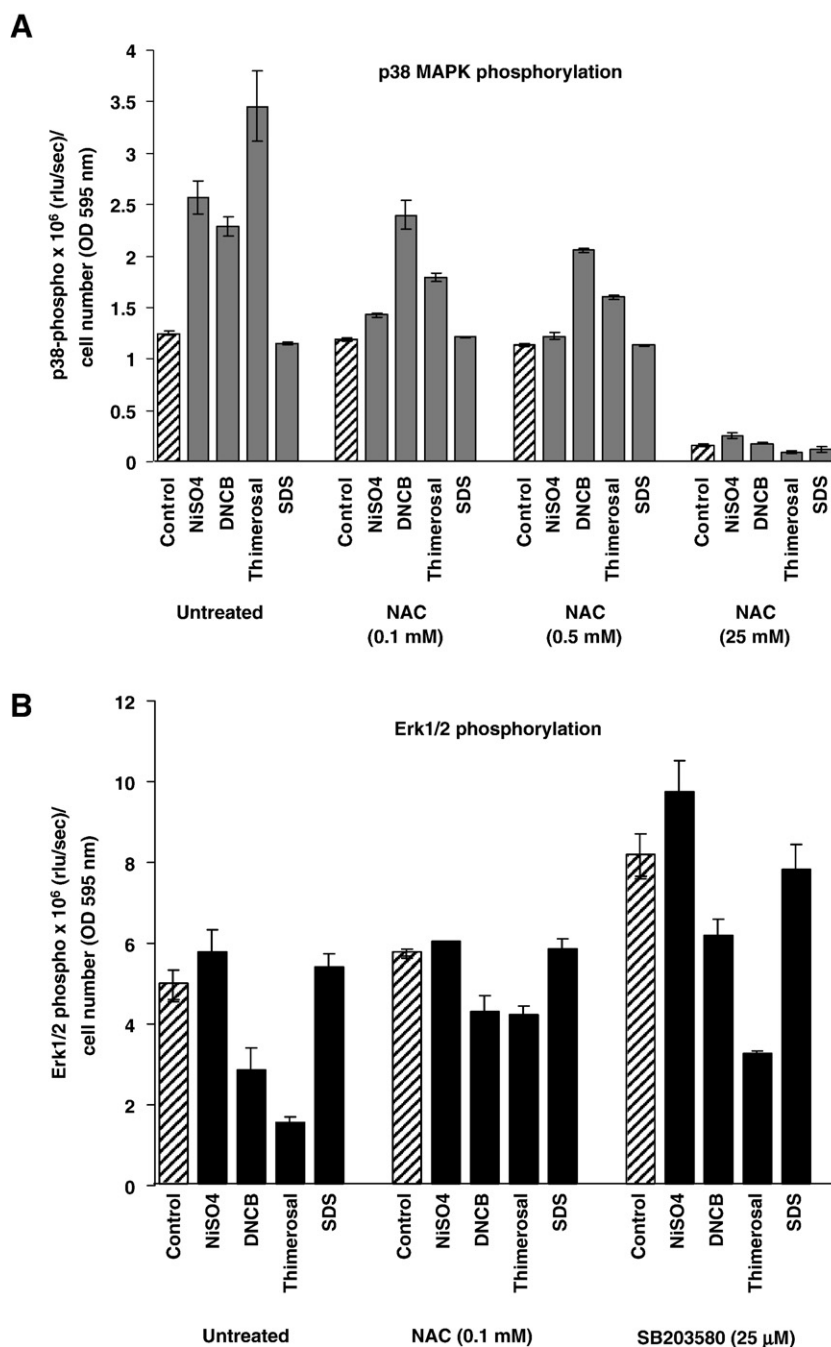


Fig. 6. Cross talk between MAPK pathways and oxidative stress. Effects of antioxidant, *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) pre-treatment on p38 MAPK (A) and Erk1/2 phosphorylation (B). After 30 min pre-treatment of mono-DCs with NAC (25 μ M) cells were exposed for 30 min to NiSO₄ (500 μ M), DNCB (30 μ M), thimerosal (14.8 μ M) or SDS (10 μ g/ml). Data represent mean of triplicate reading of three independent experiments.

inhibited after thimerosal or DNCB treatment, confirming the specificity of these two classes of sensitizers without significant variability between donors as shown from our data, which is of a great interest compared to data from DC phenotypic marker expression.

Thus, as previous studies reported on DC maturation have been insufficient to discriminate all sensitizers from non-sensitizers (Gerberick et al., 2004) the identification of early events and more specifically of MAPK phosphorylation in correlation with the redox status of chemicals could be of great interest for the prediction of sensitizing potential of unknown chemicals. The prediction of sensitizer potential using the detection of changes in DC receptor phenotype has been investigated elsewhere using various DC or DC-like cell-based methods by Python et al. (2007), Ashigaka et al. (2006) and Sakaguchi et al. (2006). Although

not yet validated, these methods show promise and two such methods (hCLAT and U937 CD86 test) published by Aeby et al. (2008), are currently under evaluation by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) for the prediction of skin sensitization. Research, such as this study, to delineate the key mechanisms underlying chemical-induced sensitization has the potential to increase our understanding and also to yield new predictive biomarkers for skin sensitization. Given that it is unlikely that all known chemical sensitizers would activate changes in the DC maturation biomarkers (predominantly CD86 and CD54) that have been incorporated into existing DC-based predictive models (Tuschl et al., 2000; Gerberick et al., 2004; Divkovic et al., 2005 and Ryan et al., 2007); the identification of new predictive biomarkers has the potential to expand the applicability domain of such methods.

Acknowledgments

This study was funded by a grant from The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association (COLIPA, Brussels, Belgium). We are particularly grateful to Dr. G. Maxwell for the critical reading of the manuscript and to Drs. K. Arab and J-P. Steghens for their technical advices on oxidative stress.

References

- Ade, N., Antonios, D., Kerdine-Romer, S., Boisleve, F., Rousset, F., Pallardy, M., 2007. NF- κ B plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO₄ but not by DNCB. *Toxicol. Sci.* 99, 488–501.
- Aeby, P., Ashikaga, T., Diembeck, W., Eschrich, D., Gerberick, G., Kimber, I., MarrecFairley, M., Maxwell, G., Ovigne, J.M., Sakaguchi, H., Tailhardat, M., Teissier, S., 2008. The Colipa strategy for the development of *in vitro* alternatives. Skin sensitization. *WCG Proceedings*.
- Agrawal, A., Kaushal, P., Agrawal, S., Gollapudi, S., Gupta, S., 2007. Thimerosal induces TH2 responses via influencing cytokine secretion by human dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 81, 474–482.
- Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., Tagami, H., 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of costimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.* 27, 3031–3038.
- Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, Z.U., Mizuashi, M., Ohtani, T., Yoshino, Y., Tagami, H., 2003. P38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and 2,4-dinitrochlorobenzene. *J. Invest. Dermatol.* 120, 390–399.
- Ardehsna, K.M., Pizzey, A.R., Devereux, S., Khwaja, A., 2000. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF- κ B signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96, 1039–1046.
- Arrighi, J.F., Rebsamen, M., Rousset, F., Kindler, V., Hauser, C., 2001. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF- α , and contact sensitizers. *J. Immunol.* 166, 3837–3845.
- Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Toyoda, H., 2006. Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. in Vitro* 20, 767–773.
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K., 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767–811.
- Becker, D., Valk, E., Zahn, S., Brand, P., Knop, J., 2003. Coupling of contact sensitizers to thiol groups is a key event for the activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 120, 233–238.
- Boislevé, F., Kerdine-Romer, S., Rougier-Lazard, N., Pallardy, M., 2004. Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF- α and MAPK. *J. Invest. Dermatol.* 123, 494–502.
- Boislevé, F., Kerdine-Römer, S., Pallardy, M., 2005. Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF- α . *Toxicol* 206, 233–244.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bruchhausen, S., Zahn, S., Valk, E., Knop, J., Becker, D., 2003. Thiol antioxidants block the activation of antigen-presenting cells by contact sensitizers. *J. Invest. Dermatol.* 121, 1039–1044.
- Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Banchereau, J., 1992. GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360, 258–261.
- Coutant, K.D., de Fraissinette, A.B., Cordier, A., Ulrich, P., 1999. Modulation of the activity of human monocyte-derived dendritic cells by chemical haptens, a metal allergen, and a staphylococcal superantigen. *Toxicol. Sci.* 52, 189–198.
- De Smedt, A.C., Van Den Heuvel, R.L., Berneman, N., Weber, G.E.E., Tuschl, H., 2002. Phenotypic alterations and IL-1 β production in CD34(+) progenitor- and monocyte-derived dendritic cells after exposure to allergens: a comparative analysis. *Arch. Dermatol. Res.* 294, 109–116.
- Denizot, F., Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* 89, 271–277.
- 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, 189–200.
- Forman, J.L., Torres, M., Fukuto, J., 2002. Redox signaling. *Mol. Cell. Biochem.* 234, 49–62.
- Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kearn, P.S., Dearman, R.J., Kimber, I., Patlewicz, G.Y., Basketter, D.A., 2004. A chemical data set for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis* 50, 274–288.
- Guironnet, G., Dalbiez-Gauthier, C., Rousset, F., Schmitt, D., Péguet-Navarro, J., 2000. *In vitro* human T cell sensitization to haptens by monocyte-derived dendritic cells. *Toxicol. in Vitro* 14, 517–522.
- Huette, B.A., Ryan, C.A., Gerberick, G.F., 2002. Elucidating changes in surface marker expression of dendritic cells following chemical allergen treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 226–233.
- Huette, B.A., Ryan, C.A., Gildea, L.A., Gerberick, G.F., 2005. Relationship of CD86 surface marker expression and cytotoxicity on dendritic cells exposed to chemical allergen. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 209, 159–166.
- Ishii, Y., Sakai, S., Honma, Y., 2001. Pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 activates p44/42 mitogen-activated protein kinase and induces the differentiation of human myeloid leukemia cells. *Leuk. Res.* 25, 813–820.
- Kumar, S., Jiang, M.S., Adams, J.L., Lee, J.C., 1999. Pyridinylimidazole compound SB203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 825–831.
- Lepoittevin, J.P., 1999. Development of structure-activity relationships (SARs) in allergic contact dermatitis. *Cell. Biol. Toxicol.* 15, 47–55.
- Martindale, J.L., Holbrook, N.J., 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* 192, 1–15.
- Matos, T.J., Duarte, C.B., Gonçalves, M., Lopes, M.C., 2005. Role of oxidative stress in ERK and p38 MAPK activation induced by the chemical sensitizer DNFB in a fetal skin dendritic cell line. *Immunol. Cell. Biol.* 83, 607–614.
- Matsuzawa, A., Ichijo, H., 2005. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 472–481.
- Mitsuashi, M., Ohtani, T., Nakagawa, S., Aiba, S., 2005. Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 124, 579–586.
- Noirey, N., Staquet, M.J., Gariazzo, M.J., Serres, M., Dezutter-Dambuyant, C., André, C., Schmitt, D., Vincent, C., 2003. Withdrawal of TNF- α after the fifth day of differentiation of CD34+ cord blood progenitors generates a homogeneous population of Langerhans cells and delays their maturation. *Exp. Dermatol.* 12, 96–105.
- Puig-Kröger, A., Relloso, M., Fernandez-Capetillo, O., Zubiaga, A., Silva, A., Bernabeu, C., Corbi, A.L., 2001. Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* 98, 2175–2182.
- Python, F., Goebel, C., Aebly, P., 2007. Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220, 113–124.
- Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C.L., Gold, M.R., Ricciardi-Castagnoli, P., 1998. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J. Exp. Med.* 188, 2175–2180.
- Romagnoli, P., Labhardt, A.M., Sinigaglia, F., 1991. Selective interaction of Ni with an MHC-bound peptide. *EMBO J.* 10, 1303–1306.
- Ryan, C.A., Gerberick, G.F., Gildea, L.A., Huette, B.C., Betts, C.J., Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Kimber, I., 2005. Interactions of contact allergens with dendritic cells: opportunities and challenges for the development of novel approaches to hazard assessment. *Toxicol. Sci.* 88, 4–11.
- Ryan, C.A., Kimber, I., Basketter, D.A., Pallardy, M., Gildea, L.A., Gerberick, G.F., 2007. Dendritic cells and skin sensitization: biological roles and uses in hazard identification. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 221, 384–394.
- Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., Itagaki, H., Toyoda, H., Suzuki, H., 2006. Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol. in Vitro* 20, 774–784.
- Tuschl, H., Kovac, R., Weber, E., 2000. The expression of surface markers on dendritic cells as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Toxicol. in Vitro* 14, 541–549.
- Wells, T., Basketter, D.A., Schröder, K.R., 2004. *In vitro* skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol. in Vitro* 18, 231–243.
- Zenarola, P., Gimma, A., Lomuto, M., 1995. Systemic contact dermatitis from thimerosal. *Contact Dermatitis* 32, 107–108.
- Zhang, H., Shi, X., Hampong, M., Blanis, L., Pelech, S., 2001. Stress-induced inhibition of ERK1 and ERK2 by direct interaction with p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 6905–6908.

