UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

DISCIPLINE : TOXICOLOGIE

ANNÉE 2013-2014 SÉRIE DOCTORAT N° 1233

THÈSE DE DOCTORAT

SOUTENUE LE 12 DÉCEMBRE 2013

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD

PAR

ZEINA EL ALI

RÔLE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION NRF2 DANS LE CONTRÔLE DE L'ALLERGIE CUTANÉE EN RÉPONSE AUX MOLÉCULES CHIMIQUES

Composition du jury :

Prof. Saadia KERDINE-RÖMER	Directrice de thèse	Professeur des Universités - INSERM UMR-S 996 Université Paris-Sud
Prof. Françoise PONS	Rapporteur	Professeur des Universités – CNRS UMR 7199 Université de Strasbourg
Dr Bertrand DUBOIS	Rapporteur	Chargé de recherche (CR1) – INSERM UMR 1052, CNRS 5286
Prof. Marcel BONAY	Examinateur	Professeur des Universités – EA 4497 Université de Versailles Saint-Quentin Praticien Hospitalier - Hôpital Ambroise Paré
Prof. Stefan MARTIN	Examinateur	Professeur des Universités Universitätsklinikum für Dermatologie und Venerologie, Freiburg - Allemagne
Prof. Oliver NÜSSE	Examinateur	Professeur des Universités – INSERM UMR-S 757 Université Paris-Sud

Dédicaces

Cette thèse est dédiée

A celle qui nous a quittés tôt cette année et dont je regrette son absence !
A ma chère petite sœur Imane qui me manque beaucoup !
Que ton âme repose en paix !

A celle qui m'a toujours entourée par son affection, sa tendresse, son amour et ses prières, celle qui m'a toujours conseillée, soutenue et encouragée aux moments les plus difficiles, ma très chère maman Salwa

A celui qui est toujours fier de moi, n'arrête pas de m'encourager et qui a hâte que je rentre au Liban, mon cher papa Abed El Kader

A celle qui, malgré parfois nos mésententes, m'a toujours encouragée, soutenue et pensé à moi, ma chère sœur Samar

A celui qui, malgré les distances qui nous séparent était toujours proche de moi, celui qui m'a toujours encouragée, mon cher frère Ayman

A celle à qui je dois tout ce que suis professionnellement, celle qui m'a poussée à continuer en Thèse, celle qui pense toujours à moi, celle qui malgré son exigence sait ce qui est le meilleur pour moi, celle qui était toujours proche de moi et m'a entourée par sa tendresse et son affection, à celle qui va me manquer beaucoup après mon départ, ma chère directrice de Thèse (et elle sait ce qu'elle représente aussi pour moi !),
ma précieuse Saadia

A celle qui a été toujours là pour me conseiller, me soutenir et m'encourager, mon amie Rafah

A tous ceux qui m'ont soutenue et pensé à moi de près ou de loin

Que ce modeste travail soit l'expression de mon affection et de ma reconnaissance pour vos conseils, votre patience, votre amour et vos prières

Si j'en suis là, c'est grâce à vous …

REMERCIEMENTS

Remerciements

Voilà quatres années de thèse qui s'achèvent et il est temps de faire le bilan, un bilan aussi bien professionnel qu'humain. Une thèse représente, certes, quatres années de travail de recherche mais aussi un travail d'équipe et de collaboration contribuant à la réussite de ce travail. Cette étape finale de rédaction qui clôt le chapitre entrepris 4 ans auparavant pourrait paraître de loin la plus facile. Mais Non ! C'est quand il s'agit de mettre sur papier ses remerciements qu'on se rend compte de toute la difficulté que cela représente.

Je tiens tout d'abord à remercier le **Prof. Françoise Pons** et le **Dr Bertrand Dubois** de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs pour l'évaluation de ce travail de thèse. Je tiens également à remercier les **Prof. Marcel Bonay**, **Stefan F. Martin** et **Oliver Nüsse** d'avoir acceptés de juger mon travail en faisant partie de mon jury de thèse.

Mes profonds et sincères remerciements vont à ma trèse chère directrice de thèse le **Prof. Saadia Kerdine-Römer**. Quoi te dire ma Saadia ? Le mot MERCI ne suffit pas pour exprimer toute la reconnaissance et la gratitude que j'ai envers toi, pour tout ce que tu as fait et tu fais pour moi ! Merci de m'avoir guidée depuis mon arrivée en Master 2. Merci de m'avoir formée et initiée au monde de la cellule dendritique. Merci pour ton appui, tes conseils et tes encouragements qui m'ont été précieux pour la réalisation de ce travail. Merci pour ta confiance, ton optimisme, ta bonne humeur, ton affection si maternelle, ton enthousiasme et ta motivation qui m'ont toujours impressionnée. Merci d'avoir toujours trouvé du temps pour moi malgré ton temps hyper chargé. Merci, parfois, pour ton exigence qui m'a poussée à être plus curieuse scientifiquement. Merci de m'avoir appris la rigueur, la précision et les mots français que je ne connaissais pas. Merci pour TOUS les moments passés et partagés ensemble. Merci pour nos discussions scientifiques et non scientifiques au moment des repas. Merci de partager avec moi les moments les plus difficiles de cette année sur le niveau personnel et professionnel, et surtout de m'avoir soutenue, cela m'a profondément touchée. Merci pour tout le temps et les weekends consacrés à 'moi', pour toutes les corrections de ma thèse. Je sais que ce n'était pas facile pour nous deux la période de la rédaction mais nous avons réussi ensemble d'être dans les temps pour finir ! Et, je n'oublie pas de te remercier pour la table que tu m'as prêtée sans laquelle j'aurais eu du mal à rédiger … ma thèse ! Bref, MERCI pour TOUT ! Je tiens également à te dire que je suis contente de rester avec toi encore pour un petit moment après ma thèse pour avancer sur notre intérêt commun "Nrf2". Grâce à

toi, je sors de cette thèse plus mûre et plus autonome. Enfin, le reste, tu le sais et c'est entre nous !

Je remercie également le **Prof. Marc Pallardy** de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche. Merci pour la confiance que tu m'as accordée même avant mon arrivée en France. Je tiens également à te remercier chaleureusement pour ta visite chez nous au Liban qui a été si précieuse pour ma famille et moi au moment le plus difficile. Merci encore !

Merci à **Rafah**, ma chère amie libanaise, qui a partagé avec moi, depuis le début de ma thèse, les pires et les meilleurs moments tout au long de ces quatre ans. Merci pour tes encouragements et tes conseils. Merci d'être toujours là pour m'écouter et me soutenir. C'est un peu grâce à toi que j'ai commencé à grandir et mûrir à partir de ma 2ème année de thèse. Bon courage pour la fin de ta thèse, tu tiens le bon bout. Nous avons commencé ensemble notre chemin et nous le finirons ensemble au même moment !

Un grand merci à mon amie le **Dr Diane Antonios-Gholam**, qui malgré la distance qui nous sépare, pense toujours à moi. Merci pour tes petits textos de temps en temps, tes encouragements et ton soutien.

Merci au **Prof. Hayat Azouri-Tannous**, qui grâce à elle, j'ai pu rencontrer Marc à Beyrouth au cours de mon Master 1 au Liban. Merci pour ta confiance, tes encouragements et ton soutien.

Merci à **Marie-Éliane Azouri (MEA)**, ma compatriote et voisine de bureau, merci d'être là pour m'écouter, me soutenir et m'encourager. Je te souhaite la bonne continuation et le bon courage pour la suite de ta thèse.

Soumaya Karaki, ma deuxième copine libanaise, merci pour tes encouragements et ton soutien tout au long de la rédaction de ma thèse. Je te souhaite la bonne continuation et la bonne chance pour la suite dans ta carrière en recherche.

Merci à **Lorena Barientos**, la jeune Docteur argentine qui vient de soutenir ! Merci pour ta présence au labo quand nous restions tard pour finir nos manips ou bien pour purifier les MoDC. Merci pour toutes les soirées et les discussions passées ensemble soit au McDonald, au japonais, à l'italien, au mexicain ou au libanais. Merci pour ta bonne humeur, ton calme, ta sympathie et ta bienveillance. Bonne chance dans ta nouvelle vie de jeune chercheur que tu

vas passer à l'Hôpital de la Pitié-Salpétrière à Paris. Merci pour les voyages et les beaux moments passés ensemble ! Nous recommencerons !

Je tiens à remercier le **Prof. Sylvie Chollet-Martin** pour son soutien et ses doux mots au moments les plus difficiles. Je n'oublierai jamais ta phase :"Tu es notre soleil de Châtenay" que tu m'avais dite à mon retour du Liban après le décès de ma petite sœur. Cela m'a profondément touchée. Merci !

Merci à **Marie-Hélène Damiens** qui m'a initiée dès mon arrivée en Master 2 aux Western blots. Merci pour ton aide précieuse, ta disposition, ta bienveillance et ta bonne humeur. Merci pour tout ton temps passé à faire les génotypes des souris *nrf2*.

Merci à tous les doctorants, **Marie de Bourayne**, **Maire-Alix Espinasse**, **Romain Génard** et **Yann Gallais**. Je vous souhaite le bon courage pour vos thèses respectifs! **Marie**, c'était une grande expérience pour moi de te former pendant ton Master 2, de t'initier sur les THP1 et les MoDC et de te transmettre les différentes techniques en biochimie que je connaissais surtout la Co-IP. Je te souhaite le bon courage pour la suite de ta thèse, ne lâche pas, tiens jusqu'au bout et surtout il faut y croire ! J'espère que tu m'inviteras à ta thèse et je ferai de mon mieux pour être présente avec toi, pour te soutenir ce jour-là. **Marie-Alix**, bon courage pour la fin de ta thèse, tu tiens le bon bout, c'est ta dernière ligne droite. C'est toi la prochaine, bonne chance ! **Romain**, je te souhaite plein de résultats sur les souris *nrf2*. C'était un plaisir de t'encadrer au cours de ton M2 et de t'initier sur les BMDC. Après mon départ, je te confie la lignée Nrf2. Prends bien soin de nos souris *nrf2*, ce sont notre trésor avec Saadia ! **Yann**, bonne continuation aussi pour la suite de ta thèse.

Une petite pensée à **Camille Migdal** ! Merci d'avoir partagé avec moi notre bureau. Merci pour les discussions scientifiques ensemble autour de Nrf2. Ce fut un plaisir de t'avoir parmi nous à ma soutenance. Bonne chance dans ton stage post-doctoral.

Merci à **Claudine Déloménie** de m'avoir formée à la PCR quantitiative. Merci pour tout le temps passé toute seule ou avec Saadia pour l'analyse des résultats du PCR array. C'est vrai que ce fut un long travail mais fructueux.

Merci à tout le personnel de l'animalerie tout particulièrment **Valérie Domergue-Dupont**, **Pauline Robert** et récemment **Ayma Galland**, d'avoir si bien gérées l'élevage de nos

souris Nrf2 qui n'était pas facile au départ. Merci pour tout votre temps consacré à couper les queues de souris pour rester à jour dans le cahier Nrf2.

Merci au Dr **Armelle Biola-Vidamment** pour sa gentillesse et sa compréhension de me laisser monter plus tôt des TP pour continuer ma rédaction de thèse. C'était un plaisir de faire les TP de Toxicologie, en tant qu'ATER, avec toi cette année et l'année dernière.

Merci à tous les membres de l'équipe 2 de l'UMR-996 que j'ai côtoyés au cours de ma thèse. Merci à **Muriel Berthault**, **Isabelle Boristhènes**, **Luc de Chaisemartin**, **Aude Glaizes**, **Roseline Gorges, Vanessa Granger, Natacha Kerzerho-Szely, Viviana Marin-Esteban, Benoît Noël, Isabelle Turbica, Catherine Sandré** pour leur sympathie, leur bonne humeur et leur bienveillance.

Merci à tous les autres membres de l'UMR-996 présents à Clamart. Je remercie particulièrement **Patrice Hémon** pour toutes les manips de marquages d'immunohistochimie effectuées sur les oreilles des souris. Merci pour ta disponibilité et ton aide.

Sans nos collaborations ce travail n'aurait pas pu être complet. C'est pourquoi, je remercie tous les collaborateurs qui ont participé à ce travail :

Un grand merci au **CitoxLab** pour leur collaboration et leur aide pour la réalisation de tous les tests du Local Lymph Node Assay (LLNA). Je tiens tout particulièrement à remercier **Cédric Gerbeix** pour sa disponibilité et sa gentillesse. Je remercie également **Roy Forster** et **Nick Pearson** pour leur confiance en notre projet.

Une chaleureuse pensée à nos collaborateurs Allemands, le Prof. **Stefan F. Martin**, le Dr **Philipp R. Esser** et le Dr **Andréa Haase**.

Merci à **Philipp** de m'avoir appris comment faire des Mouse Ear Swelling Test (MEST). Merci pour ta disponibilité et ta rapidité pour répondre à mes questions techniques. Un grand merci à **Stefan** de nous avoir montré avec Saadia au cours de notre visite à Freiburg en Allemagne comment récupérer les ganglions lymphatiques et comment injecter des cellules dans les oreilles des souris. Merci de nous avoir appris ces précieuses techniques. Je le remercie également pour l'agréable séjour passé à Freibug en 2011. Je tiens aussi à remercier **Andréa** pour sa gentillesse, sa disponibiilité, son efficacité et sa rapidité à me répondre quand j'avais besoin de son aide. Je la remercie également pour sa collaboration avec nous. J'espère que cette collaboration se concrétisera prochainement par la soumission du papier.

Merci au **Prof. Marcel Bonay** et à **Thérèse Deramaudt** pour votre gentillesse. Marcel, merci de m'avoir donné la chance de signer avec toi notre premier papier. Thérèse, merci pour ton aide pour faire les CO-IP.

Je remercie aussi nos collaborateurs en Pharmacologie le **Prof. Alain Gardier**, le **Dr Denis David** et **Indira David**. **Indira** et **Denis,** merci pour votre gentillesse, votre enthousisamse, votre optimisme qui m'ont impressionnées et félicitations pour votre petit Bryan qui vient de naître. Merci à **Alain** pour les discussions et les repas partagés ensemble avec Saadia au resto universitaire. Merci à vous 3 de m'avoir donné la chance de travailler et de signer avec vous un premier papier. C'était un grand plaisir !

Merci au Dr **Christophe Lemaire** pour ses conseils scientifiques et son aide technique concernant l'apoptose.

Je n'oublie pas non plus mes anciens collègues de l'UMR-749. Un grand merci à **Joël Raingeaud** pour sa bonne humeur, sa gentillesse, ses discussions et ses commentaires au quotidien qui me faisaient plaisir. Merci pour nos escapades de détente à la piscine avec Saadia sur le temps du midi. Merci à **Aurélie Siret**, **Virginie Hivert et Lyne Valentino** pour nos soirées en dehors du labo, pour votre bonne humeur et votre soutien.

Merci au Dr Paul Telolahy et à Catherine le Callonec, mes collègues de TP, pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Un grand MERCI à la petite famille **Römer** pour votre compréhension concernant les weekends et les soirées consacrés par Saadia à corriger ma thèse au lieu de les passer avec vous. Merci à **Sarah-Maria**, ma petite Saradou, pour sa gentillesse et sa douceur. Merci à **Sascha**, mon petit Saschou, pour son affection et sa tendresse. Merci à **Michael** pour tous les bons moments. Merci Mischa d'avoir initié Saadia à Dropbox et qui me l'a ensuite transmis. Cela a rendu notre vie professionnelle plus facile ! Merci aussi de me considérer un membre de votre adorable petite famille ! Merci pour tout !

Merci à mes amis en France et au Liban qui m'ont toujours soutenue. Je tiens particulièrement à remercier ma meilleure amie **Adila Al Soufi** (Didi) qui m'a toujours écoutée, soutenue, encouragée et surtout qui a toujours su me faire rire aux moments les plus difficiles pendant mes pleurs !

Merci à mes amis **Rima Hassan-Mallat** et **Amjad Mallat** pour leur soutien pendant la rédaction de ma thèse. Merci pour leurs conseils pendant tout mon séjour en France.

Enfin, je remercie chaleureusement ma famille, ma maman, **Salwa**, mon papa, **Abdel Kader**, ma sœur, **Samar**, et mon frère, **Ayman**, qui ont toujours eu confiance en moi, m'ont toujours soutenue et encouragée. C'est grâce à vous que j'ai pu en arriver jusque là !

Une chaleureuse et affectueuse pensée va à ma petite sœur, **Imane**, qui nous a malheureusement quittés cette année. Je regrette beaucoup que tu ne sois pas entre nous aujourd'hui mais sois sûre que ta belle image restera toujours dans mon cœur comme tu l'as souhaitée ! Tu me manques beaucoup Imano ! Que ton âme repose en paix ma chère !

Merci à tous ceux qui m'ont soutenue de près ou de loin et que j'ai oubliés de citer.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS **5**

SOMMAIRE **13**

LISTE DES FIGURES **16**

LISTE DES TABLEAUX **18**

LISTE DES ABRÉVIATIONS **19**

AVANT-PROPOS **23**

INTRODUCTION **27**

PARTIE I : IMMINUTÉ CUTANÉE **27**

1. LA PEAU 29
   - *1.1. L'épiderme* *29*
   - *1.2. Le derme* *31*
   - *1.3. L'hypoderme* *32*
2. LES CELLULES DENDRITIQUES 32
   - *2.1. La diversité des cellules dendritiques* *33*
   - *2.2. Les cellules dendritiques cutanées* *35*
     - *2.2.1. Les cellules de Langerhans* *35*
     - *2.2.2. Les cellules dendritiques dermales* *37*
     - *2.2.3. Les cellules dendritiques inflammatoires de la peau* *38*
       - ♦ *Les cellules dendritiques inflammatoires épidermales* *39*
       - ♦ *Les cellules dendritiques productrices de TNF-α et d'iNOS* *40*
       - ♦ *Les cellules dendritiques exprimant le 6-sulfo LacNac* *41*
       - ♦ *Les cellules dendritiques plasmacytoïdes* *42*
   - *2.3. Les cellules dendritiques tolérogènes* *42*
   - *2.4. Le rôle des cellules dendritiques dans l'immunité cutanée* *44*
     - *2.4.1. La reconnaissance des signaux de danger* *44*
       - ♦ *Les récepteurs toll-like* *45*
       - ♦ *Les récepteurs de la famille des lectines de type C* *45*
       - ♦ *Les récepteurs NOD-like* *46*
     - *2.4.2. Apprêtement des antigènes par les DC* *49*
     - *2.4.3. La migration des cellules dendritiques vers les ganglions lymphatiques drainants* *51*
     - *2.4.4. Rôle des cellules dendritiques dans le contrôle de la réponse lymphocytaire* *52*
3. LES LYMPHOCYTES T CUTANÉS 54
   - *3.1. Les lymphocytes T γδ* *54*
   - *3.2. Les Lymphocytes T mémoires* *55*
   - *3.3. Les Lymphocytes T régulateurs* *56*
4. LES AUTRES CELLULES DE L'IMMUNITÉ CUTANÉE 57
   - *4.1. Les kératinocytes* *57*
   - *4.2. Les mastocytes* *59*

PARTIE II : L'ECZÉMA DE CONTACT **61**

1. ECZÉMA ALLERGIQUE DE CONTACT OU HYPERSENSIBILITÉ CUTANÉE 63
   - *1.1. Les manifestations cliniques et histologiques de l'eczéma allergique de contact* *63*
   - *1.2. Le diagnostic et les tests utilisés* *67*

1.2.1. Le diagnostic ... 67
1.2.2. Les tests ... 68
1.3. Le traitement ... 70
2. LES MOLÉCULES CHIMIQUES ALLERGISANTES ... 70
2.1. Caractéristiques physico-chimiques des molécules chimiques allergisantes ... 70
2.1.1. Les liaisons covalentes ... 71
2.1.2. Les liaisons de coordination ... 72
2.2. Les différents types d'haptènes ... 73
2.2.1. Les haptènes vrais ... 73
2.2.2. Les pro-haptènes ... 74
2.2.3. Les pré-haptènes ... 74
2.3. Pénétration des haptènes à travers la peau ... 75
3. LES MÉCANISMES CELLULAIRES DE L'ECZÉMA ALLERGIQUE DE CONTACT ... 77
3.1. La phase de sensibilisation de l'eczéma allergique de contact ... 78
3.1.1. Rôle des cellules dendritiques ... 78
♦ *Activation des cellules dendritiques* ... 78
♦ *Migration des cellules dendritiques* ... 80
3.1.2. Rôle des kératinocytes dans la réaction d'hypersensibilité cutanée ... 83
3.1.3. Rôle des mastocytes dans la réaction d'hypersensibilité cutanée ... 84
3.1.4. Rôle des lymphocytes B et du complément ... 85
3.1.5. Activation des LT naïfs spécifiques des haptènes par les DC ... 86
♦ *L'interaction entre le TCR et le complexe CMH/peptide hapténisé* ... 86
♦ *Les molécules de co-stimulation* ... 88
♦ *La sécrétion des cytokines par la DC* ... 89
♦ *La génération des lymphocytes T effecteurs* ... 89
♦ *La génération des lymphocytes T mémoires* ... 90
3.1.6. La phase précoce d'élicitation ... 92
♦ *Le rôle du complément et des polynucléaires neutrophiles* ... 92
♦ *Le rôle des cellules 'natural killer'* ... 93
♦ *Le rôle des lymphocytes T* ... 94
3.1.7. La phase tardive de l'élicitation ... 95
♦ *Le rôle des kératinocytes* ... 95
♦ *Le rôle des lymphocytes T* ... 96
3.2. La régulation de la réponse inflammatoire ... 96
3.2.1. Le rôle des lymphocytes régulateurs ... 97
♦ *Les lymphocytes T régulateurs conventionnels* ... 97
♦ *Les lymphocytes T régulateurs non conventionnels* ... 100
♦ *Les lymphocytes B* ... 102
3.2.2. Le rôle des cellules dendritiques tolérogènes ... 102

PARTIE III : LA VOIE NRF2/KEAP1 ... 103

1. LES ESPÈCES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE ET LE STRESS OXYDANT ... 105
2. LA VOIE NRF2/KEAP1 ... 108
2.1. Le facteur de transcription Nrf2 et sa structure ... 108
2.2. La régulation de la réponse antioxydante par Nrf2 via ses éléments de réponse antioxidante "ARE" ... 110
2.3. Keap1 : le senseur naturel de Nrf2 ... 111
2.3.1. La structure de Keap1 ... 111
2.3.2. Le mécanisme d'interaction entre Keap1 et Nrf2 ... 113
2.4. Le mécanisme moléculaire de régulation de la voie Nrf2/Keap1 ... 113
2.4.1. Le mécanisme d'activation du complexe Nrf2/Keap1 ... 113
2.4.2. Les gènes régulés par Nrf2 ... 115
♦ *Les enzymes de l'équilibre redox* ... 116

♦ *Les enzymes de détoxication de phase II* *120*
♦ *Les autres protéines régulées par Nrf2* *122*
2.4.3. Les molécules chimiques modulatrices de Nrf2 ..... *126*
♦ *Les activateurs de Nrf2* *126*
♦ *Les inhibiteurs de Nrf2* *134*
2.5. Les autres membres de la famille Nrf2 ..... *136*
2.6. Les modifications post-traductionnelles du complexe Nrf2/Keap1 ..... *138*
2.6.1. La phosphorylation de Nrf2 ..... *138*
2.6.2. L'acétylation et la désacétylation de Nrf2 ..... *140*
2.6.3. Ubiquitination et phosphorylation du senseur naturel de Nrf2 ..... *141*
2.7. La régulation indirecte de la voie Nrf2/Keap1 ..... *142*
2.7.1. Les protéines partenaires de Keap1 ..... *142*
♦ *La prothymorsine alpha* *142*
♦ *La kayryophérine α6* *143*
♦ *L'IKKβ* *143*
♦ *La sous-unité p65 du facteur de transcription NF-κB* *144*
♦ *La phosphoglycérate mutase 5, Bcl-xl et Bcl-2* *145*
♦ *La protéine de choc thermique Hsp90* *146*
♦ *La protéine p62* *146*
2.7.2. Les protéines partenaires de Nrf2 ..... *147*
♦ *La protéine P21* *147*
♦ *La cavéoline-1* *148*
♦ *La protéine DJ-1* *149*
3. LE RÔLE FONCTIONNEL DE NRF2 150
3.1. Le rôle de Nrf2 dans la fonction cellulaire *150*
3.1.1. Mécanisme de survie *150*
3.1.2. Mécanisme de mort cellulaire par autophagie *153*
3.2. Le rôle de Nrf2 dans le contrôle de la réponse inflammatoire *154*

PRESENTATION DU TRAVAIL 159

ARTICLE 1 165

ARTICLE 2 179

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES 219

DISCUSSION 239

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 247

BIBLIOGRAPHIE 253

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES 281

ANNEXES 287

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : STRUCTURE DE LA PEAU 29
FIGURE 2 : LES DIFFERENTES COUCHES ET CELLULES DE L'EPIDERME 30
FIGURE 3 : ORIGINE DES CELLULES DENDRITIQUES 33
FIGURE 4 : LES DIFFERENTES SOUS-POPULATIONS DE DC HUMAINES ET MURINES 34
FIGURE 5 : LE RENOUVELLEMENT DES CELLULES DE LANGERHANS 35
FIGURE 6 : ACTIVATION DE LA VOIE NF□B PAR LES PROTEINES NOD1/NOD2 OU LES TLR 47
FIGURE 7 : ACTIVATION DE L'INFLAMMASOME NLRP3 PAR LES SIGNAUX DE DANGER 48
FIGURE 8 : REPRESENTATION DE CERTAINS INFLAMMASOMES ET DE LEURS ACTIVATEURS BACTERIENS OU VIRAUX 49
FIGURE 9 : PRESENTATION DES ANTIGENES PAR LES DC 50
FIGURE 10 : LES VOIES INTRACELLULAIRES DE LA PRESENTATION CROISEE DANS LES CELLULES DENDRITIQUES 51
FIGURE 11 : LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE 52
FIGURE 12 : LES DIFFERENTES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES T 53
FIGURE 13 : LES LYMPHOCYTES T MEMOIRES DANS LA PEAU MURINE 56
FIGURE 14 : LES CELLULES DENDRITIQUES ET LYMPHOCYTES T CUTANES MURINS 57
FIGURE 15 : LES MEDIATEURS SECRETES PAR LES KC ACTIVANT LA REPONSE IMMUNITAIRE 58
FIGURE 16 : ACTIVATION D'UN MASTOCYTE PAR UN ALLERGENE 60
FIGURE 17 : HISTOPATHOLOGIE DE L'ECZEMA ALLERGIQUE DE CONTACT 65
FIGURE 18 : TESTS EPICUTANES OU PATCH TESTS 69
FIGURE 19 : LES DIFFERENTES REACTIONS OBSERVEES SUITE A UN PATCH TEST 69
FIGURE 20 : LES LIAISONS COVALENTES 71
FIGURE 21 : LES PRINCIPAUX ACIDES AMINES NUCLEOPHILES SUSCEPTIBLES DE REAGIR AVEC LES HAPTENES 71
FIGURE 22 : EXEMPLES DE LIAISONS DE COORDINATION EFFECTUEES PAR LES METAUX 73
FIGURE 23 : LES DIFFERENTES CATEGORIES D'HAPTENES 73
FIGURE 24 : INTERACTION DU DNCB AVEC LES RESIDUS NUCLEOPHILE DES PROTEINES 73
FIGURE 25 : OXYDATION DE L'ALCOOL CINNAMIQUE EN ALDEHYDE CINNAMIQUE 74
FIGURE 26 : ADDITION D'UNE PROTEINE NUCLEOPHILE SUR UNE ORTHOQUINONE DERIVEE D'UN CATECHOL 74
FIGURE 27 : AUTO OXYDATION A L'AIR DU *D*-LIMONENE 75
FIGURE 28 : PRODUITS D'OXYDATION DE LA PARA-PHENYLENEDIAMINE 75
FIGURE 29 : VOIES DE PENETRATION EMPRUNTEES PAR LES MOLECULES EXOGENES POUR PENETRER DANS L'EPIDERME 76
FIGURE 30 : MECANISME CELLULAIRE DE L'ECZEMA DE CONTACT 78
FIGURE 31 : ACTIVATION DES CELLULES DENDRITIQUES PAR LES MOLECULES ALLERGISANTES (HAPTENES ET NICKEL) 79
FIGURE 32 : ROLE DES CYTOKINES ET CHIMIOKINES DANS LA MIGRATION DES DC 83
FIGURE 33 : INITIATION DE LA REPONSE D'HSC PAR L'ACTIVATION PRECOCE DES LB-1 PERITONEAUX 86
FIGURE 34 : REPRESENTATION DE LA RECONNAISSANCE HAPTENIQUE PAR LES LT 87
FIGURE 35 : EXPANSION ET PROLIFERATION DES LT CD8+ NAÏFS EN LT EFFECTEURS ET MEMOIRES APRES L'INTERACTION AVEC LA DC ACTIVEE PAR UN PATHOGENE 90
FIGURE 36 : LES PRINCIPAUX EVENEMENTS DE MIGRATION CELLULAIRE AU COURS DE L'HYPERSENSIBILITE CUTANEE INDUITE PAR UN HAPTENE ET MEDIEE PAR LES CELLULES NK 94
FIGURE 37 : ACTIVATION DES LT VERS LES TISSUS INFLAMMATOIRES AU COURS DE LA PHASE D'ELICITATION 95
FIGURE 38 : LES QUATRE ETAPES DE REDUCTION DE L'OXYGENE ET FORMATION DES INTERMEDIAIRES REDUITS 105
FIGURE 39 : LES DEUX REACTIONS DE TRANSFORMATION DE L'ANION SUPEROXYDE 105
FIGURE 40 : EXEMPLE D'OXYDATION REVERSIBLE PAR LE GSH ET/OU LA TRX 106
FIGURE 41 : REACTION DE REDUCTION DU PEROXYDE D'HYDROGENE EN EAU 107
FIGURE 42 : REDUCTION DE L'OXYGENE EN ANION SUPEROXYDE PAR LA NADPH OXYDASE 107
FIGURE 43 : STRUCTURE DE NRF2 110
FIGURE 44 : STRUCTURE DE KEAP1 112
FIGURE 45 : MODELE SPECULATIF D'INTERACTION ENTRE KEAP1 ET NRF2 112
FIGURE 46 : MECANISME D'ACTIVATION DE LA VOIE NRF2/KEAP1 114
FIGURE 47 : CONVERSION DU PEROXYDE D'HYDROGENE EN EAU PAR LA CATALASE 117

Figure 48 : Reduction du peroxyde d'hydrogene par le glutathion 117
Figure 49 : L'implication des GCL dans la synthese du GSH 118
Figure 50 : Reaction de reduction de l'heme par HO-1 119
Figure 51 : Oxydation du fer au cours de la reaction de Fenton 120
Figure 52 : La reaction de glucuronidation 121
Figure 53 : Reduction des quinones en hydroquinone par la NQO1 122
Figure 54 : Mecanisme des epoxydes hydrolases 124
Figure 55 : Reaction de l'addition de Michael entre les accepteurs de Michael et les groupements sulfhydriles (-SH) des cysteines de Keap1 127
Figure 56 : La structure chimique du curcumin 127
Figure 57 : Mecanisme d'addition de Michael entre CAPE et Keap1 128
Figure 58 : Interaction de Keap1 avec des fonctions quinones 129
Figure 59 : Mecanisme d'interaction du sulforaphane avec Keap1 129
Figure 60 : Phase precoce de phosphorylation de Nrf2 139
Figure 61 : Phase tardive de phosphorylation de Nrf2 140
Figure 62 : La voie Nrf2/Keap1 regulee par l'importine α7 143
Figure 63 : La regulation de la voie NF-kB par Keap1 144
Figure 64 : La regulation de Bcl-2 par Keap1 146
Figure 65 : La regulation de la voie Nrf2/Keap1 par p62 147
Figure 66 : La regulation de la voie Nrf2/Keap1 par p21 148
Figure 67 : La regulation de Nrf2 par DJ-1 150
Figure 68 : Nrf2 controle l'inflammation cutanee induite par le TNCB 222
Figure 69 : Les molecules d'isocyanates augmentent l'inflammation cutanee chez les souris *NRF2*$^{-/-}$ comparees aux souris *NRF2*$^{+/+}$.. 223
Figure 70 : Les molecules d'anhydrides induisent une inflammation cutanee chez les souris *NRF2*$^{-/-}$ comparees aux souris *NRF2*$^{+/+}$. 224
Figure 71 : Le $NiSO_4$ n'induit une HSC que chez les souris *NRF2*$^{-/-}$ 226
Figure 72 : Protocole experimental 227
Figure 73 : Les DC *NRF2*$^{+/+}$ controlent les reactions d'hypresensibilites cutanees en reponse au TNCB chez les souris *NRF2*$^{+/+}$ 230
Figure 74 : Les DC *NRF2*$^{+/+}$ controlent la reaction d'HSC en reponse au TNCB dans les souris *NRF2*$^{+/+}$ 232
Figure 75 : Les DC *NRF2*$^{-/-}$ generent une inflammation cutanee plus importante chez les souris *NRF2*$^{+/+}$ et *NRF2*$^{-/-}$ en reponse au TNCB 233
Figure 76 : Caracterisation du phenotype membranaire et cytokinique des DC *NRF2*$^{+/+}$ et *NRF2*$^{-/-}$ a l'etat basal.....234
Figure 77 : Expression basale des differents genes reprimes ou surexprimes dans les DC *NRF2*$^{-/-}$ comparees aux DC *NRF2*$^{+/+}$..... 234
Figure 78 : Caracterisation des Treg dans les souris *NRF2*$^{+/+}$ et *NRF2*$^{-/-}$..... 235
Figure 79 : Absence de recrutement de Treg chez les souris *NRF2*$^{+/+}$ ou *NRF2*$^{-/-}$ sensibilisees au CinA 75%. 236
Figure 80 : Absence de la reponse tolerogene chez les souris *NRF2*$^{-/-}$ pre-traitees par le DNTB contrairement aux souris *NRF2*$^{+/+}$. 237

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : PHENOTYPE DES LC CUTANEES MURINES ET HUMAINES 36
TABLEAU 2 : LES MARQUEURS PHENOTYPIQUES DES DC CUTANEES MURINES ET HUMAINES 38
TABLEAU 3 : LES MARQUEURS PHENOTYPIQUES DES DIFFERENTES DC INFLAMMATOIRES DE LA PEAU 39
TABLEAU 4 : LES DIFFERENTS LIGANDS DES TLR HUMAINS 45
TABLEAU 5 : LES DIFFERENTES LESIONS CUTANEES QUI PEUVENT ETRE OBSERVEES AU COURS D'UN ECZEMA DE CONTACT ALLERGIQUE 66
TABLEAU 6 : DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL ENTRE L'ECZEMA DE CONTACT ET LA DERMATITE IRRITATIVE 68
TABLEAU 7 : FONCTIONS CHIMIQUES ELECTROPHILES DES HAPTENES ET LES MECANISMES DE REACTIONS ASSOCIES EN PRESENCE D'UN NUCLEOPHILE (NU) 72
TABLEAU 8 : LES POPULATIONS DE LT MEMOIRES 91
TABLEAU 9 : PRINCIPALES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DES ERO ET ERA 106
TABLEAU 10 : LES GENES REGULES PAR NRF2 125
TABLEAU 11 : LES DIFFERENTS INDUCTEURS DES ARE ET DE LA VOIE NRF2 134
TABLEAU 12 : TABLEAU COMPARATIF ENTRE L'INDEX DE STIMULATION (IS) ET LE NIVEAU D'IRRITATION DES DIFFERENTES MOLECULES CHIMIQUES 225

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

a.a : acide aminé
Ac : anticorps
ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine diphosphate
Ag : Antigène
AKR : Aldo-kéto réductase
AMP : adénosine monophosphate
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
Antioxidant Response Element : ARE
AP-1 : activator protein-1
ARE : antioxydant response element
ATG7 : Autophagy-related protein 7
ATP : adénosine triphosphate
ATRA : Acide tout-trans-rétinoïque ou rétinoïne

B

BACH1 : BTB And CNC Homology 1
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
Bcl-xl : B-cell lymphoma-extra large
BDCA : Blood DC antigen
BHA *: ter*-butylhydroxyanisole
BM-DC : Cellules dendritiques murines issues des progéniteurs de la moelle osseuse
BPCO : Bronchopneumopathie chronique obstructive
Breg : LB régulateur
BTB : broad complex tramtrack and bric a brac
bZip : domaine leucine zipper

C

CAT : catalase
Cav-1 : Cavéoline-1
CCL : cys-cys chemokine ligand
CCR : cys-cys chemokine receptor
CD : cluster de differenciation
CD34-DC : Cellules dendritiques humaines issues à partir de précurseurs $CD34^+$
cDC : cellule dendritique conventionnelle
ChIP : Immunoprécipitation de la chromatine
CinA : cinnamaldéhyde
CK2 : caséine kinase 2
CLA : cutaneous lymphocyte antigen
Clec9A : C-type lectin molecule
CLR : Récepteur de la famille des lectines de type C
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CNC : cap n collar
CPA : cellule présentatrice d'antigène
CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte antigen-4
Cul3 : cullin-3-based E3 ubiquitin ligase
CXCL : chemokine (C-X-C motif) ligand
Cys : cystéine
CYP : Cytochrome

D

D3T : 1,2-dithiole-3-thione
DAMP : Damage-associated molecular pattern molecule
DC : Cellule dendritique
DC-SIGN : DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
DDC : Cellule dendritique dermale
DETC : Dendritic Epidermal T cells
DGR : Double glycine repeat/kelch
DJ-1 ou PARK7 : Parkinson protein 7
DNCB : 2,4-dinitrochlorobenzène
DNFB : Dinitrofluorobenzène
DNTB : Dinitrothiocyanobenzène
DTA : Sous-unité A de la toxine diphtérique
DTR : récepteur de la toxine diphtérique simienne

E

E. Coli : Escherichia Coli
EAC : Eczéma allergique de contact
ECF : Eosinophil chemotactic factor
ECH : Erythroïd cell-derived protein with CNC homology
EGCG : Epigallocatéchine-3-gallate
EGF : facteur de croissance épidermal ou epidermal growth factor
EH : Epoxyde hydrolase
EP : Ethyl pyruvate
EpCAM : Epithellial-cell adhesion molecule
ERA : Espèces réactives de l'azote
ERK : Extracellular signal-regulated kinase
ERO : Espèces réactives de l'oxygène

F

FITC : fluorescéine isothiocyanate
FLT3 : FMS-like tyrosine kinase 3
FoxP3 : Forkhead box P3

G

GCL : Glutamylcystéine ligase c
GM-CSF : Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GPx : glutathion peroxydase
GR : glutathion réductase
GSH : glutathion
GSK-3κ : glycogen synthase kinase 3κ
GST : Glutathion-S-transférase

H

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
H4R : Récepteur 4 de l'histamine
HA : acide hyaluronique
hBD : Bêta-défensine humaine
HDAC : Histone désacetylase
HETE : acide 12-hydroxyeicosatétraénoïque
His : Histidine
HMGB1 : High mobility group box 1 protein
$HO^{\bullet}$: radical hydroxyl
HO-1 : hème oxygénase 1
HSC : Hypersensibilité de contact
HSP : Heat Shock Protein ; protéine de choc thermique
HSPC : Cellules souches hématopoïétiques

I

IAB : N-iodoacetyl-N biotinylhexylenediamine
ICAM : Intercellular adhesion molecule
ICOS : Inducible costimulator
IDEC : Inflammatory dendritic epidermal cells ou cellules dendritiques épidermales inflammatoires
IFN-γ : Interféron-γ
Ig : Immunoglobuline
IGF-1 : Inulin growth factor-1
IκB : Inhibiteur de kappa B
IKK : IκB kinase
IL : Interleukine
ILT : Immunoglobulin-like transcript
Immunoglobuline : Ig
iNOS : Nitric oxyde synthase inductible
INrf2 : inhibiteur Nrf2 ou Keap1
IS : Index de stimulation
IVR : intervening region

J

JNK : c-jun N-terminal kinase

K

KC : Kératinocyte
kDa : kilodalton
Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1
KPNA6 : Kayryophérine α6

L

LB : Lymphocyte B
LC : Cellule de Langerhans
LDL : low density lipoprotein
LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen-1
LLNA : Local lymph node asssay
LPS : lipopolysaccharide
LT : lymphocyte T
LTh : Lymphocyte T auxiliaire
LTreg : Lymphocyte T régulateur
Lys : Lysine
LZT : Low Zone Tolerance

M

MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MARE : Maf Recognition Element
MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1
Mcpt5 : Protéase 5 des mastocytes ou mast cells protesase 5
M-CSF : macrophage colony stimulating factor
MDA : dialdéhyde malonique
mDC : Cellule dendritique myéloïde
MEST : Mouse ear swelling test
MIP-1α : Macrophage inflammatory protein-1α
MMP : matrix metalloproteinase
Mo-DC : Cellules dendritiques générées à partir des monocytes humains
MRP : Mutidrug resistance-associated protein

N

NAC : N-acétylcystéine
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCF : Neutrophil chemotactic factor
Necl2 : Nectin-like protein 2
Neh : Nrf2-ECH homology
NES : Nuclear Export Sequence
NF-E2 : Nuclear Factor Erythroid 2
NF-κB : Nuclear factor-kappa B
$NiSO_4$: Sulfate de nickel
NK : Natural killer
NLR : Récepteur NOD-like
NLS : Nuclear Localization Sequence
$NO^{\bullet}$: monoxyde d'azote radicalaire
NOD : Nucleotide-binding oligomerization domain
NOS : monoxyde d'azote synthase
NOX : NAD(P)H oxydase membranaire
NQO1 : NADPH quinone oxydoréductase
Nrf2 : Nuclear factor erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2

O

$O_2^{\bullet-}$: anion superoxide
$ONOO^-$: peroxynitrite

P

P2X7 : Récepteur prurinergique
PAM : Peptide anti-microbien
PAMP : Pathogen-associated molecular pattern
PCR : Polymerase chain reaction
PBS : Phosphate buffer saline
pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde
PERK : protein kinase RNA (PKR)-like endoplasmic reticulum (ER) kinase
PGAM5 : Phosphoglycérate mutase 5
PGE_2 : Prostaglandine E_2
PI3K : Phosphoinositide-3 kinase
PKC : Protéine kinase C
PM : Poids moléculaire
PN : Polynucléaire neutrophile
pPD : *para*-phénylènediamine
Prdx : peroxyrédoxine
Prostaglandine : PG

PRR : Pattern recognition receptor
PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1
PSM : Sous-unité 19S du protéasome
PTMα : Prothymorsine alpha

R

RANK : Receptor activator of NF-κB
RANTES : regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
Rbx1 : Ring box 1
RE : Reticulum endoplasmique
$RO^{\bullet}$: Radical alkoxyl
$RO_2^{\bullet}$: Radical peroxyde

S

SCF : Stem cell factor
Ser : Sérine
siRNA : small interfering RNA, ARN interférant
SlanDC : 6-sulpho LacNac DC
sMAF : small musculoaponeurotic fibrosacroma
SMX : Sulfaméthoxazole
SOD : Superoxyde dismutase
ssRNA : ARN simple brin

T

TAP : Transportor associated with antigen processing
tBHQ : tert-Butyl hydroquinone
t-BQ : ter-butylquinone
T_{CM} : LT à mémoire centrale
TCR : T cell receptor
T_{EM} : LT effecteurs mémoires
TGF-β : Transforming growth factor β
Th : réponse T helper
Thr : Thréonine
Tip-DC : TNF/iNOS producing dendritic cells DC productrices de TNF-α (tumor necrosis factor- α) et d'iNOS (inducible nitric oxide synthase
TLR : Récepteur Toll-like
TNBS : Acide trinitrobenzène sulfonique
TNCB : Trinitrochlorobenzène
TNF : Tumor necrosif factor
TNF-α : Tumor necrosis factor alpha
T_{RM} : LT résidentes mémoires
Trx : Thiorédoxine
TrxR **:** Trx réductase
TSLP : Thymic stromal lymphopoietin
Tyr : Tyrosine

U

UGT : Uridine diphospho (UDP)-glucuronosyltransférase
UV : Ultraviolet

V

VCAM : Vascular cell adhesion molecule
VLA-4 : Very late antigen-4

AVANT-PROPOS

Avant -propos

Les réactions allergiques telles que les réactions d'hypersensibilité de contact (HSC) sont un problème de santé publique. Elles sont classées au quatrième rang des maladies mondiales selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). L'incidence de ces réactions est estimée à 20% dans les pays industrialisés. Il s'agit d'une réaction inflammatoire aiguë qui survient suite à des expositions répétées d'une molécule allergisante avec la peau et dans laquelle les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle essentiel. Les composés chimiques responsables de HSC sont majoritairement des haptènes, molécules de faibles poids moléculaires, qui ne deviennent immunogènes qu'après association stable avec des protéines. L'HSC est composée de deux phases : une phase de sensibilisation et une phase d'élicitation. Lors du premier contact avec la peau, l'haptène est pris en charge par les DC épidermales, les cellules de Langerhans (LC), et les DC dermales qui vont migrer vers les ganglions lymphatiques *via* la lymphe pour induire une réponse lymphocyte T primaire spécifique de l'haptène.