Communications scientifiques

POSTERS

- Annual Meeting of the European Society of Dermatology Research (**ESDR**) – 2006
- Research Group on Inflammatory Mediators (**GREMI**) - 2007
«Cross talk between kinase activation/oxidative stress in human dendritic cell maturation induced by sensitizers»
Poster n°542, résumé publié dans *Journal of Invest Dermatol*, vol.126, s93 (2006).
- Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire (**SPTC**) - 2007
«Le thimérosal induit un stress oxydant et l'activation phénotypique des cellules dendritiques humaines»
Prix Ivan Chouroulinkov, attribué au meilleur poster
- Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire (**SPTC**) - 2008
«Utilisation des nanoparticules pour cibler le transfert de molécules biologiquement actives»
Poster sélectionné pour une communication orale.
- International Investigative Dermatology (**IID**) - 2008
«Mercury compounds induce phenotypic activation of human DCs via an oxidative stress»
Poster n°1086, résumé publié dans *Journal of Investigative Dermatology*, vol.128, s181 (2008).
- Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire (**SPTC**) - 2009
- Congrès Annuel de Recherche Dermatologique (**CARD**) - 2009
«Implication of oxidative stress in contact allergy»
- Annual Meeting of the European Society of Dermatology Research (**ESDR**) - 2009
«Early events involved in dendritic cell activation induced by contact sensitizers: role of oxidative stress, calcium influx and MAPKs»
Poster n°30, résumé publié dans *Journal of Investigative Dermatology*, vol.129 (2009).

COMMUNICATIONS ORALES

- Annual meeting for Young Scientists and Dermatologists (**Forum Młodych Łódź**) - 2007
«**Redox signaling and maturation of dendritic cells in response to sensitizers**»
Prix de la meilleure communication
- Congrès Annuel de Recherche Dermatologique (**CARD**) - 2007
«**Thimerosal induces mono-DC maturation via an oxidative stress**»
- International Workshop on Langerhans Cells - 2007
«**Mercury compounds induce maturation of human DCs via a redox modulation**»
- European Research Group on Experimental Contact Dermatitis (**ERGECD**)- 2008
«**Cross talk between oxidative stress and DC activation**»
- Congrès Annuel de Recherche Dermatologique (**CARD**) - 2008
«**Implication of oxidative stress and MAPKs in phenotypic activation of dendritic cells induced by contact sensitizers**»
- Colloque francophone de biologie cutanée humaine (**CoBiP**) - 2009
«**Stress oxydant : de la Physiologie aux Pathologies. Stress oxydant et cellules dendritiques**»
- European Research Group on Experimental Contact Dermatitis (**ERGECD**) - 2009
«**Role of oxidative stress, calcium and MAPKs in dendritic cell activation induced by contact sensitizers**»

REFERENCES

- Ade N**, Martinozzi-Teissier S, Pallardy M, Rousset F. 2006. Activation of U937 cells by contact sensitizers: CD86 expression is independent of apoptosis. *J Immunotoxicol* 3 :189-197.
- Ade N**, Leon F, Pallardy M, Peiffer JL, Kerdine-Romer S, Tissier MH, Bonnet PA, Fabre I, Ourlin JC. 2009. HMOX1 and NQO1 genes are upregulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: role of the Keap1/Nrf2 pathway. *Toxicol Sci* 107 : 451-460.
- Agrawal A**, Kaushal P, Agrawal S, Gollapudi S, Gupta S. 2007. Thimerosal induces TH2 responses via influencing cytokine secretion by human dendritic cells. *J Leukoc Biol* 81 : 474-482.
- Aiba S**, Terunuma A, Manome H, Tagami H. 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27 : 3031-3038.
- Aiba S**, Tagami H. 1999. Dendritic cells play a crucial role in innate immunity to simple chemicals. *J Investig Dermatol Symp Proc* 4 : 158-163.
- Aiba S**, Manome H, Yoshino Y, Tagami H. 2000. In vitro treatment of human transforming growth factor-beta1-treated monocyte-derived dendritic cells with haptens can induce the phenotypic and functional changes similar to epidermal Langerhans cells in the initiation phase of allergic contact sensitivity reaction. *Immunology* 101 : 68-75.
- Aiba S**, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, Tagami H. 2003. p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and 2,4-dinitrochlorobenzene. *J Invest Dermatol* 120 : 390-399.
- Alderman CJ**, Shah S, Foreman JC, Chain BM, Katz DR. 2002. The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function. *Free Radic Biol Med* 32 : 377-385.
- Aleksic M**, Thain E, Roger D, Saib O, Davies M, Li J, Aptula A, Zazzeroni R. 2009. Reactivity profiling: covalent modification of single nucleophile peptides for skin sensitization risk assessment. *Toxicol Sci* 108 : 401-411.
- Allan RS**, Smith CM, Belz GT, van Lint AL, Wakim LM, Heath WR, Carbone FR. 2003. Epidermal viral immunity induced by CD8alpha⁺ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 301 : 1925-1928.
- Allan RS**, Waithman J, Bedoui S, Jones CM, Villadangos JA, Zhan Y, Lew AM, Shortman K, Heath WR, Carbone FR. 2006. Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity* 25 : 153-162.
- Alvarez-Román R**, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. 2004. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release* 99 : 53-62.
- An S**, Kim S, Huh Y, Lee TR, Kim HK, Park KL, Eun HC. 2009. Expression of surface markers on the human monocytic leukaemia cell line, THP-1, as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Contact Dermatitis* 60 : 185-192.
- Andersen KE**, Maibach HI. 1985. Contact allergy predictive tests in guinea pigs. *Basel, Karger*.
- Angénioux C**, Fricker D, Strub JM, Luche S, Bausinger H, Cazenave JP, Van Dorsselaer A, Hanau D, de la Salle H, Rabilloud T. 2001. Gene induction during differentiation of human monocytes into dendritic cells: an integrated study at the RNA and protein levels. *Funct Integr Genomics* 1 : 323-329.
- Aptula AO**, Patlewicz G, Roberts DW, Schultz TW. 2006. Non-enzymatic glutathione reactivity and in vitro toxicity: a non-animal approach to skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 20 : 239-247.
- Ardehna KM**, Pizzey AR, Devereux S, Khwaja A. 2000. The PI3 kinase, p38 SAPkinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96 : 1039-1046.
- Arrighi JF**, Rebsamen M, Rousset F, Kindler V, Hauser C. 2001. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-

- derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol* 166 : 3837-3845.
- Ashikaga T**, Hoya M, Itagaki H, Katsumura Y, Aiba S. 2002. Evaluation of CD86 expression and MHC class II molecule internalization in THP-1 human monocyte cells as predictive endpoints for contact sensitizers. *Toxicol In Vitro* 16 :711-716.
- Ashikaga T**, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Toyoda H. 2006. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol in Vitro* 20 : 767-773.
- Auton TR**, Botham PA, Kimber I. 1995. Retrospective appraisal of the relationship between skin irritancy and contact sensitization potential. *J Toxicol Environ Health* 46 :149-154.
- Ayehunie S**, Snell M, Child M, Klausner M. 2009. A plasmacytoid dendritic cell (CD123⁺/CD11c⁻) based assay system to predict contact allergenicity of chemicals. *Toxicology* 264 : 1-9.
- Azam P**, Peiffer JL, Chamousset D, Tissier MH, Bonnet PA, Vian L, Fabre I, Ourlin JC. 2006. The cytokine-dependent MUTZ-3 cell line as an in vitro model for the screening of contact sensitizers. *Toxicol Appl Pharmacol* 212 : 14-23.
- Banchereau J**, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18 : 767-811.
- Baroli B**, Ennas MG, Loffredo F, Isola M, Pinna R, López-Quintela MA. 2007. Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin. *J Invest Dermatol* 127 : 1701-1712.
- Basketter DA**, Gerberick GF, Kimber I, Loveless SE. 1996. The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. *Food Chem Toxicol* 34 : 985-997.
- Basketter DA**, Kan-King-Yu D, Dierkes P, Jowsey IR. 2007. Does irritation potency contribute to the skin sensitization potency of contact allergens? *Cutan Ocul Toxicol* 26 : 279-286.
- Bechetoille N**, André V, Valladeau J, Perrier E, Dezutter-Dambuyant C. 2006. Mixed Langerhans cell and interstitial/dermal dendritic cell subsets emanating from monocytes in Th2-mediated inflammatory conditions respond differently to proinflammatory stimuli. *Leukoc Biol* 80 : 45-58.
- Becker D**, Valk E, Zahn S, Brand P, Knop J. 2003. Coupling of contact sensitizers to thiol groups is a key event for the activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *J Invest Dermatol* 120 : 233-238.
- Bennett CL**, van Rijn E, Jung S, Inaba K, Steinman RM, Kapsenberg ML, Clausen BE. 2005. Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol* 169 : 569-576.
- Bickers DR**, Athar M. 2006. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol* 126 : 2565-2575.
- Bocchietto E**, Paolucci C, Breda D, Sabbioni E, Burastero SE. 2007. Human monocytoïd THP-1 cell line versus monocyte-derived human immature dendritic cells as in vitro models for predicting the sensitising potential of chemicals. *Int J Immunopathol Pharmacol* 20 : 259-265.
- Bogunovic M**, Ginhoux F, Wagers A, Loubreau M, Isola LM, Lubrano L, Najfeld V, Phelps RG, Grosskreutz C, Scigliano E, Frenette PS, Merad M. 2006. Identification of a radio-resistant and cycling dermal dendritic cell population in mice and men. *J Exp Med* 203 : 2627-1638.
- Böhme A**, Thaens D, Paschke A, Schüürmann G. 2009. Kinetic glutathione chemoassay to quantify thiol reactivity of organic electrophiles--application to alpha,beta-unsaturated ketones, acrylates, and propiolates. *Chem Res Toxicol* 22 : 742-750.
- Boislève F**, Kerdine-Römer S, Rougier-Larzat N, Pallardy M. 2004. Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF-alpha and MAPK. *J Invest Dermatol* 123 : 494-502.
- Boislève F**, Kerdine-Römer S, Pallardy M. 2005. Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha. *Toxicol* 206 : 233-244.
- Bouchon A**, Hernández-Munain C, Cella M, Colonna M. 2001. A DAP12-mediated pathway regulates

- expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *J Exp Med* 194 : 1111-1122.
- Bour H**, Peyron E, Gaucherand M, Garrigue JL, Desvignes C, Kaiserlian D, Revillard JP, Nicolas JF. 1995. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8⁺T cells and class II-restricted CD4⁺ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol* 25 : 306-310.
- Brière F**, Dubois B, Fayette J. 2001. A direct role of dendritic cells in the regulation of humoral response. Dendritic cells biology and clinical applications. Lotze AT, Ed. *MT. San Diego : Academic Press* p293-300.
- Brigl M**, Brenner MB. 2004. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 22 : 817-890.
- Bruchhausen S**, Zahn S, Valk E, Knop J, Becker D. 2003. Thiol antioxidants block the activation of antigen-presenting cells by contact sensitizers. *J Invest Dermatol* 121 : 1039-1044.
- Buehler EV**. 1994. Occlusive patch method for skin sensitization in guinea pigs: the Buehler method. *Food Chem Toxicol* 32 : 97-101.
- Caux C**, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. 1992. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360 : 258-261.
- Caux C**, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180 : 1263-1272.
- Caux C**, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J. 1996. CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF + TNF alpha. *J Exp Med* 184 : 695-706.
- Caux C**, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, de Saint-Vis B, Dezutter-Dambuyant C, Jacquet C, Schmitt D, Banchereau J. 1997. CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF + TNF alpha. *Adv Exp Med* 417 : 21-25.
- Caux C**, Massacrier C, Dubois B, Valladeau J, Dezutter-Dambuyant C, Durand I, Schmitt D, Saeland S. 1999. Respective involvement of TGF-beta and IL-4 in the development of Langerhans cells and non-Langerhans dendritic cells from CD34⁺ progenitors. *J Leukoc Biol* 66 : 781-791.
- Cerio R**, Griffiths CE, Cooper KD, Nickoloff BJ, Headington JT. 1989. Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br J Dermatol* 121 : 421-431.
- Chang L**, Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410 : 37-40.
- Chen K**, Preuss A, Hackbarth S, Wacker M, Langer K, Röder B. 2009. Novel photosensitizer-protein nanoparticles for photodynamic therapy: photophysical characterization and in vitro investigations. *J Photochem Photobiol B* 96 : 66-74.
- Cheng TY**, Tseng YH, Sun CC, Chu CY. 2008. Contact sensitization to metals in Taiwan. *Contact Dermatitis* 59 : 353-360.
- Cluzel-Tailhardat M**, Bonnet-Duquennoy M, de Queral DP, Vocanson M, Kurfürst R, Courtellemont P, Le Varlet B, Nicolas JF. 2007. Chemicals with weak skin sensitizing properties can be identified using low-density microarrays on immature dendritic cells. *Toxicol Lett* 174 : 98-109.
- Coquette A**, Berna N, Vandenbosch A, Rosdy M, De Wever B, Poumay Y. 2003. Analysis of interleukin-1alpha (IL-1alpha) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization. *Toxicol In Vitro* 17 : 311-321.
- Cumberbatch M**, Kimber I. 1992. Dermal tumour necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration. *Immunology* 75 : 257-263.
- Cumberbatch M**, Scott RC, Basketter DA, Scholes EW, Hilton J, Dearman RJ, Kimber I. 1993. Influence of sodium lauryl sulphate on 2,4-dinitrochlorobenzene-induced lymph node activation. *Toxicology* 77 : 181-191.

- de Haar C**, Hassing I, Bol M, Bleumink R, Pieters R. 2006. Ultrafine but not fine particulate matter causes airway inflammation and allergic airway sensitization to co-administered antigen in mice. *Clin Exp Allergy* 36 : 1469-1479.
- De Smedt AC**, Van Den Heuvel RL, Zwi Berneman N, Schoeters GE. 2001. Modulation of phenotype, cytokine production and stimulatory function of CD34⁺-derived DC by NiCl₂ and SDS. *Toxicol In Vitro* 15 : 319-325.
- De Smedt AC**, Van Den Heuvel RL, Van Tendeloo VF, Berneman ZN, Schoeters GE. 2002. Capacity of CD34⁺ progenitor-derived dendritic cells to distinguish between sensitizers and irritants. *Arch Dermatol Res* 294 : 109-116.
- De Smedt AC**, Van Den Heuvel RL, Van Tendeloo VF, Berneman ZN, Schoeters GE, Weber E, Tuschl H. 2005. Phenotypic alterations and IL-1beta production in CD34⁺ progenitor- and monocyte-derived dendritic cells after exposure to allergens: a comparative analysis. *Toxicol Lett* 156 : 377-389.
- DeForge LE**, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG. 1993. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem* 268 : 25568-25576.
- Del Prete A**, Zaccagnino P, Di Paola M, Saltarella M, Oliveros Celis C, Nico B, Santoro G, Lorusso M. 2008. Role of mitochondria and reactive oxygen species in dendritic cell differentiation and functions. *Free Radic. Biol. Med.* 44 : 1443-1451.
- Dezutter-Dambuyant C**, Black A, Bechetoille N, Bouez C, Maréchal S, Auxenfans C, Cenizo V, Pascal P, Perrier E, Damour O. 2006. Evolutive skin reconstructions: from the dermal collagen-glycosaminoglycan-chitosane substrate to an immunocompetent reconstructed skin. *Biomed Mater Eng* 16 : S85-S94.
- Dinkova-Kostova AT**, Holtzclaw WD, Kensler TW. 2005. The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem Res Toxicol* 18 : 1779-1791.
- Dröge W**. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82 : 47-95.
- Dubois B**, Chapat L, Goubier A, Papiernik M, Nicolas JF, Kaiserlian D. 2003. Innate CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8⁺ T cells mediating skin inflammation. *Blood* 102 : 3295-3301.
- Ebner S**, Ehammer Z, Holzmann S, Schwingshackl P, Forstner M, Stoitznier P, Huemer GM, Fritsch P, Romani N. 2004. Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. *Int Immunol* : 16 : 877-887.
- Elferink JGR**. 1999. Thimerosal: a versatile sulfhydryl reagent, calcium mobilizer, and cell function-modulating agent. *Gen Pharmacol* 33 : 1-6.
- Emter R**, Ellis G, Natsch A. 2010. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 245 : 281-290.
- Ercal N**, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 1 : 529-539.
- Eyerich S**, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham SR, Schmidt-Weber CB, Cavani A. 2009. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 119 : 3573-3585.
- Facy V**, Flouret V, Régnier M, Schmidt R. 2004. Langerhans cells integrated into human reconstructed epidermis respond to known sensitizers and ultraviolet exposure. *J Invest Dermatol* 122 : 552-553.
- Fazilleau N**, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. 2009. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* 30 : 324-335.
- Fedorowicz A**, Singh H, Soderholm S, Demchuk E. 2005. Structure-activity models for contact sensitization. *Chem Res Toxicol* 18 : 954-969.
- Filomeni G**, Rotilio G, Ciriolo MR. 2003. Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *FASEB J* 17 : 64-66.
- Frankild SD**, Basketter DA, Andersen KE. 1996. The value and limitations of rechallenge in the guinea pig maximization test. *Contact Dermatitis* 35 : 135-140.
- Fransson J**, Heffler LC, Tengvall Linder M, Scheynius A. 1998. Culture of human epidermal Langerhans