Ces mêmes haptènes sont capables d'induire un stress chimique. Parmi les voies de détoxication en réponse aux xénobiotiques, la voie Nrf2 est une voie majeure connue pour jouer un rôle clef dans la défense anti-oxydante. Quand la cellule n'est pas soumise à un stress chimique ou un stress oxydant, une protéine senseur appelée Keap1 (Kelch-like ECH associated protein 1), séquestre Nrf2 dans le cytoplasme. En réponse au stress oxydant et aux molécules électrophiles, Keap1 libère Nrf2. Ce dernier transloque alors dans le noyau, se fixe sur des séquences consensus ARE (Antioxydant Responsive Element) et forme un complexe avec les facteurs de transcription de la famille Maf pour induire l'expression de gènes cibles *[la NAD(P)H:quinone réductase (nqo1), la hème oxygénase (ho-1), la glutathion péroxydase (gpx), la superoxyde dismutase (sod)*]. Cette voie Nrf2/Keap1 est une voie centrale pour la détection de composés électrophiles tant endogènes qu'exogènes par la cellule.

Les molécules allergisantes cutanées contrairement aux irritants induisent les expressions de gènes cibles de Nrf2, codant pour des enzymes anti-oxydantes, (*la nqo1 et l'ho-1*) et induisent l'accumulation de Nrf2 dans les DC humaines et les cellules de la lignée THP1. Natsch & Emter (2008) ont aussi montré que de nombreux composés chimiques connus pour être des molécules allergisantes cutanées sont capables d'activer la voie Nrf2.

L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle du facteur de transcription Nrf2 dans (1) le contrôle de la survie des DC en réponse aux molécules chimiques et (2) le contrôle des

réactions allergiques cutanées. Cette étude a été effectuée à l'aide d'un modèle murin de souris déficientes pour le gène codant pour *nrf2*.

INTRODUCTION

PARTIE I : IMMINUTÉ CUTANÉE

1. La peau

La peau constitue l'organe le plus lourd et le plus étendu du corps humain. Chez l'adulte, elle couvre plus ou moins 2 m^2 et pèse 4,5 à 5 kg, soit environ 16 % de la masse corporelle. Elle constitue un tissu de revêtement en continuité avec les muqueuses et une barrière physique contre l'environnement extérieur (McLafferty *et al.*, 2012).
La peau est composée de trois compartiments distincts : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (**Figure 1**).

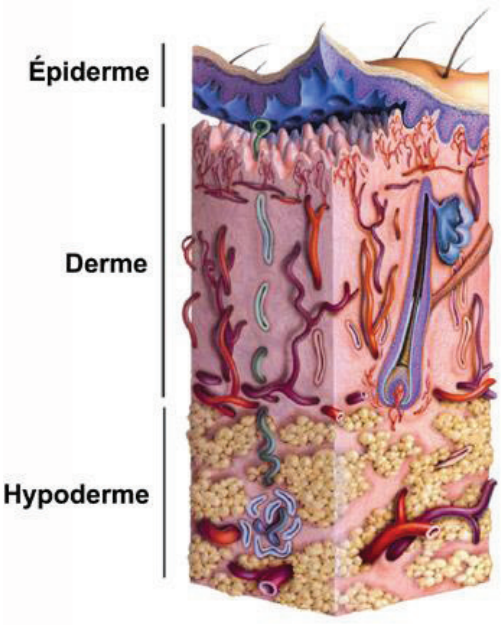


Figure 1 : Structure de la peau (Geras, 1990)

1.1. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium stratifié, squameux et kératinisé. Il constitue la partie supérieure de la peau qui est en contact direct avec l'extérieur. Il est composé de plusieurs couches superposées : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse, la couche claire et la couche cornée (**Figure 2**). L'épiderme assure une protection mécanique, chimique (sueur et sébum) et physiologique contre les agressions physiques telles que le soleil, agressions chimiques ou infectieuses.

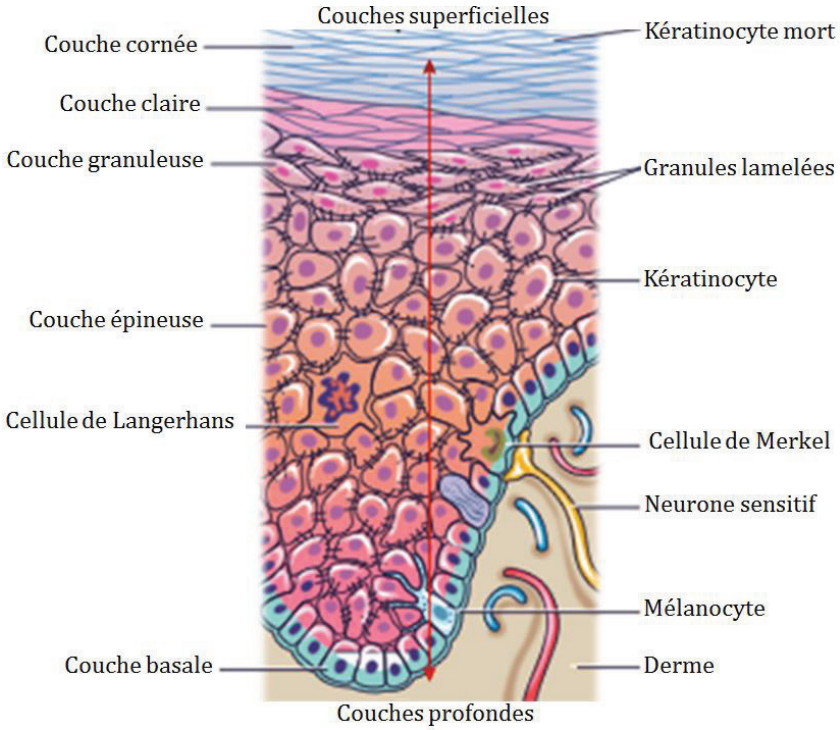


Figure 2 : Les différentes couches et cellules de l'épiderme [figure modifiée à partir (Tortora and Derrickson 2007)]

L'épiderme est constitué de 4 types cellulaires :

- ***Les kératinocytes***

Les kératinocytes (KC) constituent environ 90 % des cellules épidermiques. Ils prolifèrent au niveau de la couche basale puis se différencient en progressant vers la couche cornée. Ils s'aplatissent progressivement tout en synthétisant la kératine, une protéine qui protège la peau et les tissus sous-jacents contre la chaleur, les microorganismes et les agents chimiques (Tortora and Derrickson 2007). Au niveau de la couche cornée, les KC deviennent des cellules plates, sans noyau, les cornéocytes, attachés les uns aux autres par les cornéodesmosomes (Dreno, 2009). La cohésion et la souplesse de l'ensemble sont renforcées par une couche de lipides constituée de céramides, de cholestérol et d'acides gras. Les céramides constituent une classe de lipides qui assurent l'hydratation de la peau. Neuf céramides libres sont retrouvés dans la couche cornée dont les céramides A et les céramides B (Proksch *et al.*, 2008). Le cholestérol, constituant une classe majeure des lipides de la couche cornée, est synthétisé dans l'épiderme *in situ* à partir de l'acétate (Proksch *et al.*, 2008). L'épiderme contient aussi des acides gras libres ou liés à des triglycérides, des phospholipides et des glycosylcéramides (Proksch *et al.*, 2008). Les KC assurent la première ligne de défense grâce à

leur fonction de cohésion, de barrière et de protection. Ils participent à l'initiation et au développement des réactions inflammatoires cutanées.

- ***Les mélanocytes***

Les mélanocytes représentent environ 8% des cellules épidermiques. Ils sont responsables de la pigmentation de la peau. Les mélanocytes se trouvent dans les couches profondes de l'épiderme où ils synthétisent la mélanine. Grâce aux prolongements longs et minces des mélanocytes qui rentrent en contact avec les KC, la mélanine est transférée aux KC (Tortora and derrickson 2007). La mélanine ainsi absorbée s'accumule dans les KC et forme une barrière pigmentaire qui protège les cellules des rayonnements ultra- violets (UV) (McLafferty *et al.*, 2012).

- ***Les cellules de Langerhans***

Les cellules de Langerhans (LC) représentent 3 à 5 % des cellules épidermiques (Merad *et al.*, 2013). Elles appartiennent au groupe des cellules dendritiques (DC) et sont situées dans les couches basales et supra-basales de l'épiderme. Leur corps cellulaire, de forme étoilée, se prolonge par de longues dendrites qui leur permettent de capturer les corps étrangers qui auraient franchi la barrière cutanée. Leur fonction est de surveiller et d'alerter le système immunitaire lors de la pénétration de pathogènes (Dreno, 2009).

- ***Les cellules de Merkel***

Les cellules de Merkel sont les cellules les moins nombreuses de l'épiderme. Elles se situent dans la couche la plus profonde de l'épiderme (Tortora and derrickson 2007). Elles sont particulièrement abondantes dans les régions sensibles au toucher en contact avec une terminaison nerveuse telles que les lèvres, les paumes, la pulpe des doigts et la plante des pieds (Dreno, 2009).

1.2. Le derme

Le derme est la seconde couche de la peau qui est composé principalement de tissu conjonctif. Le derme comprend des fibres collagènes et élastiques, des vaisseaux sanguins, des nerfs, des glandes et des follicules pileux. Les fibres élastiques sont synthétisées par les fibroblastes (McLafferty *et al.*, 2012). Il est divisé en deux zones : la zone papillaire supérieure et la zone réticulaire la 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. L'association de fibres collagènes et de fibres élastiques dans le derme réticulaire confère à la peau sa résistance, son extensibilité et son élasticité (Tortora and derrickson 2007).

1.3. 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, les triglycérides. Cette couche hypodermique a essentiellement une fonction d'amortisseur des chocs contre la peau grâce à sa consistance en graisses. Elle joue également un rôle de protection contre le froid par isolation (Dreno, 2009).

2. Les cellules dendritiques

Les DC sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles jouant un rôle majeur tant dans l'immunité innée que dans l'immunité acquise ou adaptative. L'immunité innée permet de lutter de façon non spécifique contre tous les types de pathogènes et constitue la première ligne de défense (Iwasaki and Medzhitov, 2010). Quant à l'immunité acquise, elle vise à détruire spécifiquement l'agent infectieux (Iwasaki and Medzhitov, 2010). Les DC sont des cellules majeures qui assurent le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Steinman, 2006).

Les DC sont représentées dans deux états : un état dit immature et un autre dit mature. Les DC immatures ont la capacité de capturer un antigène (Ag) induisant leur maturation tandis que les DC matures ont la capacité unique de présenter l'Ag et d'activer les LT naïfs. Ces CPA dites professionnelles sont uniques dans l'initiation d'une réponse immunitaire primaire spécifique de l'Ag (Banchereau and Steinman, 1998).

Les DC proviennent des cellules souches hématopoïétiques issues de la moelle osseuse (Shortman and Naik, 2007) (**Figure 3**). Elles résident principalement dans les tissus périphériques et les organes lymphoïdes, et forment un réseau de cellules sentinelles notamment au sein des épithéliums muqueux (bouche, œsophage, poumon, vessie) et dans la peau (Liu *et al.*, 2007; Bangert *et al.*, 2011).

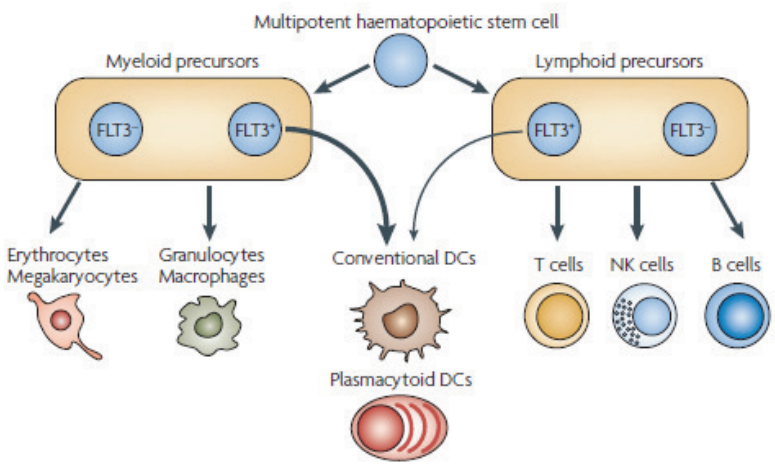


Figure 3 : Origine des cellules dendritiques (Shortman and Naik, 2007)

2.1. La diversité des cellules dendritiques

Les DC constituent un réseau remarquable de cellules assurant un lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ces DC sont issues d'un progéniteur commun de cellules souches hématopoïétiques. Elles peuvent être divisées en deux grandes catégories : les DC classiques ou conventionnelles (cDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC) (Merad et al., 2013).

Les cDC comprennent les DC résidentes dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires et les DC migratoires présentes dans les tissus périphériques. Chez la souris, les cDC résidentes dans les organes lymphoïdes comprennent deux sous-populations : les DC $CD8^+$ et les DC $CD11b^+$ (Merad et al., 2013).

Les DC $CD8^+$ constituent la majorité des cDC résidentes dans le thymus tandis qu'elles représentent 20 à 40% des cDC de la rate et des ganglions lymphatiques. Les cDC $CD8^+$ n'expriment que le marqueur membranaire CD8α contrairement aux LT $CD8^+$ qui expriment le CD8αβ. Les cDC $CD8^+$ expriment fortement le FMS-like tyrosine kinase 3 (Flt3) et prolifèrent en réponse au ligand Flt3L. Elles expriment également le CD205, récepteur de la lectine C 9A (Clec9A), et la langerine (Kiang et al.,1995, Merad 2013). Quant aux DC $CD11b^+$, elles n'expriment pas le marqueur CD8 et représentent les cDC prédominantes au niveau des tous organes lymphoïdes à l'exception du thymus (Merad et al., 2013). Comme pour les DC $CD8^+$, les DC $CD11b^+$ sont capables de proliférer en réponse au Flt3L (Waskow C 2008).

Par ailleurs, les DC migratoires constituent toutes les DC capables de migrer des tissus périphériques vers les ganglions lymphatiques. Dans cette partie, nous nous focalisons surtout sur les DC cutanées comprenant les cellules de Langerhans (LC) et les DC dermales (DDC).

Les LC épidermales sont caractérisées par l'expression de la Langerine (CD207) alors que les DDC retouvées dans le derme sont caractérisées par l'expression de DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin ou CD209) chez l'homme et par l'expression de CD11c chez la souris (Valladeau and Saeland, 2005; Guilliams *et al.*, 2010). Ces deux principales populations de DC se trouvent dans la peau à l'état d'homéostasie. Cependant, dans les conditions inflammatoires, des populations de DC non résidentes dans l'environnement cutané normal apparaissent dans la peau. Ces DC sont dites les DC inflammatoires.

La **Figure 4** montre les différentes sous-populations de DC chez la souris et leurs équivalents chez l'Homme.

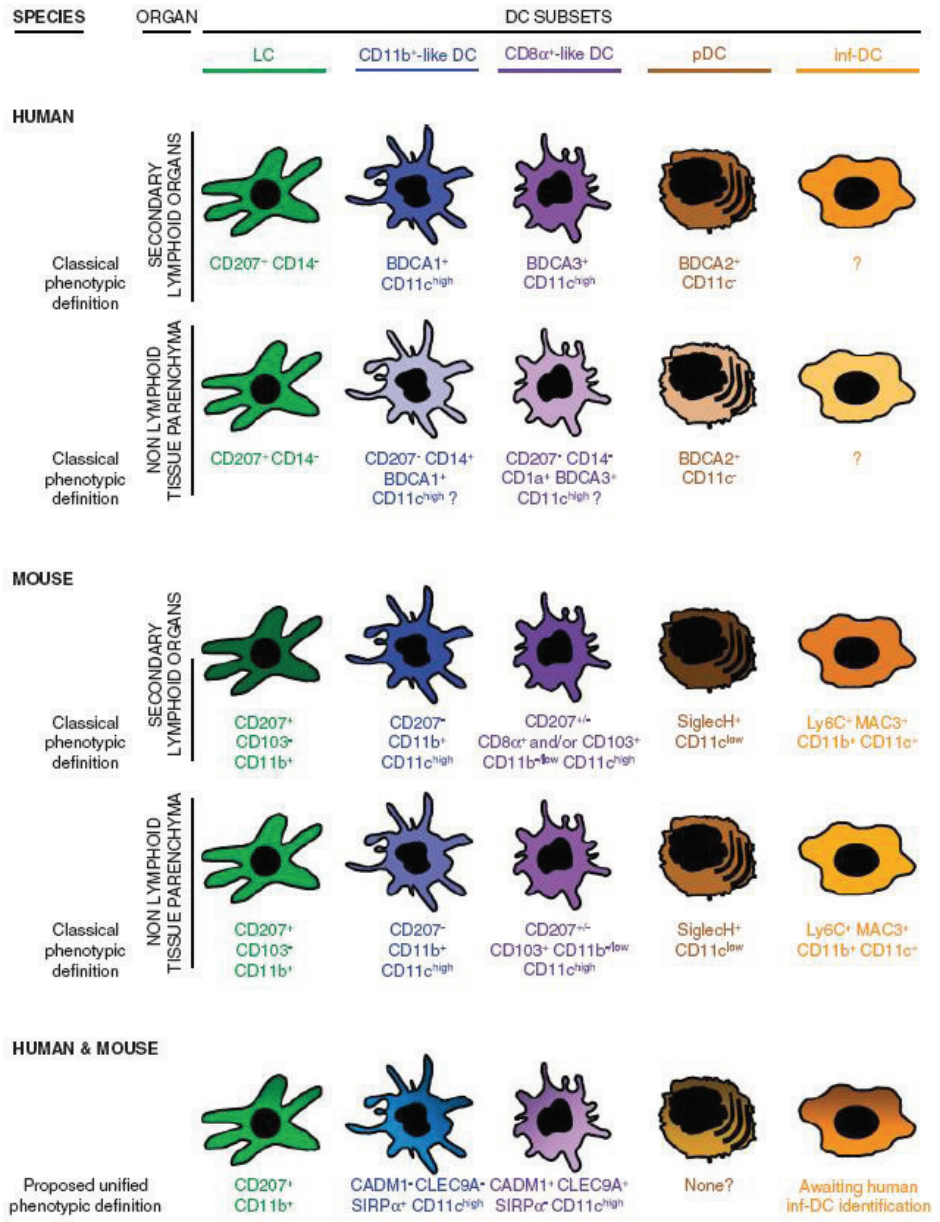


Figure 4: Les différentes sous-populations de DC humaines et murines (Guilliams *et al.*, 2010)

2.2. Les cellules dendritiques cutanées

2.2.1. Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans (LC) sont les premières DC décrites par Paul Langerhans en 1868. Ce sont les seules DC dans l'épiderme d'une peau saine (Chu *et al.*, 2011; Igyarto and Kaplan, 2012; Kaplan *et al.*, 2012). Elles représentent 3 à 5% des cellules épidermiques (Merad *et al.*, 2013). A l'état basal, ces cellules se renouvellent continuellement indépendamment des progéniteurs du sang ou de la moelle osseuse (Merad *et al.*, 2013). En effet, il a été montré par Merad *et al.,* que les LC sont capables de s'auto-renouveler en se différenciant à partir de précurseurs localisés dans l'épiderme (**Figure 5**). Ainsi, il a été observé chez la souris irradiée puis transplantée par des cellules de la moelle osseuse que les LC de l'hôte d'origine persistaient dans la peau pendant 18 mois. En revanche, toutes les autres DC des différents organes ont été totalement renouvelées à partir des cellules de la moelle osseuse transplantées. Par ailleurs, il a été montré que les LC déplétées par une exposition aux UV sont renouvelées à partir des monocytes d'origine sanguine (Merad *et al.*, 2002) (**Figure 5**).

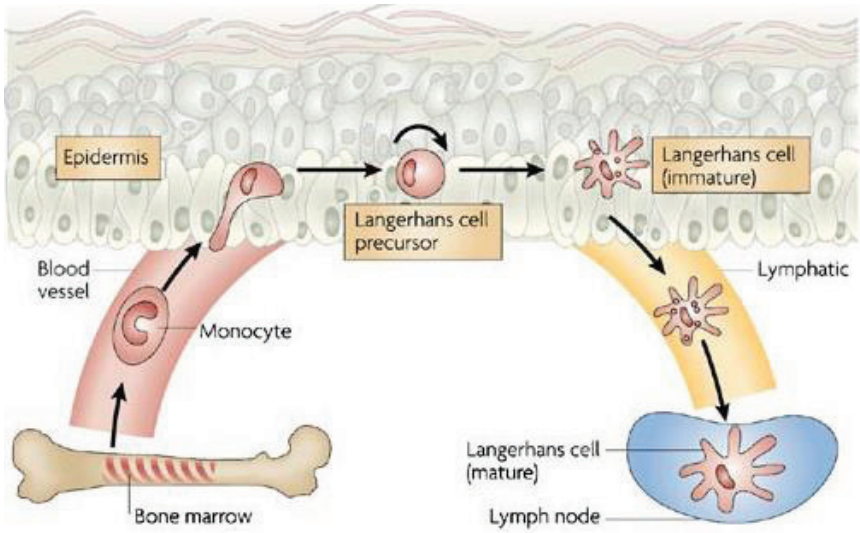


Figure 5 : Le renouvellement des cellules de langerhans (Shortman and Naik, 2007)

Les LC ont un phénotype caractérisé par l'expression de la langerine (CD207) et par la présence typique d'organelles cytoplasmiques appelés granules de Biberck. Ces granules sont constitués principalement de la langerine (Valladeau *et al.*, 2000). Elles expriment également le CD1a, le CD45 et les molécules d'adhésion telles que la molécule epithellial-cell adhesion molecule (EpCAM), la β1-intégrine et l'E-cadhérine (**Tableau 1**) (Valladeau and Saeland, 2005; Chu *et al.*, 2011; Gros and Novak, 2012).

	Peau	
LC / Marqueurs cellulaires	Souris	Humain
Langerine (CD207)	+++	+++
Granules de Birbeck	++	++
CD45	+	+
CMH class II	++	++
CD11c	+	+
CD205	++	-
CD11b	+	+ ou -
F4/80	+	ND
E-cadhérine	++	++
EpCAM	++	+
CD103	-	ND
CCR6	+	+
CCR7	-	-
CD1a	-	+++
CD1d	ND	-

Tableau 1 : Phénotype des LC cutanées murines et humaines [ND : non déterminé] (Merad *et al.*, 2008; Ainscough *et al.*, 2012)

A l'état basal, les LC sont situées dans les couches basales et suprabasales de l'épiderme où elles interagissent avec les KC *via* l'E-cadhérine. Borkowski *et al.,* ont montré que les souris déficientes pour le gène codant pour le *tgf-b (transforming growth factor b)* ne possèdent pas de LC dans leur épiderme indiquant ainsi le rôle important du facteur de croissance TGF-β dans la différenciation des LC (Borkowski *et al.*, 1996; Chu *et al.*, 2011). Les LC jouent un rôle crucial dans l'induction de la réponse immunitaire adaptative (Bangert *et al.*, 2011). Une fois activées par des allergènes, les LC sont alors capables de les capturer et d'enclencher le processus de maturation. C'est ainsi que les Ag du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)-I, CMH-II, les molécules de co-stimulation telles que le CD40, le CD80 et le CD86 et les récepteurs aux chimiokines tels que le CCR7 sont induits dans les DC. Ce processus est accompagné aussi d'une diminution de l'expression de l'E-cadhérine. Cette maturation permet aux LC de migrer vers les ganglions lymphatiques afin de présenter l'Ag aux LT naïfs

initiant ainsi une réponse immunitaire adaptative cutanée (Chu *et al.*, 2011; Igyarto and Kaplan, 2012; Kaplan *et al.*, 2012).

D'autres études montrent que les LC participent à la tolérance cutanée. Récemment Gomez de Aguero *et al.,* ont montré que les LC contrôlent la réponse inflammatoire d'origine allergique induite par une molécule chimique telle que le dinitrofluorobenzène (DNFB). Ainsi, les LC issues de souris ayant reçues une application cutanée d'une molécule chimique tolérogène telle que le dinitrothiocyanobenzène (DNTB) et transférées chez des souris receveuses protègent ces dernières contre l'allergie cutanée induite par le DNFB. Cette étude a permis ainsi de montrer que cette protection implique une absence de prolifération des LT $CD8^+$ appelée anergie et une activation des LT régulateurs (Treg) en réponse au DNTB (Gomez de Aguero *et al.*, 2012).

2.2.2. Les cellules dendritiques dermales

Les cellules dendritiques dermales (DDC) constituent une autre sous-population de DC résidentes dans la peau saine. Ces cellules sont capables d'activer le système immunitaire en présence d'un allergène. Les DDC se caractérisent surtout par l'expression de CD11c, CD45, CMH-II, la sous-unité A du facteur de coagulation XIII (FXIIIa). Contrairement aux LC, elles n'expriment pas de granules de Biberck (Bangert *et al.*, 2011) (**Tableau 2**). Deux populations de DDC ont été identifiées : les DDC langerine$^+$ connues aussi par les DDC $CD103^+$ chez la souris ou $CD141^{high}$ chez l'Homme (Haniffa *et al.*, 2012) et les DDC langerine$^-$ connues par les DDC classiques ou $CD11b^+$ chez la souris ou $CD14^-/CD1a^+$ chez l'Homme (**Tableau 2**).

Les DDC proviennent des progéniteurs de la moelle osseuse et se différencient en présence du ligand FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) (Ginhoux *et al.*, 2009). Les DDC langerine$^+$ représentent 3% de la population totale de DC, elles sont continuellement renouvellées par recrutement à partir du sang. Par ailleurs, les DDC langerine$^-$ représentent à peu près 80% de la population totale des DDC. Deux populations de DDC langerine$^-$ se distinguent par l'expression CD11b (Henri *et al.*, 2010).

Ces DDC [$CD103^+$, Langerine$^+$] sont capables de présenter *in vivo* les Ag par présentation croisée (cross-presentation), leur permettant ainsi de présenter les Ag exogènes aux LT $CD8^+$ *via* les molécules du CMH-I (Chu *et al.*, 2011; Igyarto and Kaplan, 2012; Kaplan *et al.*, 2012). Bedoui *et al.,* ont ainsi montré que les DC [$CD103^+$, Langerine$^+$], isolées à partir des ganglions de souris infectées par le virus *Herpes Simplex* (HSV), étaient les seules cellules capables d'induire la prolifération des LT $C8^+$ spécifiques du HSV (Bedoui *et al.*, 2009).

	Peau		
	Souris		Humain
Marqueurs cellulaires	**DC langerine$^+$ dermales**	**DC langerine$^-$ dermales**	**DC langerine$^-$ dermales**
Langerine (CD207)	++	-	-
Granules de Birbeck	-	-	-
CD45	+	+	+
CMH class II	++	++	++
CD11c	++	++	+
CD205	-	++	-
CD11b	faible	++	++
F4/80	-	+	ND
E-cadhérine	ND	ND	-
EpCAM	-	-	-
CD103	++	-	ND
CCR6	ND	-	-
CCR7	+++	+++	+++
CD1a	-	-	++
CD1d	ND	ND	+
CD141 (BDCA-3)	-	-	+++

Tableau 2 : Les marqueurs phénotypiques des DC cutanées murines et humaines (Merad *et al.*, 2008; Ainscough *et al.*, 2012), (ND : non déterminé)

Récemment, Hannifa *et al.,* ont pu identifier une nouvelle population de DC humaines dermales exprimant fortement le CD141 [ou Blood DC antigen (BDCA)-3)] (DC CD141^{high}). Ces DC CD141^{high} possèdent des homologies fonctionnelles aux DDC 103$^+$ murines. Elles sont capables de migrer vers les ganglions lymphatiques spontanément et suite à un *stimulus* inflammatoire. Elles sont capables de présenter les Ag *via* une présentation croisée aux LT (Haniffa *et al.*, 2012).

2.2.3. Les cellules dendritiques inflammatoires de la peau

Les DC inflammatoires correspondent à des DC recrutées en réponse à des *stimuli* microbiens ou inflammatoires. Elles disparaissent lorsque l'inflammation est résolue (Merad *et al.*, 2013). Elles peuvent être divisées en plusieurs sous-populations : les cellules dendritiques épidermales inflammatoires (IDEC), les DC productrices de TNF-α (tumor necrosis factor- α) et d'iNOS (inducible nitric oxide synthase) appelées Tip-DC, les 6-sulpho

LacNac DC (slanDC) et les DC plasmacytoides (pDC) (Bangert *et al.*, 2011; Gros and Novak, 2012).

Les IDEC, les TipDC et les slanDC proviennent des précurseurs myéloïdes et ressemblent phénotypiquement aux DC myéloïdes du sang périphérique (Bangert *et al.*, 2011). Les IDEC se retrouvent au niveau de l'épiderme alors que les TipDC et les slanDC se retrouvent au niveau du derme d'une peau enflammée (Zaba *et al.*, 2009). Par ailleurs, les pDC, d'origine lymphoïde, circulent du sang vers les zones T des organes lymphoïdes ou vers les tissus enflammés (Gros and Novak, 2012).

♦ Les cellules dendritiques inflammatoires épidermales

L'origine des cellules dendritiques inflammatoires épidermales (IDEC) n'est à ce jour pas connue. Les IDEC sont absentes dans l'épiderme d'une peau saine, elles apparaissent en réponse à un *stimulus* inflammatoire. Ces cellules ont été décrites pour la première fois en analysant des suspensions cellulaires des épidermes de patients atteints de dermatite atopique (Wollenberg *et al.*, 1996). Ainsi, Wollenberg *et al.,* ont montré que les différentes biopsies de peau issues de patients atteints de dermatite atopique, d'eczéma de contact, de psoriasis ou de lupus érythémateux présentent un nombre élevé de cellules inflammatoires cutanées telles que les IDEC et les pDC contrairement à la peau saine (Wollenberg *et al.*, 2002).

Les IDEC représentent une population de mDC recrutées au niveau des sites inflammatoires à partir de monocytes sanguins suite à un *stimulus* inflammatoire (Novak 2002, Gros et Novak 2012). Le **Tableau 3** montre les différents marqueurs cellulaires exprimés par les IDEC. Suite à leur activation, les IDEC induisent la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine (IL)-1, MIP-1α (macrophage inflammatory protein-1 α), l'IL-16 favorisant ainsi le recrutement des éosinophiles (Gros and Novak, 2012).

Type de DC	Marqueurs cellulaires
IDEC	CD1a, CD1b, CD11b, CD1c, CD11c, FcεRI, CD23, HLA-DR, CD206, CD36
TipDC	CD11c, CD11b, CD206, CD209
slanDC	CD11c, CD16 (FcγRIII), C5aR, CD45RA, Récepteurs de l'histamine (H1R, H2R, H4R)
pDC	BDCA-4 (neuropilin), BDCA-2 (CD303), CD4, CD123, immunoglobulin like transcript 7, DEC-205

Tableau 3 : les marqueurs phénotypiques des différentes DC inflammatoires de la peau (Chu *et al.*, 2011; Gros and Novak, 2012)

♦ Les cellules dendritiques productrices de TNF-α et d'iNOS

Les DC productrices de TNF-α et d'iNOS (Tip-DC) sont des DC inflammatoires qui ont été décrites pour la première fois au cours des infections bactériennes. Elles ont ainsi été retrouvées dans la rate au cours d'un modèle d'infection à la *Listeria monocytogenes* (Serbina et al., 2003) et dans l'intestin au cours d'une infection à l'*Escherichia Coli* (*E. Coli*) (Engel *et al.*, 2006).

Les Tip-DC sont aussi décrites dans le derme et l'épiderme d'une peau d'un sujet atteint de psoriasis (Lowes *et al.*, 2005). L'inflammation psoriasique induit une augmentation de 30 fois plus le nombre de DC exprimant le $CD11c^+$ dans le derme par rapport à une peau saine (Zaba *et al.*, 2009; Bangert *et al.*, 2011). Elles produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) d'où leur nom TNF-α and inducible nitric oxide synthase (iNOS) producing ou Tip-DC (Zaba *et al.*, 2009; Bangert *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2011). Ces cellules se différencient à partir des monocytes sanguins. Ainsi, une présence remarquable de cellules $CD11c^+$ exprimant à la fois l'iNOS et le TNF-α a été identifiée dans le derme et l'épiderme de la peau psoriasique. L'Efalizumab (Raptiva®) [anti-CD11a], utilisé en clinique dans le traitement du psoriasis, est montré pour diminuer le nombre de Tip-DC (Lowes *et al.*, 2005). Guttmann *et al.,* ont également identifié les Tip-DC comme cellules caractérisant la maladie de psoriasis. Par un marquage immunohistochimique et par une approche de PCR quantitative, ils ont ainsi pu montrer que l'expression d'iNOS est beaucoup plus faible dans les échantillons issus de donneurs ayant une dermatite atopique comparés à ceux issus de patients atteints du psoriasis (Guttman-Yassky *et al.*, 2007). Par ailleurs, Stary *et al.,* montrent que ces Tip-DC peuvent aussi être induites par un traitement topique d'imiquimod (Aldara®), un agoniste du récepteur toll-like (TLR) 7/8 utilisé dans le traitement du carcinome cellulaire basal et des verrues génitales (Stary *et al.*, 2007). En effet, les biopsies issues de patients atteints du carcinome cellulaire basal et traitées topiquement à l'imiquimod pendant 2 semaines montrent une infiltration importante de pDC et de mDC au niveau cutané (Stary *et al.*, 2007).

Toutes les études effectuées jusqu'à présents utilisaient des TipDC issues de biopsies de patients atteints de psoriasis. Cependant, Wilsmann-Theis *et al.,* viennent de proposer un nouveau protocole de différenciation *in vitro* de Tip-DC à partir des monocytes humains. Ce protocole consiste à mettre en culture les monocytes purifiés à partir du sang périphérique pendant 5 jours dans du milieu supplémenté de sérum humain et non de sérum de veau fœtal

en présence du GM-CSF et de l'IL-4. Ceci permet alors d'obtenir des TipDC CD1a$^-$ similaires phénotypiquement aux Tip-DC purifiées directement à partir du sang de patients atteints de psoriasis (Wilsmann-Theis *et al.*, 2013).

Les TipDC ont également été décrites au cours des infections bactériennes. Elles ont ainsi été retrouvées dans la rate au cours d'un modèle d'infection à la *Listeria monocytogenes* (Serbina et al., 2003) et dans l'intestin au cours d'une infection à l'*Escherichia Coli* (*E. Coli*) (Engel *et al.*, 2006).

♦ Les cellules dendritiques exprimant le 6-sulfo LacNac

Les 6-sulfo LacNac (slan) slanDC représentent 0,5% à 2% des cellules mononuclées du sang périphérique. Ces cellules sont considérées comme des précurseurs directs des DC dermales inflammatoires. Le 6-sulfo LacNac est une modification glucidique du ligand 1 de la glycoprotéine P séléctine (PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand-1) exprimée par la DC. Les slanDC sont caractérisées par la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α et l'IL-12 en réponse au lipopolysaccharide (LPS) (Schakel *et al.*, 2006). Le **Tableau 3** montre les différents marqueurs exprimés à la surface des slanDC. Ces cellules ont toujours été décrites comme étant des DC pro-inflammatoires présentes dans le sang et recrutées au site inflammatoire. Cependant, une étude récente montre que ces slanDC sont présentes uniquement au niveau du derme sain. Leur taux est doublé dans le derme d'une peau psoriasique (Gunther *et al.*, 2012). Le traitement par l'Etanercept (Enbrel®), de patients atteints de psoriasis, induit une diminution du nombre des slanDC dermales et des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α et l'IL-23. Cette diminution des slanDC dermales est associée à une augmentation des slanDC sanguines (Gunther *et al.*, 2013). Gschwandtner *et al.,* ont montré que les slanDC isolées de patients atteints de dermatite atopique, expriment fortement le récepteur 4 de l'histamine (H4R) en réponse à l'interféron-γ (IFN-γ), cytokine Th1, pouvant être retrouvées au cours des lésions chroniques de la dermatite atopique. La stimulation des slanDC *via* le récepteur H4R inhibe la production de cytokines inflammatoires telles que le TNF-α et l'IL-12 induites par le LPS *in vitro*. Ainsi, les agonistes du récepteurs H4R pourraient constituer un traitement potentiel de la dermatite atopique (Gschwandtner *et al.*, 2011).

Une nouvelle étude montre que les slanDC sont aussi retrouvées dans le derme des patients atteints de lupus érythémateux (Hansel *et al.*, 2013).

♦ Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les DC plasmacytoïdes (pDC) représentent 0,2% à 0,8% des cellules mononuclées du sang périphérique. A l'état basal, ces cellules sont présentes dans le sang et les organes lymphoïdes et absentes dans la peau. Au cours de pathologies inflammatoires (psoriasis, lupus érythémateux, dermatite atopique, éczéma de contact), ces pDC quittent le sang et migrent vers la peau (Conrad *et al.*, 2009). Ces DC se distinguent par leurs marqueurs cellulaires, BDCA-4 (neuropilin) et BDCA-2 (CD303) [**Tableau 3**]. Ces cellules jouent un rôle important dans l'immunité antivirale grâce à leur capacité à produire de l'IFN de type I tels que l'IFN-α et l'IFN-β en réponse à des ligands des TLR7 et TLR9. Les pDC rejoignent les organes lymphoïdes à partir du sang à travers les veinules endothéliales grâce à l'expression du CCR7 et de la L-sélectine (CD62L). La migration des pDC vers les tissus enflammés est liée à différents récepteurs de chimiokines tels que le ChemR23, le CXCR3 et le CXCR4 en réponse aux chimiokines inflammatoires correspondantes la Chemerin, le CXCL9, le CXCL10, le CXCL11 et le CXCL12. Les récepteurs CXCR3 et CXCR4 sont exprimés à la surface des pDC murines et humaines (Kaisho, 2012).

La forte présence des pDC dans la peau psoriasique est due à l'activation chronique des pDC par l'hypersécrétion des IFN de type I (IFN-α et l'IFN-β) (Nestle *et al.*, 2005). Lande *et al.,* ont montré que l'activation chronique de ces pDC est médiée par un peptide antimicrobien de cathélicidine humain, le LL-37. Ce dernier n'est pas présent dans la peau saine mais est produit par les KC en réponse à des infections ou des lésions cutanées. Le LL-37 se lie aux fragments d'ADN libérés par les cellules mourantes pour former un complexe LL-37/ADN. Ce complexe permet alors l'activation des pDC *via* ses TLR7 et TLR9 induisant ainsi la production d'IFN-α (Lande *et al.*, 2007).

Il a été également montré qu'une lésion cutanée induite par un ruban adhésif chez la souris entraîne un recrutement des pDC au niveau de la peau entre 24 h et 48 h. Ceci induit l'activation des pDC qui se traduit par une production d'IFN-α et β (Gregorio *et al.*, 2010).

2.3. Les cellules dendritiques tolérogènes

Bien que les DC soient connues pour initier une réponse immunitaire, une fonction régulatrice pour ces DC a été montrée. Les DC tolérogènes appelées aussi DC semi-matures sont des DC exprimant les molécules de co-stimulation mais incapables de produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β, IL-6, IL-12p40 ou le TNF-α (Saei and Hadjati, 2013; Svajger and Rozman, 2013). Le microenvironnement cellulaire joue un rôle crucial dans

la génération des DC tolérogènes. Ce microenvironnement comprend les interactions cellule-cellule, l'interation entre les DC et la flore microbiale et l'interaction entre les DC et les corps apoptotiques issues des cellules mourantes (Saei and Hadjati, 2013). Des études antérieures ont montré que des Ag protéiques tels que l'ovalbumine couplés à l'Ac monoclonal anti-DEC205 et injectés chez des souris naïves sont capables d'induire une tolérance (Bonifaz *et al.*, 2002). Ceci se traduit par une augmentation du nombre de Treg ($CD4^+CD25^+$) au niveau des ganglions et de la rate (Mahnke *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que les DC immatures sont sensibles à l'IL-10. Ainsi, la stimulation des DC par l'IL-10 induit un arrêt de prolifération des LT $CD4^+$ et $CD8^+$ (Muller *et al.*, 2002; Steinbrink *et al.*, 2002). Wakkash *et al.,* ont montré que les DC issues de souris transgéniques surexprimmant l'IL-10 présentent un phénotype immature (Wakkash et al., 2003). L'IL-10 et l'IFN-α induisent l'expression de l'ILT (immunoglobulin-like transcript)-3 et l'ILT4, des récepteurs de co-inhibition exprimés sur les DC, inhibant ainsi l'activation des LT. D'autres médiateurs tels que le TGF-β, l' l'indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) et l'acide rétinoïque sont décrits pour induire des Treg par les DC (Manavalan *et al.*, 2003).

Gregori *et al.,* ont pu identifier et caractériser une sous-population de DC tolérogènes humaines productrices d'IL-10 appelées DC-10 (Gregori et al., 2010). Cette population est caractérisée par l'expression de CD1a-, $CD1c^-$, $CD14^+$, $CD16^+$, $CD11c^+$, $CD11b^+$, $HLA\text{-}DR^+$et $CD83^+$. Elles expriment également les molécules de co-inhibition telles que l'ILT (immunoglobulin-like transcript)-2, l'ILT-3 et l'ILT-4 ainsi que les molécules de co-stimulation telles que CD40 et CD86. Ces DC sont capables d'induire des Treg produteurs d'IL-10 appelés Tr1 (Gregori *et al.*, 2010).

Il a été également montré que la vitamine D3 (1α,25dihydroxyvitamin D3) participe à la génération des DC tolérogènes. Ainsi, les DC traitées par la vitamine D3 présentent un phénotype immature et sont capables d'induire des Treg jouant un rôle dans la tolérance (Griffin *et al.*, 2001).

Les pDC exprimant IDO, le ligand d'ICOS (ICOSL) et/ou le programmed death 1 ligand (PD-L1) peuvent permettre la différenciation des LT naïfs enTreg (Gehrie *et al.*, 2011).

Ainsi, les DC tolérogènes constituent une population de DC jouant un rôle important dans la tolérance cutanée (Luckey *et al.*, 2011). Il été montré que l'exposition à des faibles concentrations d'une molécule allergisante telle que le DNFB induit des Treg

($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) producteurs d'IL-10 aboutissant à une réponse tolérogène (Luckey et al., 2012).

2.4. Le rôle des cellules dendritiques dans l'immunité cutanée

Les DC jouent le rôle de sentinelle du système immunitaire. Elles sont définies par leur capacité à **(1)** capturer et apprêter les Ag dans les tissus périphériques où elles résident, **(2)** migrer et transporter ces Ag de la périphérie vers les organes lymphoïdes secondaires et **(3)** présenter les Ag et stimuler les LT naïfs (Banchereau and Steinman, 1998).

2.4.1. La reconnaissance des signaux de danger

En 1994, Matzinger introduit la théorie du 'signal de danger'. Ce signal déterminera si la reconnaissance de l'Ag conduira à la tolérance ou à une réponse immunitaire effectrice (Matzinger, 1994). Pour initier une réponse immunitaire primaire complète, la DC a besoin de 'signaux de danger' endogènes ou exogènes. Ces 'signaux de danger' sont produits lors de dommages tissulaires, d'une réaction inflammatoire ou d'un stress ou bien d'une mort cellulaire par nécrose. Ainsi, la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α et IL-1β), la libération de protéases (métalloprotéases), de nucléotides intracellulaires (ATP, UTP), de protéines de choc thermique (HSP70) (Vabulas *et al.*, 2002) ou d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les cellules voisines des DC participent à la maturation complète des DC (Gallucci and Matzinger, 2001).

Via l'activation de récepteurs capables de reconnaître des motifs présents sur les pathogènes appelés PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) et des signaux dérivés de tissus ou cellules endommagés appelés DAMP (Danger Associated Molecule Patterns), les mécanismes de défense innée sont déclenchés (Matzinger, 2002). Les meilleurs exemples de ces PAMP sont le LPS des bactéries à Gram négatif et les peptidoglycanes des bactéries à Gram positif.

A l'état immature, les DC sont équipées de nombreux récepteurs capables de détecter les PAMP et les DAMP dans l'environnement, appelés les Patterns Recognition Receptors (PRR). Ces PRR peuvent être exprimés à la surface de la cellule ou être intracytoplasmiques. Parmi ces récepteurs PRR, trois familles sont décrites pour reconnaitre les PAMP : les récepteurs TLR, les récepteurs de la famille des lectines de type C (CLR) et les récepteurs à domaine intracytoplasmique d'oligomérisation de nucléotide [NLR ou NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain)-like receptors].

♦ Les récepteurs toll-like

Les récepteurs toll-like (TLR) sont exprimés sur un grand nombre de cellules dont les DC. A ce jour, dix TLR ont été identifiés chez l'Homme (TLR1 à TLR10) et 12 chez la souris (TLR1 à TLR9 puis de TLR11 à TLR13) (Ainscough *et al.*, 2012; Song and Lee, 2012). Ils peuvent être subdivisés en sous-familles, en fonction du type de ligands qu'ils reconnaissent ou en fonction de leur localisation cellulaire. En effet, les TLR1, TLR2, TLR4 et TLR6 reconnaissent des structures lipidiques alors que les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 reconnaissent des acides nucléiques (**Tableau 4**) (Akira *et al.*, 2006; Song and Lee, 2012).

Famille des TLR	Agonistes microbiens	Ligands endogènes
TLR1	Lipoprotéines (bactéries et mycobactéries), peptidoglycanes (bactéries Gram positif),	-
TLR2	Lipoprotéines, glycolipides, zymozan	-
TLR3	dsRNA, siRNA	ARN simple brin (virus)
TLR4	Lipopolysaccharide, LPS (bactéries Gram négatif), virus de la tumeur mammaire murine, enveloppe protéique d'un virus, phosphorylcholine	Heat shock protein (Hsp)2, défensine 2, fibrinogène, acide hyaluronique, HMGB-1
TLR5	Flagelline (bactéries flagellées)	-
TLR6	Lipopeptides	-
TLR7/TLR8	ssRNA, imidazoquinoline, resquimod, imiquimod	ARN simple brin (virus)
TLR9	CpG (bactéries)	Chromatine
TLR10	Inconnu	Inconnu

Tableau 4 : Les différents ligands des TLR humains (Moser and Leo, 2010)

Les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 sont exprimés à la surface des cellules tandis que les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 ont une localisation intracellulaire. Les TLR assurent une réponse immunitaire efficace et immédiate en réponse à une infection bactérienne, virale ou fongique (Song and Lee, 2012). Les différents TLR reconnaissent donc des PAMP différents et délivrent des signaux moléculaires distincts, induisant ainsi la maturation de différents types de DC et donc des réponses immunitaires distinctes (Kapsenberg, 2003).

♦ Les récepteurs de la famille des lectines de type C

Les DC expriment un large répertoire des récepteurs de la famille des lectines de type C (CLR), qui ont la propriété de lier la partie glucidique des glycoprotéines (Hardison and Brown, 2012). Tout comme pour les TLR, certaines populations de DC expriment certains

CLR. Le BDCA-2 est spécifique des pDC (Dzionek *et al.*, 2001), la langérine est spécifique des LC (Valladeau *et al.*, 2000) et le DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin, CD209) est exprimé spécifiquement sur les DC interstitielles (Geijtenbeek *et al.*, 2000).

Les lectines de type C se lient à un grand nombre de microorganismes, dont les virus, les bactéries, les parasites ou les champignons et permettent leur internalisation (Hardison and Brown, 2012). Les CLR appartiennent à une superfamille hétérogène de protéines solubles et transmembranaires caractérisées par leur domaine lectine de type C (Hardison and Brown, 2012). Les CLR peuvent induire une signalisation intracellulaire suite à une reconnaissance antifongique *via* la dectin-1, la dectin-2, le récepteur de mannose (DEC-205), le récepteur de lectine de type-C tel que la langerine, DC-SIGN et Mincle (Hardison and Brown, 2012).

Parmi ces CLR, la dectin-1, qui est un récepteur PAMP, reconnait les 1,3-β glucans des champignons (Ainscough *et al.*, 2012). Les collectines, les sélectines et les récepteurs des cellules natural killer (NK) font partie aussi des CLR et sont impliqués dans la détection des signaux de danger (Ainscough *et al.*, 2012). Ce sont des CLR solubles ayant la capacité de détecter les produits glucidiques des microorganismes (Hardison and Brown, 2012). Suite à leur activation, les collectines sont capables de déclencher des processus immunitaires tels que la neutralisation, l'activation du complément et la phagocytose (Ainscough *et al.*, 2012).

Certains CLR tels que le récepteur du mannose est impliqué uniquement dans l'endocytose et l'internalisation des microorganismes (Pothlichet and Quintana-Murci, 2013).

- **Les récepteurs NOD-like**

Les récepteurs NOD-like (NLR) sont une famille de récepteurs intracellulaires qui reconnaissent des composants microbiens. Cette famille compte vingt-trois membres dont la majorité est divisée en deux sous-classes : les Nucleotide-binding oligomerization domain NOD (1 et 2) contenant un motif CARD et les NLRP (Nucleotide-binding oligomerization domain Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing) ou NALP contenant un motif pyrine.

Les protéines NOD1 (NLRC1 ou CARD4) et NOD2 (NLRC2 ou CARD15) sont des récepteurs cytosoliques qui détectent les peptidoglycanes des bactéries à Gram négatif ou positif et sont exprimées dans le cytoplasme des macrophages et des DC (Fritz *et al.*, 2005). Elles sont activées par des muropeptides (petits fragments de peptidoglycanes bactériens). NOD1 est activé par l'acide diaminophilique des muropeptides de bactéries telles que *Moraxella*

catarrhalis, Pseudomonas aeruginosa, Helicobacter pylori, Chlamydia, Shigella, Escherichia coli et Campylobacter. Cependant, NOD2 est activé par les muramyl dipeptides (MDP) des peptidoglycanes de bactéries telles que *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella*, *Listeria,* et *Streptococcus* (Rietdijk *et al.*, 2008).

Après la liaison d'un PAMP, les NLR subissent un réarrangement conformationnel qui permet leur activation. Il s'ensuit la mise en route de voies de signalisation induisant la production de cytokines pro-inflammatoires. Les protéines NOD activent la voie du facteur de transcription nuclear factor kappa B (NFκB) (**Figure 6**) alors que les protéines NLRP telles que le NLRP3 régule la sécrétion de l'IL-1β et de l'IL-18 (**Figure 7**).

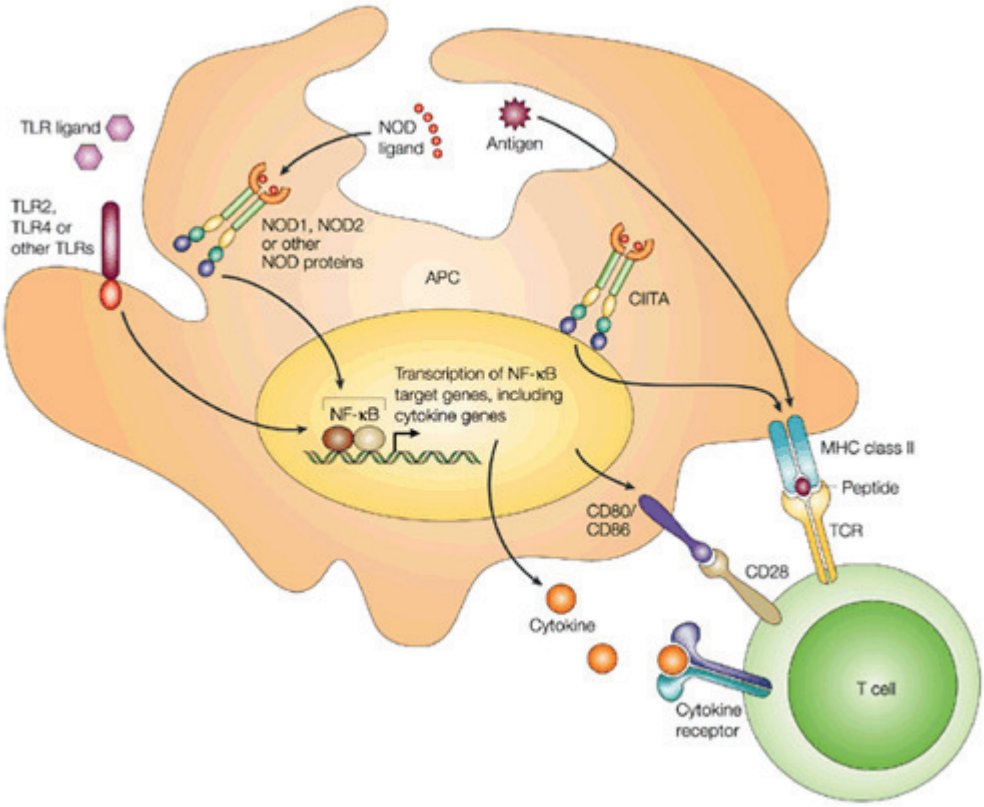


Figure 6 : Activation de la voie NFκB par les protéines NOD1/NOD2 ou les TLR (Inohara and Nunez, 2003)
major histocompatibility complex (MHC) class II transactivator (CIITA)

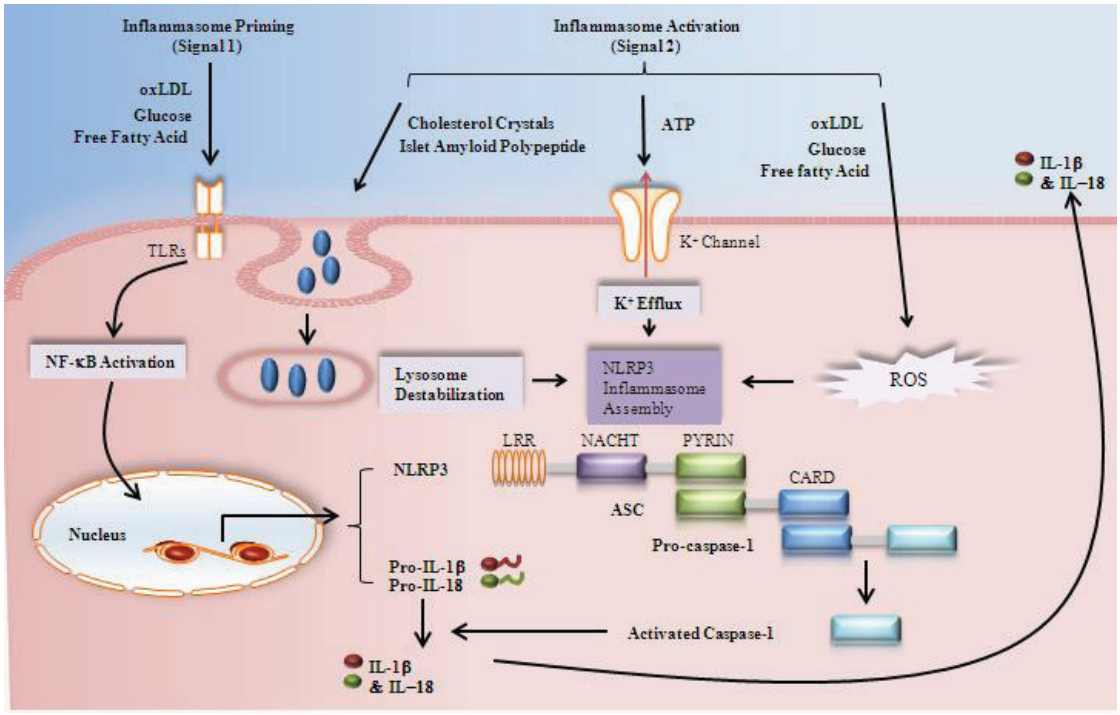


Figure 7 : Activation de l'inflammasome NLRP3 par les signaux de danger (Yin *et al.*, 2013)

Les NLRP ou NALP font partie de l'inflammasome, complexe multiprotéique jouant un rôle important dans l'activation des caspases pro-inflammatoires, participant à la sécrétion de l'IL-1β et de l'IL-18 (Martinon and Tschopp, 2005; Mariathasan and Monack, 2007; Bangert *et al.*, 2011).

La famille des NLRP comprend 14 membres : NLRP1-NLRP14 (Martinon *et al.*, 2007). Parmi la famille des NLRP, le NLRP3 (NALP3 ou Cyropyrin) peut aussi être activé par l'ARN bactérien ou par des signaux de danger endogènes tels que l'ATP et les cristaux d'acide urique libérés par les cellules mourantes (Martinon *et al.*, 2006). Le NOD1, le NOD2 et les NALP 1-4, le NLRP6, le NLRP7, le NLRP10, le NLRP12, les NLRC (NLR family CARD domain-containing protein) 3-5 et l'AIM2 (Absent In Melanoma 2) sont fortement exprimés dans les DC (Krishnaswamy *et al.*, 2013).

La **Figure 8** représente quelques exemples des inflammasomes présents dans les DC et leurs activateurs bactériens ou viraux.

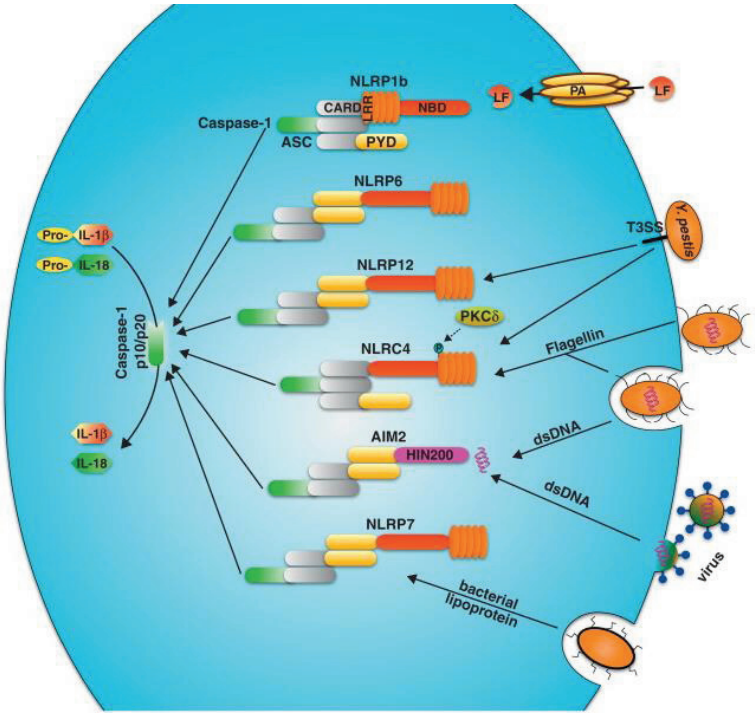


Figure 8 : Représentation de certains inflammasomes et de leurs activateurs bactériens ou viraux (Vladimer *et al.*, 2013)

Parmi tous les inflammasomes exprimés par les DC, le NLRP3 est le mieux étudié. Il est activé en présence d'un signal de danger détecté par la DC (Krishnaswamy *et al.*, 2013). L'activation du NLRP3 implique deux signaux distincts. Le premier signal est médié par les TLR activant la voie NFκB pour induire la transcription des gènes codant pour la *pro-il1b* et le *nlrp3*. Le second signal consiste en l'assemblage de l'inflammasome NLRP3/ASC/pro-caspase-1 *via* divers *stimuli* tels que la productiond'ERO, l'ATP ou les cristaux d'acide urique ou de cholestérol (Yin *et al.*, 2013) (**Figure 8**).

2.4.2. Apprêtement des antigènes par les DC

Toutes les cellules nucléées expriment le CMH de classe I. Comme le montre la **Figure 9 A,** les protéines sont fragmentées dans le cytoplasme par le protéasome (un complexe de protéines ayant une activité protéolytique) ou par d'autres protéases telles que les cathépsines (Villadangos and Schnorrer, 2007; Neefjes *et al.*, 2011). Les fragments sont ensuite transportés à travers la membrane du réticulum endoplasmique par des protéines de transport appelées TAP (Transportor associated with antigen processing). La synthèse et l'assemblage de la chaîne lourde et de la bêta-2-microglobuline (β2m) du CMH de classe I se produisent dans le réticulum endoplasmique. Dans le réticulum endoplasmique, la chaîne lourde, la β2m du CMH de classe I, et le peptide forment un complexe stable qui sera

transporté à travers le corps de Golgi à la surface cellulaire pour être présenté aux LT CD8⁺ (Neefjes *et al.*, 2011).

Bien que toutes les cellules nucléées expriment le CMH de classe I, seul un groupe restreint de cellules expriment le CMH de classe II. Ce groupe comprend les CPA telles que les macrophages, les DC et les Lymphocytes B (LB).

Comme le montre la **Figure 9 B**, les protéines exogènes internalisées par endocytose sont fragmentées par des protéases dans un endosome. Les chaînes alpha et bêta du CMH de classe II, ainsi qu'une chaîne invariante, sont synthétisées, assemblées dans le réticulum endoplasmique, et transportées à travers le corps de Golgi pour atteindre l'endosome. A ce niveau-là, la chaîne invariante est digérée et le fragment peptidique produit à partir de la protéine exogène peut s'associer avec les molécules de classe II du CMH pour former un complexe qui est finalement transporté à la surface cellulaire pour être présenté par les LT CD4⁺ (Neefjes *et al.*, 2011).

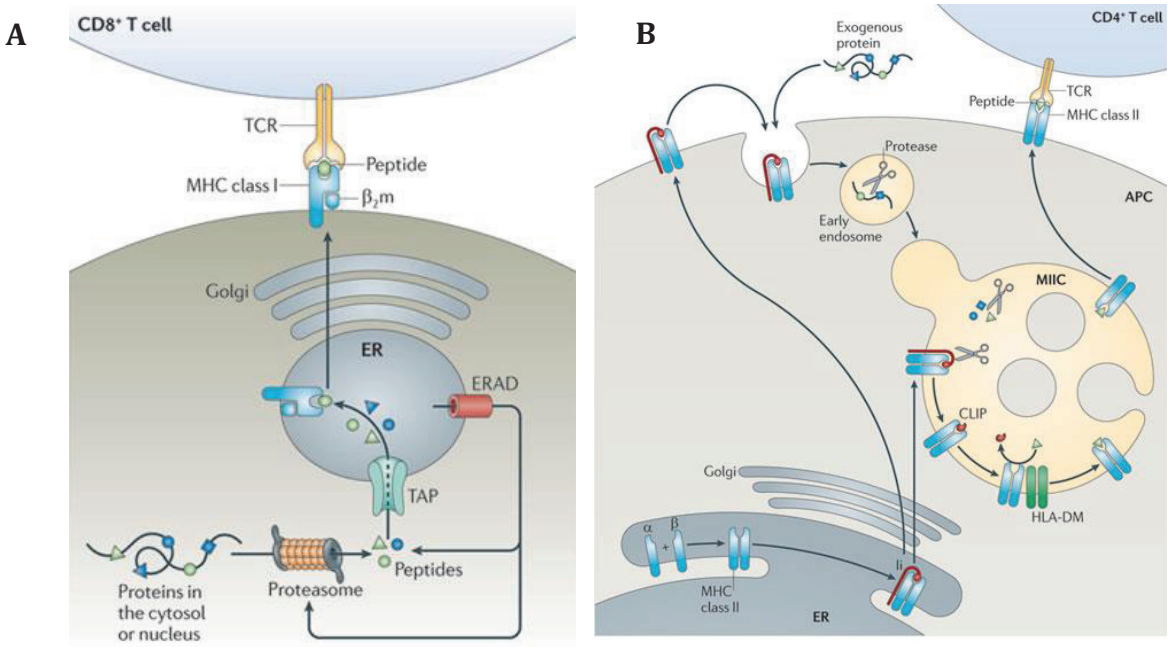


Figure 9 : Présentation des antigènes par les DC (Neefjes *et al.*, 2011)
ERAD, ER-associated protein degradation; TCR, T cell receptor

En plus de ces deux voies de présentation, les DC peuvent endocyter les Ag exogènes et les présenter aux LT CD8⁺ cytotoxiques *via* une présentation croisée par les CMH-I (cross-presentation) selon deux voies connues : la voie cytosolique et la voie vacuolaire. La voie cytosolique impliquant le protéasome est la voie prédominante (Joffre *et al.*, 2012) (**Figure 10**).

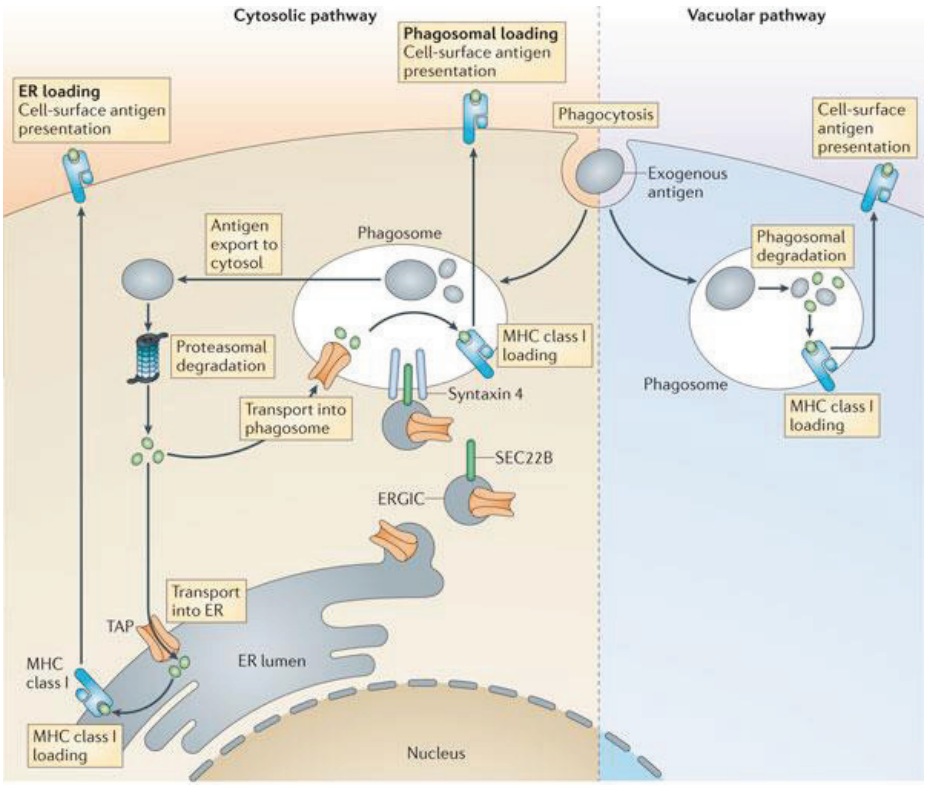


Figure 10 : Les voies intracellulaires de la présentation croisée dans les cellules dendritiques (Joffre *et al.*, 2012), ER–Golgi intermediate compartment (ERGIC)

2.4.3. La migration des cellules dendritiques vers les ganglions lymphatiques drainants

A l'état d'homéostasie, peu de DC migrent de la périphérie jusqu'aux ganglions lymphatiques drainants (Alvarez *et al.*, 2008). En présence d'un signal de danger, les DC passent d'un état immature à un état mature caractérisé par des modifications phénotypiques et fonctionnelles conduisant à leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires (Alvarez *et al.*, 2008).

Ainsi, dans les ganglions, les DC matures acquièrent la capacité d'activer les LT naïfs et perdent alors les fonctions d'endocytose et de phagocytose nécessaires à la capture de l'Ag. L'activation des DC est associée à une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86), de CD83 et du CMH-II (Banchereau *et al.*, 2000). Par ailleurs, les DC perdent l'expression de l'E-cadhérine (molécule d'adhésion intercellulaire) et produisent des enzymes protéolytiques comme les métalloprotéinases (MMP-2, MMP-9) (Forster *et al.*, 2012).

L'Il-1β et le TNF-α sont deux cytokines indispensables pour la migration des DC (Forster *et al.*, 2012). D'autre part, la mobilisation des DC de la périphérie aux ganglions lymphatiques est régulée par le récepteur aux chimiokines CCR7. Deux chimiokines se lient à CCR7 : le

CCL19 et le CCL21. Le CCL19 exprimée par les zones T des ganglions lymphatiques et est produite par les DC interdigitées. Le CCL21 est exprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques et produite par les cellules stromales. Cette chimiokine permet alors à la DC de se diriger vers les ganglions lymphatiques à travers les vaisseaux lymphatiques afférents (Luther *et al.*, 2000).

2.4.4. Rôle des cellules dendritiques dans le contrôle de la réponse lymphocytaire

La fonction caractéristique des DC est leur aptitude à induire l'activation primaire des LT naïfs. L'activation des LT nécessite une interaction entre la CPA et le TCR (T-cell receptor). Le TCR est la structure de reconnaissance du LT qui se lie spécifiquement à l'Ag (Dustin, 2008). Cette interaction entre la DC et le LT a lieu dans les ganglions lymphoïdes secondaires. Le signal d'activation du LT est initié par l'interaction du récepteur spécifique du LT, le TCR, avec le complexe CMH-peptide antigénique présenté par la DC (signal 1). Ce signal est néanmoins insuffisant pour l'activation des LT naïfs. Un deuxième signal de co-stimulation est indispensable. Il est délivré par des interactions cellulaires (molécules accessoires et d'adhésion) et moléculaires (cytokines) (signal 2). La DC va alors sécréter des cytokines nécessaires à l'activation et à la polarisation des LT (signal 3) (Kapsenberg, 2003) (**Figure 11**) et jouer un rôle important dans la différenciation des LT naïfs vers une réponse T-helper (Th)1, Th2, Th9, Th17 ou Th22 *via* la libération de cytokines (Akdis *et al.*, 2012) (**Figure 12**).

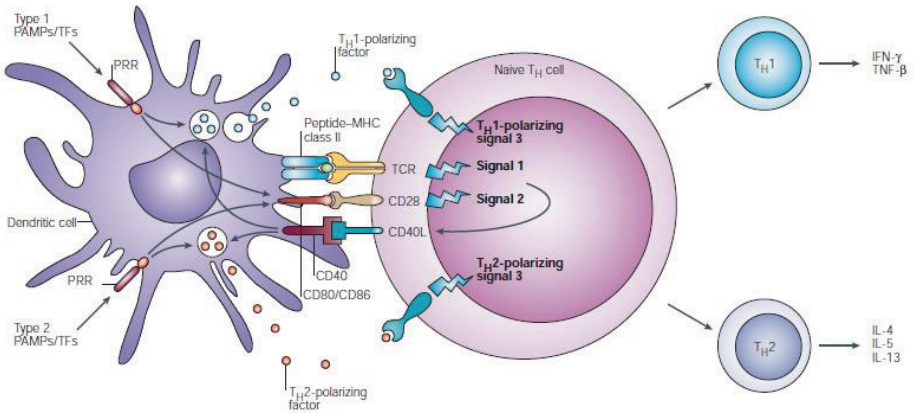


Figure 11 : La synapse immunologique (Kapsenberg, 2003)

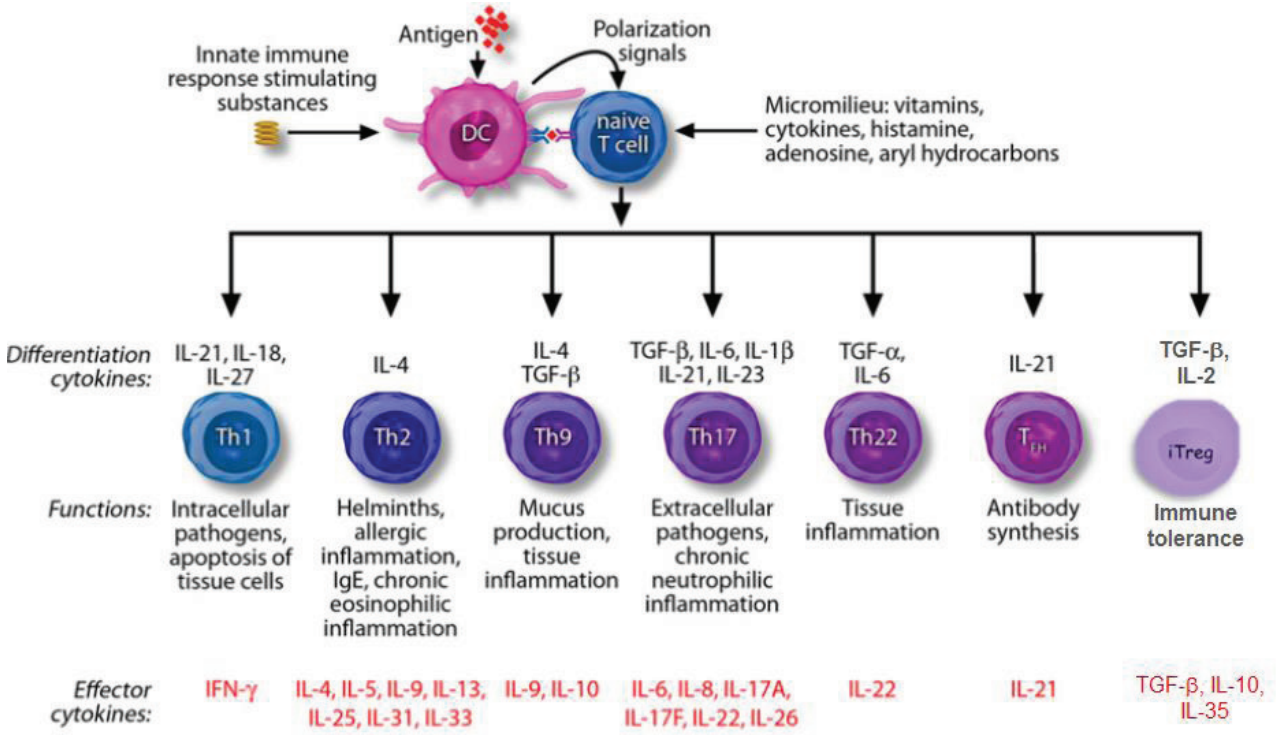


Figure 12 : Les différentes sous-populations de lymphocytes T
[Figure modifiée à partir (Akdis *et al.*, 2012)]

Au cours de cette synapse immunologique qui se crée entre la DC et le LT, des signaux co-inhibiteurs dits signaux négatifs sont délivrés. Ces signaux ont pour rôle d'éviter l'activation excessive des LT, de rétablir une homéostasie cellulaire et de favoriser la tolérance. Ils impliquent différentes molécules de co-inhibition exprimées par les LT telles que le CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) et le PD-1 (Program cell death-1) (Jung et Choi 2013).

CTLA-4 est une glycoprotéine transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines (Ig). Contrairement au CD28, le CTLA-4 n'est pas constitutivement exprimé par le LT naïf mais induit par le LT activé (Das et al., 2013). La molécule CTLA-4 possède 100 plus d'affinité pour le CD80 et le CD86 que la molécule CD28 (Linsley et al., 1994). Après la liaison du CD80/CD86 au CTLA-4 et de l'expression de l'IDO, l'activation des LT effecteurs par la DC est inhibée orientant ainsi la différenciation en Treg (Munn DH et al., 2004). Le CTLA possède un motif ITIM (Immnuoreceptor tyrosine inhibitory motif) permettant le recrutement des phosphatases SHP (Src homology domain-containing phosphatase)-1 et SHP-2. Ces phosphatases déphosphorylent les sous unités CD3 inhibant ainsi l'activation et la prolifération du LT (Thaventhiran et al., 2012).

PD-1 est une glycoprotéine induite à la surface des LT activés. Elle est exprimée par différentes cellules immunitaires telles que les LT, les Treg, le LB, les DC, les cellules NK, les NKT et les monocytes activés. Le ligand PD-L1 (B7-H1) est exprimé par les LT, les LB, les DC, les macrophages et les mastocytes tandis que l'expression de PD-L2 (B7-DC) est limitée aux DC et aux macrophages (Jung et Choi 2013). La liaison de PD-1 à ses ligands PDL-1 et PDL-2 inhibe l'activation des LT. De plus, le récepteur PD-1 possède un motif ITIM et un motif ITSIM (Immunoreceptor swich motif) qui se lient aux phosphatases SHP-1 et SHP-2 transmettant ainsi un signal inhibiteur aux LT caractérisé par une diminution de l'expression de Bcl-xl aboutissant à l'apotose (Keir et al., 2008).

Par ailleurs, il existe des ligands qui sont connus comme des molécules de co-inhibition et dont les récepteurs ne sont à ce jour pas connus. Il s'agit des ligands B7-H3, B7-H4 et B7-H5 (Jung et Choi 2013).

3. Les lymphocytes T cutanés

3.1. Les lymphocytes T γδ

Chez l'Homme et la souris, l'épiderme et le derme sont composés de LT exprimant le TCR formé de chaînes γ et δ (Heath and Carbone, 2013). Les LT γδ résidents dans l'épiderme murin sont connus sous le nom de Dendritic Epidermal T cells (DETC) et expriment le TCR $V_{\gamma}5V_{\delta}1$ (Macleod and Havran, 2011). Ces $V\gamma5^{+}V\delta1^{+}$ DETC jouent un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire d'origine allergique (Girardi *et al.*, 2002).

Les LT γδ jouent un rôle important dans l'homéostasie cutanée (Sharp *et al.*, 2005) et la cicatrisation cutanée *via* la production d'IGF-1 (Inulin-like growth factor-1) (Toulon *et al.*, 2009).

Cai *et al.,* ont montré que les LT γδ dermiques expriment le récepteur de l'IL-23 (IL-23R) et le facteur de transcription RORγt (Cai *et al.*, 2011). A l'état d'homéostasie, elles produisent constitutivement le facteur de croissance IGF-1 qui joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie de l'épiderme. En revanche, une fois ces cellules activées au cours d'une inflammation telle que le psoriasis, elles produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17, l'IL-22, l'IFN-γ et le TNF-α (Cai *et al.*, 2011; Macleod and Havran, 2011). Les LT γδ dermiques humains et murins produisent de l'IL-17 suite à une stimulation par l'IL-23, cytokine pro-inflammatoire induite au cours de l'inflammation cutanée.

Les LTγδ présents au niveau du derme de sujets atteints de psoriasis produisent des quantités massives d'IL-17 (Cai *et al.*, 2011) leur conférant un rôle de défense contre les pathogènes

(Macleod and Havran, 2011). En effet, un modèle murin de souris dépourvu en DETC (TCR$\delta^{-/-}$) a permis de montrer que les lésions cutanées développées suite à une infection cutanée par le *Staphylococcus aureus* sont plus importantes que chez des souris contrôles. Ces lésions sont caractérisées aussi par un recrutement plus important de polynucléaires neutrophiles (PN) au niveau de la peau (Molne *et al.*, 2003).

3.2. Les Lymphocytes T mémoires

Suite à un contact cutané avec un antigène, les DC, ainsi activées, sont capables de migrer vers les ganglions drainants pour induire une réponse immunitaire primaire spécifique de l'antigène. Une prolifération clonale de LT effecteur (T_{EFF}) est alors induite au niveau des ganglions. Ces T_{EFF} rejoignent la circulation sanguine dont une partie se différencie en LT effecteurs mémoires (T_{EM}) (Islam and Luster, 2012). Ces T_{EM} expriment la molécule CLA (cutaneous lymphocyte antigen) (Clark *et al.*, 2006) et les récepteurs de chimiokines tels que le CCR10 (Homey *et al.*, 2002), le CCR4 (Campbell *et al.*, 1999) et le CCR8 (McCully *et al.*, 2012). Les veinules capillaires de la peau expriment le CCL17, l'E-sélectine et le CCL1 qui sont les ligands respectifs de CCR4, CLA et CCR8 alors que les cellules épidermales telles que les KC expriment le CCL27 et le mCCL8, les ligands respectifs de CCR10 et du CCR8 murin (Islam and Luster, 2012) (**Figure 13**). Ces T_{EM} ont la capacité de circuler entre le sang et les tissus périphériques tels que la peau.