- cells in a skin equivalent. *Br J Dermatol* 139 : 598-604.
- Fuchs J**, Zollner TM, Kaufmann R, Podda M. 2001. Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. *Free Radic Biol Med* 30 : 337-353.
- Fujishima A**, Honda K. 1972. Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Nature* 238 : 37-38.
- Furio L**, Berthier-Vergnes O, Ducarre B, Schmitt D, Peguet-Navarro J. 2005. UVA radiation impairs phenotypic and functional maturation of human dermal dendritic cells. *J Invest Dermatol* 125 : 1032-1038.
- Gad SC**, Dunn BJ, Dobbs DW, Reilly C, Walsh RD. 1986. Development and validation of an alternative dermal sensitization test: the mouse ear swelling test (MEST). *Toxicol Appl Pharmacol* 84 : 93-114.
- Gallo RL**, Nizet V. 2003. Endogenous production of antimicrobial peptides in innate immunity and human disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 3 : 402-409.
- Gamer A**, Leibold E, van Ravenzway B. 2006. The in vitro absorption of microfine ZnO and TiO₂ through porcine skin. *Toxicol In Vitro* 20 : 301-307.
- Garner LA**. 2004. Contact dermatitis to metals. *Dermatol Ther* 17 : 321-327.
- Geier M.R.**, Geier D.A.. 2005. The potential importance of steroids in the treatment of autistic spectrum disorders and other disorders involving mercury toxicity. *Med Hypotheses* 64 : 946-954.
- Geier DA**, Sykes LK, Geier MR. 2007. A review of thimerosal (merthiolate) and its ethylmercury breakdown product: specific historical considerations regarding safety and effectiveness. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 10 : 575-596.
- Geissmann F**, Prost C, Monnet JP, Dy M, Brousse N, Hermine O. 1998. Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med* 187: 961-966.
- Geissmann F**, Dieu-Nosjean MC, Dezutter C, Valladeau J, Kayal S, Leborgne M, Brousse N, Saeland S, Davoust J. 2002. Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *J Exp Med* 196 : 417-430.
- Gerberick GF**, Ryan CA, Kern PS, Dearman RJ, Kimber I, Patlewicz GY, Basketter DA. 2004a. A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis* 50 : 274-288.
- Gerberick GF**, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, Lepoittevin JP. 2004b. Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol Sci* 81 : 332-343.
- Gerberick GF**, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittevin JP. 2007. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. *Toxicol Sci* 97 : 417-427.
- Gerberick GF**, Aleksic M, Basketter D, Casati S, Karlberg AT, Kern P, Kimber I, Lepoittevin JP, Natsch A, Ovigne JM, Rovida C, Sakaguchi H, Schultz T. 2008. Chemical reactivity measurement and the predictive identification of skin sensitizers. The report and recommendations of ECVAM Workshop 64. *Altern Lab Anim* 36 : 215-242.
- Gerberick GF**, Troutman JA, Foertsch LM, Vassallo JD, Quijano M, Dobson RL, Goebel C, Lepoittevin JP. 2009 Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system. *Toxicol Sci* 112 : 164-174.
- Gilliam AC**, Kremer IB, Yoshida Y, Stevens SR, Tootell E, Teunissen MB, Hammerberg C, Cooper KD. 1998. The human hair follicle: a reservoir of CD40⁺ B7-deficient Langerhans cells that repopulate epidermis after UVB exposure. *J Invest Dermatol* 110 : 422-427.
- Ginhoux F**, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubeau M, Dai XM, Stanley ER, Randolph GJ, Merad M. 2006. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 7 : 265-273.
- Goncalo M**, Figueiredo A, Goncalo S. 1996. Hypersensitivity to thimerosal: the sensitizing moiety. *Contact Dermatitis* 34 : 201-203.
- Goon AT**, Goh CL. 2006. Patch testing of Singapore children and adolescents: our experience over 18 years. *Pediatr Dermatol* 23: 117-120.

- Goya** GF, Marcos-Campos I, Fernández-Pacheco R, Sáez B, Godino J, Asín L, Lambea J, Tabuenca P, Mayordomo JI, Larrad L, Ibarra MR, Tres A. 2008. Dendritic cell uptake of iron-based magnetic nanoparticles. *Cell Biol Int* 32 : 1001-1005.
- Grabbe** S, Steinert M, Mahnke K, Schwartz A, Luger TA, Schwarz T. 1996. Dissection of antigenic and irritative effects of epicutaneously applied haptens in mice. Evidence that not the antigenic component but nonspecific proinflammatory effects of haptens determine the concentration-dependent elicitation of allergic contact dermatitis. *J Clin Invest* 98 : 1158-1164.
- Guironnet** G, Dalbiez-Gauthier C, Rousset F, Schmitt D, Péguet-Navarro J. 2000. In vitro human T cell sensitization to haptens by monocyte-derived dendritic cells. *Toxicol in Vitro* 14: 517-522.
- Guironnet** G, Dezutter-Dambuyant C, Gaudillère A, Maréchal S, Schmitt D, Péguet-Navarro J. 2001. Phenotypic and functional outcome of human monocytes or monocyte-derived dendritic cells in a dermal equivalent. *J Invest Dermatol* 116 : 933-939.
- Hammonds** LM, Hall VC, Yiannias JA. 2009. Allergic contact dermatitis in 136 children patch tested between 2000 and 2006. *Int J Dermatol* 48 : 271-274.
- Hashimoto** S, Suzuki T, Dong HY, Nagai S, Yamazaki N, Matsushima K. 1999. Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 94 : 845-852.
- Hashimoto** SI, Suzuki T, Nagai S, Yamashita T, Toyoda N, Matsushima K. 2000. Identification of genes specifically expressed in human activated and mature dendritic cells through serial analysis of gene expression. *Blood* 96 : 2206-2214.
- He** Y, Zhang J, Donahue C, Falo LD Jr. 2006. Skin-derived dendritic cells induce potent CD8⁺ T cell immunity in recombinant lentivector-mediated genetic immunization. *Immunity* 24 : 643-656.
- Hirota** M, Moro O. 2005. MIP-1beta, a novel biomarker for in vitro sensitization test using human monocytic cell line. *Toxicol In Vitro* 20 : 736-742.
- Hirota** M, Suzuki M, Hagin S, Kagatani S, Sasaki Y, Aiba S, Itagaki H. 2009. Modification of cell-surface thiols elicits activation of human monocytic cell line THP-1: possible involvement in effect of haptens 2,4-dinitrochlorobenzene and nickel sulfate. *J Toxicol Sci* 34 : 139-150.
- Hoet** PHM, Bruske-Hohlfeld I, Sata OV. 2004. Nanoparticles - Known and unknown health risks. *J Nanotechnol* 2 : 1-15.
- Hooyberghs** J, Schoeters E, Lambrechts N, Nelissen I, Witters H, Schoeters G, Van Den Heuvel R. 2008. A cell-based in vitro alternative to identify skin sensitizers by gene expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 231 : 103-111.
- Hubert** P, Jacobs N, Caberg JH, Boniver J, Delvenne P. 2007. The cross-talk between dendritic and regulatory T cells: good or evil ?. *J Leukoc Biol* 82 : 781-794.
- Hulette** BC, Rowden G, Ryan CA, Lawson CM, Dawes SM, Ridder GM, Gerberick GF. 2001. Cytokine induction of a human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1) to a CD1a⁺ dendritic cell phenotype. *Arch Dermatol Res* 293 : 147-158.
- Hulette** BA, Ryan CA, Gerberick GF. 2002 Elucidating changes in surface marker expression of dendritic cells following chemical allergen treatment. *Toxicol Appl Pharmacol* 182 : 226-233.
- Jacobs** JJ, Lehé CL, Hasegawa H, Elliott GR, Das PK. 2006. Skin irritants and contact sensitizers induce Langerhans cell migration and maturation at irritant concentration. *Exp Dermatol* 15 : 432-440.
- Jakob** T, Udey MC. 1998. Regulation of E-cadherin-mediated adhesion in Langerhans cell-like dendritic cells by inflammatory mediators that mobilize Langerhans cells in vivo. *J Immunol* 160 : 4067-4073.
- Jańczyk** A, Wolnicka-Głubisz A, Urbanska K, Kisch H, Stochel G, Macyk W. 2008. Photodynamic activity of platinum (IV) chloride surface-modified TiO₂ irradiated with visible light. *Free Radic Biol Med* 44 : 1120-1130.
- Kagatani** S, Sasaki Y, Hirota M, Mizuashi M, Suzuki M, Ohtani T, Itagaki H, Aiba S. 2010. Oxidation of cell surface thiol groups by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J Invest Dermatol* 130 : 175-183.
- Kandárová** H, Hayden P, Klausner M, Kubilus J, Kearney P, Sheasgreen J. 2009. In vitro skin irritation testing: Improving the sensitivity of the EpiDerm skin irritation test protocol. *Altern Lab Anim* 37 : 671-689.

- Kanitakis J**, Petruzzo P, Dubernard JM. 2004. Turnover of epidermal Langerhans' cells. *N Engl J Med* 351 : 2661-2662.
- Kantengwa S**, Jornot L, Devenoges C, Nicod LP. 2003. Superoxide anions induce the maturation of human dendritic cells. *Am. J Resp Crit Care Med* 167 : 431-437.
- Kaplan DH**, Jenison MC, Saeland S, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. 2005. Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* 23 : 611-620.
- Kawai K**, Shimura H, Minagawa M, Ito A, Tomiyama K, Ito M. 2002. Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 30 : 185-194.
- Kertész Zs**, Szikszai Z, Gontier E, Moretto P, Surlève-Bazeille JE, Kiss B, Juhász I, Hunyadi J, Kiss ÁZ. 2005. Nuclear microprobe study of TiO₂-penetration in the epidermis of human skin xenografts. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* 231 : 280-285.
- Kimber I**, Dearman RJ. 1991. Investigation of lymph node cell proliferation as a possible immunological correlate of contact sensitizing potential. *Food Chem Toxicol* 29 : 125-129.
- Kimber I**. 2001. The local lymph node assay and potential application to the identification of drug allergens. *Toxicology* 158 : 59-64.
- Kish DD**, Gorbachev AV, Fairchild RL. 2005. CD8⁺ T cells produce IL-2, which is required for CD4⁺CD25⁺ T cell regulation of effector CD8⁺ T cell development for contact hypersensitivity responses. *J Leukoc Biol* 78 : 725-735.
- Kiss B**, Bíró T, Czifra G, Tóth BI, Kertész Z, Szikszai Z, Kiss AZ, Juhász I, Zouboulis CC, Hunyadi J. 2008. Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells. *Exp Dermatol* 17 : 659-667.
- Kissenpfennig A**, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhé C, Perrin P, Romani N, Tripp CH, Douillard P, Leserman L, Kaiserlian D, Saeland S, Davoust J, Malissen B. 2005. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22 : 643-654.
- Klechevsky E**, Morita R, Liu M, Cao Y, Coquery S, Thompson-Snipes L, Briere F, Chaussabel D, Zurawski G, Palucka AK, Reiter Y, Banchereau J, Ueno H. 2008. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14⁺ dermal dendritic cells. *Immunity* 29 : 497-510.
- Kligman AM**, Basketter DA. 1995. A critical commentary and updating of the guinea pig maximization test. *Contact Dermatitis* 32 : 129-134.
- Kobayashi Y**, Matsumoto M, Kotani M, Makino T. 1999. Possible involvement of matrix metalloproteinase-9 in Langerhans cell migration and maturation. *J Immunol* 163 : 5989-5993.
- Korn T**, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immuno* 27 : 485-517.
- Krasteva M**, Kehren J, Ducluzeau MT, Sayag M, Cacciapuoti M, Akiba H, Descotes J, Nicolas JF. 1999. Contact dermatitis I. Pathophysiology of contact sensitivity. *Eur J Dermatol* 9 : 65-77.
- Krasteva M**, Kehren J, Horand F, Akiba H, Choquet G, Ducluzeau MT, Tédone R, Garrigue JL, Kaiserlian D, Nicolas JF. 1998. Dual role of dendritic cells in the induction and down-regulation of antigen-specific cutaneous inflammation. *J Immunol* 160 : 1181-1190.
- Krasteva M**, Peguet-Navarro J, Moulon C, Courtellemont P, Redziniak G, Schmitt D. 1996. In vitro primary sensitization of hapten-specific T cells by cultured human epidermal Langerhans cells - a screening predictive assay for contact sensitizers. *Clin Exp Allergy* 26 : 563-570.
- Kühn U**, Brand P, Willemsen J, Jonuleit H, Enk AH, van Brandwijk-Petershans R, Saloga J, Knop J, Becker D. 1998. Induction of tyrosine phosphorylation in human MHC class II-positive antigen-presenting cells by stimulation with contact sensitizers. *J Immunol* 160 : 667-673.
- Kuntsche J**, Bunjes H, Fahr A, Pappinen S, Rönkkö S, Suhonen M, Urtti A. 2008. Interaction of lipid nanoparticles with human epidermis and an organotypic cell culture model. *Int J Pharm* 354 : 180-195.
- Lademann J**, Weigmann HJ, Rickmeier CH, Barthelme H, Schaefer H, Mueller G, Sterry W. 1999. Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the

- follicular orifice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2 : 247-256.
- Lambrechts** N, Verstraelen S, Lodewyckx H, Felicio A, Hooyberghs J, Witters H, Van Tendeloo V, Van Cauwenberge P, Nelissen I, Van Den Heuvel R, Schoeters G. 2009. THP-1 monocytes but not macrophages as a potential alternative for CD34⁺ dendritic cells to identify chemical skin sensitizers. *Toxicol Appl Pharmacol* 236 : 221-230.
- Landsteiner** K, Jacobs J. 1936. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *J Exp Med* 64 : 625-639.
- Langerhans** P. 1868. Über die nerven der menschlichen haut Virchows. *Arch Path Anat* 44 : 325-337
- Larese** FF, D'Agostin F, Crosera M, Adami G, Renzi N, Bovenzi M, Maina G. 2009. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology* 255 : 33-37.
- Larregina** AT, Morelli AE, Spencer LA, Logar AJ, Watkins SC, Thomson AW, Falo LD Jr. 2001. Dermal-resident CD14⁺ cells differentiate into Langerhans cells. *Nat Immunol* 2 : 1151-1158.
- Larsen** ST, Roursgaard M, Jensen KA, Nielsen GD. 2010. Nano titanium dioxide particles promote allergic sensitization and lung inflammation in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106 : 114-117.
- Lekki** J, Stachura Z, Dabros W, Stachura J, Menzel F, Reinert T, Butz T, Gontier E, Ynsa MD, Moretto P, Kertesz Z, Szikszai Z, Kiss AZ. 2007. On the follicular pathway of percutaneous uptake of nanoparticles: ion microscopy and autoradiography studies. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* 260 : 174-177.
- Le Varlet** B, Dezutter-Dambuyant C, Staquet MJ, Delorme P, Schmitt D. 1991. Human epidermal Langerhans cells express integrins of the beta 1 subfamily. *J Invest Dermatol* 96 : 518-522.
- Le Varlet** B, Staquet MJ, Dezutter-Dambuyant C, Delorme P, Schmitt D. 1992. In vitro adhesion of human epidermal Langerhans cells to laminin and fibronectin occurs through beta 1 integrin receptors. *J Leukoc* 51 : 415-420.
- Lebre** MC, Antons JC, Kalinski P, Schuitemaker JH, van Capel TM, Kapsenberg ML, De Jong EC. 2003. Double-stranded RNA-exposed human keratinocytes promote Th1 responses by inducing a Type-1 polarized phenotype in dendritic cells: role of keratinocyte-derived tumor necrosis factor alpha, type I interferons, and interleukin-18. *J Invest Dermatol* 120 : 990-997.
- Lee-Wong** M, Resnick D, Chong K. 2005. A generalized reaction to thimerosal from an influenza vaccine. *Ann Allergy Asthma Immunol* 94 : 90-94.
- Lehé** CL, Jacobs JJ, Hua CM, Courtellemont P, Elliott GR, Das PK. 2006. Subtoxic concentrations of allergenic haptens induce LC migration and maturation in a human organotypic skin explant culture model: a novel method for identifying potential contact allergens. *Exp Dermatol* 15 : 421-431.
- Long** TC, Saleh N, Tilton RD, Lowry GV, Veronesi B. 2006. Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ Sci Technol* 40 : 4346-4352.
- Long** TC, Tajuba J, Sama P, Saleh N, Swartz C, Parker J, Hester S, Lowry GV, Veronesi B. 2007. Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environ Health Perspect* 115 : 1631-1637.
- Lu** N, Zhu Z, Zhao X, Tao R, Yang X, Gao Z. 2008. Nano titanium dioxide photocatalytic protein tyrosine nitration: a potential hazard of TiO₂ on skin. *Biochem Biophys Res Commun* 370 : 675-680.
- Magnusson** B, Kligman AM. 1969. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Invest Dermatol* 52 : 268-276.
- Makani** S, Gollapudi S, Yel L, Chiplunkar S, Gupta S. 2002. Biochemical and molecular basis of thimerosal-induced apoptosis in T cells: a major role of mitochondrial pathway. *Genes Immun* 3 : 270-278.
- Masterson** AJ, Sombroek CC, De Gruijl TD, Graus YM, van der Vliet HJ, Lougheed SM, van den Eertwegh AJ, Pinedo HM, Scheper RJ. 2002. MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34⁺ precursors. *Blood* 100 : 701-703.
- Matsue** H, Edelbaum D, Shalhevet D, Mizumoto N, Yang C, Mummert ME, Oeda J, Masayasu H, Takashima A. 2003. Generation and function of