Une autre population de LT mémoires appelées LT résidentes mémoires (T_{RM}) peut aussi se retrouver dans les tissus périphériques. Contrairement aux T_{EM}, cette population n'a pas la capacité de recirculer (Shin and Iwasaki, 2012). Les LT mémoires seront également décrits dans la partie II (c.f page 90).

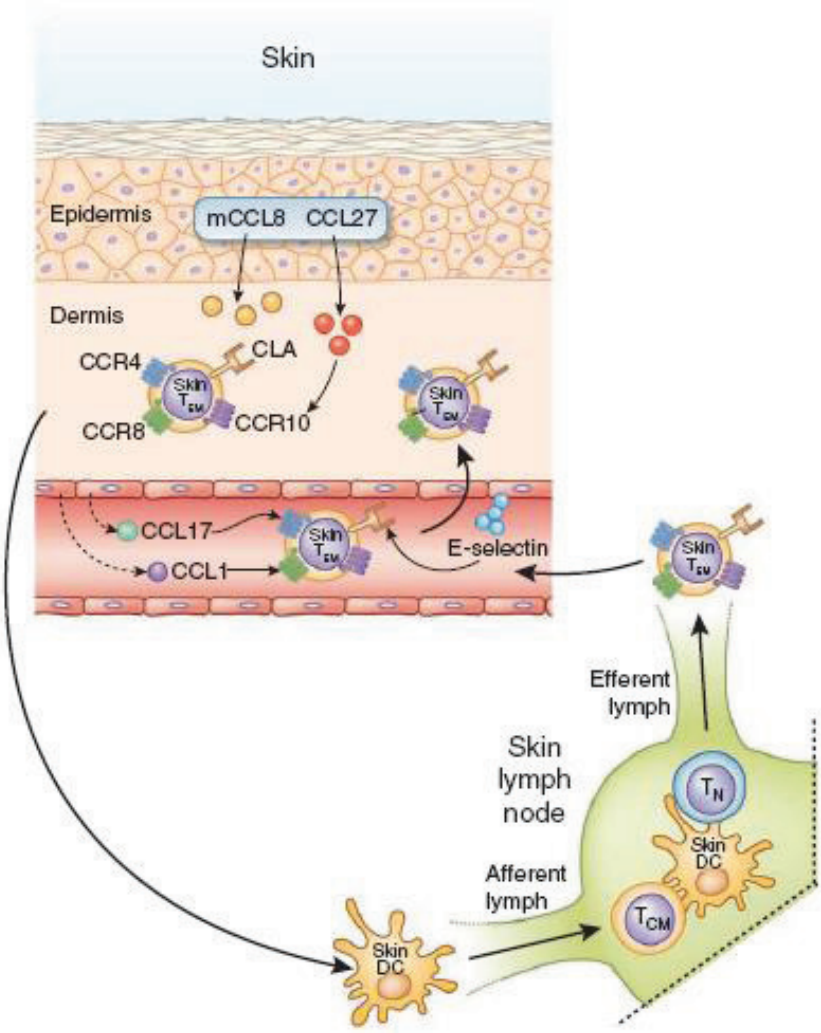


Figure 13 : Les lymphocytes T mémoires dans la peau murine
[figure modifiée à partir de (Islam and Luster, 2012)]

3.3. Les Lymphocytes T régulateurs

En plus de ces deux populations de LT, les LT régulateurs (Treg) représentent 5% à 10% des LT résidents dans la peau humaine saine. Ils sont caractérisés par l'expression du CD25, du facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box P3), de l'antigène lymphocytaire cutané CLA, et du récepteur CCR4 (**Figure 14**). Au cours d'une inflammation, les Treg sont capables de proliférer *in situ* en présence de l'IL-15 sécrétée par les fibroblastes dermiques activés par le TNF-α. Cette cytokine peut être aussi produite par les KC durant une inflammation chronique (Clark and Kupper, 2007). Les Treg jouent un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire. Ce rôle des Treg sera largement détaillé dans la partie II (cf. page 97).

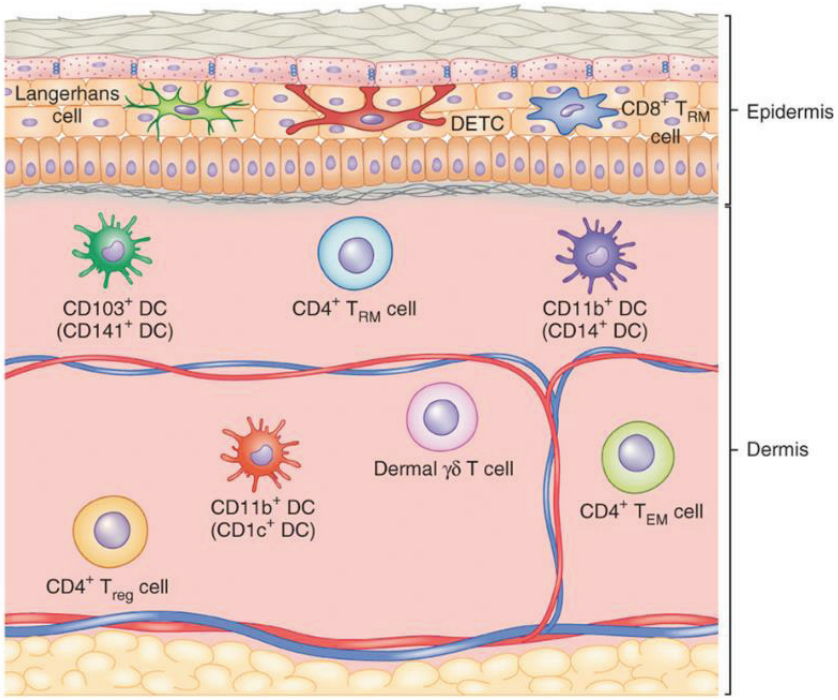


Figure 14 : Les cellules dendritiques et lymphocytes T cutanés murins [figure modifiée à partir de (Heath and Carbone, 2013)]

4. Les autres cellules de l'immunité cutanée

4.1. Les kératinocytes

En plus de leur rôle important dans le maintien de la barrière physique de la peau, les KC participent activement à l'immunité innée. Ils représentent 80% des cellules épidermiques. Ils sont capables de synthétiser les composants du complément tels que le C3 et le facteur B (Pasch *et al.*, 2000; Purwar *et al.*, 2011), des peptides antimicrobiens (PAM) tels que les β-défensines (HBD-1, HBD-2 et HBD-3), la cathélicidine (LL-37); des cytokines telles que le thymic stromal lymphopoietin (TSLP), le tumor necrosis factor (TNF)-α, l'IFN type I, l'IL-1α, l'IL-6, et l'IL-18; des chimiokines telles que l'IL-8, le CCL2, le CCL20, le CCL27, le CXCL16, le CXCL9 et le CXCL10 et les métabolites de l'acide arachidonique tels que le leucotriène B4, l'acide 12-hydroxyeicosatétraénoïque (HETE) et le 15-HETE. Tous ces médiateurs favorisent le recrutement de PN et de LT vers la peau (Gutowska-Owsiak and Ogg, 2012). Parmi les PAM sécrétés par les KC, certains sont exprimés constitutivement dans les zones les plus superficielles de l'épiderme et stockés dans la couche cornée comme la RNAse 7 et la psoriasine actives contre l'*E. Coli* (Doutre, 2009; Bangert *et al.*, 2011). Les KC expriment la plupart des TLR à l'exception du TLR7 et TLR8 (Kaplan *et al.*, 2012). A l'état basal, les KC produisent peu d'IL-1, d'IL-7 et de TGF-β. Ils synthétisent constitutivement l'IL-1α qui se trouve sous sa forme active (Mee *et al.*, 2005; Magcwebeba *et al.*, 2012) tandis que l'IL-1β se

trouve sous sa forme inactive (pro-IL-1 β) (Bangert *et al.*, 2011; Magcwebeba *et al.*, 2012). Une fois la pro-IL-1 β sécrétée, elle est clivée par la caspase-1 en IL-1β active induisant ainsi une réponse inflammatoire cutanée (Mee *et al.*, 2005). Selon les signaux de danger, les KC activés produisent et libèrent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, le TNF-α et l'IL-18 (Stoll *et al.*, 1997), des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF-β (Enk and Katz, 1992), des facteurs de croissance pour les LT tels que le GM-CSF, le macrophage colony stimulating factor (M-CSF), l'IL-7 et l'IL-15 (Blauvelt *et al.*, 1996) et des chimiokines telles que le CCL20 et l'IL-8 (**Figure 15**). Ils expriment également des molécules d'adhésion telles que le CD54 (ICAM-1) qui joue un rôle prépondérant dans le traffic lymphocytaire de la peau. Les KC sont également capables d'exprimer le CMH-II ce qui leur permet de se comporter comme une CPA dans un contexte inflammatoire (Debenedictis *et al.*, 2001; Doutre, 2009; Bangert *et al.*, 2011). Du fait de leur abondance dans l'épiderme et de leur rôle dans la formation de la barrière cutanée, les KC jouent un rôle crucial dans le développement des réactions cutanées d'origine allergique (Van Och *et al.*, 2005; Kaplan *et al.*, 2012).

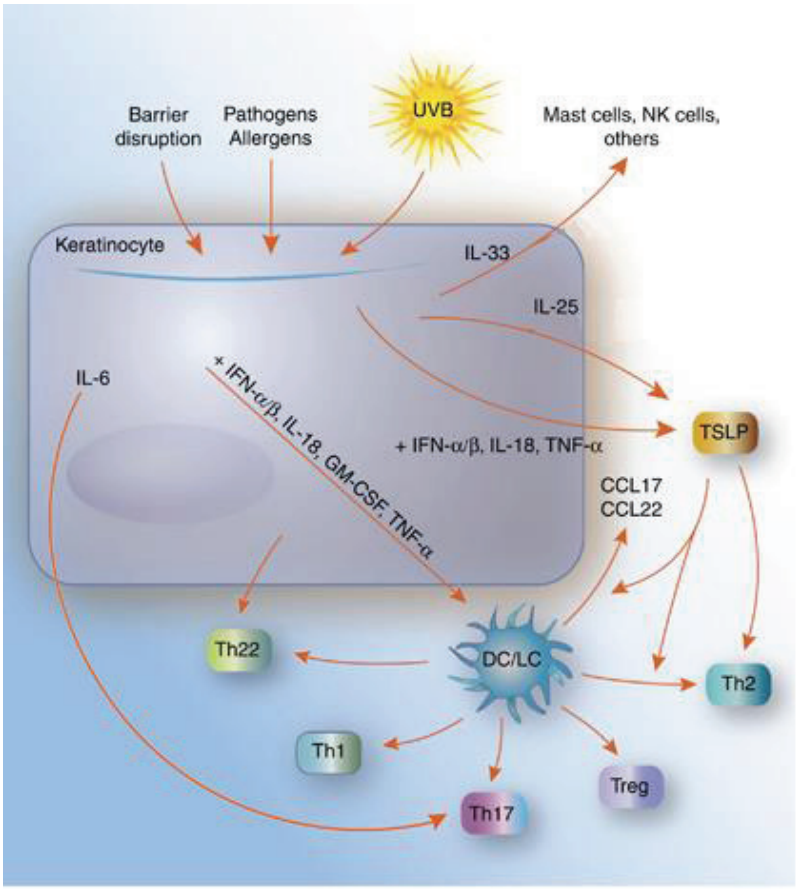


Figure 15 : Les médiateurs secrétés par les KC activant la réponse immunitaire (Gutowska-Owsiak and Ogg, 2012)

4.2. Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules différenciées à partir des précurseurs de la moelle osseuse. Ce sont les cellules hématopoïétiques résidant dans la peau. Ils sont généralement identifiés par l'expression du récepteur de forte affinité pour les immunoglobulines E (IgE), le FcεRI, et le récepteur du facteur des cellules souches (SCF) (Gurish and Austen, 2012). Les mastocytes jouent un rôle important dans les réactions allergiques *via* leur récepteur FcεRI favorisant la dégranulation et la libération de médiateurs vasoactifs et pro-inflammatoires (Theoharides and Kalogeromitros, 2006). Ainsi, en réponse à une activation médiée par les IgE, les mastocytes sécrètent des médiateurs médiateurs préformés et les médiateurs néoformés (Theoharides *et al.*, 2012). Les médiateurs préformés comprennent l'histamine, la sérotonine, les enzymes protéolytiques telles que l'arylsulfatase, les phospholipases et les tryptases; les chimiokines telles que l'IL-8, le monocyte chemotactic protein (MCP)-1, le MCP-3, le MCP-4 et le RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted); et les peptides telles que la substance P et la bradikinine (Theoharides et al., 2012). Cependant, les médiateurs néoformés comprennent des cytokines, des facteurs de croissance tels que le GM-CSF, le CSF et le VEGF (vascular endothelial growth factor) et les métabolites de l'acide arachidonique (le leukotriène B4, le leucotriène C4 et la prostaglandine (PG) D2) (Renoux, 1997; Theoharides and Kalogeromitros, 2006; Theoharides *et al.*, 2012).

Les mastocytes sont capables de déclencher une réaction d'hypersensibilité type I suite à une libération de ces médiateurs pro-inflammatoires. En réponse à un allergène, la réaction d'hypersensibilité type I se caractérise par une dégranulation rapide et immédiate (quelques minutes) de médiateurs vasoactifs tels que l'histamine, les protéases, les protéoglycanes et le TNF-α (Theoharides et al., 2012). Elle est suivie d'une réponse tardive (2 h à 4 h) caractérisée par une sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires. Après leur activation, les mastocytes produisent l'IL-5 favorisant ainsi le recrutement et l'activation des éosinophiles. Ils induisent également le recrutement des PN par la libération d'IL-8 et de TNF-α (Bischoff, 2007) (**Figure 16**).

Les mastocytes participent aussi à de nombreux types de réactions et maladies inflammatoires telles que l'asthme, la dermatite atopique et le psoriasis (Renoux, 1997; Theoharides and Kalogeromitros, 2006; Theoharides *et al.*, 2012).

Le rôle des mastocytes dans l'eczéma allergique de contact sera décrit dans la partie II (cf. page 84).

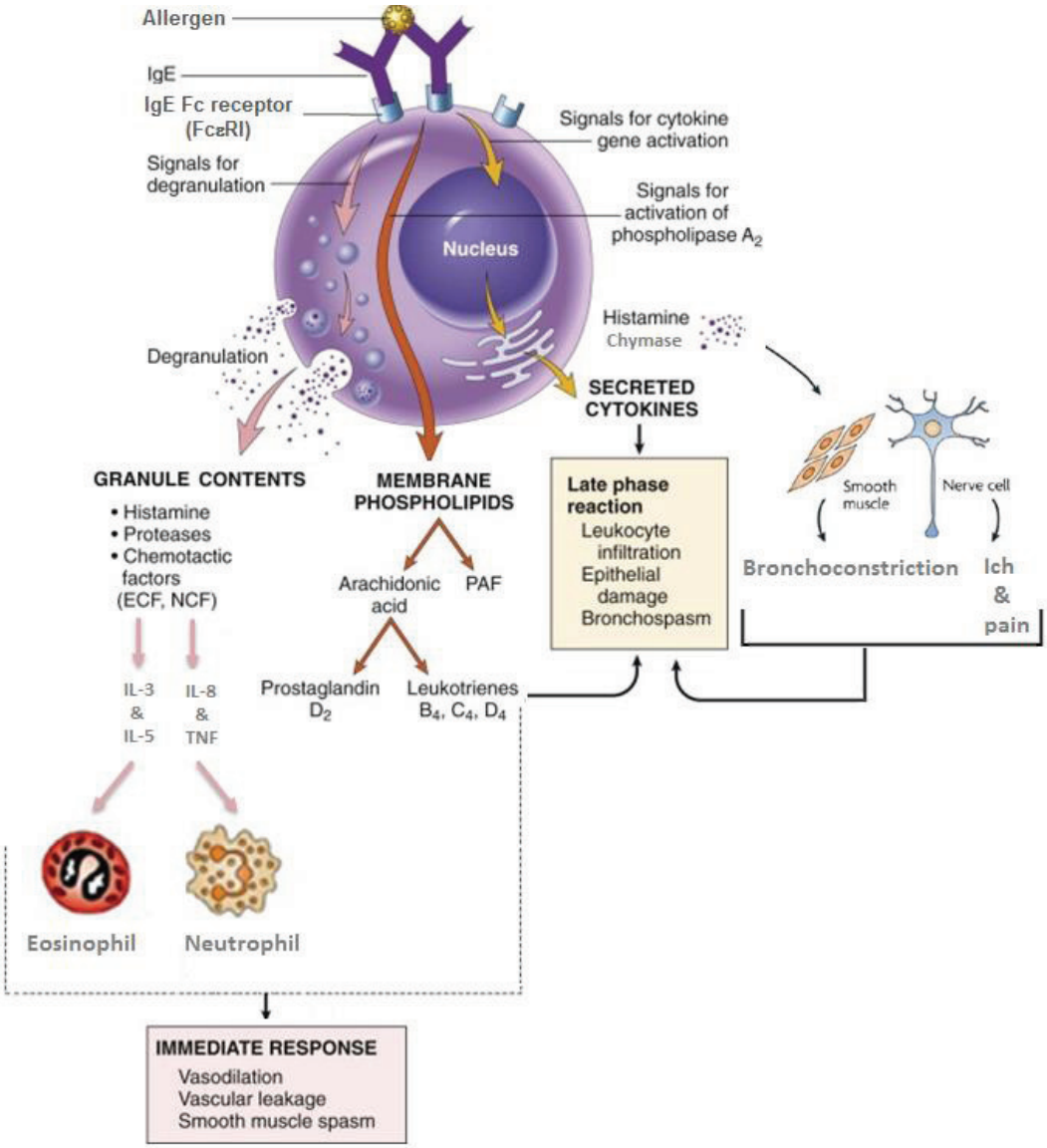


Figure 16 : Activation d'un mastocyte par un allergène [figure modifiée à partir de [(Bischoff, 2007) et Kumar, 2012), ECF : eosinophil chemotactic factor; NCF : neutrophil chemotactic factor

PARTIE II : L'ECZÉMA DE CONTACT

1. Eczéma allergique de contact ou hypersensibilité cutanée

En Europe, 15 à 20 % de la population générale souffre d'une maladie allergique. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) classe l'allergie au quatrième rang des maladies chroniques. Cette maladie est considérée comme un problème majeur de Santé publique (Peiser *et al.*, 2012). 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. Les allergies peuvent affecter les yeux, la peau et les voies respiratoires. Parmi ces réactions, l'eczéma allergique de contact (EAC) est une pathologie cutanée qui peut être causée par le contact d'un agent allergisant avec la peau (Kaplan *et al.*, 2012). Les métaux tels que le nickel, retrouvé dans les boutons de jeans, et le chrome, les additifs en caoutchouc tels que les carbamates et les mercaptobenzothiazole retrouvés dans les gants ou les chaussures; les conservateurs ou autres additifs tels que le quaternium-15, l'imidiazolidinyle urée retrouvés dans les produits cosmétiques tels que les lotions dermatologiques, les colorants et les médicaments tels que la néomycine et l'hydrocortisone peuvent induire des EAC (Habif *et al.,* 2012).

L'EAC peut être induit par différents voies d'exposition soit par un contact direct soit par un contact manuporté ou par un contact aéroporté (Tennstedt, *et al.,* 2012). Le contact direct de l'allergène avec la peau induisant un EAC se manifeste par une réaction inflammatoire eczémateuse. Cette dernière a lieu à l'endroit où l'agent allergisant est déposé. Pour les parfums, la localisation rétroauriculaire est le reflet de ce type de contact (Vigan, 2009). Lorsque l'agent allergisant est déposé *via* les mains sur le visage, il s'agit d'un transfert manuporté (Goossens and Lepoittevin, 2003). Cependant, lorsque l'agent allergisant est vaporisé en suspension dans l'air, il s'agit alors d'un transfert aéroporté (Goossens and Lepoittevin, 2003; Vigan, 2009). Dans ce cas, l'EAC est déclenché sur les zones exposées principalement le visage, les paupières, le décolleté, les bras et les jambes. Les lésions sont papuleuses et prurigineuses (Fitzpatrick, 2007). Par exemple, le jet du spray qui arrive sur la peau peut être considéré comme un contact direct ou aéroporté (Vigan, 2009).

1.1. Les manifestations cliniques et histologiques de l'eczéma allergique de contact

L'intensité de l'EAC dépend de la concentration en allergène et de la durée de l'exposition à l'agent allergisant. Les lésions primaires sont limitées au site de contact avec le facteur déclenchant (Goossens and Lepoittevin, 2003). L'EAC est caractérisé par des vésicules, un œdème, un érythème parfois des bulles et souvent un prurit important. Cet aspect clinique se

manifestant par une plaque érythémateuse et œdémateuse s'étend rapidement. Très vite elle se couvre de papulo-vésicules suintantes, qui peuvent déborder au-delà de la zone érythémateuse (Sasseville, 2008). Les poussées de vésicules se succèdent dans le temps et donne un aspect polymorphe aux lésions. Après un certain temps, le suintement s'arrête et la plaque se couvre de croûtes (Vigan, 2009). Au départ, l'EAC se limite à la zone d'exposition directe. Si l'exposition est chronique, l'EAC peut s'étendre au-delà des zones de contact direct. Les mains, les avant-bras, et le visage sont les zones les plus couramment affectées par l'EAC. Ce dernier peut affecter aussi des zones très limitées de la peau telles que les paupières, les lèvres ou le dessus des pieds (Habif *et al.,* 2012).

L'eczéma de contact est une inflammation auto-limitée dans le temps, qui en l'absence de contact ultérieur avec l'allergène régresse spontanément après 7 à 10 jours. La guérison se fait sans cicatrice. Suite à la persistance de l'allergène, l'eczéma peut devenir chronique. Les plaques prennent alors un aspect lichenifié et pigmenté avec un prurit intense. Dans ce dernier cas, l'éviction conduit rarement à la guérison à cause de l'ancienneté du prurit (Tennstedt *et al.,* 2012).

Les signes histologiques de l'eczéma de contact se caractérisent par un œdème et une vésiculation épidermique avec un épaississement de la peau due à une prolifération exagérée des cellules épidermiques appelée acanthose et une kératinisation anormale appelée parakératose.

Dans le cas d'un eczéma aigu, les altérations épidermiques sont plus prononcées et consistent principalement en une spongiose et une exocytose (**Figure 17**) (Jullien and Faure, 2000; Vigan, 2009) ; Fitzpatrick, 2007). La spongiose est un œdème intra-épidermique dissociant les KC les uns des autres et aboutissant à la formation de vésicules. Les zones spongiotiques contiennent des cellules inflammatoires mononuclées, il s'agit de l'exocytose. La couche cornée devient parakératosique. Les altérations dermiques consistent en une vasodilatation un œdème surtout superficiel et des infiltrats mononuclés périvasculaire, essentiellement lymphocytaire migrant vers le derme (Aractingi *et al.*, 2012).

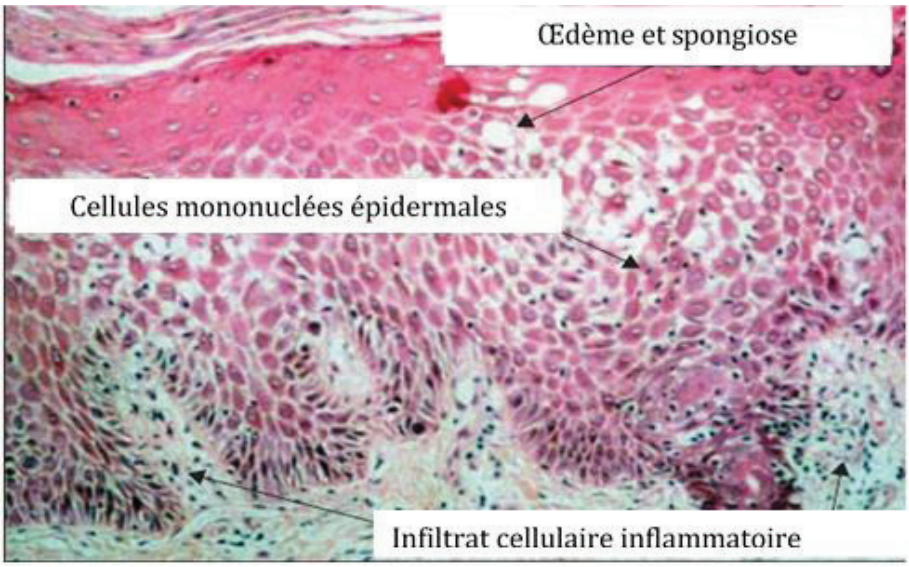


Figure 17 : Histopathologie de l'eczéma allergique de contact (Saint-Mezard *et al.*, 2004)

Par ailleurs, l'eczéma chronique est caractérisé par une acanthose marquée avec des allongements interpapillaires. L'épiderme devient résistant, imperméable et une parakératose se développe. La spongiose est plus discrète, les vésicules sont absentes ou très peu nombreuses. L'exocytose est peu marquée. Le derme est le siège d'un infiltrat inflammatoire périvasculaire superficiel à prédominance lymphocytaire (LT $CD4^+$) (Krasteva *et al.*, 1999).

La durée des lésions varie selon les sujets, régressant en 1 à 2 semaines. L'EAC a tendance à s'aggraver tant que le contact avec l'allergène persiste. Ainsi l'évolution de l'EAC aigu se caractérise par l'érythème suivi par la formation de papules, de vésicules, d'érosions, de croûtes et fini par une desquamation. Quant à celle de l'EAC chronique, elle se caractérise par l'apparition de papules, d'une desquamation puis d'une lichénification et finie par une plaie et une croûte. Une lichénification est un épaississement de l'épiderme avec accentuation des lignes cutanées de disposition parallèle (Fitzpatrick, 2007).

Les différentes lésions cutanées observées lors d'un EAC sont illustrées dans le **Tableau 5**.

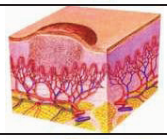
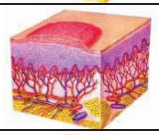
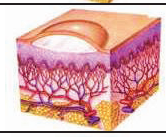
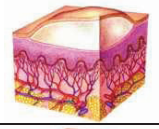
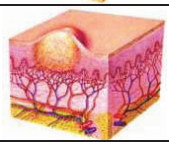
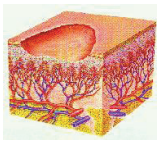
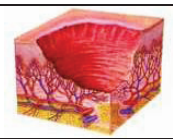
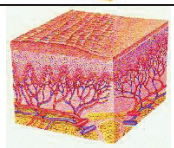
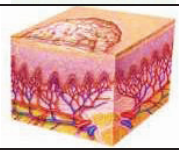
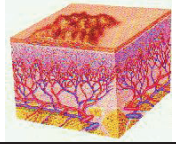
Type de lésions cutanées		Définition
Macule		Tache non palpable de taille et de couleur variables
Papule		Lésion superficielle, palpable de taille en général inférieur à 5 mm
Plaque		Lésion en relief, de surface étendue par rapport à son épaisseur
Vésicule		Cavité superficielle surélevée, de taille inférieure à 5 mm, bien limitée, contenant du sérum
Bulle		Cavité superficielle surélevée, de taille supérieure à 5 mm, bien limitée, contenant du sérum
Pustule		Cavité superficielle bien limitée contenant un exsudat purulent
Erosion		Perte de la couche de cellules superficielles cutanées n'atteignant pas le derme et guérissant sans cicatrice. Il s'agit d'une zone bien limitée, érythémateuse et suintante.
Plaie ou ulcère		Perte de substance s'étendant au derme et parfois à l'hypoderme et guérissant avec une cicatrice.
Lichénification		Plaque de grande taille due à l'épaississement de la peau et une accentuation des stries
Squame		Résidus de la couche cornée, de petite ou grande taille dus à un renouvellement cellulaire accru de la couche cornée
Croûte		Constituant sec formé à partir d'exsudat (sang, sérum, ou pus) à la surface de la peau

Tableau 5 : Les différentes lésions cutanées qui peuvent être observées au cours d'un eczéma de contact allergique (Fitzpatrick, 2007)

1.2. Le diagnostic et les tests utilisés

1.2.1. Le diagnostic

Le diagnostic de l'EAC repose sur le déclenchement des lésions inflammatoires sur le site de contact après exposition avec l'agent allergisant. Afin de caractériser cette allergie, deux types de diagnostic existent : le diagnostic étiologique et le diagnostic différentiel (Usatine and Riojas, 2010).

Le **diagnostic étiologique** commence par un interrogatoire pour déterminer les contacts possibles et permet alors d'établir la liste des produits et des objets en contact avec ce site (Vigan 2009). La prise des médicaments, l'utilisation des produits d'hygiène et des produits cosmétiques et sur l'exposition professionnelle avec l'agent allergisant sont documentés pendant l'interrogatoire (Aractingi *et al.*, 2012). De plus, ce diagnostic permet de préciser la chronologie de la survenue des manifestations cliniques et d'orienter vers les tests épicutanés appelés aussi "patch tests".

Cependant, une autre forme de dermatite existe, il s'agit de la dermatite irritative. Elle est provoquée par une exposition répétée d'agents irritants. Elle est surtout fréquente sur les mains et ne nécessite pas l'intervention de mécanismes immunologiques spécifiques.

La dermatite irritative est caractérisée par des lésions qui apparaissent dans les premières heures qui suivent le premier contact avec l'agent irritant et sont strictement limitées à la zone où il a été appliqué. L'aspect est souvent érythémateux. La sensation est plus cuisante que prurigineuse. La répétition de l'agression conduit à une dermatite d'usure avec un aspect rugueux et crevassé. Le fait d'arrêter d'être en contact avec le produit irritant entraîne une guérison progressive. Les tests épicutanés sont négatifs et l'histologie montre des altérations au niveau de l'épiderme. L'altération de la barrière cutanée peut favoriser la pénétration des allergènes et peut conduire à un eczéma de contact (Jullien and Faure, 2000; Nosbaum *et al.*, 2009). Afin de la différencier de l'EAC, le diagnostic différentiel est utilisé (**Tableau 6**) (Aractingi *et al.*, 2012).

	Eczéma de contact	Dermatite irritative
Epidémiologie	Atteint quelques sujets en contact avec le produit	Atteint la majorité des sujets en contact avec le produit
Symptomatologie	Prurit	Brûlure
Délai d'apparition	Sensibilisation préalable puis déclenchement 24h-48h après une nouvelle exposition avec l'allergène	Rapide, de quelques minutes à quelques heures après l'exposition avec l'allergène
Lésions cutanées	Bords émiettés	Bords nets
Histologie	Spongiose, exocytose	Nécrose épidermique
Tests épicutanés	Positifs ou lésion d'eczéma	Négatifs ou lésion d'irritation

Tableau 6 : Diagnostic différentiel entre l'eczéma de contact et la dermatite irritative (Nosbaum *et al.*, 2009; Aractingi *et al.*, 2012)

Le **diagnostic différentiel** peut également consister à différencier entre les divers types de dermatoses et d'eczémas qui peuvent exister. Ces dermatoses et eczémas, provoqués ni par des agents irritants, ni par des agents allergisants, comprennent la dermatite atopique; la dermatite séborrhéique; le psoriasis; et la dysidrose ou l'eczéma dysidrosique. La dermatite atopique se caractérise par une réaction inflammatoire chronique accompagnée d'une sécheresse et d'un prurit cutanés (Nicolas *et al.*, 2005). La dermatite séborrhéique est une dermatose érythématosquameuse chronique très fréquente touchant les zones séborrhéiques du corps telles que le visage et le cuir chevelu. Le psoriasis est une dermatose héréditaire caractérisée par des papules et des plaques squameuses, récidivantes et chroniques. La dysidrose se caractérise principalement par des vésicules très prurigineuses et dures des faces latérales des doigts des mains ou des pieds. Elle est idiopathique et s'accompagne parfois de lésions palmo-plantaires (Aractingi *et al.*, 2012).

1.2.2. Les tests

Afin d'identifier la substance à l'origine de l'EAC, plusieurs types de tests existent. Parmi ces tests, les tests épicutanés et les tests d'application ouvert itératif (ROAT, repeated open application test) sont utilisés (Tennstedt *et al.,* 2012).

Les **tests épicutanés** sont réalisés à distance de la réaction inflammatoire, en l'absence de lésions cutanées chez le patient. En général, les patch tests s'effectuent au niveau du dos (**Figure 18**) (Jullien and Faure, 2000). Ces tests cherchent à reproduire la lésion de manière

expérimentale sur une zone limitée avec une molécule parfaitement définie. Ils sont appliqués sur la peau saine du dos avec une série de molécules sous occlusion pendant 48 h. La lecture est effectuée à 48 h et elle est suivie d'une seconde lecture à 72 h. En fonction des réactions observées, le test est dit positif ou négatif (**Figure 19**) (Lachapelle and Maiback 2009).

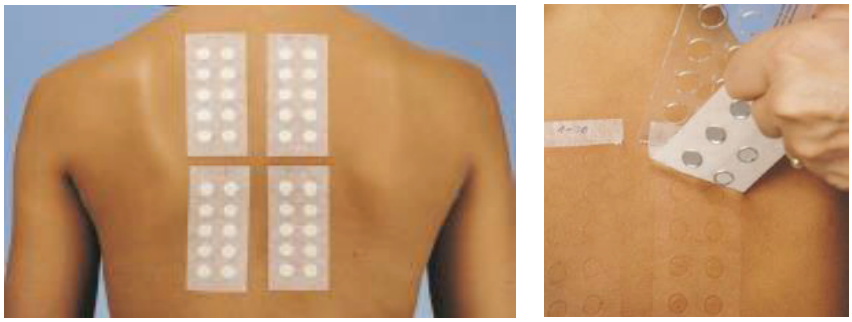


Figure 18 : Tests épicutanés ou patch tests (Aractingi *et al.*, 2012)

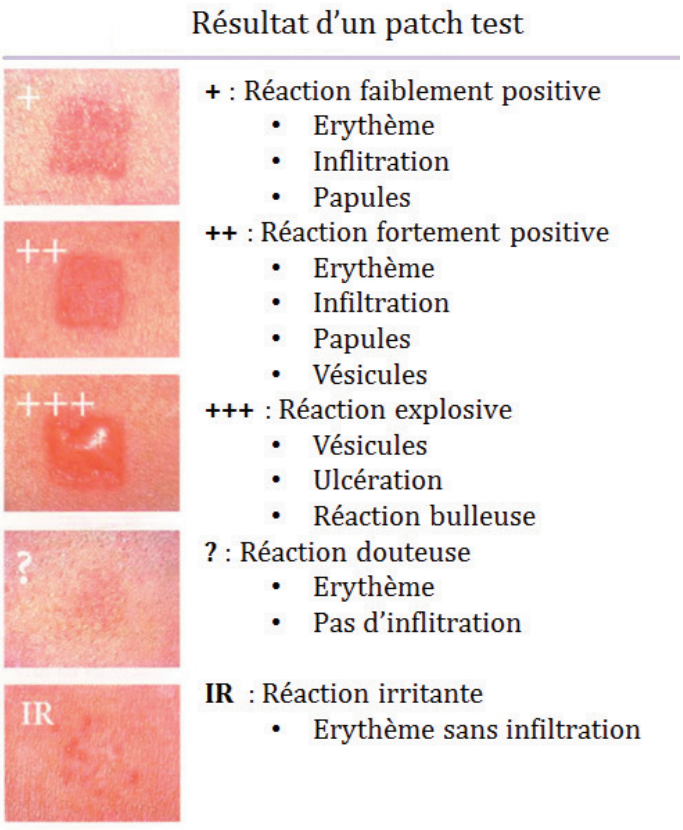


Figure 19 : Les différentes réactions observées suite à un patch test (Tennstedt *et al.*, 2012)

Par ailleurs, les **tests ouverts répétitifs ou "repeated open application test" (ROAT)** sont également utilisés dans le diagnostic de l'EAC. Ces tests consistent à appliquer le produit à tester deux ou trois fois par jour au niveau du pli du coude ou de l'avant-bras, et ce pendant au moins une semaine (Goossens, 2006).

1.3. Le traitement

Après identification de l'agent de contact en cause de l'allergie, l'éviction de l'agent est l'élément clef du traitement. Cependant, le traitement doit être commencé même en l'absence de cause non identifiée.

Le traitement consiste à traiter les symptômes de la réaction inflammatoire cutanée causée par l'agent de contact. Il repose dans un premier temps par un traitement aux corticoïdes topiques sous forme de pommade ou gel deux fois par jour pendant une à deux semaines et dans un second temps par l'utilisation d'émollients gras (Sasseville, 2008). Tous les hydratants, lotions et produits topiques doivent être arrêtés excepté la vaseline pure utilisée si nécessaire sur les zones sèches de la peau (Habif et al., 2012).

A la phase aiguë suintante de l'EAC, les corticoïdes puissants sont utilisés sous forme de lotion ou de crème servant à diminuer l'inflammation (Duteau, 2006). Au cours de cette phase suintante, les crèmes émollientes grasses ne sont pas utilisées. Lorsque la lésion cutanée devient sèche, les corticoïdes sous forme de pommades associés à des émollients gras tels que le Cerat frais de Galien ou le cold cream sont utilisés (Imbesi *et al.*, 2011). L'amélioration conduit à diminuer progressivement l'utilisation des corticoïdes et à la remplacer par celle des émollients gras. Si l'EAC devient répandu et sévère à cause d'une surinfection, des corticoïdes systémiques doivent être utilisés pour une courte durée (3 à 7 jours) (Saint-Mezard *et al.*, 2004; Imbesi *et al.*, 2011). En parallèle, la surinfection de la lésion cutanée nécessite une antibiothérapie générale active contre les bactéries $Gram^+$ surtout contre le *Staphylococcus aureus* telle que la pristinamycine (Pyostacine®) et l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique (Augmentin®) (Aractingi *et al.*, 2012).

2. Les molécules chimiques allergisantes

2.1. Caractéristiques physico-chimiques des molécules chimiques allergisantes

Les molécules chimiques allergisantes sont caractérisées par un faible poids moléculaire (PM) inférieur à 500 Daltons et sont appelées "haptènes" (Lepoittevin, 2006). Le terme "haptène" a été défini pour la première fois par Landsteiner et Jacobs en 1935 (Landsteiner and Jacobs, 1935). Pour acquérir un pouvoir sensibilisant, la molécule doit se lier avec les acides aminés nucléophiles des protéines cutanées pour former un complexe haptène-protéine immunogène (Lepoittevin, 2006). Ce complexe immunogène est capable de déclencher une réponse immunitaire (Divkovic *et al.*, 2005).

Une fois ce complexe haptène-protéine formé, il est alors pris en charge par les CPA et présenté aux cellules T engendrant une réponse immunitaire à médiation cellulaire et spécifique de l'haptène telle que l'EAC (Kaplan *et al.*, 2012). L'interaction entre l'haptène et la protéine se fait soit par la formation de liaisons covalentes soit par des liaisons de coordination.

2.1.1. Les liaisons covalentes

Les liaisons covalentes sont des liaisons très stables et peuvent se former par un mécanisme à deux électrons pour les réactions de type nucléophile (donneur d'électron)-électrophile (receveur d'électron). Un mécanisme de type radicalaire lorsque les espèces impliquées génèrent des intermédiaires réactifs à un électron est également envisageable (Aptula *et al.*, 2007) (**Figure 20**).

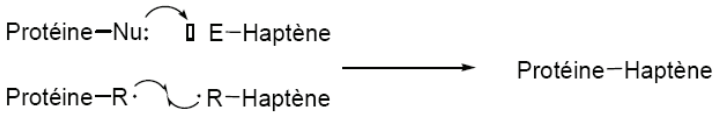


Figure 20 : Les liaisons covalentes (Aptula *et al.*, 2007)

Les protéines comportent de nombreux résidus riches en électrons, en particulier au niveau des chaînes latérales des acides aminés contenant des atomes nucléophiles tels que l'azote, l'oxygène et le soufre (Lepoittevin and Cribier, 1998). La liaison covalente se fait entre les groupements nucléophiles des protéines tels que les groupements thiols (-SH) de la cystéine ou amines (-NH2) de la lysine et les haptènes (Divkovic *et al.*, 2005). Les acides aminés tels que la méthionine, la tyrosine et l'histidine possèdent aussi des propriétés nucléophiles (Karlberg *et al.*, 2008) (**Figure 21** et **Tableau 7**).

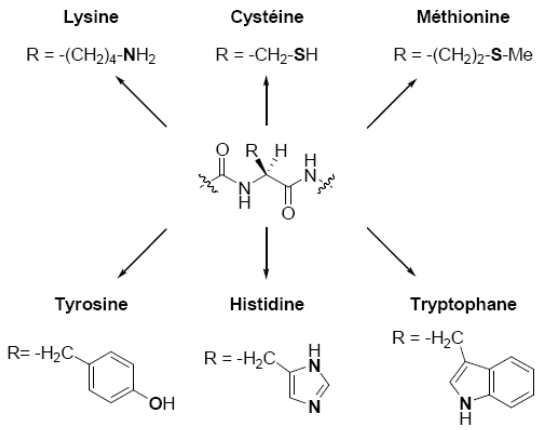


Figure 21 : Les principaux acides aminés nucléophiles susceptibles de réagir avec les haptènes (Lepoittevin and Cribier, 1998).