- reactive oxygen species in dendritic cells during antigen presentation. *J Immunol* 171 : 3010-3018.
- Maurer M**, Seidel-Guyenot W, Metz M, Knop J, Steinbrink K. 2003. Critical role of IL-10 in the induction of low zone tolerance to contact allergens. *J Clin Invest* 112 : 432-439.
- Megherbi R**, Kiorpelidou E, Foster B, Rowe C, Naisbitt DJ, Goldring CE, Park BK. 2009. Role of protein haptentation in triggering maturation events in the dendritic cell surrogate cell line THP-1. *Toxicol Appl Pharmacol* 238 : 120-132.
- Merad M**, Manz MG, Karsunky H, Wagers A, Peters W, Charo I, Weissman IL, Cyster JG, Engleman EG. 2002. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 3 : 1135-1141.
- Miller SJ**, Aly R, Shinefeld HR, Elias PM. 1988. In vitro and in vivo antistaphylococcal activity of human stratum corneum lipids. *Arch Dermatol* 124 : 209-215.
- Mitjans M, Viviani B, Lucchi L, Galli CL, Marinovich M, Corsini E. 2008 Role of p38 MAPK in the selective release of IL-8 induced by chemical allergen in naive THP-1 cells. *Toxicol In Vitro* 22 : 386-395.
- Miyazawa M, Ito Y, Kosaka N, Nukada Y, Sakaguchi H, Suzuki H, Nishiyama N. 2008 Role of TNF- α and extracellular ATP in THP-1 cell activation following allergen exposure. *J Toxicol Sci* 33: 71-83.
- Miyazawa M, Ito Y, Kosaka N, Nukada Y, Sakaguchi H, Suzuki H, Nishiyama N. 2008 Role of MAPK signaling pathway in the activation of dendritic type cell line, THP-1, induced by DNCB and NiSO₄. *J Toxicol Sci* 33 : 51-59.
- Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. 2007 Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol In Vitro* 21 : 428-437.
- Mizuashi M., Ohtani T., Nakagawa S., Aiba, S.. 2005 Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol* 124: 579-586.
- Morishige T**, Yoshioka Y, Tanabe A, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. 2010. Titanium dioxide induces different levels of IL-1 β production dependent on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive oxygen species and cathepsin B. *Biochem Biophys Res Commun* 392 : 160-165.
- Nakahara T, Uchi H, Urabe K, Chen Q, Furue M, Moroi Y. 2004 Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol* 16: 1701-1709.
- Natsch A**, Gfeller H. 2008. LC-MS-based characterization of the peptide reactivity of chemicals to improve the in vitro prediction of the skin sensitization potential. *Toxicol Sci* 106 : 464-478.
- Natsch A**, Emter R. 2008. Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the in vitro testing of the sensitization potential of chemicals. *Toxicol Sci* 102 : 110-119.
- Natsch A**, Emter R, Ellis G. 2009. Filling the concept with data: integrating data from different in vitro and in silico assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol Sci* 107 : 106-121.
- Natsch A**. 2010. The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers-functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers. *Toxicol Sci* 113 : 284-292.
- Nelissen I**, Selderslaghs I, Heuvel RV, Witters H, Verheyen GR, Schoeters G. 2009. MUTZ-3-derived dendritic cells as an in vitro alternative model to CD34⁺ progenitor-derived dendritic cells for testing of chemical sensitizers. *Toxicol In Vitro* 23 :1477-1481.
- Nestle FO**, Zheng XG, Thompson CB, Turka LA, Nickoloff BJ. 1993. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol* 151 : 6535-6545.
- Nestle FO**, Filgueira L, Nickoloff BJ, Burg G. 1998. Human dermal dendritic cells process and present soluble protein antigens. *J Invest Dermatol* 110 : 762-766.
- Nohynek GJ**, Dufour EK, Roberts MS. 2008. Nanotechnology, cosmetics and the skin: is there a health risk? *Skin Pharmacol Physiol* 21 : 136-149.
- Nukada Y**, Miyazawa M, Kosaka N, Ito Y, Sakaguchi H, Nishiyama N. 2008. Production of IL-8 in THP-1

- cells following contact allergen stimulation via mitogen-activated protein kinase activation or tumor necrosis factor- α production. *J Toxicol Sci* 33 : 175-185.
- Oberdorster** G, Oberdorster E, Oberdorster J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113 : 823-839.
- Okayama** Y. 2005. Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4 : 517-519.
- Ouwehand** K, Spiekstra SW, Reinders J, Scheper RJ, de Gruijl TD, Gibbs S. 2010. Comparison of a novel CXCL12/CCL5 dependent migration assay with CXCL8 secretion and CD86 expression for distinguishing sensitizers from non-sensitizers using MUTZ-3 Langerhans cells. *Toxicol In Vitro* 24 : 578-585.
- Palomäki** J, Karisola P, Pylkkänen L, Savolainen K, Alenius H. 2010. Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells. *Toxicology* 267 : 125-131.
- Paquette** RL, Hsu NC, Kiertscher SM, Park AN, Tran L, Roth MD, Glaspy JA. 1998. Interferon- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 64 : 358-367.
- Park** EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K. 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett* 180 : 222-229.
- Patlewicz** G, Aptula AO, Uriarte E, Roberts DW, Kern PS, Gerberick GF, Kimber I, Dearman RJ, Ryan CA, Basketter DA. 2007. An evaluation of selected global (Q)SARs/expert systems for the prediction of skin sensitisation potential. *SAR QSAR Environ Res* 18 : 515-541.
- Patrizi** A, Rizzoli L, Vincenzi C, Trevisi P, Tosti A. 1999. Sensitization to thimerosal in atopic children. *Contact Dermatitis* 40 : 94-97.
- Pearson** LL, Castle BE, Kehry MR. 2001. CD40-mediated signaling in monocytic cells: up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Int Immunol* 13 : 273-283.
- Pflücker** F, Hohenberg H, Hölzle E, Will T, Pfeiffer S, Wepf R, Diembeck W, Wenck H, Gers-Barlag H. 1999. The outermost stratum corneum layer is an effective barrier against dermal uptake of topically applied micronized titanium dioxide. *Int J Cosmet Sci* 21 : 399-411.
- Pichowski** JS, Cumberbatch M, Dearman RJ, Basketter DA, Kimber I. 2001. Allergen-induced changes in interleukin 1 beta (IL-1 beta) mRNA expression by human blood-derived dendritic cells: inter-individual differences and relevance for sensitization testing. *J Appl Toxicol* 21 : 115-121.
- Piemonti** L, Bernasconi S, Luini W, Trobonjaca Z, Minty A, Allavena P, Mantovani A. 1995. IL-13 supports differentiation of dendritic cells from circulating precursors in concert with GM-CSF. *Eur Cytokine Netw* 6 : 245-252.
- Popov** AP, Lademann J, Priezzhev AV, Myllyla R. 2005. Effect of size of TiO₂ nanoparticles embedded into stratum corneum on ultraviolet-A and ultraviolet-B sun-blocking properties of the skin. *J Biomed Optics* 10 : 1-9.
- Puig-Kröger** A, Relloso M, Fernández-Capetillo O, Zubiaga A, Silva A, Bernabéu C, Corbí AL. 2001. Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* 98 : 2175-2182.
- Python** F, Goebel C, Aeby P. 2007. Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol Appl Pharmacol* 220 : 113-124.
- Python** F, Goebel C, Aeby P. 2009. Comparative DNA microarray analysis of human monocyte derived dendritic cells and MUTZ-3 cells exposed to the moderate skin sensitizer cinnamaldehyde. *Toxicol Appl Pharmacol* 239 : 273-283.
- Rahal** R, Daniele S, Hubert-Pfalzgraf LG, Guyot-Ferréol V, Tranchant JF. 2008. Synthesis of para-amino benzoic acid-TiO₂ hybrid nanostructures of controlled functionality by an aqueous one-step process. *Eur J Inorg Chem* 208 : 980-987.
- Randolph** GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. 1998. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282 : 480-483.