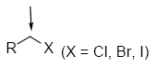
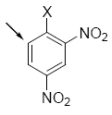
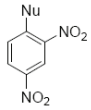
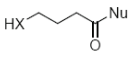
Sites réactifs électrophiles	Mécanismes de réaction	Adduits formés
 (X = Cl, Br, I) Dérivé halogéné	Substitution nucléophile sur un centre saturé	
 (X = Cl, Br, I) Dérivé halogéné aromatique	Substitution nucléophile aromatique	
 Epoxyde	Substitution nucléophile sur un centre saturé	
 Ester : R' = OR'' Amide : R' = NHR''	Substitution nucléophile sur un centre insaturé	
Aldéhyde : R' = H Cétone : R' = alkyle, aryle	Addition nucléophile	
 Systèmes carbonyle α,β-insaturés	Addition nucléophile	
 (X = O, NH) Lactone, lactame	Substitution nucléophile sur un centre insaturé	

Tableau 7 : Fonctions chimiques électrophiles des haptènes et les mécanismes de réactions associés en présence d'un nucléophile (Nu) (Lepoittevin and Cribier, 1998)

2.1.2. Les liaisons de coordination

Les liaisons de coordination sont des liaisons faibles. Elles s'effectuent avec certains ligands électrophiles des protéines tels que l'azote, l'oxygène ou le soufre (Basketter *et al.*, 1995). Elles sont fréquemment retrouvées dans le cas des métaux. Ces liaisons sont réversibles (Thierse *et al.*, 2005).

Les métaux tels que le nickel (Ni), le chrome (Cr), le cobalt (Co), le béryllium, le platine et l'or sont capables d'effectuer des liaisons de coordination (Chipinda *et al.*, 2011). Ces liaisons sont suffisamment stables pour être pris en charge par le système immunitaire (Thierse *et al.*, 2005). Le Ni sous sa forme Ni^{2+} forme un complexe en plan carré avec quatre ligands alors que le cobalt Co^{2+} forme un tétraèdre et le chrome Cr^{2+} forme un tétraèdre (Basketter *et al.*, 1995) (**Figure 22**). Le Ni interagit principalement avec des histidines, en particulier celles de

certaines molécules du CMH de classe II permettant ainsi une différenciation de LT spécifique du Ni (Romagnoli *et al.*, 1991; Thierse *et al.*, 2004; Thierse *et al.*, 2005).

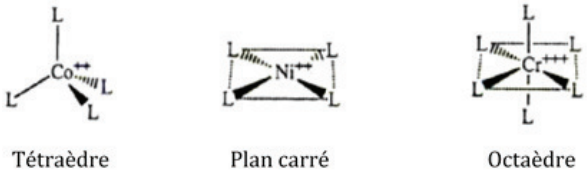


Figure 22 : Exemples de liaisons de coordination effectuées par les métaux (Basketter *et al.*, 1995) (L : ligand)

2.2. Les différents types d'haptènes

Les haptènes peuvent être classés en trois catégories selon leur réactivité chimique : les haptènes vrais, les pro-haptènes et les pré-haptènes (**Figure 23**).

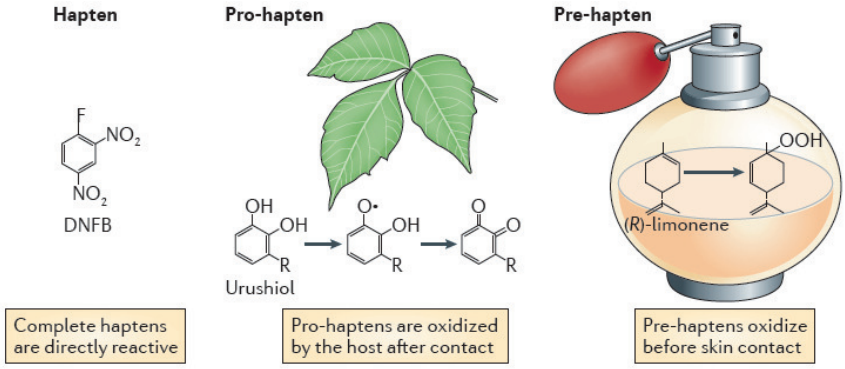


Figure 23 : Les différentes catégories d'haptènes (Kaplan *et al.*, 2012)

2.2.1. Les haptènes vrais

Les haptènes vrais sont souvent des molécules électrophiles ayant une réactivité intrinsèque et capables d'induire un EAC en se liant covalemment avec les protéines de la peau (Divkovic *et al.*, 2005). La majorité des haptènes tels que le DNFB, le 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB) (**Figure 24**), l'héxylcinnamaldéhyde (HCA) et la pénicilline interagissent de façon covalente avec des résidus nucléophiles des protéines (Aptula *et al.*, 2007) comme déjà décrit dans le paragraphe 2.1.1.

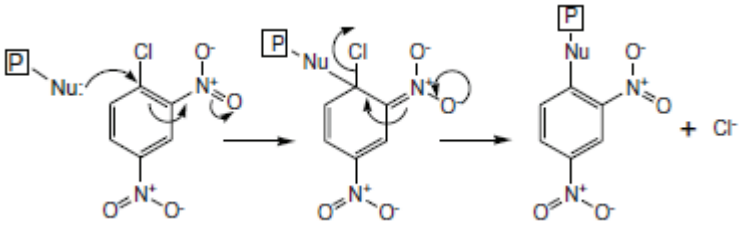


Figure 24 : Interaction du DNCB avec les résidus nucléophile des protéines (Aleksic *et al.*, 2007), P : protéine – Nu : nucléophile

2.2.2. Les pro-haptènes

Il s'agit de molécules ne présentant pas de réactivité intrinsèque et ne pouvant pas se fixer aux protéines quand elles pénètrent la peau (Divkovic *et al.*, 2005). Elles nécessitent une biotransformation par les enzymes de métabolisation aboutissant à des métabolites réactifs. En effet, les processus de détoxication, impliquant les isoenzymes de la superfamille des cytochromes P (CYP)-450, les monoxygénases, les estérases, les époxydes hydrolases, les transférases ou les réductases, peuvent dans certains cas être responsables de la formation de nouvelles espèces chimiques très réactives (Divkovic *et al.*, 2005). L'alcool cinnamique est un exemple de pro-haptène. En effet, l'alcool cinnamique doit être oxydé *in vivo* avant de devenir l'aldéhyde cinnamique, très réactif vis-à-vis des résidus nucléophiles (**Figure 25**) (Smith *et al.*, 2000).

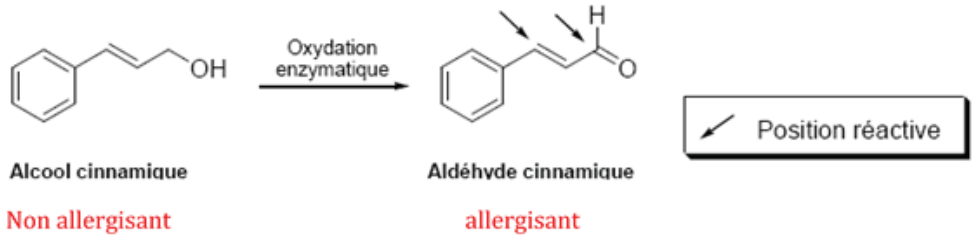


Figure 25 : Oxydation de l'alcool cinnamique en aldéhyde cinnamique (Smith *et al.*, 2000)

Un autre exemple de pro-haptène est l'urushiol ou le pentadecylcatéchol qui appartient à la famille des catéchols et il est présent dans le poison ivy ou *Rhus radicans* (**Figure 23** et **Figure 26**) (Kaplan *et al.*, 2012).

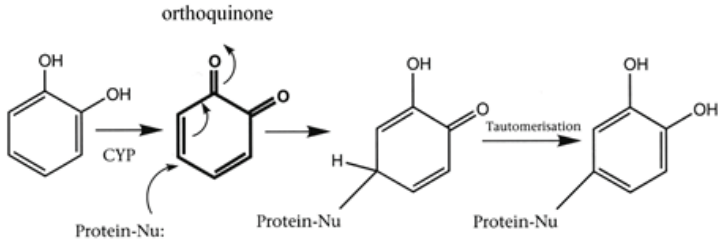


Figure 26 : Addition d'une protéine nucléophile sur une orthoquinone dérivée d'un catéchol *D'après Smith C. & Hotchkiss S., Allergic contact dermatitis, 2001*

2.2.3. Les pré-haptènes

Le terme de pré-haptène a été introduit par Lepoittevin en 2006 (Lepoittevin, 2006). Il s'agit de molécules non réactives transformées par des mécanismes non enzymatiques en dérivés radicalaires très réactifs (époxydes, hydroperoxydes). A titre d'exemple simple, de

nombreux terpènes non sensibilisants comme le *d*-limonène, présents dans les agrumes, peuvent donner des hydropéroxydes sensibilisants après oxydation par l'air (**Figure 27**) (Divkovic *et al.*, 2005).



Figure 27 : Auto oxydation à l'air du *d*-limonène (Divkovic *et al.*, 2005)

Un autre exemple est le cas de la *para*-phénylènediamine (pPD), utilisée comme ingrédient dans la composition de colorants comme les teintures capillaires, les colorants pour textiles et les colorants incorporés dans les caoutchoucs. La pPD est très rapidement oxydée à l'air favorisant ainsi la formation d'un ensemble de molécules réactives (Lepoittevin, 2006; Aptula *et al.*, 2007) (**Figure 28**).

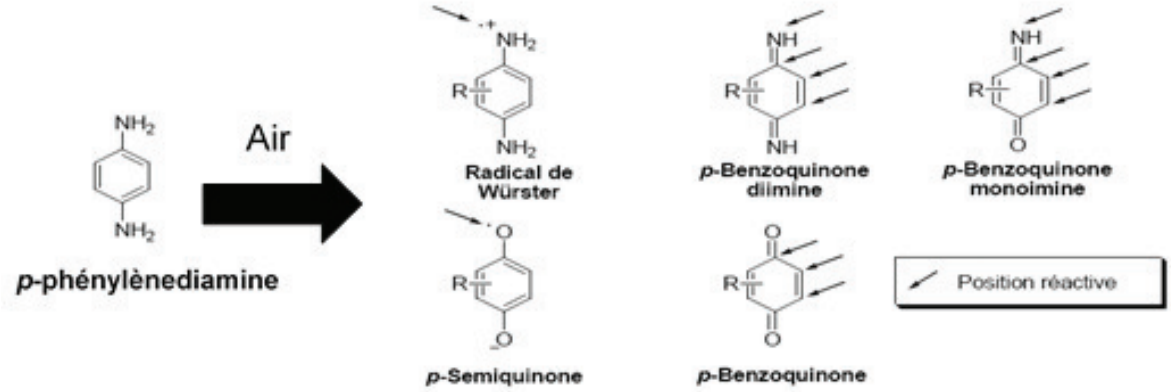


Figure 28 : Produits d'oxydation de la para-phénylènediamine (Lepoittevin, 2006; Aptula *et al.*, 2007)

2.3. Pénétration des haptènes à travers la peau

La peau constitue l'organe le plus important en contact avec le milieu extérieur (Milpied-Homsi *et al.*, 2009). Sa fonction de "barrière" vis-à-vis de l'environnement n'est pourtant pas absolue. Son degré de perméabilité varie en fonction de son état physiologique et des propriétés physicochimiques des composés et des adjuvants utilisés lors de leur application sur la peau (Milpied-Homsi *et al.*, 2009). Ainsi, toute altération de la couche cornée de l'épiderme s'accompagne d'une augmentation de la pénétration des substances exogènes (Honda *et al.*, 2013). Le vieillissement cutané qui se traduit par une sécheresse et une diminution de l'épaisseur de la peau entraînent une baisse d'efficacité de la "fonction barrière" de la peau (Roskos and Maibach, 1992; Garg *et al.*, 2001). Cette fonction de barrière

assurée par la peau empêche l'entrée des pathogènes dans l'organisme (Milpied-Homsi *et al.*, 2009). La première ligne de défense est assurée par la couche cornée. Au niveau de cette couche, la fillagrine, une protéine se trouvant au niveau de l'épiderme joue un rôle essentiel dans cette fonction de barrière (Honda *et al.*, 2013). L'absence de fillagrine constitue un facteur prédisposant de la dermatite atopique (Palmer *et al.*, 2006). Cependant aucune relation entre fillagrine et EAC n'a été montrée (Lerbaek *et al.*, 2007; Schnuch *et al.*, 2011). Par ailleurs, les jonctions serrées, se trouvant au niveau de la couche granuleuse, agissent comme une seconde barrière pour empêcher la pénétration des allergènes à travers la peau. Ces jonctions sont composées de diverses protéines telles que les claudines et les occludines au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme (Honda *et al.*, 2013).

Enfin, les haptènes, grâce à leur faible PM, peuvent pénétrer à travers la peau par deux voies distinctes (**Figure 29**) : la voie transépidermique et la voie des annexes cutanés tels que les follicules pilo-sébacés et les glandes sudoripares (Milpied-Homsi *et al.*, 2009). La substance peut diffuser par passage transcellulaire direct ou circuler entre les cellules. La vitesse de diffusion est alors très différente car le trajet intercellulaire est beaucoup plus long. Les molécules de très petite taille ont également la possibilité de pénétrer en passant par les glandes sudoripares ou par les follicules pilo-sébacés. Ceci leur permet d'éviter la couche lipidique cutanée et donc de pénétrer plus rapidement (Schaefer and Lademann, 2001).

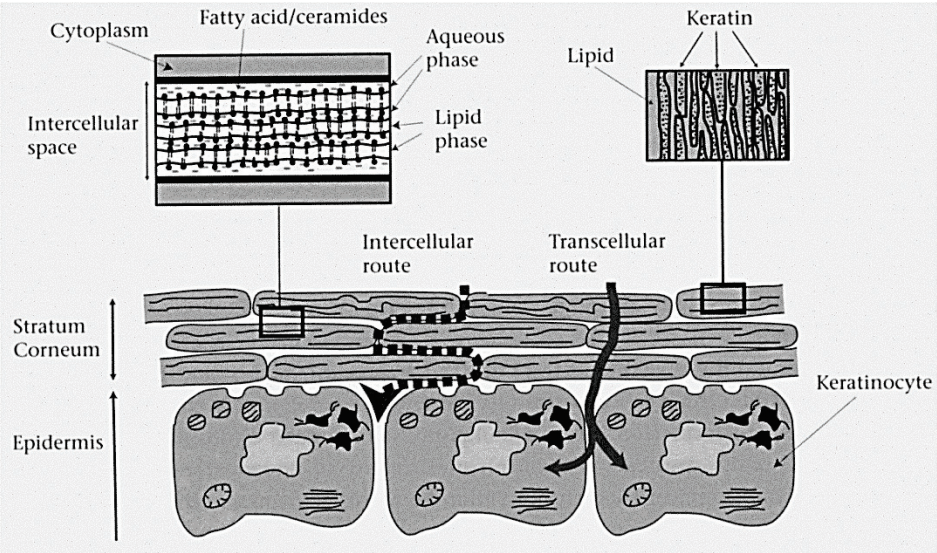


Figure 29 : Voies de pénétration empruntées par les molécules exogènes pour pénétrer dans l'épiderme.

D'après Smith C. & Hotchkiss S., Allergic contact dermatitis, 2001

Dans la majorité des cas, les deux voies sont impliquées dans la pénétration des molécules à travers la peau (Milpied-Homsi *et al.*, 2009).

La faible poids moléculaire et la lipophilie des haptènes sont les deux paramètres favorisant la pénétration rapide à travers l'épiderme. Les composés ionisés passent généralement difficilement à travers l'épiderme (Lepoittevin, 2006).

3. Les mécanismes cellulaires de l'eczéma allergique de contact

L'EAC est caractérisé par une réaction inflammatoire cutanée médiée par les LT (Krasteva *et al.*, 1999). Ainsi, la réaction immunopathologique de l'EAC se déroule en deux temps. La première phase est la sensibilisation de l'individu à l'haptène appelée phase de sensibilisation. Celle-ci est cliniquement muette et sera suivie par une phase de révélation ou d'élicitation lors d'une réexposition au même haptène ou à un haptène de structure chimique analogue (Vocanson *et al.*, 2006).

Lors de l'application de l'haptène sur la peau, celui-ci va traverser la couche cornée et va interagir avec les protéines présentes dans l'épiderme. Ce complexe haptène-protéine devient immunogène et il est donc capturé par les différentes DC de la peau (LC et les DDC) (Kaplan *et al.*, 2008; Honda *et al.*, 2013).

Les DC activées migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques drainants où elles présentent les peptides hapténisés aux lymphocytes T naïfs (**Figure 30**). La migration survient suite à la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires sécrétées par les KC et les cellules cutanées. Parmi ces cytokines, l'IL-1β et le TNF-α participent à la maturation et à la migration des LC vers les ganglions lymphatiques (Cumberbatch *et al.*, 1997a). Une fois dans les ganglions, les LT exprimant les TCR spécifiques des peptides hapténisés sont activés induisant la prolifération de LT $CD4^+$ et $CD8^+$ spécifiques de l'haptène (Vocanson *et al.*, 2009).

Les LT $CD8^+$ rejoignent le tissu cutané par la circulation sanguine. Ces LT $CD8^+$ migrent vers la peau grâce à l'expression de marqueurs associés au recrutement cutané telle que la molécule CLA et le récepteur de chimiokines CCR4 (Campbell *et al.*, 1999; Santamaria-Babi, 2004). Au cours de cette phase, les LT $C8^+$ se différencient en LT $CD8^+$ mémoires dont une partie est recrutées au niveau de la peau. Lors d'une ré-application cutanée de l'haptène, les peptides hapténisés sont directement présentés par les DC aux LT mémoires. Il s'ensuit une réaction inflammatoire ; c'est la phase de révélation de l'eczéma de contact (Honda *et al.*, 2013).

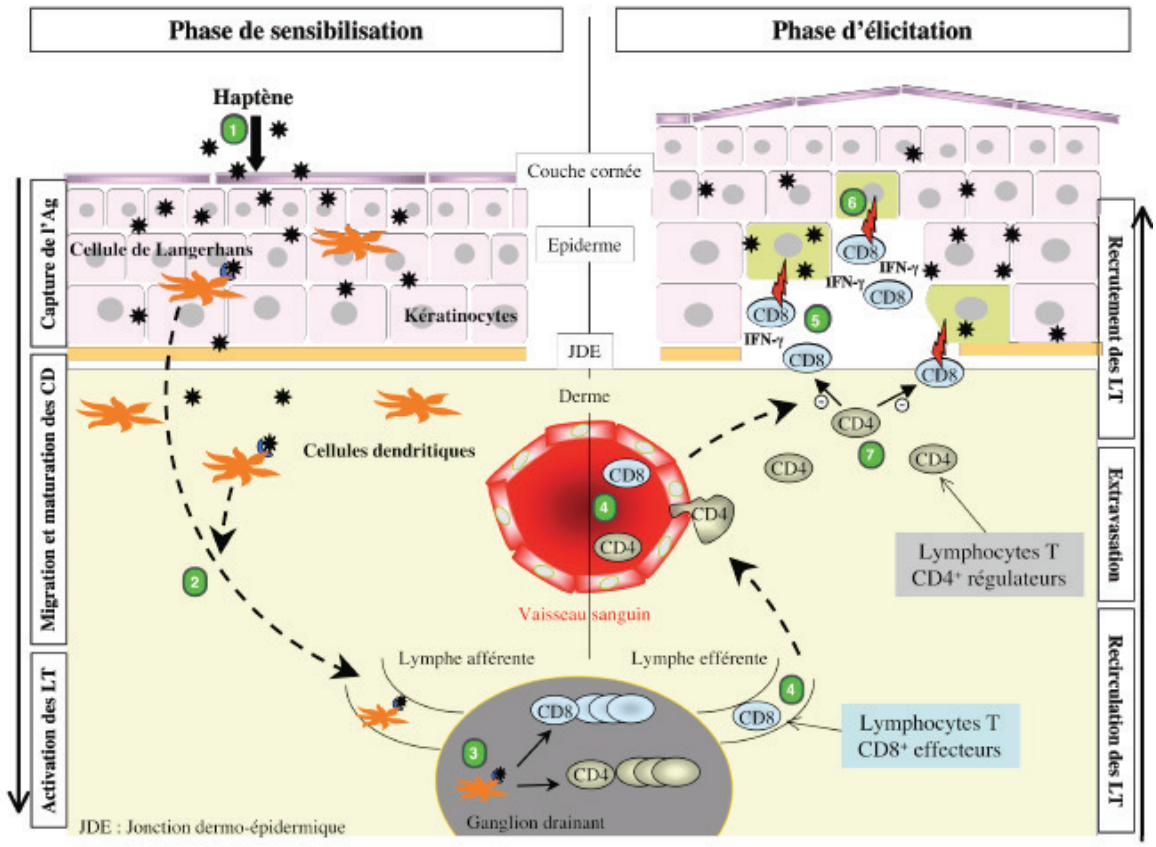


Figure 30 : Mécanisme cellulaire de l'eczéma de contact (figure modifiée d'après (Saint-Mezard *et al.*, 2004)

3.1. La phase de sensibilisation de l'eczéma allergique de contact

Cette phase concerne uniquement les individus exposés pour la première fois à l'haptène. Elle dure 10 à 15 jours chez l'homme et 5 jours chez la souris. Elle aboutit à la production de LT mémoires spécifiques de l'haptène qui migrent ensuite dans la peau (Vocanson *et al.*, 2009).

3.1.1. Rôle des cellules dendritiques

Au vue de la littérature, parmi les cinq populations de DC cutanées [partie I (cf. page 6)], les LC et les DDC sont majoritairement impliquées dans l'EAC.

- **Activation des cellules dendritiques**

En présence d'un haptène, les DC activées induisent le déclenchement de la phase de sensibilisation. Cette activation des DC peut être soit directe par les haptènes soit indirecte par la reconnaissance des DAMP ou des PAMP *via* les TLR ou les NLR (Honda *et al.*, 2013).

- **Activation indirecte *via* les TLR ou les NLR**

Parmi les TLR, le **TLR2** et le **TLR4** jouent un rôle important dans l'induction de l'HSC en réponse au TNCB. Ainsi, les souris doublement déficientes pour les gènes codant pour *tlr2* et *tlr4* ne développent pas de réaction d'HSC en présence du TNCB (Martin *et al.*, 2008).
Par ailleurs, le nickel, connu pour être une des causes les plus fréquentes de l'EAC chez l'Homme, est un activateur sélectif du **TLR4** humain. Il a été montré que les trois résidus His reconnus par le TLR4 chez l'homme différaient de ceux de la souris et justifie ainsi l'incapacité du nickel à induire une HSC chez la souris (Schmidt *et al.*, 2010) (**Figure 31**).

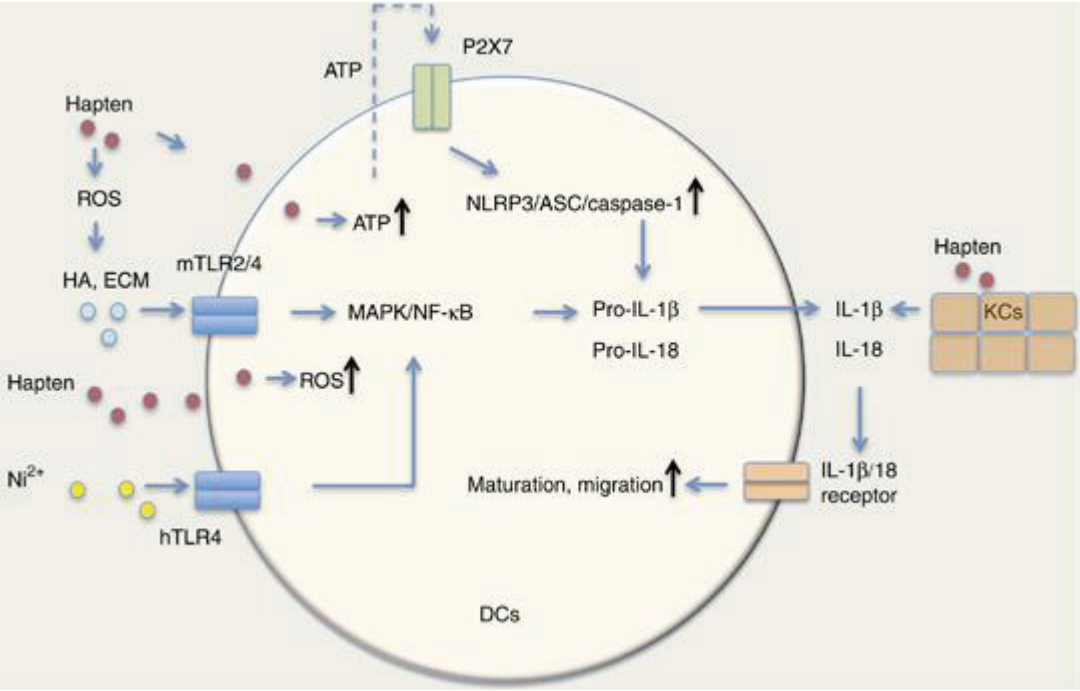


Figure 31 : Activation des cellules dendritiques par les molécules allergisantes (haptènes et nickel) (Honda *et al.*, 2013)

L'activation indirecte des DC se caractérise aussi par la capacité des haptènes à activer les KC d'une manière dépendante des récepteurs **NLR** (Honda *et al.*, 2013). Parmi ces NLR, le NLRP3 contrôle la production de cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1β et l'IL-18, *via* l'activation de la caspase-1 (Sutterwala *et al.*, 2006; Antonopoulos *et al.*, 2008). Les études utilisant des modèles de souris déficientes pour le gène codant pour le *nlrp3* ou pour sa protéine adaptatrice 'apoptosis-associated speck-like protein' *(asc)* ont montré une inhibition de la production d'IL-1β et d'IL-18 par les KC en réponse au TNCB ou au DNFB (Watanabe *et al.*, 2007a; Watanabe *et al.*, 2008). Les souris *il-18*$^{-/-}$ sensibilisées au DNFB ou à l'oxazolone montrent une diminution de la réponse inflammatoire d'origine allergique par rapport aux

souris sauvages car l'IL-18 est une cytokine jouant un rôle dans la migration des DC (Antonopoulos *et al.*, 2008).

- **Activation directe *via* les ERO, l'ATP ou le récepteur P2X7**

La DC peut être aussi activée *via* la production d'ERO induite en réponse à des molécules allergisantes. Ainsi, le TNCB induit la dégradation de l'acide hyaluronique (HA), un composant de la matrice extracellulaire, *via* la production d'**ERO** par les DC (Esser *et al.*, 2012). L'inhibition de la dégradation de l'HA par l'inhibiteur pep-1 (Martin *et al.*, 2008) ou par l'acide aristolochique, un inhibiteur de l'activité hyaluronidase (Esser *et al.*, 2012), réduit la réponse d'HSC en réponse au TNCB (Martin *et al.*, 2008; Esser *et al.*, 2012).

Les voies impliquant l'adénosine triphosphate (**ATP**) et le récepteur prurinergique (**P2X7**) participent aussi à l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les haptènes. L'ATP est un nucléotide intracellulaire relargué par les cellules en stress (inflammation, hypoxie, trauma) ou les cellules mourantes (Martin *et al.*, 2011). L'ATP extracellulaire est reconnu par des récepteurs purinergiques tels que les récepteurs P2X qui sont des protéines transmembranaires capables de former des canaux ioniques (Surprenant and North, 2009). Après fixation du ligand, le récepteur P2X7 (P2X7R) ouvre un canal cationique qui entraîne un influx de Ca^{2+} et Na^{+} et un efflux de K^{+} (Surprenant and North, 2009). Martinon *et al.,* ont montré que l'activation de l'inflammasome NLRP3 est médié par le ligand P2X7 *via* un efflux de K^{+} (Martinon *et al.*, 2009). Chez les souris déficientes pour le gène codant pour *p2x7,* aucune réaction d'HSC n'a été observée en réponse au TNCB ou à l'oxazolone (Weber *et al.*, 2010). Ces deux molécules sont capables de produire de l'ATP dans les cellules cutanées de souris sensibilisées contrairement aux souris contrôles (Martin *et al.*, 2011). Cependant l'absence de ligand et par conséquent de signalisation ATP/P2X7R n'active pas le NLRP3 (Weber *et al.*, 2010). Par ailleurs, les souris déficientes pour le gène codant pour *nlrp12* montrent un défaut de migration des DC dans les ganglions lymphatiques drainants et une réduction de l'infiltrat de PN au niveau de la peau. Ceci se traduit par une forte diminution de la réponse d'HSC en réponse à l'oxazolone ou à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (Arthur *et al.*, 2010).

- **Migration des cellules dendritiques**

La migration des DC requiert plusieurs phénomènes. La diminution de l'expression de certaines molécules d'adhésion telles que l'E-cadhérine conduit au détachement des DC des

KC (Jakob and Udey, 1998). Au cours de la migration de l'épiderme vers les ganglions lymphatiques, les LC et les DC acquièrent de nouvelles molécules d'adhésion à leur surface leur permettant ainsi de se fixer sur les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques. L'expression membranaire du CD54 (Ozawa *et al.*, 1996), de l'α6 intégrine (Price *et al.*, 1997) et du CD44 (Osada *et al.*, 1995) semble être essentielle à la migration des DC. En effet, chez les souris déficientes en *cd54,* l'application cutanée du DNFB induit une réaction inflammatoire beaucoup plus faible que chez les souris sauvages (Sligh *et al.*, 1993). La neutralisation du CD54 (Ma *et al.*, 1994) ou de son ligand, LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1) (Xu *et al.*, 2001), inhibe la migration des DC vers les ganglions lymphatiques en réponse au FITC. Les souris déficientes en *cd54* ou en *l-selectine* montrent une réduction significative des LT $CD4^+$ et $CD8^+$ recrutés au niveau de peau enflammée par rapport aux souris sauvages (Ogawa *et al.*, 2010).

Les métalloprotéases matricielles (MMP) constituent une famille de protéases comprenant les collagénases et les gélatinases participant également à la migration des cellules (Salmi and Jalkanen, 2005) et jouent un rôle important dans la migration des DC (Martin-Fontecha *et al.*, 2009). Les MMP sont exprimées à la surface des cellules immunitaires telles que les LC et les DC permettant une protéolyse facilitant la migration de ces DC vers les ganglions lymphatiques (Murphy and Gavrilovic, 1999). Les MMP dégradent les composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, permettant à la LC de se détacher de la membrane basale (Verma and Hansch, 2007; Martin-Fontecha *et al.*, 2009). Parmi les MMP, la MMP-2 et la MMP-9 sont les principales impliquées dans la dégradation du collagène. MMP-9 (gélatinase B) est sécrétée sous forme d'une pro-enzyme inactive (pro-MMP-9) par différents types cellulaires tels que les macrophages, les monocytes et les DC activés. La pro-MMP-9 est ensuite clivée par d'autres MMP telles que la MMP-2 (gélatinase A), la MMP-3 (stromelysine-1) et la MMP-13 (collagénase 3) et peut agir à la fois comme une protéase sécrétée ou une protéase membranaire (Van den Steen *et al.*, 2002). Par ailleurs, la MMP-9, exprimée au niveau des LC épidermales, est induite par les cytokines pro-inflammatoires (TNF-α et IL-1β) (Saren *et al.*, 1996).

Le traitement des LC épidermales par une molécule allergisante telle que le DNCB, le TNCB ou le DNFB induit une expression protéique de la MMP-9 ainsi qu'une libération de cette protéase dans le surnageant de ces cellules (Kobayashi, 1997). Cette étude a ainsi montré que les MMP semblent essentielles dans l'induction de l'HSC. Une autre étude a montré que l'inhibition spécifique des MMP réprime la migration induite par le nickel (Lebre

et al., 1999). Wang *et al.*, ont montré que les souris déficientes en *mmp-3* ne développent pas de réaction d'HSC en réponse au DNFB (Wang *et al.*, 1999). D'autres équipes en utilisant des Ac anti-MMP-9 ou des inhibiteurs spécifiques, ont mis en évidence l'importance de la MMP-9 dans l'initiation des réactions d'HSC induites par différents haptènes tels que l'oxazolone, le DNFB, le DNTB et la Rhodamine B, chez la souris mais également dans la migration de DC provenant d'explants de peau murine ou humaine (Kobayashi *et al.*, 1999; Ratzinger *et al.*, 2002). Par conséquent, la MMP-9 tout comme la MMP-2 et la MMP-3, sont impliquées dans l'initiation de l'HSC en participant à l'induction de la migration des LC et des DC.

Les chimiokines et leurs récepteurs jouent également un rôle important dans la réaction d'HSC, en contrôlant la migration des DC. Les DC ayant migrées de la peau vers les ganglions expriment le récepteur CCR7 (Yanagihara *et al.*, 1998). Deux chimiokines se lient à CCR7, le CCL21 et le CCL19. Ainsi, les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques sécrètent le ligand de CCR7, le CCL21 exprimé par les veinules endothéliales à l'entrée des ganglions lymphatiques (HEV) (Saeki *et al.*, 1999). Il a été montré que les souris déficientes en *ccr7* ne développent pas de réactions d'HSC en réponse au FITC (Forster *et al.*, 1999). De même, la neutralisation de CCL21, avant la sensibilisation des souris par le DNFB, l'oxazolone ou le FITC, inhibe la réaction d'HSC (Engeman *et al.*, 2000). Ainsi, le couple CCR7/CCL21 est essentiel quant à la migration des DC et à l'induction de la réponse HSC. L'autre ligand du CCR7, le CCL19 (MIP-3β), est exprimé au niveau du paracortex du ganglion et guide les LC et les DC vers les ganglions lymphatiques (Wang *et al.*, 2003). Ainsi, les interactions entre le CCL21, le CCL19 et le CCR7 sont importantes pour la migration des DC au cours de la phase de sensibilisation (**Figure 32**).

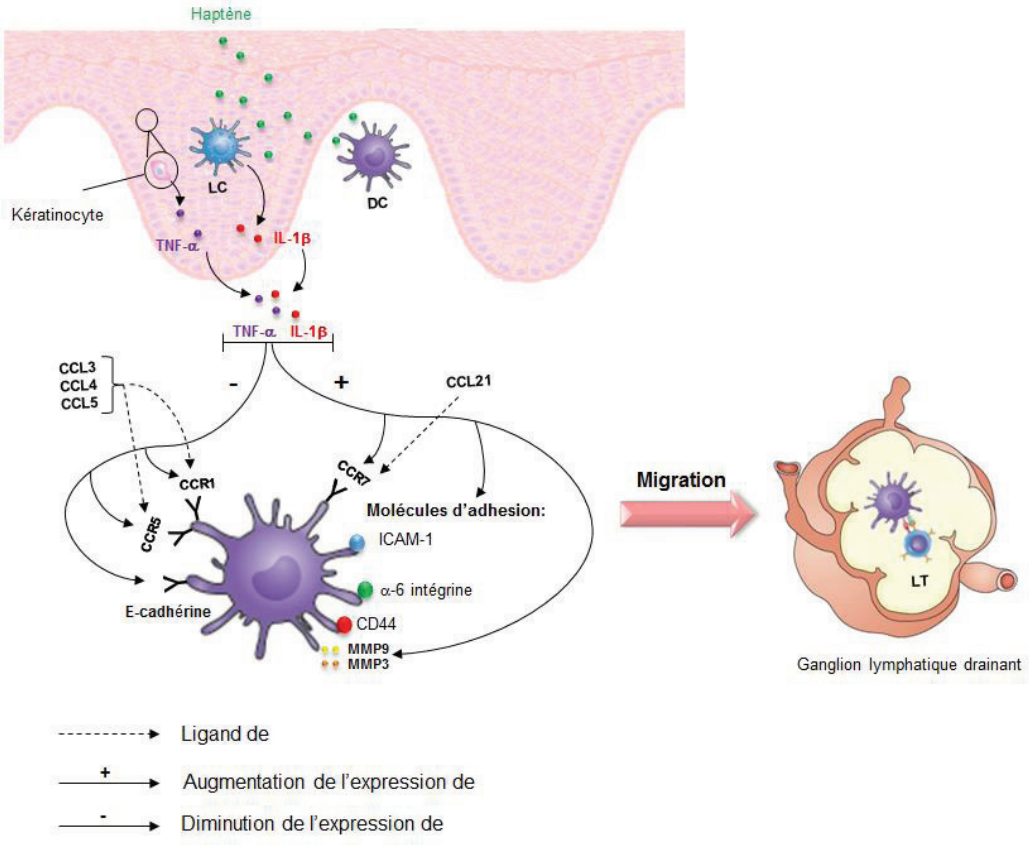


Figure 32 : Rôle des cytokines et chimiokines dans la migration des DC [figure modifiée d'après (Christensen and Haase, 2012)]

3.1.2. Rôle des kératinocytes dans la réaction d'hypersensibilité cutanée

En plus de leur fonction de protection cutanée, les KC jouent un rôle important dans la réaction d'HSC. Au cours de la phase de sensibilisation et suite à l'application d'un haptène tel que le TNCB ou le DNFB, les KC activés, induisent la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β, l'IL-18 (Watanabe *et al.*, 2007a; Watanabe *et al.*, 2008) et le TNF-α (Nakae *et al.*, 2003). La sécrétion de ces cytokines induit la maturation des DC et favorise leur migration vers les ganglions lymphatiques (Cumberbatch *et al.*, 1997a; Cumberbatch *et al.*, 1997b; Kabashima *et al.*, 2003). L'IL-1β et le TNF-α jouent un rôle central dans l'inhibition de l'expression de certains récepteurs de chimiokines présents à la surface des DC tels que le CCR1 et le CCR5. Les ligands de CCR1 et de CCR5 sont des chimiokines pro-inflammatoires telles que le CCL3 (MIP-1α), le CCL4 (MIP-1β) et le CCL5 (RANTES) qui favorisent la rétention des DC dans la peau (Sozzani *et al.*, 1998). La production d'INF-γ par les LT permet l'augmentation de l'expression de CD54 à la surface des KC et la production des chimiokines telles que CXCL8, CXCL9, CXCL10 et CXCL11 favorisant le recrutement de l'infiltrat cellulaire dans la peau (Albanesi *et al.*, 2001; Albanesi, 2010).

3.1.3. Rôle des mastocytes dans la réaction d'hypersensibilité cutanée

Le rôle des mastocytes dans l'HSC a fait l'objet de nombreuses études mais leur rôle est assez controversé (Kaplan *et al.*, 2012; Honda *et al.*, 2013). Certaines études ont montré que les souris déficientes en mastocytes (souris W/W^v et souris Sl/Sl^d) montrent une réduction de la réponse inflammatoire d'origine allergique en réponse au TNCB (Biedermann *et al.*, 2000). D'autres études ont montré que chez ces mêmes souris déficientes la réponse d'HSC est similaire à celle observée chez les souris sauvages en réponse au TNCB ou au DNFB (Galli and Hammel, 1984; Mekori and Galli, 1985). Grimbaldeston *et al.,* ont montré un rôle régulateur des mastocytes *via* une production d'IL-10 dans un modèle de souris WBB6F1-$Kit^{W/W\text{-}v}$ et B6-$Kit^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$. Ces souris présentent des mutations au niveau du gène *kit (CD117)*, connu aussi sous le nom du récepteur du facteur de croissance des mastocytes et des cellules souches (Mast/stem cell growth factor receptor) (Grimbaldeston *et al.*, 2007). Dans cette étude, les souris déficientes en mastocytes induisent une exacerbation de la réaction d'HSC en réponse à l'urushiol ou au DNFB (Grimbaldeston *et al.*, 2007). Cependant, ces souris déficientes en mastocytes présentent d'autres altérations immunologiques. En effet, les souris WBB6F1-$Kit^{W/W\text{-}v}$ développent une anémie, présentent un nombre réduit de PN, une absence de mélanocytes et sont stériles et les souris B6-$Kit^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$ sont capables de produire des auto-anticorps et de développer une arthrite médiée par les PN (Kalesnikoff and Galli, 2008). A cause de ces altérations immunologiques, ce modèle de souris déficientes ne semble pas être le meilleur modèle pour étudier le rôle des mastocytes dans la réaction d'HSC.

Deux autres modèles de souris transgéniques déficientes en mastocytes ont été développés par deux différents groupes (Dudeck *et al.*, 2011; Otsuka *et al.*, 2011).

Dudeck *et al.,* ont utilisé des souris présentant soit une déficience constitutive *via* l'expression de la sous-unité A de la toxine diphtérique (DTA) soit une déficience inductible des mastocytes *via* l'expression du récepteur de la toxine diphtérique simienne (DTR), et ce sous le contrôle du promoteur de la protéase 5 des mastocytes (Mcpt5) (Dudeck *et al.*, 2011). L'utilisation de ces deux modèles de souris déficientes en mastocytes a montré une diminution de la réponse d'HSC en réponse au DNFB ou au FITC (Dudeck *et al.*, 2011). Cette étude montre également une diminution de la migration des DC au cours de la phase de sensibilisation chez les souris déficientes en mastocytes. Par ailleurs, l'inflammation des oreilles des souris suite à l'application du DNFB ou du FITC est due à la dégranulation des mastocytes et la libération d'histamine (Dudeck *et al.*, 2011).

Otsuka et al., ont utilisé des souris transgéniques déficientes en mastocytes connues sous le nom de souris Mas-TRECK (Mast cell-specific enhancer-mediated Toxin Receptor-mediated Conditionnal cell Knock out). Ces souris expriment le récepteur de la toxine diphtérique humaine sous le contrôle d'un activateur intronique. En réponse au DNFB ou l'oxazolone, cette étude montre que la maturation et la migration des DC sont diminuées chez les souris transgéniques Mas-TRECK comparées aux souris sauvages. Ces mêmes souris transgéniques montrent également une diminution de la réponse d'HSC en réponse aux deux molécules testées (Otsuka *et al.*, 2011).

3.1.4. Rôle des lymphocytes B et du complément

Différentes études ont montré le rôle des LB dans la réaction d'HSC (Tsuji *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2003; Szczepanik *et al.*, 2003; Itakura *et al.*, 2005). Les LB sont divisées en deux sous-populations : les LB-1 et les LB-2. Les LB-1 sont trouvés au niveau de la cavité péritonéale et sont capables de produire des anti-IgM spécifiques de l'haptène. Ces Ac sont retrouvés dans la circulation (Tsuji *et al.*, 2002; Szczepanik *et al.*, 2003). En revanche, les LB-2 sont capables de migrer vers les organes lymphoïdes et sont dépendants des LT pour produire différents classes d'anticorps, les anti-IgG1, les anti-IgG2 et les anti-IgE (Askenase *et al.*, 2004). Il a été montré que dans l'heure qui suit la sensibilisation, les LB-1 se trouvant dans la cavité péritonéale sont activés (Itakura *et al.*, 2005). Ces cellules migrent ensuite dans la rate et les ganglions lymphatiques dans lesquels elles vont produire des IgM anti-haptène détectés au niveau sanguin 24 h après la sensibilisation (Itakura *et al.*, 2005) (**Figure 33**).

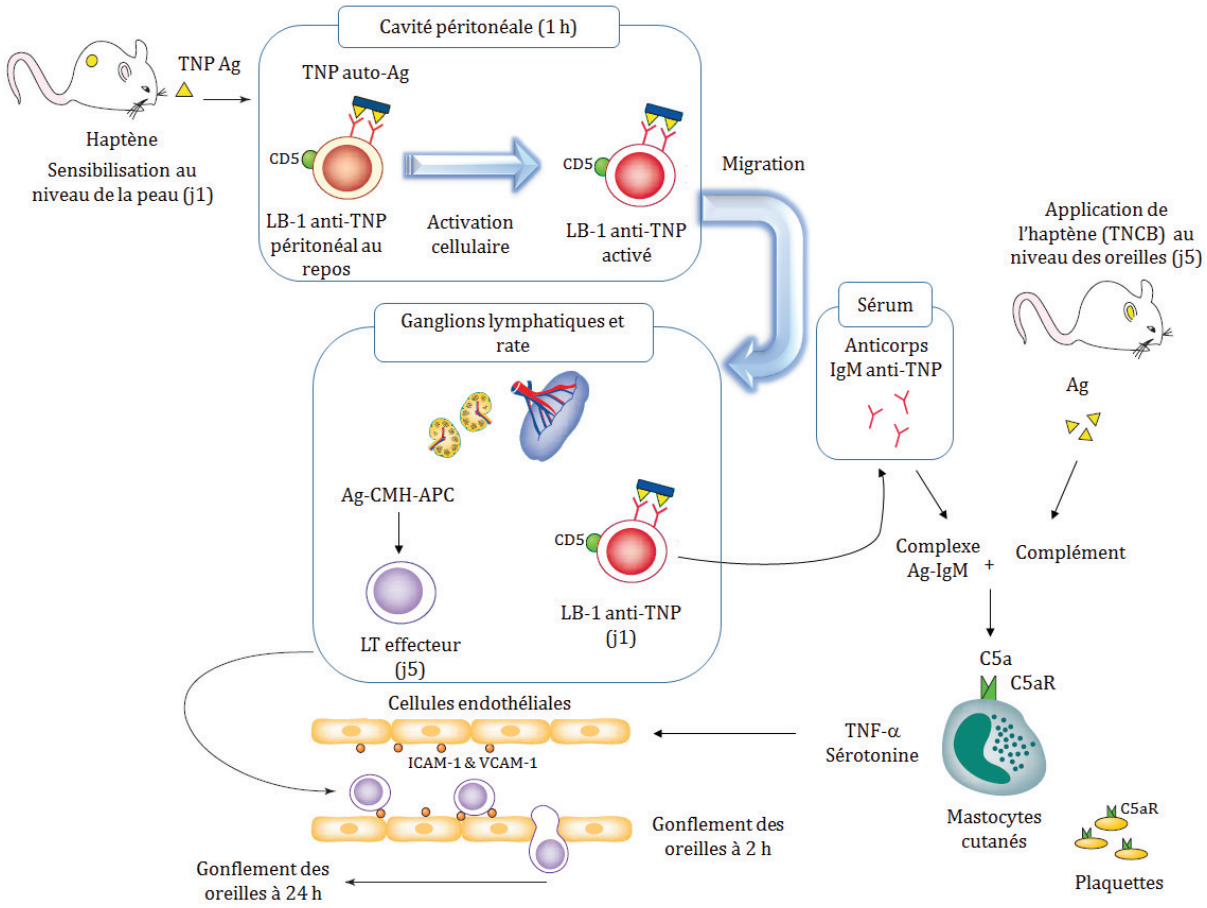


Figure 33 : Initiation de la réponse d'HSC par l'activation précoce des LB-1 péritonéaux [figure modifiée d'après (Askenase *et al.*, 2004; Itakura *et al.*, 2005)]

3.1.5. Activation des LT naïfs spécifiques des haptènes par les DC

Dans le ganglion lymphatique, les DC activées par les haptènes sont appelées DC matures (Villadangos and Schnorrer, 2007) et expriment de nombreuses molécules du CMH de classe I et II à leur surface leur permettant d'interagir avec les LT naïfs et les activer. L'activation des LT nécessite une combinaison de trois signaux distincts : l'interaction entre le TCR et le complexe CMH/peptide hapténisé (signal 1), les molécules de co-stimulation (signal 2) et la sécrétion des cytokines (signal 3) par les DC (Vocanson *et al.*, 2009) (**Figure 11**).

- **L'interaction entre le TCR et le complexe CMH/peptide hapténisé**

Le **premier signal** correspond à l'interaction du TCR du LT avec le complexe CMH/peptides hapténisés au niveau de la DC (Vocanson *et al.*, 2009).

Afin d'être reconnu par les LT, les haptènes doivent être remaniés par les DC afin de former des peptides hapténisés capables d'être reconnus par les molécules de CMH.

La reconnaissance des haptènes peut se faire selon trois cas de figure : un haptène vrai, un pro-haptène ou selon un modèle appelé 'pharmacological interaction concept' (p-i concept) (Posadas and Pichler, 2007).

Les haptènes, présentant une réactivité intrinsèque, sont capables de se fixer de façon covalente aux protéines extracellulaires telles que l'albumine, les protéines membranaires telles que les intégrines ou les protéines intracellulaires. Ces haptènes peuvent également se fixer directement aux molécules du CMH-I ou du CMH-II. Parmi les molécules les plus décrites les médicaments tels que la pénicilline et le sulfaméthoxazole (SMX) sont connus pour induire des réactions d'HSC (Qiao *et al.*, 2009; Rozieres *et al.*, 2010). La pénicilline par exemple est capable de se liée à l'albumine. Le complexe pénicilline-albumine est pris en charge par la DC qui le digère en peptides. Ceux-ci sont présentés *via* les CMH-I ou CMH-II aux LT CD8⁺ ou LTCD4⁺ respectivement (Posadas and Pichler, 2007; Adam *et al.*, 2011) (**Figure 34**).

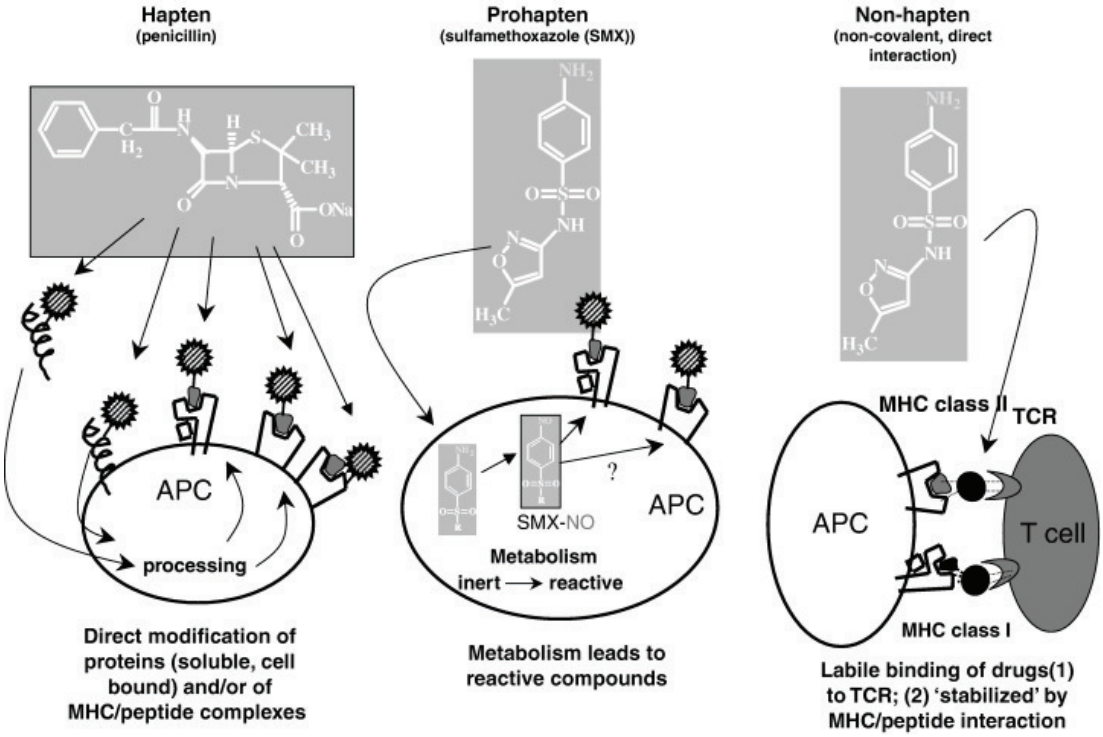


Figure 34 : Représentation de la reconnaissance hapténique par les LT (Posadas and Pichler, 2007)

Les pro-haptènes tels que le SMX nécessitent une étape de métabolisation pour être transformé en nitroso-sulfaméthoxazole (SMX-NO), molécule réactive, qui va se fixer aux protéines intracellulaires. Le complexe SMX-NO/protéine va être digéré par la DC en peptides qui seront présentés *via* le CMH-I aux LTCD8⁺ ou *via* le CMH-II aux LTCD4⁺ (Posadas and Pichler, 2007; Adam *et al.*, 2011) (**Figure 34**).

Le pi-concept est un concept proposé par Pichler concernant la reconnaissance de certains médicaments tels que la pénicilline ou la carbamazépine par les LT (Pichler, 2002). D'après ce concept, les médicaments seraient capables d'interagir directement avec le TCR des LT *via* des liaisons non covalentes induisant ainsi l'activation des LT (Posadas and Pichler, 2007) (**Figure 34**).

♦ Les molécules de co-stimulation

Grâce à la formation de la synapse immunologique entre les LT et les DC, le **second signal** d'activation lymphocytaire provient de l'interaction des molécules de co-stimulation telles que le CD40, le CD80 et le CD86 avec leurs ligands. Le CD80 et le CD86, retrouvés à la surface des DC, interagissent avec le CD28 exprimé sur les LT. Le CD28 est exprimé constitutivement sur les LT et particulièrement sur les LT naïfs (Vocanson *et al.*, 2009). Au cours de la maturation, les DC induisent l'expression du CD80 (B7-1) et du CD86 (B7-2) (Reiser and Schneeberger, 1996). Ce dernier est le principal ligand impliqué dans le deuxième signal. La liaison entre le CD86 et le CD28 est essentielle pour le développement d'une HSC (Kondo *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1997). Ainsi, aucune réponse d'HSC n'a été observée chez les souris déficientes pour le gène codant pour *cd28* en réponse au DNFB et à l'oxazolone (Kondo *et al.*, 1996). Par ailleurs, le CD40 et son ligand CD154, appartenant à la superfamille des récepteurs de TNF, sont aussi importants dans l'activation des LT naïfs (Chen *et al.*, 1999; Summers deLuca and Gommerman, 2012). L'interaction entre le CD40 et le CD154 amplifie le processus d'activation des LT se traduisant par une plus forte production de cytokines et une induction de molécules de co-stimulation telles que l'OX40L (CD252).

OX40 (CD134) est une molécule de co-stimulation appartenant à la superfamille des récepteurs de TNF et exprimée à la surface des LT naïfs (Ishii *et al.*, 2010). L'interaction entre OX40 et son ligand OX40L, exprimé à la surface des DC, induit une forte expression de CD80 et CD86 à la surface des DC. Les souris *ox40l*$^{-/-}$ montrent une forte diminution de la prolifération lymphocytaire et de la réponse d'HSC en réponse à l'oxazolone, le DNFB ou le FITC en comparaison avec les souris sauvages (Chen *et al.*, 1999).

Ainsi, en réponse à cette signalisation induite par le LT, la DC produit des cytokines qui participent à la différenciation lymphocytaire. Par exemple, l'IL-12 produite par les DC en présence du DNFB ou du TNCB oriente la différenciation des LT en LT CD8^{+} producteurs d'INF-γ (Koch *et al.*, 1996; Gorbachev *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2008).

♦ La sécrétion des cytokines par la DC

Le **troisième signal** est essentiel dans la différentiation des LT en différentes sous-populations T effectrices. La différenciation des LT CD4 est dépendante de cytokines sécrétées au cours de l'interaction entre la DC et le LT (Vocanson *et al.*, 2009). Ainsi, les LT naïfs se différencient en LT Th1, Th2 ou Th17 qui se distinguent par de leur profil de sécrétion en cytokines (**Figure 12**).

Selon les haptènes, certains ont été démontrés inducteurs de cytokines de type 2 tels que le FITC alors que d'autres sont inducteurs de la production de cytokine de type 1 tels que le DNCB, le DNFB et l'oxazolone (Gorbachev *et al.*, 2001; Gorbachev and Fairchild, 2001; Martin *et al.*, 2008).

Si la différenciation des LT naïfs en **Th17** est dépendante du TGF-β, chez la souris, chez l'Homme, cette cytokine n'est pas essentielle pour la différenciation des LT en Th17 (Awasthi and Kuchroo, 2009). L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire jouant un rôle dans la régulation de l'infiltration des leucocytes vers les tissus inflammatoires et dans la régulation de production de diverses cytokines et chimiokines telles que le Monocyte Chimioattractant Protein-1 (MCP-1), l'IL-10 et le MIP-1β (He *et al.*, 2009). Les souris déficientes pour le gène codant pour l'*il-17* ou l'*ifn-g* ne développent pas une HSC en réponse au DNFB par rapport aux souris sauvages (Nakae *et al.*, 2002; Kish *et al.*, 2009). Ces mêmes souris déficientes montrent une diminution de l'infiltration des cellules inflammatoires telles que les PN et les LT $CD8^+$ dans la peau. Chez les souris sauvages, les LT $CD8^+$ recrutés au niveau de la peau 18 h après le rappel par le DNFB produisent de l'IL-17 et de l'INF-γ (Kish *et al.*, 2009).

♦ La génération des lymphocytes T effecteurs

Au cours de la phase de sensibilisation et suite à l'activation des LT par les DC, une réponse de type 1 est déclenchée. Cette réponse favorise la différencitation des LT $CD8^+$ en LT cytotoxiques (CTL) sécétant des enzymes telles que la granzyme et la perforine, responsables des dommages tissulaires au niveau cutané, et des cytokines telles que l'IFN-γ et le TNF-α. En prallèle, les LT $CD4^+$ se différencient en cellules Th1 produisant à leur tour de l'IFN-γ, du TNF-α et de l'IL-2 (Kaech and Cui, 2012).

Après la clairance de l'haptène, les LT $CD8^+$ effecteurs subissent une phase de contraction durant laquelle la majorité des LT $CD8^+$ meurent par apoptose. Cependant, 5 à 10% des LT $CD8^+$ effecteurs survivent et se différencient en LT $CD8^+$ mémoires (Kaech and Cui, 2012).

La prolifération des LT CD8⁺ et leur différenciation en LT CD8⁺ mémoires dépend à la fois de la nature de l'haptène, de la dose initiale, de la voie d'administration, de la durée de contact avec l'haptène et de l'intensité de la réponse inflammatoire à la phase initiale. Ainsi, une durée de contact avec l'haptène inférieure à 20 h, entraîne un arrêt de la réponse proliférative des LT CD8⁺. Cependant si l'exposition à l'haptène persiste se traduisant par une inflammation chronique, les LT CD8⁺ étant épuisés ne se différencient pas en LT CD8⁺ mémoires compétents (Arens and Schoenberger, 2010) (**Figure 35**).

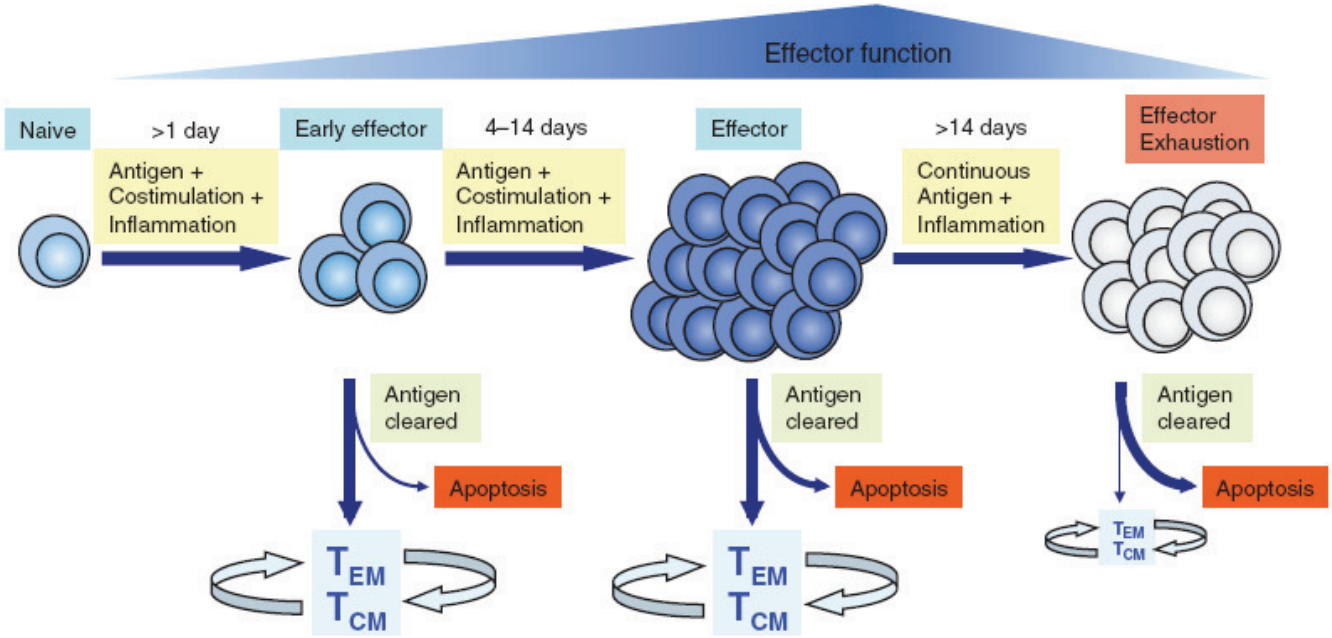


Figure 35 : Expansion et proliferation des LT CD8+ naïfs en LT effecteurs et mémoires après l'intéraction avec la DC activée par un pathogène (Arens and Schoenberger, 2010)

♦ La génération des lymphocytes T mémoires

Après l'activation des LT au sein du ganglion lymphatique drainant, les LT activés migrent en dehors des ganglions lymphatiques *via* les vaisseaux lymphatiques efférents pour gagner la circulation générale afin de participer à la réponse immunitaire.

Deux populations de LT mémoires sont alors générées : les LT effecteurs mémoires (T_{EM}) et les LT à mémoire centrale (T_{CM}) (Ebert *et al.*, 2005; Mueller *et al.*, 2013) (**Tableau 8**).

Sous-population	Phénotype	Localisation
T_{CM}	$CD44^{high}$, $CD62L^{+}$, $CCR7^{+}$, $CD127^{+}$, $CD69^{-}$, $CD103^{-}$	Ganglions lymphatiques, rate (pulpe blanche > pulpe rouge), sang, moelle osseuse
T_{EM}	$CD44^{high}$, $CD62L^{-}$, $CCR7^{-}$, $CD127^{+}$, $CD69^{-}$, $CD103^{-}$	Rate (pulpe rouge > pulpe blanche), ganglions lymphatiques, sang, voies pulmonaires, foie, intestins, appareil reproducteur, reins, tissue adipeux et cœur
T_{RM}	$CD44^{high}$, $CD62L^{-}$, $CCR7^{-}$, $CD11a^{high}$, $CD69^{+}$,$CD103^{+}$	CD8 : épithélium de la peau, estomac, vagin, glandes salivaires, poumons, cerveau, ganglion CD4 : parenchyme pulmonaire

Tableau 8 : Les populations de LT mémoires (Mueller *et al.*, 2013)

Les T_{EM} n'expriment pas le CCR7 et peuvent rapidement être recrutés au niveau du tissu inflammatoire pour assurer une réponse rapide. Ces cellules sont présentes dans la circulation sanguine et lymphatique mais également dans les tissus non lymphoïdes ce qui favorise une action rapide au plus près du tissu inflammatoire. En plus, elles possèdent une capacité proliférative et produisent des cytokines telles que l'IFN-γ (Mueller *et al.*, 2013). Quant aux T_{EM} $CD4^{+}$ et $CD8^{+}$, ils recirculent à partir de la rate et sont moins présents dans les ganglions lymphatiques. Les T_{EM}, probablement les T_{EM} $CD4^{+}$ plus que les T_{EM} $CD8^{+}$, migrent à travers les tissus non-lymphoïdes tels que la peau. Les T_{EM} $CD4^{+}$ se trouvent surtout sous la membrane basale du derme et du tissu muqueux de la lamina propria. Dans la peau, les T_{EM} expriment le CLA, le CCR4 et le CCR10 (Campbell *et al.*, 1999).

Quant aux T_{CM}, ils expriment le CD62L (L-selectin) et le CCR7 par lequel ils peuvent re-circuler du sang vers les ganglions lymphatiques. Ces cellules constituent un fort potentiel prolifératif, produisent de l'IL-2 et constituent une réserve de nouvelles cellules T effectrices en cas de réexposition à l'allergène. Les populations de T_{CM} $CD4^{+}$ sont capables de recirculer pour atteindre les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques la rate.

Récemment, il a été montré l'existence d'une population de LT mémoire résidant de manière permanente dans les tissus périphériques. Il s'agit des LT mémoires résidents (tissue-resident memory T cells, T_{RM}) (**Tableau 8**). Les T_{RM}, se trouvent au niveau des couches épithéliales de la peau, des muqueuses intestinales ou vaginales, des voies pulmonaires et des tissus nerveux (Mueller *et al.*, 2013).

3. 2. La phase d'élicitation ou de révélation

Sa survenue est conditionnée par la réexposition avec le même haptène ou un composé de structure chimique analogue au cours de la sensibilisation. Cette phase de révélation peut être divisée en deux : la phase précoce qui a lieu 2 h après la réexposition et la phase tardive qui survient 24 h après la réexposition.

3.1.6. La phase précoce d'élicitation

Au cours de cette première phase, un premier pic d'inflammation observé par une augmentation de l'épaisseur des oreilles chez la souris a lieu 2 h après la ré-application de l'haptène (van Loveren *et al.*, 1983; Askenase *et al.*, 2004). Un second pic est observé 24 h après l'exposition à l'haptène (van Loveren *et al.*, 1983; Christensen and Haase, 2012).

- **Le rôle du complément et des polynucléaires neutrophiles**

• Le rôle du complément

Cette phase précoce est médiée par un recrutement de LT, des composants du complément (C5 et C5a), de l'activation des mastocytes et des plaquettes libérant des médiateurs inflammatoires et vasoactifs tels que le TNF-α et la sérotonine (Zemelka-Wiacek *et al.*, 2013). Au cours de cette phase, le complément C5 se lie à son récepteur C5a (C5aR) exprimé à la surface des mastocytes et des plaquettes (Askenase *et al.*, 2004). Cette liaison permet la libération de sérotonine par les mastocytes et les plaquettes et de la libération de TNF- α par les mastocytes (Tsuji *et al.*, 2000). Ces derniers vont activer l'endothélium facilitant ainsi le recrutement de LT. La réaction d'HSC survient dans les deux heures qui suivent la ré-application de l'haptène (Itakura *et al.*, 2005)

• Le rôle des polynucléaires neutrophiles

Les haptènes tels que le TNCB (Biedermann et al., 2000) ou le DNFB (Kish et al., 2011) sont capables d'activer les mastocytes et les KC. Une fois activés, les mastocytes et les KC produisent des chimiokines telles que le CXCL1 (ou Groα) et le CXCL2 (ou MIP-2) permettant ainsi le recrutement des PN au niveau cutané (Biedermann *et al.*, 2000; Honda *et al.*, 2009; Kish *et al.*, 2011). En parallèle, les mastocytes activés induisent la libération d'histamine qui se traduit par une augmentation de la perméabilité vasculaire cutanée Cette libération d'histamine favorise aussi le recrutement des PN au niveau de la peau. Il a été montré que le

recrutement des PN est important pour assurer un infiltrat lymphocytaire cutané (Dudeck *et al.*, 2011).

La déplétion des PN, par l'utilisation d'anticorps (anti-neutrophile, RB6.8C5), de souris sensibilisées par le DNFB induit une diminution de la réponse d'HSC ainsi qu'une réduction du nombre de LT $CD8^+$ infiltrés dans la peau (Dilulio *et al.*, 1999; Engeman *et al.*, 2004). Kish *et al.*, ont montré que les LT CD8 sont capables de produire de l'IL-17 et de l'IFN-γ. Ces cytokines stimulent les cellules endothéliales à produire des chimiokines telles que le CXCL1 et le CXCL2 favorisant ainsi le recrutement des PN au niveau cutané (Kish *et al.*, 2009).

- **Le rôle des cellules 'natural killer'**

Traditionnellement, les cellules NK ont été considérées comme des cellules de l'immunité innée mais récemment un nouveau rôle des cellules NK dans l'immunité adaptative a été décrit (Paust *et al.*, 2010b). Paust *et al.*, ont montré que les souris déficientes en LT et LB (souris $RAG^{-/-}$) développent une mémoire immunologique spécifique de l'haptène (Paust *et al.*, 2010a; Paust *et al.*, 2010b). Ainsi, les souris $RAG^{-/-}$ dites naïves, ayant reçue des cellules NK de souris sensibilisées au DNFB développent une réaction d'HSC lors d'une première application par le DNFB (Rouzaire *et al.*, 2012). Les cellules NK transférées persistent dans l'organisme pendant des mois même en absence de l'haptène. Une réexposition avec le DNFB chez les souris $RAG^{-/-}$ naïves, un mois après le transfert des cellules NK, induit un recrutement des cellules NK au niveau du site d'inflammation et se traduit par une réaction HSC positive observée par une augmentation de l'épaisseur des oreilles (Rouzaire *et al.*, 2012).

La sensibilisation de souris par une application cutanée d'un haptène (Ag A) permet la prise en charge de cet Ag A par les APC au niveau de la peau qui vont migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques (**Figure 36a**) (Paust and von Andrian, 2011). Les cellules NK naïves circulantes migrent vers les ganglions lymphatiques où elles vont rencontrer les DC présentant l'haptène ce qui va favoriser l'activation et la prolifération des cellules NK en cellules NK mémoires (**Figure 36b**). Une fois activées, ces cellules NK mémoires quittent les ganglions lymphatiques à travers les vaisseaux lymphatiques efférents vers la circulation sanguine pour gagner le foie où elles vont être retenues au niveau de la lumière sinusoïdale. La rétention des cellules NK mémoires au niveau du foie nécessite l'expression du CXCR6 par les cellules NK et de son ligand, CXCL16, exprimé par les cellules endothéliales hépatiques sinusoïdales (**Figure 36c**). La ré-application au niveau de la peau du même haptène (Ag A) permet le recrutement des cellules NK mémoires au niveau de la peau enflammée. En

revanche, la ré-application d'un haptène différent de celui appliqué en sensibilisation ne déclenche aucune réaction. Ce processus nécessite l'interaction des cellules NK avec la P-sélectine et la E-sélectine exprimées au niveau des micro-vaisseaux dermaux (**Figure 37d**) (Paust and von Andrian, 2011).

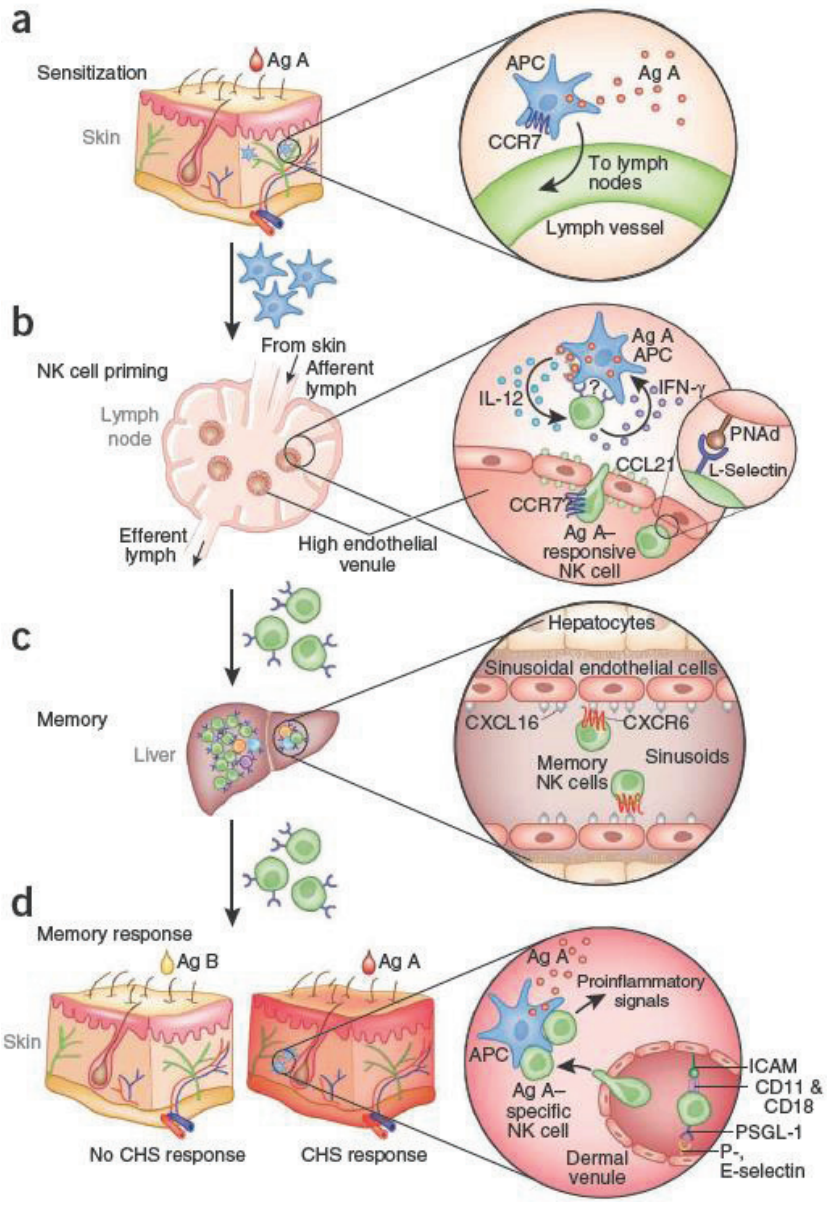


Figure 36 : Les principaux événements de migration cellulaire au cours de l'hypersensibilité cutanée induite par un haptène et médiée par les cellules NK
(Paust and von Andrian, 2011)

- **Le rôle des lymphocytes T**

Deux heures après la ré-exposition avec l'haptène, les LT sont recrutés dans la peau. Ce recrutement est dépendant de l'interaction entre la P-sélectine/PSGL-1 et de l'interaction l'E-

sélectine/CD43. Ces deux ligands PSGL-1 et CD43 sont deux glycoprotéines membranaires exprimées à la surface des LT (Alcaide *et al.*, 2007) (**Figure 37**).

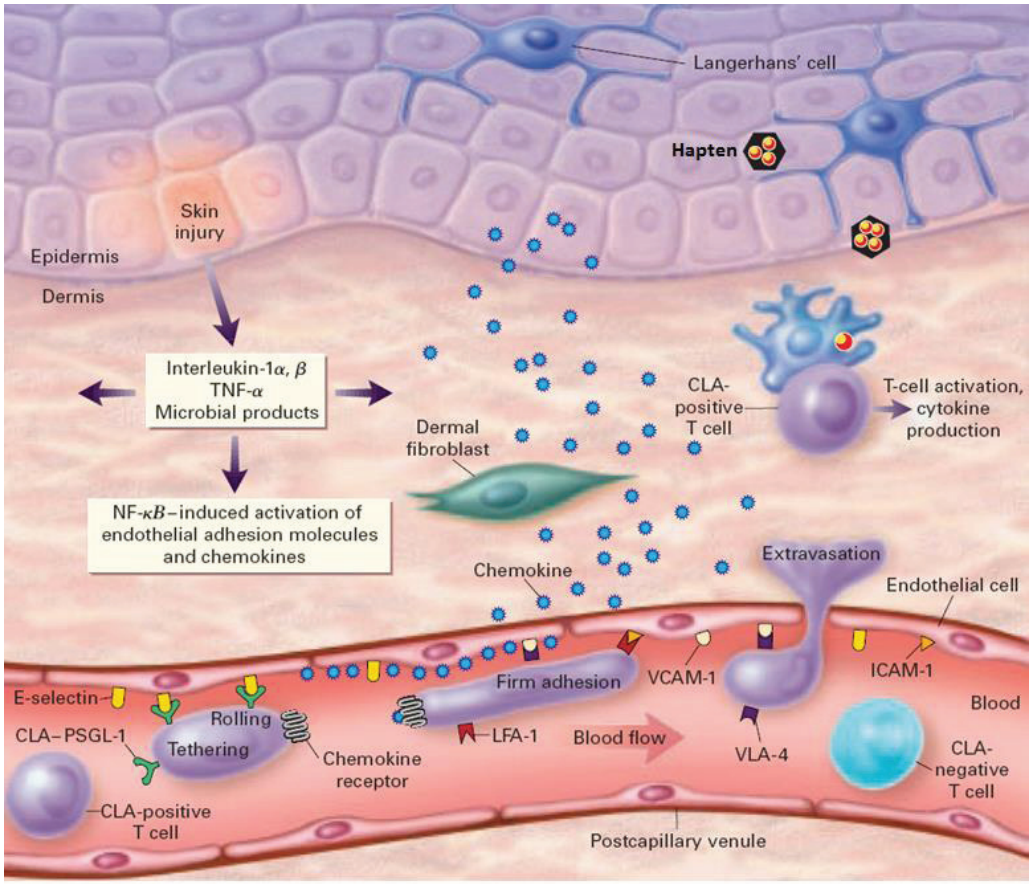


Figure 37 : Activation des LT vers les tissus inflammatoires au cours de la phase d'élicitation (Robert and Kupper, 1999; Christensen and Haase, 2012)

LFA-1 : leucocyte function-associated antigen-1; PSGL-1 : p-selectin glycoprotein ligand; VCAM : vascular adhesion molecule-1; VLA-4 : very late antigen-4

Par ailleurs, il a été décrit que les LT natural killer (NKT) jouent un rôle dans la phase précoce de l'HSC (Campos *et al.*, 2003; Nieuwenhuis *et al.*, 2005). Ainsi, les souris déficientes pour les gènes codants pour *cd1d*, le CMH-I des NKT, ou pour *jα18*, le TCR des NKT, montrent une diminution de l'HSC en réponse à l'oxazolone (Nieuwenhuis *et al.*, 2005). Par leur production d'IL-4, les NKT activent les LB-1 pour produire des IgM jouant ainsi un rôle dans le recrutement des LT (Askenase *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2006).

3.1.7. La phase tardive de l'élicitation

- **Le rôle des kératinocytes**

Les KC sont la principale source de production de chimiokines. Les KC activés produisent différentes chimiokines telles que le CXCL1, le CXCL2, le CXCL9, le CXCL10, le CCL8, le CCL17

et le CCL27 (Flier *et al.*, 2001; Karsak *et al.*, 2007; Mori *et al.*, 2008; Honda *et al.*, 2009). Le CXCL10 est le ligand du récepteur CXCR3 qui est fortement exprimé sur les lymphocytes Th1. L'inbibition de CXCL10, *via* l'utilisation d'Ac bloquant anti-CXCL10 ou de souris déficientes en *cxcl10,* induit une diminution de la réaction d'HSC en réponse au TNCB (Nakae *et al.*, 2003). Les chimiokines favorisant le recrutement des PN comme le CXCL1 jouent un rôle dans l'HSC. En effet, l'inhibition du CXCL1 ou la déficience en *ccr2*, son récepteur, induit une diminution de l'HSC (Dilulio *et al.*, 1999; Cattani *et al.*, 2006).

- **Le rôle des lymphocytes T**

Le recrutement des lymphocytes T effecteurs au niveau cutané oriente la réponse en une réponse tardive et participe à la réponse inflammatoire observée 24-48 heures après l'élicitation. Ce recrutement de cellules effectrices est contrôlé par une sécrétion coordonnée et séquentielle de cytokines et de chimiokines.

Tout d'abord, l'application de l'haptène active les KC qui vont à leur tour sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β et le TNF-α. Cette sécrétion de cytokines déclenche l'extravasation des LT $CD8^+$ effecteurs à partir du sang *via* une augmentation de l'expression des E/P-sélectines et des VCAM-1/ICAM-1 au niveau des cellules endothéliales (Tietz *et al.*, 1998; McHale *et al.*, 1999; Hirata *et al.*, 2000) (**Figure 37**). Les LT $CD8^+$ effecteurs migrent alors vers la peau grâce à l'augmentation de l'expression de CCL2, CCL5, CCL20, CCL22 ou CCL27 6 h à 12 h après la réapplication de l'haptène (Vocanson *et al.*, 2009). Ensuite, les LT $CD8^+$ effecteurs, nouvellement recrutés dans la peau, sont activés par les cellules cutanées afin de produire l'IFN-γ, et l'IL-17 (Mori *et al.*, 2008). Ces cytokines stimulent les KC pour induire une infiltration lymphocytaire massive (Mori *et al.*, 2008). Les KC sécrètent alors des chimiokines telles que le CXCL10, le CXCL11 et le CXCL9 jouant un rôle dans l'HSC (Sebastiani *et al.*, 2002). Ces trois chimiokines sont connus comme les ligands du récepteur CXCR3 exprimé par les LT. C'est pourquoi ces chimiokines contribuent à l'accumulation des LT $CD4^+$ et des LT $CD8^+$ dans la peau enflammée.

3.2. La régulation de la réponse inflammatoire

La réponse inflammatoire atteint son maximum 24 h à 48 h après la réexposition à l'haptène. La résolution de la phase inflammatoire est alors médiée par le recrutement de différentes cellules telles que les LT régulateurs $CD4^+$. Plusieurs populations de LT participent à la régulation de la réponse inflammatoire. Parmi ces LT, les Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ et les Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+ICOS^+$ jouent un rôle important dans cette régulation.

3.2.1. Le rôle des lymphocytes régulateurs

♦ Les lymphocytes T régulateurs conventionnels

Plusieurs familles de LT participent à la tolérance périphérique. Les Treg sont divisés en 2 populations : les Treg naturels (nTreg ou LT $CD4^+CD25^+Foxp3^+$) qui se développent dans le thymus et les Treg induits (iTreg) se différenciant au niveau périphérique à partir de LT $CD4^+Foxp3^-$ (Jonuleit and Schmitt, 2003; Schmitt and Williams, 2013). Le nTreg joue un rôle important dans la tolérance périphérique au soi et dans l'homéostasie immunitaire (Honda *et al.*, 2011a). Les LT $CD4^+CD25^+$ ont une activité inhibitrice dépendante d'un contact membranaire avec les LT effecteurs. Les iTreg sont induits à partir des LT naïfs en présence du TGF-β et se développent en périphérie. L'acide rétinoïque facilite la différenciation des LT naïfs en Treg $Foxp3^+$ et pourrait contribuer à la tolérance par voie orale (Benson *et al.*, 2007; Mucida *et al.*, 2007).

Les iTreg sont à leur tour divisés en trois sous-populations : les Tr1 générés dans les organes du système immunitaire périphérique qui sont producteurs de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et les Th3 producteurs de TGF-β. Ces deux sous-populations de iTreg expriment ni Foxp3 ni CD25 (Kimber *et al.*, 2012). Une troisième population de iTreg ($CD4^+CD25^-Foxp3^-$) est capable de se différencier en *ex vivo* en LT $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ à partir des LT $CD4^+CD25^-$ en réponse au TGF-β (Zheng *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2005; Wisniewski *et al.*, 2013)

Les LT $CD4^+CD25^+$ expriment fortement le marqueur CD25, le récepteur de l'IL-2, et dépendent du facteur de transcription FoxP3 (Jonuleit and Schmitt, 2003; Schmitt and Williams, 2013). Ils représentent 5% à 10% de la population des LT $CD4^+$ se trouvant en périphérie (Jonuleit and Schmitt, 2003; Schmitt and Williams, 2013). L'IL-2 joue un rôle important dans la survie cellulaire, la prolifération et la stabilité des Treg (D'Cruz and Klein, 2005; Fontenot *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011b).