- Reddy ST, Swartz MA, Hubbell JA.** 2006. Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *Trends Immunol* 27 : 573-579.
- Régnier M, Staquet MJ, Schmitt D, Schmidt R.** 1997. Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis. *J Invest Dermatol* 109 : 510-512.
- Régnier M, Patwardhan A, Scheynius A, Schmidt R.** 1998. Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells. *Med Biol Eng Comput* 36 : 821-824.
- Remick DG, Villarete L.** 1996. Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates. *J Leukoc Biol* 59 : 471-475.
- Rivollier A, Perrin-Cocon L, Luche S, Diemer H, Strub JM, Hanau D, van Dorsselaer A, Lotteau V, Rabourdin-Combe C, Rabilloud T, Servet-Delprat C.** 2006. High expression of antioxidant proteins in dendritic cells: possible implications in atherosclerosis. *Mol Cell Proteomics* 5 : 726-736.
- Roberts DW, Williams DL.** 1982. The derivation of quantitative correlations between skin sensitisation and physio-chemical parameters for alkylating agents, and their application to experimental data for sultones. *J Theor Biol* 99 : 807-825.
- Roberts DW, Basketter DA.** 2000. Quantitative structure-activity relationships: sulfonate esters in the local lymph node assay. *Contact Dermatitis* 42 : 154-161.
- Roberts DW, Patlewicz G, Dimitrov SD, Low LK, Aptula AO, Kern PS, Dimitrova GD, Comber MI, Phillips RD, Niemelä J, Madsen C, Wedebye EB, Bailey PT, Mekenyan OG.** 2007. TIMES-SS a mechanistic evaluation of an external validation study using reaction chemistry principles. *Chem Res Toxicol* 20 : 1321-1330.
- Roberts DW, Aptula AO, Patlewicz G, Pease C.** 2008. Chemical reactivity indices and mechanism-based read-across for non-animal based assessment of skin sensitisation potential. *J Appl Toxicol* 228: 443-454.
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G.** 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180 : 83-93.
- Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P.** 2003. Langerhans cells-dendritic cells of the epidermis. *Apmis* 111 : 725-740.
- Rothén-Rutishauser B, Mühlfeld C, Blank F, Musso C, Gehr P.** 2007. Translocation of particles and inflammatory responses after exposure to fine particles and nanoparticles in an epithelial airway model. *Part Fibre Toxicol* 25 : 4-9.
- Rothén-Rutishauser B, Mueller L, Blank F, Brandenberger C, Muehlfeld C, Gehr P.** 2008. A newly developed in vitro model of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of nanoparticles. *ALTEX* 25 : 191-196.
- Rougier N, Redziniak G, Schmitt D, Vincent C.** 1998. Evaluation of the capacity of dendritic cells derived from cord blood CD34⁺ precursors to present haptens to unsensitized autologous T cells in vitro. *J Invest Dermatol* 110 : 348-352.
- Rougier N, Redziniak G, Mouglin D, Schmitt D, Vincent C.** 2000. In vitro evaluation of the sensitization potential of weak contact allergens using langerhans-like dendritic cells and autologous T cells. *Toxicology* 145 : 73-82.
- Rozis G, Benlahrech A, Duraisingham S, Gotch F, Patterson S.** 2008. Human Langerhans' cells and dermal-type dendritic cells generated from CD34 stem cells express different toll-like receptors and secrete different cytokines in response to toll-like receptor ligands. *Immunology* 124 : 329-338.
- Rutault K, Alderman C, Chain BM, Katz DR.** 1999. Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radic Biol Med* 26 : 232-238.
- Ryan CA, Gildea LA, Hulette BC, Dearman RJ, Kimber I, Gerberick GF.** 2004. Gene expression changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol Lett* 150 : 301-16.
- Sadrieh N, Wokovich AM, Gopee NV, Zheng J, Haines D, Parmiter D, Siitonen PH, Cozart CR, Patri AK, McNeil SE, Howard PC, Doub WH, Buhse LF.** 2010. Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing

- nano- and submicron-size TiO₂ particles. *Toxicol Sci* 115 : 156-166.
- Sakaguchi H**, Ashikaga T, Miyazawa M, Yoshida Y, Ito Y, Yoneyama K, Hirota M, Itagaki H, Toyoda H, Suzuki H. 2006. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human cell line activation test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol in Vitro* 20 : 774-784.
- Sakaguchi H**, Miyazawa M, Yoshida Y, Ito Y, Suzuki H. 2007. Prediction of preservative sensitization potential using surface marker CD86 and/or CD54 expression on human cell line, THP-1. *Arch Dermatol Res* 298 : 427-437.
- Sakaguchi H**, Ashikaga T, Miyazawa M, Kosaka N, Ito Y, Yoneyama K, Sono S, Itagaki H, Toyoda H, Suzuki H. 2009. The relationship between CD86/CD54 expression and THP-1 cell viability in an in vitro skin sensitization test-human cell line activation test (h-CLAT). *Cell Biol Toxicol* 25 : 109-126.
- Sallusto F**, Lanzavecchia A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179 : 1109-1118.
- Santegoets SJ**, Masterson AJ, van der Sluis PC, Loughheed SM, Fluitsma DM, van den Eertwegh AJ, Pinedo HM, Scheper RJ, de Gruijl TD. 2006. A CD34⁺ human cell line model of myeloid dendritic cell differentiation: evidence for a CD14⁺CD11b⁺ Langerhans cell precursor. *J Leukoc Biol* 80: 1337-1344.
- Schaerli P**, Willimann K, Ebert LM, Walz A, Moser B. 2005. Cutaneous CXCL14 targets blood precursors to epidermal niches for Langerhans cell differentiation. *Immunity* 23 : 331-342.
- Schanen BC**, Karakoti AS, Seal S, Drake DR 3rd, Warren WL, Self WT. 2009. Exposure to titanium dioxide nanomaterials provokes inflammation of an in vitro human immune construct. *ACS Nano* 3 : 2523-2532.
- Schoeters E**, Verheyen GR, Van Den Heuvel R, Nelissen I, Witters H, Van Tendeloo VF, Schoeters GE, Berneman ZN. 2005. Expression analysis of immune-related genes in CD34⁺ progenitor-derived dendritic cells after exposure to the chemical contact allergen DNCB. *Toxicol In Vitro* 19 : 909-13.
- Schoeters E**, Nuijten JM, Van Den Heuvel RL, Nelissen I, Witters H, Schoeters GE, Van Tendeloo VF, Berneman ZN, Verheyen GR. 2006. Gene expression signatures in CD34⁺-progenitor-derived dendritic cells exposed to the chemical contact allergen nickel sulfate. *Toxicol Appl Pharmacol* 216 : 131-149.
- Schoeters E**, Verheyen GR, Nelissen I, Van Rompay AR, Hooyberghs J, Van Den Heuvel RL, Witters H, Schoeters GE, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. 2007. Microarray analyses in dendritic cells reveal potential biomarkers for chemical-induced skin sensitization. *Mol Immunol* 44 : 3222-3233.
- Schreiner M**, Peiser M, Briechle D, Stahlmann R, Zuberbier T, Wanner R. 2007. A loose-fit coculture of activated keratinocytes and dendritic cell-related cells for prediction of sensitizing potential. *Allergy* 62 : 1419-1428.
- Schreiner M**, Peiser M, Briechle D, Stahlmann R, Zuberbier T, Wanner R. 2008. A new dendritic cell type suitable as sentinel of contact allergens. *Toxicology* 249 : 146-152.
- Schulz J**, Hohenberg F, Pflücker F, Gärtner B, Will T, Pfeiffer S, Wepf R, Wendel V, Gers-Berlag H, Wittern KP. 2002. Distribution of sunscreens on skin. *Adv Drug Deliv Rev* 54 : S157-S163.
- Schultz TW**, Yarbrough JW, Johnson EL. 2005. Structure-activity relationships for reactivity of carbonyl-containing compounds with glutathione. *SAR QSAR Environ Res* 16 : 313-322.
- Schultz TW**, Yarbrough JW, Hunter RS, Aptula AO. 2007. Verification of the structural alerts for Michael acceptors. *Chem Res Toxicol* 20 : 1359-1363.
- Song PI**, Park YM, Abraham T, Harten B, Zivony A, Neparidze N, Armstrong CA, Ansel JC. 2002. Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol* 119 : 424-432.
- Staquet MJ**, Sportouch M, Jacquet C, Schmitt D, Guesnet J, Péguet-Navarro J. 2004. Moderate skin sensitizers can induce phenotypic changes on in vitro generated dendritic cells. *Toxicol In Vitro* 18: 493-500.

- Stoitzner P**, Tripp CH, Eberhart A, Price KM, Jung JY, Bursch L, Ronchese F, Romani N. 2006. Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 : 7783-7788.
- Stone V**, Johnston H, Clift MJ. 2007. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. *IEEE Trans Nanobioscience* 6 : 31-40.
- Strobl H**, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Pickl WF, Rappersberger K, Majdic O, Knapp W. 1996. TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34⁺ hemopoietic progenitors. *J Immunol* 157 : 1499-1507.
- Suneja T**, Belsito DV. 2001. Thimerosal in the detection of clinically relevant allergic contact reactions. *J Am Acad Dermatol* 45 : 23-27.
- Suzuki M**, Hirota M, Hagino S, Itagaki H, Aiba S. 2009. Evaluation of changes of cell-surface thiols as a new biomarker for in vitro sensitization test. *Toxicol In Vitro* 23 : 687-696.
- Szameit S**, Weber E, Noehammer C. 2009. DNA microarrays provide new options for allergen testing. *Expert Rev Mol Diagn* 9 : 843-850.
- Tang A**, Amagai M, Granger LG, Stanley JR, Udey MC. 1993. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361 : 82-85.
- Tas SW**, de Jong EC, Hajji N, May MJ, Ghosh S, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. 2005. Selective inhibition of NF-kappaB in dendritic cells by the NEMO-binding domain peptide blocks maturation and prevents T cell proliferation and polarization. *Eur J Immunol* 35 : 1164-1174.
- Teobald I**, Dunnion DJ, Whitbread M, Curnow SJ, Browning MJ. 2008. Phenotypic and functional differentiation of KG-1 into dendritic-like cells. *Immunobiology* 213 : 75-86.
- Tietze C**, Blomeke B. 2008. Sensitization assays: monocyte-derived dendritic cells versus a monocytic cell line (THP-1). *J Toxicol Environ Health A* 71 : 965-968.
- Tinkle SS**, Antonini JM, Rich BA, Roberts JR, Salmen R, DePree K, Adkins EJ. 2003. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect* 111 : 1202-1208.
- Trombetta ES**, Mellman I. 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23 : 975-1028.
- Trompezinski S**, Migdal C, Tailhardat M, Le Varlet B, Courtellemont, P, Haftek M, Serres M. 2008. Characterization of early events involved in human dendritic cell maturation induced by sensitizers: cross talk between MAPK signalling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 230 : 397-406.
- Trouiller B**, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH. 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res* 69 : 8784-8789.
- Tudela E**, MacPherson C, Maibach HI. 2008. Long-term trend in patch test reactions: a 32-year statistical overview (1970-2002), part II. *Cutan Ocul Toxicol* 27 : 187-202.
- Türeci O**, Bian H, Nestle FO, Radrizzani L, Rosinski JA, Tassis A, Hilton H, Walstead M, Sahin U, Hammer J. 2003. Cascades of transcriptional induction during dendritic cell maturation revealed by genome-wide expression analysis. *FASEB* 17 : 836-847.
- Tuschl H**, Kovac R, Weber E. 2000. The expression of surface markers on dendritic cells as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Toxicol In Vitro* 14 : 541-549.
- Tuschl H**, Kovac R. 2001. Langerhans cells and immature dendritic cells as model systems for screening of skin sensitizers. *Toxicology in Vitro* 15 : 327-331.
- Uchino T**, Takezawa T, Ikarashi Y. 2009. Reconstruction of three-dimensional human skin model composed of dendritic cells, keratinocytes and fibroblasts utilizing a handy scaffold of collagen vitrigel membrane. *Toxicol In Vitro* 23 : 333-337.
- Valladeau J**, Duvert-Frances V, Pin JJ, Dezutter-Dambuyant C, Vincent C, Massacrier C, Vincent J, Yoneda K, Banchereau J, Caux C, Davoust J, Saeland S. 1999. The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface. *Eur J Immunol* 29 : 2695-2704.
- Valladeau J**, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, Duvert-Frances V, Vincent C,