Bettelli *et al.*, ont montré qu'en fonction de la quantité de TGF-β et d'IL-6 présente dans le microenvironnement, une différenciation des précurseurs T $CD4^+$ soit en Ti-Treg (*TGF*-β *induced Treg*, néo-conversion de lymphocytes T $CD4^+$ $CD25^-$ $Foxp3^-$ en lymphocytes T $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ régulateurs) si la concentration en TGF-β est importante, soit en lymphocytes Th17 effecteurs si la concentration en IL-6 est plus importante. Il y aurait un développement réciproque et un équilibre entre les lymphocytes T effecteurs et Treg. En situation

physiologique, le TGF-β prépondérant, favoriserait la génération de Treg afin d'assurer la tolérance périphérique au soi, alors que dans une situation physiopathologique et inflammatoire, l'IL-6 produit par les cellules de l'immunité innée favoriserait plutôt le développement d'effecteurs afin d'assurer une réponse optimale (Bettelli *et al.*, 2006) (**Figure 12**). Mucida *et al.* ont identifié l'acide rétinoïque, métabolite de la vitamine A, comme régulateur clé de la polarisation TGF-β dépendante des réponses immunitaires. L'acide rétinoïque serait en effet capable d'inhiber l'induction des cellules inflammatoires Th17 et de promouvoir la différenciation des LT naïfs en Treg (Mucida *et al.*, 2007).

Les radiations UV induisent les Treg (Loser and Beissert, 2009) dont l'induction est dépendante des LC exprimant OX40L et produisant de l'IL-10 (Yoshiki *et al.*, 2010). Ainsi, la déplétion des LC par injection de la toxine diphtérique (DT) chez des souris transgéniques Langerin-DTR exposées aux UV conduit à une abolition de l'induction des Treg en réponse au DNFB (Schwarz *et al.*, 2010).

Au cours de la phase de sensibilisation, l'administration par voie orale du DNFB avant son application sur la peau des souris, inhibe le développement de LT $CD8^+$ producteurs d'IFN-γ et par conséquent, la réaction d'HSC (Artik *et al.*, 2001; Dubois *et al.*, 2003; Roelofs-Haarhuis *et al.*, 2003). Dubois *et al.*, ont montré que cette tolérance cutanée au DNFB est due à la présence de LT $CD4^+CD25^+$ spécifiques du DNFB générés suite à l'administration de cet haptène par voie orale. Ces LT $CD4^+CD25^+$ sont également capables de restaurer la tolérance vis-à-vis du DNFB lorsqu'ils sont injectés à une souris déficiente en *CMH-II* développant habituellement une HSC chronique en réponse à cet haptène (Dubois *et al.*, 2003).

L'injection de Treg ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$), 2 h avant la sensibilisation par le TNCB, supprime la réaction d'HSC (Ring *et al.*, 2010b). Cette suppression est due à l'inhibition de l'activation des DC et des LT CD8 au niveau ganglionnaire. Il existe, en effet, entre les DC et les Treg des jonctions lacunaires ou "gap junctions" induisant une réduction de la capacité de la DC à activer les LT CD8 au niveau des ganglions (Ring *et al.*, 2010b).

Le rôle des Treg dans la régulation a été aussi étudié dans un modèle de souris transgéniques Foxp3 exprimant les protéines chimériques CD2 humaines et CD52 humaines ($Foxp3^{hCD2/hCD52}$). Le CD2, une molécule d'adhésion, et le CD52, une glycoprotéine, sont retrouvées toutes les deux à la surface des LT humains (Tomura *et al.*, 2010). Cette étude montre qu'à l'état basal, des $CD4^+$ $Foxp3^+$ Treg cutanés sont retrouvés dans la peau. Au cours de la réaction d'HSC, les Treg migrent de la peau vers les ganglions puis regagnent la peau

pour induire une régulation de la réponse inflammatoire (Tomura *et al.*, 2010). La déplétion des Treg au cours de la phase de sensibilisation induit une augmentation du nombre des LT $CD4^+$ et LT $CD8^+$ effecteurs aboutissant à un gonflement des oreilles plus important et plus prolongé (Honda *et al.*, 2011b).

Vocanson *et al.,* ont identifié une population de Treg exprimant le marqueur **ICOS** (**$CD4^+CD25^+Foxp3^+ICOS^+$**) jouant un rôle important dans le contrôle de la réaction inflammatoire en réponse au DNFB. Ainsi, au cours de la phase de sensibilisation, ces cellules inhibent la prolifération des LT $CD8^+$ spécifiques de l'haptène au niveau des ganglions lymphatiques. Ces Treg $ICOS^+$ représentent une population fortement suppressive qui expriment sélectivement Foxp3 et CTLA-4 et produisent de l'IL-10, de l'IL-17 et de l'IFN-γ (Vocanson *et al.*, 2010).

Récemment, Gomez de Aguero *et al.,* ont montré que les LC possèdent une fonction immunorégulatrice importante dans l'HSC (Gomez de Aguero *et al.*, 2012). Ainsi, le DNTB, considéré comme un produit tolérogène, n'induit pas une sensibilisation des souris à cause de son incapacité à activer l'inflammasome NLRP3 et contrôle ainsi l'activation des DC. Les souris pré-traitées par du DNTB puis sensibilisées par du DNFB ne développent pas de réaction d'HSC. Le DNTB, favorisant cette tolérance, induit la migration des LC des ganglions lymphatiques. Les LC activés présentent alors l'haptène aux LT $CD8^+$ et aux Treg $ICOS^+CD4^+Foxp3^+$. Cette étude a montré que les LC protègent contre l'HSC par un mécanisme favorisant l'anergie ou la délétion des LT $C8^+$ spécifiques de l'haptène et l'activation d'une population de LT connus sous le nom de Treg $ICOS^+CD4^+Foxp3^+$ (Gomez de Aguero *et al.*, 2012).

Ring *et al.,* ont montré que le transfert de Treg $CD4^+CD25^+$ purifiés à partir de souris naïves, précédant la phase d'élicitation chez des souris sensibilisées au TNCB, réduit la réponse inflammatoire d'origine allergique comparé aux souris contrôles. Ceci est caractérisé par une diminution du gonflement des oreilles et de l'afflux de l'infiltrat lymphocytaire (LT $CD8^+$ effecteurs) au niveau de la peau enflammée (Ring *et al.*, 2006). Ils ont également montré dans cette étude que l'effet suppresseur de la réaction d'HSC est surtout médié par l'IL-10, produite par les Treg, et non pas par le TGF-β. Ainsi, l'injection de surnageant de Treg activés, contenant de fortes quantités d'IL-10, chez des souris sauvages, juste avant l'élicitation, supprime la réaction d'HSC en réponse au TNCB. Cette étude montre alors que la suppression

de la réaction d'HSC est médiée par les Treg producteurs d'IL-10 *via* une inhibition de l'afflux des LT effecteurs au niveau de la peau (Ring *et al.*, 2006).

Il a également été montré que l'adénosine produit par les Treg est impliqué dans l'inhibition de l'afflux lymphocytaires à la peau grâce à une diminution de l'expression de l'E- et la P-sélectine sur les cellules endothéliales (Ring *et al.*, 2009). L'adénosine triphosphate (ATP) est tout d'abord dégradée par CD39, une ectoenzyme membranaire, en adénosine diphosphate (ADP) puis en adénosine monophosphate (AMP). L'AMP est ensuite déphosphorylé par CD73 en adénosine. Le CD39 et le CD73 sont deux ectoenzymes fortement exprimées à la surface des Treg activés (Ring *et al.*, 2010a). Par conséquent, les Treg sont capables de convertir l'ATP en adénosine et d'inhiber la réaction d'HSC. L'injection de l'adénosine ou de Treg chez des souris sensibilisées par du TNCB, juste avant l'élicitation diminue le gonflement des oreilles. Cette diminution n'est pas observée lorsque les Treg isolés à partir des souris déficientes en *cd39* sont transférés chez des souris sauvages sensibilisés avec le TNCB (Ring *et al.*, 2009). Cependant, l'ATP n'est pas juste un substrat pour la formation de l'adénosine, il active aussi la fonction immunosuppressive des Treg *via* son récepteur, P2X7 (Ring *et al.*, 2010a). Les Treg issus de souris déficientes en *il-10* ont une faible capacité à former l'adénosine et ne sont pas activés par l'ATP malgré l'expression de CD39/CD73 et de P2X7 (Ring *et al.*, 2011). Ainsi les Treg de souris déficientes en *il-10* n'inhibent pas la réaction d'HSC car incapables de former de l'adénosine (Ring *et al.*, 2011).

♦ Les lymphocytes T régulateurs non conventionnels

▪ Les lymphocytes T γδ

Une autre population de LT a été décrite pour son rôle régulateur dans l'inflammation cutanée en réponse aux haptènes. Il s'agit des cellules T Vγ5+ intraépithéliale γδ appartenant aux DETC (Vocanson *et al.*, 2009). Ces cellules expriment le TCR Vγ5-Vδ1. Des études effectuées sur des souris de fond génétique C57BL/6 déficientes pour le gène codant pour le TCRγδ, souris *tcrd*$^{-/-}$, montrent qu'elles développent une réaction normale d'HSC en réponse au DNFB. En revanche, ces souris *tcrd*$^{-/-}$ sur un fond génétique FVB ou diabétique non obèse (NOD) développent une dermatite spontanée chronique et une majoration de la réponse inflammatoire lors d'une HSC en réponse au DNFB. Des transferts adoptifs de cellules T Vγ5^{+}Vδ1^{+} effectués chez ces souris déficientes permettent de corriger cette majoration de l'effet. Cet effet restaurateur n'est pas observé lors des transferts adoptifs d'autres cellules Tδγ n'exprimant pas le TCR Vγ5-Vδ1 (Girardi *et al.*, 2002). Ainsi, les cellules Vγ5^{+}Vδ1^{+} DETC jouent

un rôle dans la suppression de l'HSC *via* des mécanismes jusqu'à présent inconnus (Kaplan *et al.*, 2012).

- **Les lymphocytes NKT**

Parmi, les LT non conventionnels, les NKT sont décrits jouer un rôle régulateur dans l'EAC. Les cellules NKT représente un faible pourcentage des LT totaux (1% à 2% dans la rate de la souris et 0,01% à 2% dans le sang périphérique humain.) Ces cellules sont capables de reconnaître les antigènes lipidiques et les glycolipides présentés par la molécule CMH-I non classique, CD1d. Le CD1d est exprimé à la surface de différentes DC telles que les DDC (Gerlini *et al.*, 2001) et les LC (Fukunaga *et al.*, 2010). Deux classes de NKT existent, les NKT invariants (iNKT) appelés aussi NKT type I et les NKT variants ou NKT type II. Les iNKT co-expriment, à la fois, les chaînes α invariantes du TCR (Vα14Jα18 chez la souris et Vα24Jα18 chez l'Homme) et les récepteurs des NK tels que NK1.1. Les NKT type II expriment des TCR non invariants et sont stimulés par les antigènes lipidiques présentés *via* la molécule CD1d (Godfrey and Berzins, 2007). Les iNKT murins constituent 30% à 40% des LT TCRαβ$^+$ dans le foie. Monteiro *et al.,* ont identifié des iNKT régulateurs exprimant Foxp3$^+$ dans un modèle de souris développant une maladie auto-immune d'encéphalomyélite (EAE). En effet, les souris EAE traitées par l'α- galactosylceramide (α-GalCer), agoniste spécifique des iNKT, développent une protection contre l'apparition de l'EAE contrairement aux souris non traitées. Cette protection est due à une augmentation du nombre de NKT Foxp3$^+$ régulateurs dans les ganglions induits par la production de TGF-β (Monteiro *et al.*, 2010).

Fukunaga *et al.,* ont montré que l'activation des NKT participe à la régulation des LC au niveau cutané. En effet, au cours de la migration, les LC isolées de souris exposées aux rayons UVB montrent une augmentation de l'expression de CD1d à leur surface. Les LC CD1d$^+$ transporteraient les glycolipides cutanés vers les ganglions où elles activeraient les NKT; celles-ci sécrèteront à leur tour de l'IL-4 jouant un rôle dans la diminution de l'inflammation cutanée (Fukunaga *et al.*, 2010). Par ailleurs, Goubier *et al.,* ont montré que les iNKT inhibent l'apparition de l'HSC médiée par les LT CD8$^+$ en réponse au DNFB indépendamment des LT CD4$^+$. Les souris *cd1d*$^{-/-}$ ou les souris *Jα18*$^{-/-}$ montrent une exacerbation de la réponse inflammatoire induite par le DNFB par rapport aux souris sauvages. De plus, la déplétion des souris en NKT par le PK136, Ac dirigé contre l'antigène NK1.1, avant la sensibilisation ou après le rappel par le DNFB, induit une augmentation plus importante de l'épaisseur des oreilles par rapport aux souris contrôles. En réponse au DNFB, les LT CD8$^+$ produisant de l'IFN-γ activent les NKT qui à leur tour sécrètent de l'IL-4 et de l'IL-13 (Goubier *et al.*, 2013).

- **Les lymphocytes B**

En plus des Treg, les LB régulateurs (Breg) ont été aussi identifiés pour jouer un rôle dans la régulation de la réaction d'HSC. Les Breg sont identifiés par leur expression $CD1^{high}CD5^{+}CD19$ (Bouaziz *et al.*, 2008). Ils représentent 1% à 2% des cellules $B220^{+}$ présentes au niveau de la rate (Yanaba *et al.*, 2008). La fonction régulatrice des Breg est surtout due à leur forte production d'IL-10 d'où leur nom de B10. Ainsi, les souris déficientes en LB, les souris *cd19*$^{-/-}$ montrent une exacerbation de la réaction d'HSC en réponse au DNFB. Le transfert de Breg, isolés à partir de souris sauvages sensibilisées par le DNFB, chez des souris *cd19*$^{-/-}$ normalise la réaction inflammatoire d'origine allergique (Watanabe *et al.*, 2007b).

3.2.2. Le rôle des cellules dendritiques tolérogènes

L'application cutanée répétée de très faibles concentrations d'un haptène tel que le DNFB ou l'oxazolone conduit à une tolérance spécifique de l'haptène appliqué et prévient toute sensibilisation ultérieure au même haptène. Les concentrations de l'haptène appliqué doivent être 100 à 1000 fois plus faibles que celles nécessaires à l'induction d'une sensibilisation (Vocanson *et al.*, 2006). Cette tolérance est connue sous le nom de Low Zone Tolerance (LZT) (Steinbrink *et al.*, 1996). La tolérance est maintenue par les LT $CD8^{+}$ suppresseurs (régulateurs) et les Treg, tous deux producteurs d'IL-10, au cours de la phase d'induction de la LZT (Maurer *et al.*, 2003; Xystrakis *et al.*, 2004; Noble *et al.*, 2006). Le mécanisme de la LZT a été récemment élucidé. Ce dernier est dû à la libération du TNF-α par une population de DC $CD11c^{+}CD8^{+}$ (DC tolérogènes) présentes dans les ganglions lymphatiques lorsqu'elles sont activées par les LT $CD8^{+}$ suppresseurs. Ainsi, le TNF-α produit par ces DC tolérogènes induit l'apoptose des LT $CD8^{+}$ effecteurs spécifiques de l'haptène *via* le récepteur 2 de TNF (TNFR2) exprimé sur ces LT (Luckey *et al.*, 2011).

PARTIE III : LA VOIE NRF2/KEAP1

1. Les espèces réactives de l'oxygène et le stress oxydant

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) est un processus métabolique essentiel pour le maintien de l'homéostasie corporel. La quantité d'ERO se trouvant dans la cellule est régulée par un équilibre entre leur taux d'élimination par le système de défense antioxydant et leur taux de production. Par ailleurs, les cellules immunitaires telles que les macrophages produisent des ERO afin d'éliminer les pathogènes (West *et al.*, 2011). La chaîne respiratoire mitochondriale et les réactions enzymatiques impliquant la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, les cyclooxygénases et la lipooxygénase sont des sources endogènes de production d'ERO. Ces dernières peuvent être produites également par des *stimuli* exogènes tels que les radiations ultra-violets (UV), les polluants environnementaux et les molécules chimiques (Jung and Kwak, 2010). Le stress oxydant est alors défini comme étant un déséquilibre entre la production d'ERO et le système antioxydant au niveau de l'organisme. Ce déséquilibre se caractérise par une production excessive d'ERO et une diminution des capacités anti-oxydantes de l'organisme (Ma and He, 2012).

Les ERO comprennent l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), le radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Figure 38**).



Figure 38 : Les quatre étapes de réduction de l'oxygène et formation des intermédiaires réduits (Migdal and Serres, 2011)

L'anion superoxide est un précurseur commun des ERO et est impliqué dans deux réactions : **(1)** sa transformation rapide en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en oxygène (O_2) par la superoxyde dismutase (SOD) et **(2)** la génération du peroxynitrite ($ONOO^-$) *via* sa réaction avec le monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$) (Jung and Kwak, 2010) (**Figure 39**).

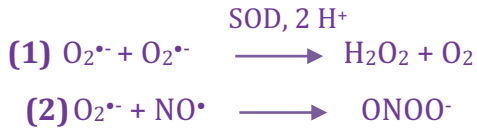


Figure 39 : Les deux réactions de transformation de l'anion superoxyde (Migdal and Serres, 2011)

En plus des ERO, des espèces réactives de l'azote (ERA) existent aussi. Ces ERA comprennent le monoxyde d'azote radicalaire $NO^{\bullet}$ et le peroxynitrite ($ONOO^-$). Le $NO^{\bullet}$ est synthétisé à partir des NO synthases (NOS) (Trachootham *et al.*, 2008). Tout comme pour les ERO, le $NO^{\bullet}$

produit, de façon excessive, est impliqué dans de nombreuses pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose, la thrombose et l'hypertension (Napoli and Ignarro, 2009) ainsi que dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Togo *et al.*, 2004).

Les ERO à faibles concentrations jouent le rôle de second messager dans la signalisation cellulaire. Elles sont ainsi impliquées dans la relaxation des cellules vasculaires, dans l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, dans l'adhésion plaquettaire et dans la régulation du tonus (**Tableau 9**) (Droge, 2002; Migdal and Serres, 2011).

Type de radical libre	Source du radical	Processus physiologique
Monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$)	Monoxyde d'azote synthase	Relaxation du muscle lisse, contrôle du tonus vasculaire
Anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) et les ERO associés	NADPH oxydase	Contrôle de la ventilation Contrôle de la production de d'érythropoïétine
Anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) et les ERO associés	Différentes sources	Stress oxydant et le maintien de l'homéostasie redox

Tableau 9 : Principales fonctions physiologiques des ERO et ERA (Droge, 2002)

Cependant, à fortes concentrations, elles produisent de nombreux dommages oxydants au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides induisant la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose (Trachootham *et al.*, 2008). Afin de limiter les effets toxiques des ERO, les cellules ont développé des systèmes antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques. Parmi les antioxydants non enzymatiques se trouvent les molécules contenant les groupements thiols (SH) telles que le glutathion (GSH) et la thiorédoxine (Trx). Ces molécules sont capables de neutraliser les ERO par des interactions directes (Jung and Kwak, 2010) (**Figure 40**).



Figure 40 : Exemple d'oxydation réversible par le GSH et/ou la Trx (Migdal and Serres, 2011)

Le système antioxydant enzymatique comprend la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la peroxyrédoxine (Prdx) capables de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau (**Figure 41**). En revanche, le système antioxydant non enzymatique comprend le GSH,

la Trx, l'acide ascorbique (la vitamine C), l'α-tocophérol (la vitamine E), les flavonoïdes et les caroténoïdes tels que le β-carotène (Valko *et al.*, 2007).

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow[\text{Prdx}]{\text{CAT}\ \text{GPx}} 2H_2O + O_2$$

Figure 41 : Réaction de réduction du peroxyde d'hydrogène en eau (Migdal and Serres, 2011)

En parallèle de la production d'ERO par le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire, la plupart des cellules sont capables de produire l'$O_2^{\bullet-}$ *via* une activité NADPH oxydase membranaire (NOX). La NOX est une protéine membranaire qui catalyse la réduction de l'O_2 en utilisant le NAD(P)H pour donner l'$O_2^{\bullet-}$ (**Figure 42**). Ce dernier est dismuté à son tour par la SOD en H_2O_2 (Brieger *et al.*, 2012).

$$NADPH + 2O_2 \xrightarrow{NOX} NADP^+ + H^+ + 2O_2^{\bullet-}$$

Figure 42 : Réduction de l'oxygène en anion superoxyde par la NADPH oxydase (Migdal and Serres, 2011)

La NOX a été étudié dans les cellules phagocytaires telles que les PN et les macrophages dans lesquelles elle joue un rôle important dans la défense contre les pathogènes. Cette enzyme se retrouve également dans les cellules non phagocytaires où elle participe à la signalisation cellulaire (Bedard and Krause, 2007). La NOX est localisée au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules. La famille des NOX/DUOX comprend plusieurs isoformes : la NOX1, 2, 4, 5, et deux enzymes associées la DUOX1 et la DUOX2 (Katsuyama *et al.*, 2012). Parmi ces isoformes, la NOX2 est la plus étudiée. Elle est surtout présente dans les cellules phagocytaires dans lesquelles elle génère l'$O_2^{\bullet-}$ pour lyser les bactéries. Elle peut également être retrouvée au niveau des cellules endothéliales, les fibroblastes, les neurones et les cellules β-pancréatiques (Bedard and Krause, 2007; Brieger *et al.*, 2012).

En plus des NOX, d'autres enzymes telles que la xanthine oxydase, les enzymes du réticulum endoplasmique telles que les CYP-450, les enzymes de la voie de l'acide arachidonique, les myéloperoxydases au niveau lysosomal, les cytochromes oxydases au niveau nucléaire et les organelles telles que les peroxysomes sont capables aussi de produire des ERO (Migdal and Serres, 2011; Brieger *et al.*, 2012).

Par ailleurs, la production d'ERO a été aussi montrée comme jouant un rôle dans l'HSC. Ainsi, les molécules chimiques allergisantes connues pour induire l'HSC telles que le DNCB, l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) et le DNFB produisent des ERO dans les DC humaines issues de monocytes (Mo-DC) (Byamba *et al.*, 2010). Cette production d'ERO était diminuée en utilisant la N-acétylcystéine (NAC), une molécule antioxydante (Byamba *et al.*, 2010). Une autre étude, effectuée sur la lignée THP1, montrent également une production d'ERO en présence du DNCB (Migdal *et al.*, 2010).

L'utilisation de modèles *in vivo* d'HSC murin et *in vitro* à partir de lignée murines telles que la lignée de KC (Pam212) et les fibroblastes (L929) montre que la production d'ERO induite par le TNCB, molécule allergisante, est responsable de la dégradation enzymatique de l'HA, un composant de la matrice extracellulaire de la peau. Cette production d'ERO a été inhibée en présence de la NAC (Esser *et al.*, 2012).

Au niveau cellulaire, une voie centrale est connue pour la détection des molécules électrophiles générant un stress oxydant. Il s'agit de la voie Nrf2 [Nuclear factor erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2] / Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Ainsi, le facteur de transcription Nrf2 augmente la capacité antioxydante de la cellule en régulant l'expression de différents gènes antioxydants et des enzymes de phase II.

2. La voie Nrf2/Keap1

2.1. Le facteur de transcription Nrf2 et sa structure

Le facteur de transcription Nrf2 a été identifié pour la première fois par Moi *et al.* en 1994 comme un homologue du facteur de transcription érythroïde NF-E2 (Nuclear Factor Erythroid 2), connu pour sa capacité à interagir avec une séquence d'ADN contrôlant le gène de la β-globine (Moi *et al.*, 1994). Nrf2 est une protéine ubiquitaire retrouvée dans les différents organes détoxifiants tels que le foie et les reins mais aussi dans les poumons, le tube digestif et la peau (Singh *et al.*, 2010). Il appartient à la famille Cap 'n' collar (CNC) des protéines régulatrices (Baird and Dinkova-Kostova, 2011).

La protéine Nrf2 est composée de 605 acides aminés (a.a) chez l'Homme et de 597 a.a chez la souris (Ma and He, 2012). Le poids moléculaire (PM) prédictif de Nrf2 est ~ 55-65 kDa alors que le PM apparent sur un gel d'acrylamide est ~ 95-110 kDa (Lau *et al.*, 2013). Cette différence de PM est probablement due à l'abondance des résidus acidiques des a.a ralentissant alors la migration par électrophorèse [point isoélectrique de Nrf2 (PH 4,7)]. Nrf2 est constituée de 17% de résidus acidiques tels que l'aspartate et le glutamate et de 13% de

résidus basiques tels que la lysine, l'arginine et l'histidine (Taguchi *et al.*, 2011). Cette différence de PM peut être également due à des modifications post-traductionnelles de Nrf2 telles que sa phosphorylation (Pi *et al.*, 2007; Apopa *et al.*, 2008), sa liaison covalente au monomère d'actine (Kang *et al.*, 2002) ou son ubiquitination (Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2012b). La protéine Nrf2 humaine contient six résidus cystéines (Cys) contre sept résidus cystéines chez la souris (Moi *et al.*, 1994).

Nrf2 possède une région basique leucine zipper (bZIP) au niveau de son domaine C-terminal et contient 6 domaines fonctionnels appelés Neh 1-6 (Nrf2-ECH homology, ECH : erythroïd cell-derived protein with CNC homology = chicken Nrf2) (Itoh *et al.*, 1995; Ma and He, 2012). La région basique Neh1, en amont de la région leucine zipper, est responsable de la liaison à l'ADN au niveau des séquences ARE et permet la dimérisation avec les protéines "small musculoaponeurotic fibrosacroma (sMaf)" (Katsuoka *et al.*, 2005). La région Neh2, présente au niveau du domaine N-terminal de Nrf2, est nécessaire pour sa liaison avec son régulateur négatif Keap1. Elle contient des motifs DLG et ETGE assurant sa liaison avec Keap1 au niveau du domaine kelch (Magesh *et al.*, 2012). Quant aux régions Neh3, Neh4 et Neh5, elles sont nécessaires pour l'activation transcriptionnelle (Magesh *et al.*, 2012). La région Neh3 est présente au niveau du domaine C terminal alors que les deux régions Neh4 et Neh5 se trouvent au niveau du domaine N terminal. Cette activation transcriptionnelle *via* les éléments de réponse ARE nécessite l'hétérodimérisation de Nrf2 à d'autres facteurs de transcriptions bZIP, incluant les protéines de la famille Jun (c-Jun, Jun-D et Jun-B) et des protéines de la famille Maf (MafG, MafK et MafF) (Ma and He, 2012). Enfin, la région Neh6 se trouvant entre le Neh5 et le Neh1 possède deux séquences spécifiques d'a.a [a.a 329-339, a.a 363-379] identifiées comme des degrons. Ceux-ci permettent la dégradation de Nrf2 dans le noyau *via* l'ubiquitine ligase E3 en réponse à un stress oxydant (McMahon *et al.*, 2004; Ma and He, 2012). En plus de ces deux degrons, le domaine Neh2 possède les motifs DIDLID (a.a 17-32), DLG (a.a 29-31) et ETGE (a.a 79-82) agissant également comme des degrons (McMahon *et al.*, 2004; Ma and He, 2012). Enfin, Nrf2 possède des séquences d'import NLS (Nuclear Localization Sequence) permettant sa translocation vers le noyau et des séquences d'export NES (Nuclear Export Sequence) permettant son export du noyau (Jain *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2010; Magesh *et al.*, 2012) (**Figure 43**).

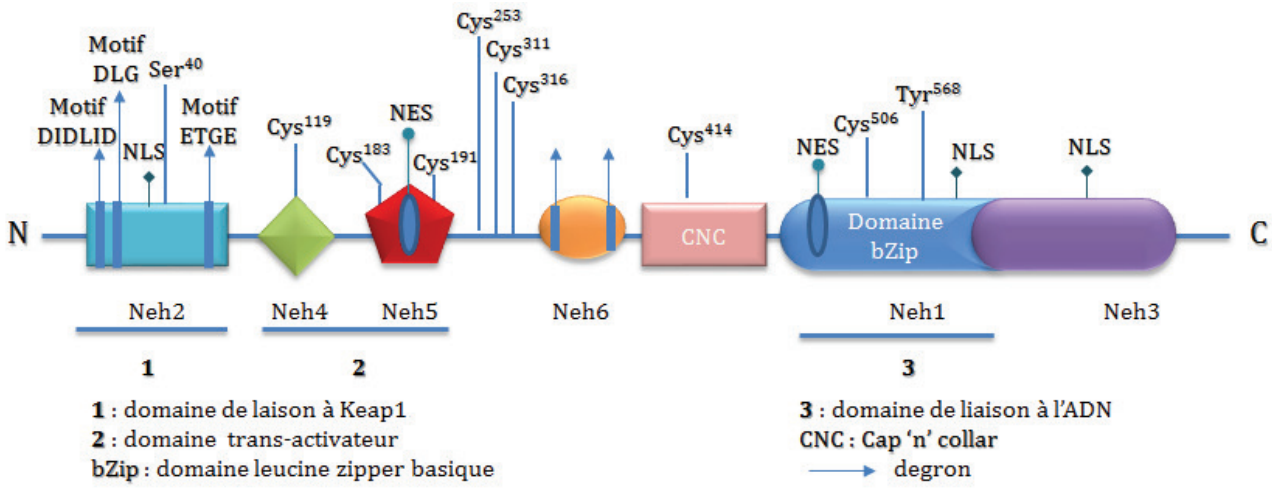


Figure 43 : Structure de Nrf2 [figure modifiée à partir de (Magesh *et al.*, 2012)].

2.2. La régulation de la réponse antioxydante par Nrf2 *via* ses éléments de réponse antioxidante "ARE"

Les éléments de réponse antioxidante ou "Antioxidant Response Element" (ARE) sont essentiellement des séquences spécifiques retrouvées au niveau des promoteurs des gènes cibles de Nrf2 (Rushmore *et al.*, 1991). Cette séquence consensuelle est définie ainsi 5'-gagTcACaGTgAGtCggCAaaatt-3' (les bases majeures étant en majuscules) ou 5'-TMAnnRTGAYnnnGCR-3' (M=A ou C, R= A ou G, Y= C ou T, W= A ou T, n= n'importe quelle base) ou TGA (C/T)nnnGCA et est située généralement en amont de la séquence codante des gènes, dans la région régulatrice (Rushmore *et al.*, 1991; Nioi *et al.*, 2003).

Ces séquences ont été identifiées pour la première fois par Rushmore *et al.,* en 1991. L'analyse du promoteur des gènes codant pour la sous-unité 2a de la *glutathion-s-transférase* (*gst2a)* et de la *nadph-quinone oxydoréductase 1 (nqo1),* deux enzymes de détoxication de phase II, chez le rat a permis d'identifier les séquences suivantes : *5'-TGACnnnGC-3'* comme séquences ARE. (Rushmore *et al.*, 1991). Le promoteur du gène *glutamylcystéine ligase c (gclc)* possède une séquence ARE sur le brin non codant *TCCCCGTGACTCAGCG* responsable de son induction en réponse au β-naphtolflavone, un flavonoïde synthétique connu comme inducteur enzymatique des CYP450 (Erickson *et al.*, 2002).

Le tétranucléotide *5'-TGAC-3'* de la séquence ARE est similaire à la moitié du site TPA (12-O-trétradécanoylphorbol 13-acétate) Response Element (TRE) identifié comme suit : *5'-TGAGTCA-3'* (Ma and He, 2012). Sur cet élément de séquence de lie la protéine AP-1 (activator protein-1), protéine contrôlant de nombreuses fonctions cellulaires, se lie aux séquences TRE en réponse aux esters de phorbol, aux facteurs de croissance tels que le facteur de croissance

épidermal (EGF), aux rayons UV et au stress oxydant. Cette protéine possède une faible affinité pour les séquences ARE. Nrf2 possède des séquences ARE au niveau de son promoteur lui permettant sa liaison au niveau nucléaire et sa propre transcription (Andrews *et al.*, 1993). Par ailleurs, la séquence ARE présente des analogies de séquence pour celle de Maf (musculoaponeurotic fibrosarcoma) Recognition Element (MARE). Ces dernières sont identifiées soit par le *5'-TGCTGA* G/C *TCAGCA-3'* [13 paires de base (bp)] contenant le cœur de la séquence TRE soit par le *5'-TGCTGA* GC/CG TCAGCA-3' (14 bp) contenant l'élément de réponse de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Kataoka *et al.*, 1994; Kerppola and Curran, 1994). La séquence MARE est reconnue par l'homo-dimère Maf qui se lie au dinucléotide GC de MARE.

Ainsi, cette séquence ARE est le lieu de fixation d'un hétéro-dimère de Nrf2 avec une protéine Maf (Kurokawa *et al.*, 2009). L'hétéro-dimère Maf/Nrf2 se fixe sur une séquence spécifique de type ARE engendrant la transcription du gène cible auquel il appartient (Itoh *et al.*, 1997). Les ARE peuvent aussi fixer des homo-dimères de Maf, ce qui a pour conséquence d'inhiber la transcription du gène.

D'autres protéines ont la possibilité de former des hétéro-dimères avec Maf et de se fixer aux ARE. C'est le cas de Bach1. Les hétéro-dimères Bach1 (BTB And CNC Homology 1) / Maf se fixent sur les ARE, inhibant ainsi la transcription du gène cible.

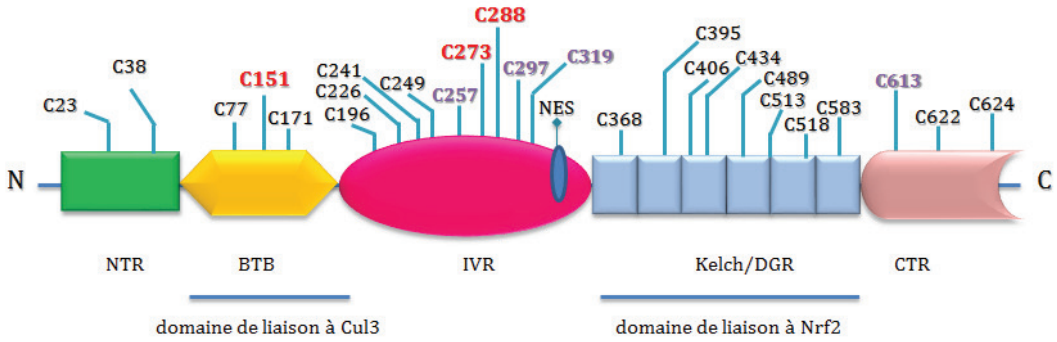
2.3. Keap1 : le senseur naturel de Nrf2

2.3.1. La structure de Keap1

La protéine Keap1 est l'inhibiteur naturel de Nrf2 (INrf2). C'est une protéine de 69 kDa contenant 624 acides aminés, riche en groupement thiol : 25 cystéines chez la souris contre 27 cystéines chez l'Homme (Magesh *et al.*, 2012). Keap1 possède cinq domaines fonctionnels : la région N-terminale, le domaine de dimérisation Broad complex Tramtrack and Bric-a-Brac (BTB), la région riche en cystéine InterVening Region (IVR), le domaine Double Glycine Repeat/Kelch (DGR) et la région C-terminale (Baird and Dinkova-Kostova, 2011).

Keap1 se lie au facteur de transcription Nrf2 *via* le domaine DGR et la région C-terminale, appelé le domaine Keap1-DC. Il interagit directement avec le domaine Neh2 de Nrf2 *via* le domaine Keap1-DC (Watai *et al.*, 2007) (**Figure 44**). Keap1 *via* son domaine BTB est responsable de l'homodimérisation et de l'interaction avec le complexe cullin 3/ring box 1 (Cul3/Rbx1) E3 ubiquitine ligase favorisant ainsi la dégradation de Nrf2 *via* la voie du protéasome 26S (Watai *et al.*, 2007). Le domaine IVR contenant des résidus cystéines est

sensible aux réactions d'oxydation et possède des séquences NES. Le domaine DGR possédant six kelch répétés (KR1-KR6) est capable d'interagir avec Nrf2 au niveau de son domaine Neh2 (Magesh *et al.*, 2012).



NTR : région N terminale, BTB : Broad complex Tramtrack and Bric-à-brac , IVR : InterVening Région, DGR : Double Glycine repeat, CTR : région C terminale

Figure 44 : Structure de Keap1 [figure modifié à partir de (Ma and He, 2012)]

Keap1 constitue un véritable senseur de l'état redox de la cellule. Les nombreux résidus cystéines peuvent réagir avec les ERO induisant un changement de conformation de Keap1 (D'Autreaux and Toledano, 2007) (**Figure 45**). Ce changement de conformation altère alors la liaison entre Nrf2 et Keap1, stabilisant ainsi Nrf2. Sept cystéines ont été identifiées jouant un rôle important dans l'activité de Keap1 [Cys151, cys257, Cys273, Cys288, Cys297, Cys434, Cys613] (Magesh *et al.*, 2012). Ces cystéines sont très réactives vis-à-vis des ERO et des molécules électrophiles. Ainsi, la Cys151 située dans le domaine BTB est importante pour le recrutement du complexe d'ubiquitination et de dimérisation de Keap1. Elle est indispensable pour la stabilisation de Nrf2 en présence des inducteurs tels que le t-BHQ et le sulforaphane (Yamamoto *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2011). Les Cys273 et Cys288, quant à elles, situées dans le domaine IVR sont nécessaires pour la fixation de Nrf2 à Keap1 (Baird and Dinkova-Kostova, 2011).

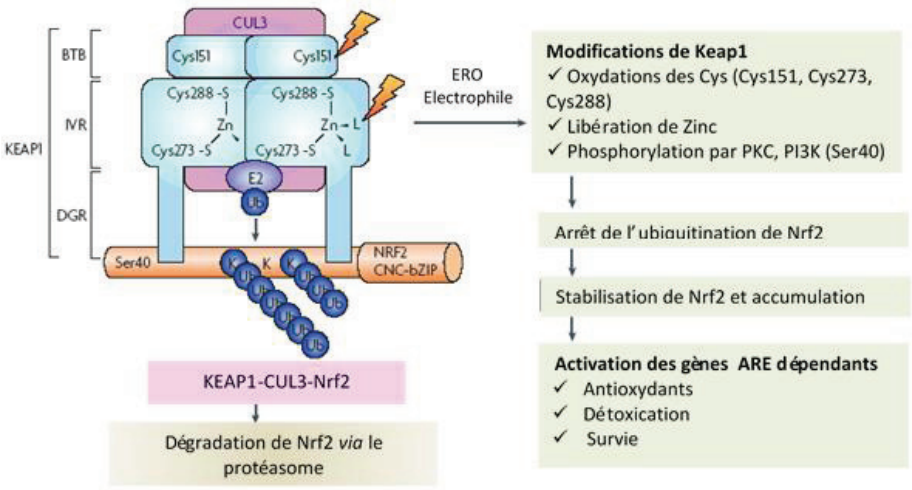


Figure 45 : Modèle spéculatif d'interaction entre Keap1 et Nrf2 (D'Autreaux and Toledano, 2007)

2.3.2. Le mécanisme d'interaction entre Keap1 et Nrf2

Keap1 est une protéine cytoplasmique ayant pour rôle de réguler négativement Nrf2 en induisant sa dégradation *via* le protéasome 26S. En présence d'un stress oxydant cellulaire, la quantité d'ERO vont réagir avec les résidus cystéines de Keap1 et aura pour conséquence, le non recrutement du complexe d'ubiquitination et donc l'absence de dégradation de Nrf2 et sa stabilisation (Taguchi *et al.*, 2011).

Les analyses biochimiques et structurales ont montré qu'une cellule à l'état basal possèdent deux molécules de Keap1, formant un homo-dimère, qui sont associées à une molécule de Nrf2 *via* le domaine DGR de Keap1 et le domaine Neh2 de Nrf2. Au sein du domaine Neh2 de Nrf2, se trouvent deux motifs, le DLG et l'ETGE, se liant au domaine DGR/Kelch de Keap1 avec des affinités différentes. La molécule de Nrf2 se lie alors à Keap1 par deux sites de liaison, DLG et ETGE. L'ETGE possède une forte affinité de liaison à Keap1 tandis que le motif DLG possède une faible affinité de liaison. La région entre les motifs DLG et ETGE forme une hélice-α au sein de laquelle sont contenues sept lysines importantes pour l'ubiquitination de Nrf2 (Tong *et al.*, 2006a).

2.4. Le mécanisme moléculaire de régulation de la voie Nrf2/Keap1

2.4.1. Le mécanisme d'activation du complexe Nrf2/Keap1

A l'état d'homéostasie, Nrf2 est ubiquitiné *via* le complexe Cul3/Rbx1-E3 et dégradé *via* le protéasome. Dans ces conditions, Nrf2 possède une courte demi-vie de 15 à 20 minutes (Baird and Dinkova-Kostova, 2011; Ma and He, 2012).

Récemment, deux modèles mécanistiques ont été proposés pour la stabilisation de Nrf2. Le premier étant le modèle de la charnière et du loquet appelé modèle "hinge and latch" et le second étant le modèle de dissociation de Keap1 et de Cul3 (Magesh *et al.*, 2012) (**Figure 46**).