- Schmitt D, Davoust J, Caux C, Lebecque S, Saeland S. 2000. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12 : 71-81.
- Vamanu** CI, Cimpan MR, Hol PJ, Sornes , Lie SA, Gjerdet NR. 2008. Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: studies on human monoblastoid cell line. *Toxicol In Vitro* 22 : 1689-1696.
- Vandebriel** RJ, Van Och FM, van Loveren H. 2005. In vitro assessment of sensitizing activity of low molecular weight compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 207 :142-148.
- Verhasselt** V, Goldman M, Willems F. 1998. Oxidative stress up-regulates IL-8 and TNF-alpha synthesis by human dendritic cells. *Eur J Immunol* 28 : 3886-3890.
- Verhasselt** V, Vanden Berghe W, Vanderheyde N, Willems F, Haegeman G, Goldman M. 1999. N-acetyl-L-cysteine inhibits primary human T cell responses at the dendritic cell level: association with NF-kappaB inhibition. *J Immunol* 162 : 2569-2574.
- Verrier** AC, Schmitt D, Staquet MJ. 1999. Fragrance and contact allergens in vitro modulate the HLA-DR and E-cadherin expression on human epidermal Langerhans cells. *Int Arch Allergy Immunol* 120 : 56-62.
- Vileno** B, Lekka M, Sienkiewicz A, Jeney S, Stoessel G, Lekki J, Forró L, Stachura Z. 2007. Stiffness alterations of single cells induced by UV in the presence of nanoTiO₂. *Env Sci Technol* 41 : 5149-5153.
- Wamer** WG, Yin JJ, Wei RR. 1997. Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. *Free Radic Biol Med* 23 : 851-858.
- Wanner** R, Schreiner M. 2008. An in vitro assay to screen for the sensitizing potential of xenobiotics. *ALTEX* 25 : 115-120.
- Warheit** DB, Hoke RA, Finlay C, Donner EM, Reed KL, Sayes CM. 2007. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol Lett* 171 : 99-110.
- Warheit** DB. 2008. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol Sci* 101 : 183-185.
- Wattanakrai** P, Rajatanavin N. 2007. Thimerosal allergy and clinical relevance in Thailand. *J Med Assoc Thai* 90 : 1775-1779.
- Woo** KJ, Lee TJ, Bae JH, Jang BC, Song DK, Cho JW, Suh SI, Park JW, Kwon TK. 2006. Thimerosal induces apoptosis and G2/M phase arrest in human leukemia cells. *Mol Carcinog* 45 : 657-666.
- Wu** J, Liu W, Xue C, Zhou S, Lan F, Bi L, Xu H, Yang X, Zeng FD. 2009. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol Lett* 191 : 1-8.
- Yamada** H, Arai T, Endo N, Yamashita K, Fukuda K, Sasada M, Uchiyama T. 2006. LPS-induced ROS generation and changes in glutathione level and their relation to the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Life Sci* 78 : 926-933.
- Yamamoto** A, Honma R, Sumita M, Hanawa K. 2004. Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes. *J Biomed Mater Res* 68A : 244-256.
- Yoshida** Y, Sakaguchi H, Ito Y, Okuda M, Suzuki H. 2003. Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naive THP-1 cell line. *Toxicol In Vitro* 17 : 221-228.
- Yoshimoto** T, Nagase H, Ishida T, Inoue J, Nariuchi H. 1997. Induction of interleukin-12 p40 transcript by CD40 ligation via activation of nuclear factor-kappaB. *Eur J Immunol* 27 : 3461-3470.
- Yoshimura** S, Bondeson J, Foxwell BM, Brennan FM, Feldmann M. 2001. Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Int Immunol* 13 : 675-683.
- Zaba** LC, Fuentes-Duculan J, Steinman RM, Krueger JG, Lowes MA. 2007. Normal human dermis contains distinct populations of CD11c⁺BDCA-1⁺ dendritic cells and CD163⁺FXIIIa⁺ macrophages. *J Clin Invest* 117 : 2517-2525.

- Zenarola P**, Gimma A, Lomuto M. 1995. Systemic contact dermatitis from thimerosal. *Contact Dermatitis* 32 : 107-108.
- Zhang X**, Chen X, Song H, Chen HZ, Rovin BH. 2005. Activation of the Nrf2/antioxidant response pathway increases IL-8 expression. *Eur J Immunol* 35 : 3258-3267.
- Zhao X**, Deak E, Soderberg K, Linehan M, Spezzano D, Zhu J, Knipe DM, Iwasaki A. 2003. Vaginal submucosal dendritic cells, but not Langerhans cells, induce protective Th1 responses to herpes simplex virus-2. *J Exp Med* 197 : 153-162.
- Zvinavashe E**, Murk AJ, Rietjens IM. 2008. Promises and pitfalls of quantitative structure-activity relationship approaches for predicting metabolism and toxicity. *Chem Res Toxicol* 21 : 2229-2236.

Etude des évènements précoces impliqués dans l'activation des cellules dendritiques humaines induite par le thimerosal : rôle du stress oxydant.

L'eczéma allergique de contact (EAC) est une pathologie inflammatoire cutanée de plus en plus fréquente. Il s'agit d'une sensibilisation vis-à-vis de substances chimiques, appelées haptènes, qui sont en contact répété avec la peau. A l'heure actuelle, le pouvoir sensibilisant d'une molécule est évalué principalement grâce à des modèles animaux. Cependant, dans un contexte européen exigeant le développement de méthodes alternatives, la compréhension et la reproduction *in vitro* des mécanismes de l'EAC permettent le développement de nouvelles stratégies. Le but de ce travail, réalisé sur des cellules dendritiques (DCs) et la lignée humaine U937, est de mettre en évidence les événements précoces de la signalisation intracellulaire à l'origine de l'activation des DCs induite par des allergènes, et notamment par le composé mercurique thimerosal. Les résultats obtenus démontrent que l'induction d'un stress oxydant par les allergènes est un mécanisme induit précocement. L'utilisation d'antioxydants montre que ce mécanisme participe de manière directe à l'initiation du processus d'activation des DCs (expression du CD86 et sécrétion d'IL-8) et de l'apoptose. Le stress oxydant, caractérisé par une production d'ERO associée à une chute du potentiel membranaire mitochondrial et une déplétion en glutathion intracellulaire, est un acteur majeur de la signalisation induite par les allergènes et notamment dans la réponse induite par le thimerosal et le DNCB. Plus particulièrement, ce travail démontre le rôle des groupements thiols dans l'initiation de la transduction du signal aboutissant à l'activation des DCs. Par ailleurs, une signalisation calcique, dépendante du stress oxydant, a également été mise en évidence en réponse aux allergènes. Ces résultats mettent en valeur l'importance de l'étude de la réactivité des allergènes vis-à-vis des groupements thiols et de la nécessité de tenir compte du potentiel oxydant (rédox) des haptènes ainsi que du métabolisme cellulaire dans la mise en place de modèles prédictifs *in vitro*.

Characterization of early events involved in human dendritic cell activation induced by thimerosal: role of oxidative stress.

Allergic Contact Dermatitis (ACD) resulting from skin sensitization is a frequent inflammatory skin disease linked to the use of chemicals, called haptens. At this time, the sensitizing potential of a new chemical is evaluated on animal models. However, new European legislation requires alternative methods for skin sensitization. In this context, a better knowledge of ACD and the capacity to reproduce *in vitro* its mechanisms lead to the development of new alternative methods. The aim of this study performed with human dendritic cells (DCs) and the human cell line U937 was to determine the early events involved in dendritic cell activation induced by contact sensitizers and especially by the mercury compound thimerosal. Data show that oxidative stress induced by sensitizers is an early signaling event leading to DC activation (expression of CD86 and IL-8 release) and to apoptosis. Using antioxidants, our data show that oxidative stress, characterized by ROS production in correlation with the depletion of the mitochondrial membrane potential and of intracellular glutathione, is a key player in signal transduction induced by sensitizers, especially in the response of DCs towards thimerosal and DNCB. More specifically, these studies demonstrate that thiol groups play a direct role in the initiating events leading to DC activation. In addition, calcium influx was detected in DCs exposed to sensitizers, in correlation with oxidative stress. These data highlight the great interest in the development of a hapten-protein binding assay based on thiol groups and the necessity to better understand the redox status of chemicals as well as cell metabolism for predicting skin sensitization.

MOTS-CLES : cellules dendritique (DCs), lignée U937, stress oxydant, espèces réactives de l'oxygène (ERO), antioxydants, groupements thiols, calcium, méthodes alternatives *in vitro*.

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

EA 41-69 « Fonctions normales et pathologiques de la barrière cutanée » Laboratoire de Dermatologie
Pavillon R, Hôpital Edouard Herriot, Place d'Arsonval, 69437 LYON cedex 03.