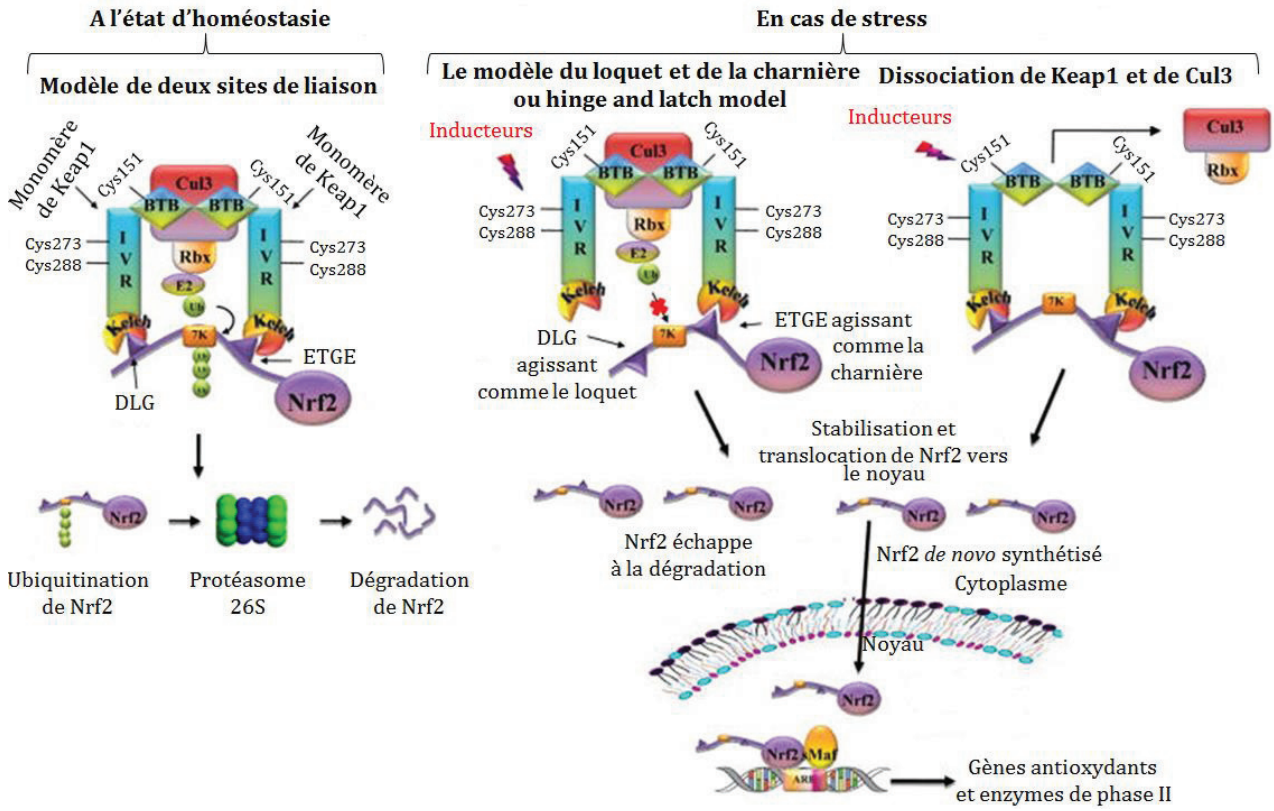


Figure 46 : Mécanisme d'activation de la voie Nrf2/Keap1 [figure modifiée à partir de (Magesh *et al.*, 2012)].

Dans le modèle "hinge and latch", la forte affinité du motif ETGE agit comme la charnière [hinge] afin de fixer Nrf2 à Keap1 alors que le motif de faible affinité agit comme le loquet [lach] permettant de bloquer l'ubiquitination de Nrf2 *via* son domaine Neh2 et d'inhiber par la suite sa dégradation par le protéasome (Magesh *et al.*, 2012). Suite à un stress oxydant, les résidus cystéine de Keap1 se trouvant au niveau de ses domaines BTB et IVR sont alors oxydés aboutissant à un changement de conformation de Keap1. Ce changement de conformation entraine une perturbation au niveau du motif DLG de faible affinité (Tong *et al.*, 2006b). Ainsi, le motif DLG est dissocié de Keap1 tandis que le motif ETGE dont l'affinité est 100 fois plus élevée de celle du motif DLG, reste associer à Keap1 (Tong *et al.*, 2007). Sous ces conditions-là, Nrf2, échappant à la dégradation par le protéasome, peut s'accumuler alors dans la cellule et les molécules de Nrf2 nouvellement synthétisées transloquent vers le noyau. Elles s'hétérodimérisent avec les protéines sMaf puis se lient aux séquences ARE pour induire la transcription des gènes antioxydants et régulateurs de Nrf2 (Magesh *et al.*, 2012).

Il a été en effet montré qu'en présence d'un stress chimique, une modification de la configuration de Keap1 est observée. Elle est caractérisée par une oxydation des résidus cystéines de Keap1 telles que la Cys151, Cys273 et la Cys288 avec la libération de zinc

aboutissant à une conformation ne permettant plus l'ubiquitination de Nrf2 (Kaspar *et al.*, 2009; Baird and Dinkova-Kostova, 2011).

La dissociation de Keap1 et de Cul3 est le second modèle proposé pour la stabilisation de Nrf2 (Taguchi *et al.*, 2011). Ainsi, en présence d'un stress oxydant ou de molécules électrophiles, l'oxydation des résidus cystéines particulièrement la Cys151 au niveau du domaine de liaison à Cul3, le domaine BTB de Keap1, induit un détachement de Cul3 de Keap1. Cette modification n'aboutit pas à un changement de conformation de Keap1 mais perturbe l'activité du complexe Keap1-Cul3 E3 ligase *via* une dissociation des deux protéines (Eggler *et al.*, 2009). Nrf2 reste alors fixer aux dimères de Keap1 mais n'est plus ubiquitinylé. Toute nouvelle protéine Nrf2 synthétisée *de novo* sera alors épargnée d'une dégradation.

Au vue de ces deux modèles mécanistiques, il pourrait être alors proposé dans le premier modèle du 'hinge and latch' que Nrf2 puisse d'une part s'accumuler en échappant à la dégradation et d'autre part puisse être néo-synthétisé. Dans ce cas précis, le domaine de faible affinité DLG de Nrf2 se détache de Keap1 sous l'influence des attaques électrophiles. En revanche, dans le second modèle, Nrf2 ne serait que néo-synthétisé. Dans ce modèle, les domaines DLG et ETGE de Nrf2 interagissant avec Keap1 sont maintenus intacts tandis que Keap1 et Cul3 sont dissociés.

2.4.2. Les gènes régulés par Nrf2

Le modèle de souris déficientes pour le gène codant pour *nrf2* a permis d'étudier les gènes régulés par Nrf2. La première observation a ainsi montré lors de traitement des souris *nrf2*$^{-/-}$ par le *ter*-butylhydroxyanisole (BHA) (un antioxydant phénolique) l'absence d'expression protéique de la GST et de l'expression génique de *nqo1* (Itoh *et al.*, 1997). C'est ainsi que les gènes *gst* et *nqo1* ont été identifiés comme gènes cibles de Nrf2.

Les études de microarray ont permis par la suite d'élargir l'ensemble des gènes induits par Nrf2. Le premier microarray réalisé à partir de cellules issues d'intestins de souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$ traitées par le sulforaphane ou non (huile de maïs) a permis d'identifier un certain nombre gènes régulés par Nrf2 (Thimmulappa *et al.*, 2002). Parmi ces gènes, ceux codant pour les enzymes de phases II comprenant la *nqo1*, la *gst* et la *γ-gcs* ont été identifiés. Des gènes codant pour les enzymes permettant la régénération de la NADPH telles que la glucose 6-phosphate déshydrogénase, la 6-phosphogluconate déshydrogénase et l'enzyme malique ainsi que des gènes antioxydants tels que la GPx, la GR et la ferritine ont été également identifiés (Thimmulappa *et al.*, 2002).

D'autres études de microarray ont montré que le t-BHQ induit les gènes ARE dépendants de Nrf2 dans les astrocytes de souris *nrf2*$^{+/+}$ et non pas dans les astrocytes *nrf2*$^{-/-}$ (Lee *et al.*, 2003). Ainsi, il a pu être identifié plusieurs catégories de gènes régulés par Nrf2 : les gènes antioxydants tels que la *cat*, la *ferritine*, la *gpx*, *l'ho-1*, la *sod,* la *trx*, les gènes codant pour les enzymes de phase II telles que la *gst*, la *gcl*, la *glutathion réductase (gr)* et les autres gènes tels que l'*époxyde hydrolase* (*eh*). Les GPx (Banning *et al.*, 2005), la GR (Harvey *et al.*, 2009), la GCL (Mulcahy *et al.*, 1997), la GS (Wild and Mulcahy, 2000), les GST A1, A2, A3, A4, M1, M3 et M4 (Chanas *et al.*, 2002), la NQO1 (Nioi *et al.*, 2003), la HO-1(Prestera *et al.*, 1995), la ferritine (Pietsch *et al.*, 2003) et l'uridine diphospho (UDP)-glucuronosyltransférase (UGT) 1A6 (Ramos-Gomez *et al.*, 2001) possèdent toutes des séquences ARE et sont ainsi régulées par Nrf2.

♦ Les enzymes de l'équilibre redox

Plusieurs protéines antioxydantes sont impliquées dans l'élimination des ERO. Parmi ces protéines se trouvent la SOD, la CAT, la GPx et la TRX. La CAT, la SOD et la GPx sont capables de neutraliser directement les ERO (Jung and Kwak, 2010).

La **SOD** a été montrée par de nombreuses études être régulée par Nrf2 (Zhu *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006; Reisman *et al.*, 2009). Zhu *et al.,* ont montré que les fibroblastes cardiaques issus de souris *nrf2*$^{-/-}$ induisent une activité plus faible de la SOD par rapport aux cellules *nrf2*$^{+/+}$ (Zhu *et al.*, 2005)

La SOD est une métallo-enzyme qui catalyse la dismutation de l'$O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 (Migdal and Serres, 2011). Il existe trois isoformes de la SOD, la SOD1, la SOD2 et la SOD3. La SOD1 contient du cuivre et du zinc (Cu, Zn-SOD) et est essentiellement localisée dans le cytoplasme. Elle peut se retrouver aussi dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie, le noyau et les lysosomes. La SOD2 et la SOD3 sont présentes respectivement dans les mitochondries et la matrice extracellulaire (Crapo *et al.*, 1992; Sturtz *et al.*, 2001; Faraci and Didion, 2004).

La **CAT** est une hémoprotéine contenant quatre groupements hème (Le Bras *et al.*, 2005). Elle est ubiquitaire, localisée au niveau des peroxysomes (Le Bras *et al.*, 2005) et est présente à des concentrations élevées dans le foie, les érythrocytes et les reins (Jung and Kwak, 2010). Elle catalyse la conversion de l'H_2O_2 en H_2O et inhibe la formation de radicaux libres réactifs tels que le radical hydroxyle (Jung and Kwak, 2010) (**Figure 47**).



Figure 47 : Conversion du peroxyde d'hydrogène en eau par la catalase (Gardes-Albert *et al.*, 2003)

Reismann *et al.,* ont montré que les cellules hépatiques issus de souris *nrf2*$^{-/-}$ ont une plus faible expression génique de la CAT à l'état basal par rapport aux souris *nrf2*$^{+/+}$ (Reisman *et al.*, 2009).

La **GPX** est une sélénoprotéine comprenant cinq isoformes (GPx 1, 2, 3, 4 et 6) qui permet la réduction de l' H_2O_2 par le glutathion (GSH) en H_2O et en disulfure de glutathion (GSSG), la forme oxydée du GSH (Migdal and Serres, 2011) (**Figure 48**).



Figure 48 : Réduction du peroxyde d'hydrogène par le glutathion (Gardes-Albert *et al.*, 2003; Migdal and Serres, 2011)

La GPX1 est ubiquitaire et présente dans le cytoplasme et la mitochondrie. Elle permet d'éliminer l'H_2O_2 et les hydroperoxydes lipidiques (Brigelius-Flohe and Maiorino, 2013). La GPX2 est présente au niveau de l'épithélium intestinal alors que la GPX3 est une enzyme extracellulaire glycosylée retrouvée dans le plasma. Quant à la GPX4, elle est présente dans le cytoplasme, la mitochondrie et le noyau. Elle protège contre l'oxydation des phospholipides membranaires. La GPX6 est exprimée dans l'épithelium olfactif (Brigelius-Flohe and Maiorino, 2013). Parmi ces GPX, la GPX2 semble la plus régulée par Nrf2. Ainsi, les souris *nrf2*$^{+/+}$ exposées pendant 5 h à la fumée de cigarette montrent une augmentation de l'expression génique de *gpx2* par rapport aux souris non exposées. Cette induction de *gpx2* n'a pas été observée chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ (Singh *et al.*, 2006).

La **GCL** appelée aussi glutamylcystéine synthétase (GCS), comprenant les deux sous-unités, une unité catalytique, la GCLC, et une unité régulatrice, la GCLM, catalysent la synthèse du GSH par la formation du γ-glutamyl cystéine à partir du glutamate et de la cystéine en présence de l'ATP (Lu, 2013) (**Figure 49**). La glycine est ensuite ajoutée à ce dipeptide par la GSH synthase pour donner le GSH (Lu, 2013).

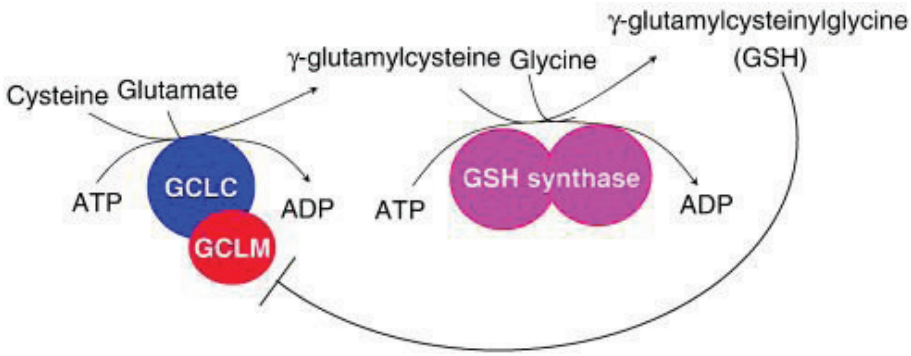


Figure 49 : L'implication des GCL dans la synthèse du GSH (Lu, 2013)

Il a été montré que ces enzymes sont régulées par Nrf2. Ainsi, MacLeod *et al.,* ont montré une augmentation de l'expression protéique de GCLC et GCLM dans les KC humains (HaCaT) en présence du sulforaphane, un activateur de Nrf2 (MacLeod *et al.*, 2009). Une étude récente effectuée par Mani *et al.,* montre que le traitement des cellules hépatiques HepG2 par l'homocystéine, un acide aminé formé au cours du métabolisme de la méthionine induit une augmentation de l'expression génique et protéique de GCLC. Cet acide aminé induit également l'expression protéique de Nrf2 dans ces mêmes cellules (Mani *et al.*, 2013b).

La **Trx** est le substrat de la **Prdx** et se trouve dans la membrane mitochondriale interne et est impliquée dans la réduction du H_2O_2, du peroxyde lipidique et des protéines contenant des résidus sulfhydriles modifiés par oxydation. La **Trx réductase** (TrxR) catalyse la réduction de la Trx oxydée en utilisant le NAD(P)H (Lillig and Holmgren, 2007). Il a été démontré que la Prdx1, la Trx et les TrxR 1, 3 et 5 sont régulées par Nrf2 (Lou *et al.*, 2006; MacLeod *et al.*, 2009). Ainsi, le traitement par le 4-hydroxynonenal [(4-HNE) aldéhyde réactif produit au cours de la peroxydation lipidique] de cellules murines rétinales 661W déficientes en *nrf2*, induit une diminution de l'expression protéique de Trx et la TrxR contrairement aux cellules contrôles (Tanito *et al.*, 2007).

De plus, le traitement des cellules humaines du réseau trabéculaire osseux NTM5 ou HTMC par la quercetine, un activateur de Nrf2, induit l'expression protéique et génique de *prdx1* et *prdx5* (Miyamoto *et al.*, 2011). Kim *et al.,* ont également montré que les cellules de la lignée MEF *nrf2*$^{+/+}$ présentent une expression génique basale de *prx1*. Cette expression est totalement absente dans les MEF *nrf2*$^{-/-}$ (Kim *et al.*, 2007).

La protéine **HO-1** est une enzyme permettant la dégradation de l'hème en monoxyde de carbone (CO), en fer et en biliverdine qui sera transformée en bilirubine par la biliverdine réductase (BVR) (Gozzelino *et al.*, 2010) (**Figure 50**).

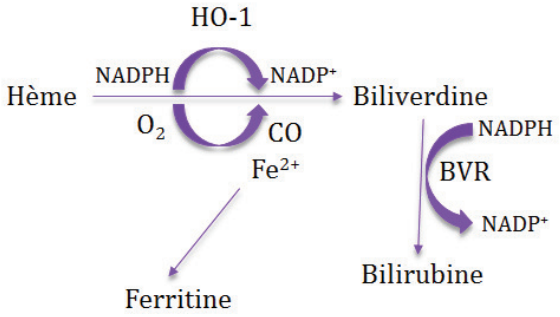


Figure 50 : Réaction de réduction de l'hème par HO-1 [figure modifiée d'après (Gozzelino *et al.*, 2010)]

La protéine HO-1 est aussi nommée heat shock protein 32 (Hsp32) (Gozzelino *et al.*, 2010) dont l'activité du promoteur est régulée par Nrf2 (Alam *et al.*, 1999). Une étude récente montre que le traitement des cellules de la lignée HepG2 par l'homocystéine induit l'expression génique et protéique de HO-1 (Mani *et al.*, 2013a). De plus, le traitement par différentes molécules telles que le diéthyl maléate (DEM), le paraquat et le chlorure de cadmium de macrophages péritonéaux *nrf2*$^{+/+}$ induit l'expression génique et protéique de HO-1. En revanche, aucune expression n'est induite par de tels xénobiotiques dans les macrophages péritonéaux *nrf2*$^{-/-}$ (Ishii *et al.*, 2000). Une autre étude montre que le zerumbone, sesquiterpène phytochimique d'un type de gingembre comestible connu pour ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, induit HO-1 dans les cellules épidermales murines de la lignée JB6 (Shin *et al.*, 2011). Par ailleurs, il a été récemment montré que les molécules chimiques allergisantes telles que le cinnamaldéhyde (CinA), un aldéhyde dérivé de la cannelle retrouvé dans les parfums et les fragrances, induisent l'expression protéique et génique de *ho-1* dans la lignée THP-1 et dans les DC issues des monocytes (Mo-DC) (Migdal *et al.*, 2013).

La **ferritine** est une protéine intracellulaire qui fixe le fer et permet son stockage. Elle comprend 24 sous-unités de chaînes lourdes (H) et légères (L) (Wang *et al.*, 2010). Elle est exprimée d'une manière ubiquitinaire et joue un rôle important dans le métabolisme du fer au cours d'un stress oxydant. Elle permet la séquestration du fer dans le cytoplasme pour inhiber la formation de radicaux libres tels que HO$^{\bullet}$ au cours de la réaction de Fenton (Papanikolaou and Pantopoulos, 2005) (**Figure 51**).

$$Fe(II) + H_2O_2 \longrightarrow Fe(III) + HO^- + HO^\bullet$$ Réaction de Fenton

Figure 51 : Oxydation du fer au cours de la réaction de Fenton (Papanikolaou and Pantopoulos, 2005)

Pietsch *et al.,* ont été les premiers à montrer la régulation de la ferritine par Nrf2. Des fibroblastes murins issus de souris *nrf2*$^{+/+}$ traités par des activateurs de Nrf2 tels que l'oltipraz ou le 1,2-dithiole-3-thione (D3T) montrent une expression génique et protéique des ferritines H et L. Cette expression est retrouvée diminuée dans les cellules invalidées en *nrf2* (Pietsch *et al.*, 2003). Une étude récente montre que l'expression génique des ferritines H et L est induite dans des KC humains (HaCaT) traitées par l'arsenic et ce, *via* l'activation de Nrf2 (Huang *et al.*, 2013).

♦ Les enzymes de détoxication de phase II

Les enzymes de détoxication de phase II sont des protéines antioxydantes qui assurent une protection cellulaire contre les métabolites réactifs formés en réponse à un stress électrophile ou oxydant (Baird and Dinkova-Kostova, 2011). Ces enzymes permettent le maintien de l'homéostasie cellulaire et peuvent être régulées par le facteur de transcription Nrf2. Elles peuvent être classées en deux catégories : **1)** les enzymes de conjugaison telles que les glutathion-S-transférases (GST) et les uridine diphospho (UDP)-glucuronosyltransférase (UGT) et **2)** les enzymes impliquées dans la réduction des métabolites réactifs telles que la NAD(P)H quinone oxydoréductase (NQO1).

Les **GST** sont des enzymes ubiquitaires jouant un rôle important dans la détoxication des produits électrophiles endogènes et exogènes tels que les époxydes, les aldéhydes et les peroxydes. Ces enzymes catalysent la conjugaison du GSH aux produits électrophiles facilitant ainsi leur élimination (Board and Menon, 2013). Il s'agit de protéines majoritairement cytoplasmiques comprenant huit classes distingues : alpha (α), mu (μ), pi (π), sigma (σ), theta (θ), omega (Ω) et zeta (ζ) (Board and Menon, 2013). La GST mitochondriale appartient à la classe Kappa (κ). Différentes études effectuées chez des souris *nrf2*$^{-/-}$ ont montré que les différentes isoformes de GST telles que la GST A1, A2, A3, A4, M1, M3 et M4 sont régulées par Nrf2 (Thimmulappa *et al.*, 2002; Rangasamy *et al.*, 2004; Reisman *et al.*, 2009). Ainsi, aucune induction des différentes isoformes de la GST chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ par le BHA n'a pas été observée en comparaison avec les souris *nrf2*$^{+/+}$ (Itoh *et al.*, 1997).

Les **UGT** sont des enzymes catalysant la réaction de conjugaison de l'acide UDP-glucuronique. Elles jouent un rôle essentiel dans la détoxication de composés chimiques tels que les polluants, les médicaments et les composés endogènes tels que la bilirubine, les stéroïdes et les hormones (Rowland *et al.*, 2013). Cette réaction s'appelle la glucuronidation (**Figure 52**).

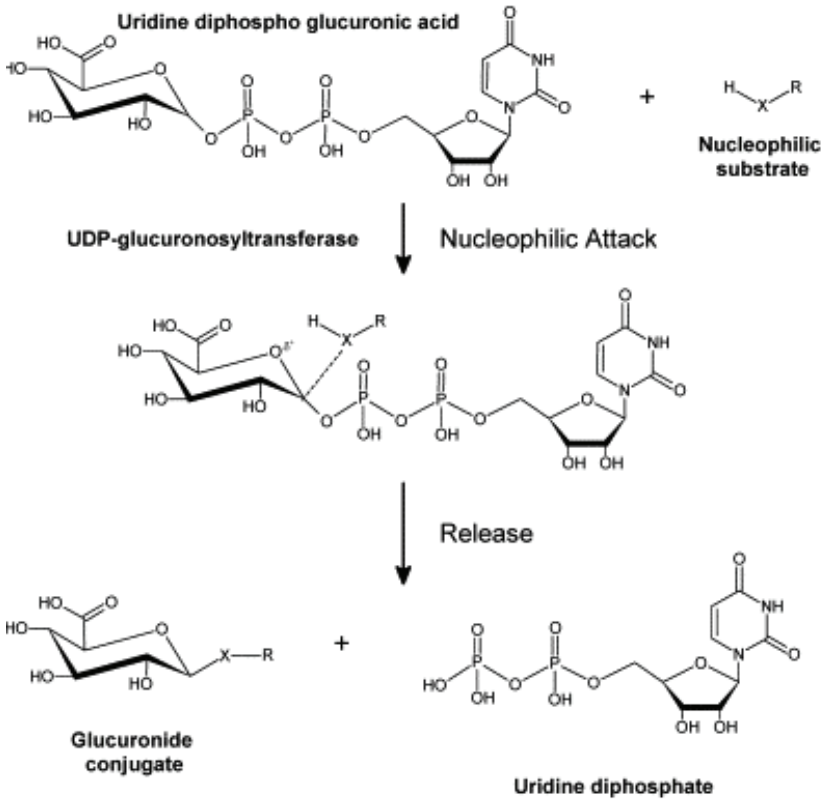


Figure 52 : La réaction de glucuronidation (Rowland *et al.*, 2013)

Seize UGT humaines ont été identifiées, neuf codent pour l'UGT1A (1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9 et 1A10), trois codent pour l'UGT2A (2A1, 2A2, 2A3) et sept codent pour l'UGT2B (2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15, 2B17, 2B28) (Rowland *et al.*, 2013).

Parmi ces UGT, seule l'UGT1A6 est régulée par Nrf2. Ainsi, l'expression basale de l'UGT1A6 au niveau hépatique et pulmonaire est beaucoup plus faible dans les souris déficientes en *nrf2* comparées aux souris *nrf2* sauvages (Enomoto *et al.*, 2001).

La protéine **NQO1**, appartient à la famille des flavoprotéines homodimériques. C'est une enzyme cytoplasmique ubiquitaire. Elle catalyse la réduction, par deux électrons, des quinones en hydroquinones (Siegel *et al.*, 2012) (**Figure 53**).

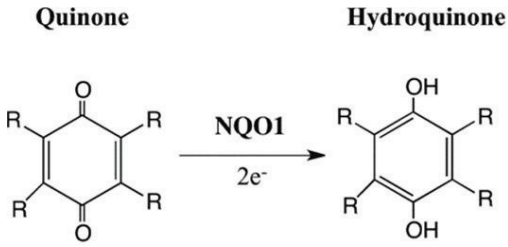


Figure 53 : Réduction des quinones en hydroquinone par la NQO1 (Siegel *et al.*, 2012)

Son activité varie entre les différents individus et tissus ainsi qu'entre les tissus sains et cancéreux. Elle est fortement exprimée dans les cellules épithéliales humaines telles que l'endothélium vasculaire et les adipocytes.

NQO1 est aussi très exprimée dans différents cancers tels que le cancer du côlon, le cancer du sein, le cancer du pancréas et le cancer du poumon (Siegel *et al.*, 2012). Les souris déficientes en *nqo1* traitées par application cutanée par le benzo[a]pyrène, ont une plus forte susceptibilité à développer des tumeurs cutanées que les souris sauvages (Long *et al.*, 2000). En réponse aux radiations-γ, ces mêmes souris *nqo1*$^{-/-}$ développent des maladies myéloprolifératives caractérisées par une augmentation du nombre de PN au niveau sanguin, une hypercellularité au niveau de la moelle osseuse et un gonflement au niveau des ganglions lymphatiques et de la rate. Ces souris développent des adénocarcinomes pulmonaires contrairement aux souris sauvages (Iskander *et al.*, 2008).

♦ Les autres protéines régulées par Nrf2

En plus de ces gènes, Nrf2 régule les expressions des ARN messagers (ARNm) codant pour les transporteurs d'efflux dépendants de l'ATP tels que les multi-drug resistance associated (MDR) (Hu *et al.*, 2006; Reisman *et al.*, 2009) la glycoprotéine P (P-gp) et les muti-resistance proteins (MRP) (Maher *et al.*, 2005; Reisman *et al.*, 2009), les deux sous-unités du protéasome 19S et 20S (Kwak *et al.*, 2003b; Hu *et al.*, 2006; Kapeta *et al.*, 2010), les aldo-kéto réductases (AKR) telles que les AKR1B3 (Nishinaka and Yabe-Nishimura, 2005), AKR1B10, AKR1C1 et AKR1C2 (Lou *et al.*, 2006; MacLeod *et al.*, 2009) et les EH microsomales (Morisseau and Hammock, 2005).

L'élimination des produits chimiques toxiques par les transporteurs membranaires d'efflux peut diminuer le dommage cellulaire en plus des phénomènes de détoxication (Singh *et al.*, 2010). Certaines études proposent que les transporteurs **MDR** et **MRP** participent à la réponse antioxydante (Klaassen and Slitt, 2005; Yeh and Yen, 2006). Ces protéines de transport appartiennent à la famille des transporteurs ABC (ATP-Binding cassette) et

favorisent l'élimination des xénobiotiques à l'extérieur des cellules. La famille des MRP est composée de 9 membres (MRP1 à MRP9) (Dallas *et al.*, 2006). Plusieurs études ont montré la régulation des MRP par Nrf2. Ainsi, l'expression constitutive au niveau génique et protéique de MRP1 dans les cellules MEF issus de souris *nrf2*$^{-/-}$ est beaucoup plus faible que celle observée dans les cellules MEF *nrf2*$^{+/+}$ (Hayashi *et al.*, 2003). Le traitement par le DEM n'induit une augmentation de l'expression de MRP1 que dans les cellules MEF *nrf2*$^{+/+}$ (Hayashi *et al.*, 2003). Récemment, il a été montré par Ji *et al.,* que Nrf2 régule l'expression génique de *mrp1* dans les lignées pulmonaires humaines. Le présence de 2 séquences ARE (ARE1 et ARE2) dans le promoteur du gène *mrp1* et une corrélation entre l'expression de Nrf2 et de MRP1 dans des tumeurs malignes de différents cancers ont été mise en évidence (Ji *et al.*, 2013). Le traitement des cellules hépatiques par les activateurs de Nrf2 tels que l'oltipraz et le BHA induisent l'expression de différents MRP (MRP1-6) (Maher *et al.*, 2005).

De même, Jigorel *et al.,* ont montré l'augmentation de l'expression génique de *nqo1*, *mrp1*, *mrp3* et *mdr1* dans les hépatocytes primaires humains en réponse à l'oltipraz (Jigorel *et al.*, 2006). De plus, Cornejo *et al.,* ont montré que le traitement des rats mâles Sprague-Dawley par l'hormone thyroïdienne T3 induit une augmentation de l'expression génique et protéique de MRP2 et MRP3 *via* une activation de Nrf2 (Cornejo *et al.*, 2013).

Les enzymes **AKR** sont des NAD(P)H oxydoréductases solubles qui permettent la réduction des groupement carbonyles des aldéhydes en alcool primaires et des cétones en alcool secondaires (Jin and Penning, 2007). Les produits résultant de cette réduction subissent ensuite une conjugaison par sulfonation ou glucuronidation *via* les enzymes de phase II. Les conjugués sulfonés ou glucuronidés sont ensuite pris en charge par les sulfotransférases ou les UGT respectivement. Les AKR appartiennent aux enzymes de détoxication de phase I (Jin and Penning, 2007). L'étude effectuée par Macleod *et al.,* montre que le traitement des KC humains par le sulforaphane induit l'expression protéique de AKR1B10, AKR1C1 et AKR1C2 (MacLeod *et al.*, 2009). Un microarray effectué sur cellules hépatiques issues de souris *nrf2*$^{+/+}$ ou *nrf2*$^{-/-}$ traitées avec le sulforaphane a permis de montrer que AKR1B7 et AKR1B8 sont régulées par Nrf2 (Hu *et al.*, 2006).

Les **EH** microsomales sont responsables de l'inactivation et de l'hydrolyse des métabolites époxydes réactifs par la conversion de l'époxyde en dihydrodiol (Morisseau and Hammock, 2005) (**Figure 54**).

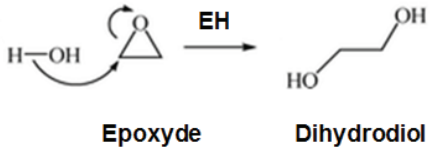


Figure 54 : Mécanisme des époxydes hydrolases (Morisseau and Hammock, 2005)

Une étude effectuée par Hu *et al.,* montre la diminution de l'expression génique de l'EH dans des hépatocytes de souris *nrf2*$^{-/-}$ traitées par le sulforaphane comparée à celle retrouvée dans les hépatocytes de souris sauvages (Hu *et al.*, 2006).

Plusieurs études ont montré que Nrf2 module les sous-unités 20S et 19S du **protéasome** en réponse à des activateurs de Nrf2 tels que le D3T ou le sulforaphane (Kwak *et al.*, 2003a; Kwak *et al.*, 2003b; Kapeta *et al.*, 2010). Ainsi, le microarray effectué par Kwak *et al.,* a montré l'augmentation de l'expression de 19 gènes codants pour le 19S et le 20S dans les cellules hépatiques issus de souris *nrf2*$^{+/+}$ et leur diminution dans les cellules *nrf2*$^{-/-}$ en réponse au D3T (Kwak *et al.*, 2003a). Ainsi l'analyse montre l'augmentation de l'expression génique de PSBA1, PSMA4, PSMB3, PSMB5 et PSMB6 faisant partie de la sous-unité 20S et de PSMC1, PSMC3 et PSMD14 faisant partie de la sous-unité 19S. Ceci est associé à une augmentation de l'activité protéasomale 20S en présence du D3T dans les cellules *nrf2*$^{+/+}$ (Kwak *et al.*, 2003a; Kwak *et al.*, 2003b). De plus, l'activité protéasomale 20S dépendante de Nrf2 est augmentée en réponse au sulforaphane. Ce dernier induit le gène PSMB5 de la sous-unité catalytique 20S dans les cellules *nrf2*$^{+/+}$ retrouvé diminué dans les cellules *nrf2*$^{-/-}$ (Kwak *et al.*, 2003a). Une étude récente, effectuée par Pickering *et al.,* montre que l'activité protéasomale 20S n'est augmentée que dans les cellules MEF issues de souris *nrf2*$^{+/+}$ en réponse au H_2O_2 (Pickering *et al.*, 2012). Le **Tableau 10** montre les différents gènes régulés par Nrf2.

Fonction cellulaire	Gène régulé par Nrf2	Classe
Biosynthèse du glutathion	Gamma glutamylcystéine synthetase (γ-GCS)	GCS
	Glutamate cystéine ligase (GCL)	GCLC, GCLM
	Glutathion-S-transférase (GST)	GST A1, A2, A3, A4, M1, M2, M3, M4, M5
	Glutathione péroxydase (GPx)	GPX2
	Glutathion réductase (GR)	GR1
	Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)	G6PDH
Métabolisme des xénobiotiques	NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1)	NQO1
	UDP-glucuronosyltransférase (UGT)	UGT1A1, A6, A9, 2B7
	Epoxyde hydrolase microsomal (mEH)	EPHX1
	Aldo-Kéto réductase (AKR)	AKR1B7, 1B8, 1B10, 1C1, 1C2 et 7A2
Réponse au stress	Hème oxygenase-1 (HO1)	HO-1
	Protéine de choc (Heat shock protein, HSP)	HSP1, 8, 40, 70, 105
Métabolisme du fer	Ferritine	FTL1, FTH1
Transporteurs	Multi-resistance protein (MRP)	MRP1, 2 et 3
Défense antioxydante	Superoxyde dismutase (SOD)	SOD1, 2 et 3
	Péroxyrédoxine (PRDX)	PRDX1, 6
	Thiorédoxine (TRX)	TRX
	Thiorédoxine réductase (TRXR)	TRXR1
	Catalase (CAT)	CAT
Autophagie	Séquestosome 1	SQSTM1
	p62	p62
Apoptose	Bcl-2	Bcl-2
	Bcl-xl	Bcl-xl
Protéasome	20S	PSBA1, PSMA4, PSMB3, PSMB5 et PSMB6
	19S	PSMC1, PSMC3 et PSMD14
	11S	Pa28αβ

Tableau 10 : Les gènes régulés par Nrf2 (Thimmulappa *et al.*, 2002; Kwak *et al.*, 2003a; Kwak *et al.*, 2003b; Hu *et al.*, 2006; MacLeod *et al.*, 2009; Jung and Kwak, 2010; Niture and Jaiswal, 2012; Pickering *et al.*, 2012; Ma, 2013; Niture and Jaiswal, 2013)

2.4.3. Les molécules chimiques modulatrices de Nrf2

♦ Les activateurs de Nrf2

L'intérêt des activateurs de Nrf2 vient de l'observation que le BHA administré chez des souris les protégeait des effets toxiques et carcinogènes des hydrocarbures aromatiques polycycliques tels que le benzo[a]pyrène et induisait l'induction des enzymes de détoxication telles que la GST, l'HO-1 et la NQO1 dans différents tissus (Benson *et al.*, 1978; Keum *et al.*, 2006).

La plupart des activateurs de Nrf2 sont des molécules électrophiles capables de former des liaisons covalentes avec les groupements –SH des cystéines des protéines par oxydation ou alkylation (Magesh *et al.*, 2012). Ils comprennent des molécules phytochimiques d'origine alimentaire et des molécules chimiques capables d'induire des allergies cutanées (Emter *et al.*, 2010). Nous avons montré que les molécules allergisantes telles que le DNCB, le Ni, le CinA et la para-phénylènediamine (pPD) induisent l'expression protéique de Nrf2 dans les DC issus de progéniteurs humains (CD34-DC) (Ade *et al.*, 2009). Cette même étude a montré par PCR quantitative, l'augmentation de l'expression génique de *nqo1* et *ho-1* en présence du DNCB, CinA, Ni et pPD (Ade *et al.*, 2009). Plus récemment, nous avons également montré que les molécules allergisantes telles que le DNCB et le CinA induisent l'expression des gènes cibles de Nrf2 tels que *ho-1*, *nqo-1* et *il-8* et une accumulation protéique de Nrf2 dans les MoDC et les cellules THP1 (Migdal *et al.*, 2013).

Les dithiolethiones tels que l'oltipraz (Iida *et al.*, 2004) et le 1,2-dithiole-3-thione (D3T) (Manandhar *et al.*, 2007) ; le resvératrol (Balogun *et al.*, 2003; Hsieh *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2012); le curcumin (Balogun *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2009); le 6-Methylthiohexyl isothiocyanate (6-MTTIC), présent dans le wasabi japonais (Korenori *et al.*, 2013) et le zerumbone (Shin *et al.*, 2011) induisent Nrf2 et ses gènes cibles tels que *ho-1* et *nqo1*.

Les inducteurs de Nrf2 peuvent être classés selon plusieurs groupes : **1)** les accepteurs de Michael, **2)** les quinones et les phénols oxydables, **3)** les isothiocyanates (ITC) et les thiocarbamates **4)** les dithioethiones et les sulfures de diallyle, **5)** les dimercaptans, **(6)** les polyènes, **(7)** les hydroperoxydes et **(8)** les métaux (Baird and Dinkova-Kostova, 2011; Ma and He, 2012; Magesh *et al.*, 2012).

(1) Les accepteurs de Michael

Il s'agit de molécules qui se lient aux cystéines de Keap1, la protéine inhibitrice ou régulatrice de Nrf2, (**Figure 55**) induisant par la suite l'activation des gènes cytoprotecteurs et antioxydants dépendants des ARE (Magesh *et al.*, 2012).

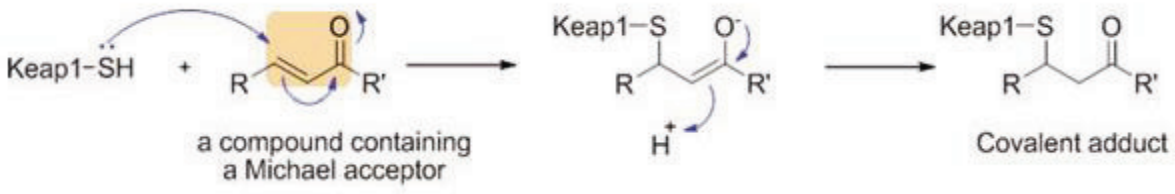


Figure 55 : Réaction de l'addition de Michael entre les accepteurs de Michael et les groupements sulfhydriles (-SH) des cystéines de Keap1 (Magesh *et al.*, 2012).

Ces accepteurs de Michael peuvent se retrouver dans les produits phytochimiques tels que les curcuminoïdes, les dérivés de l'acide cinnamic, les coumarines, les chalcones, les flavonoïdes et les terpenoïdes.

Le curcumin est un pigment jaune retrouvé dans le curry indien. Grâce à la présence de deux groupements phénoliques fonctionnels, le curcumin est connu pour sa capacité à neutraliser les ERO (Ak and Gulcin, 2008). Il contient deux groupements d'accepteur de Michael et une fonction β-dicétone capables de réagir directement avec les résidus cystéines des protéines. Il est aussi capable d'induire la voie Nrf2-Keap1-ARE *via* une modification des cystéines (Cys151, Cys273, Cys288) au niveau de Keap1 (Balogun *et al.*, 2003; Satoh *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009). Le curcumin est connu pour ses propriétés thérapeutiques telles que ses propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes; et ses effets antiarthritiques, anti-ischémiques et anticarcinogènes (Goel *et al.*, 2008) (**Figure 56**).

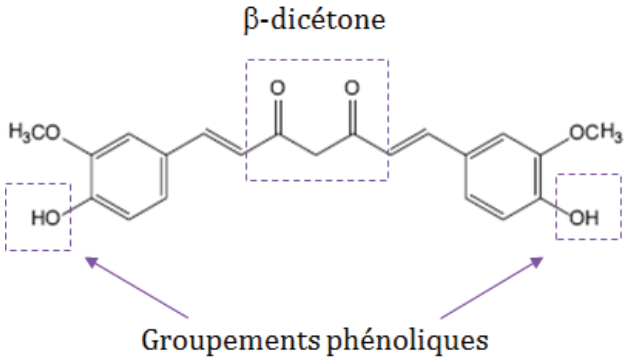


Figure 56 : La structure chimique du curcumin (Magesh *et al.*, 2012)

Les esters dérivés de l'acide cinnamique tels que l'ester de phénéthyl acide caféique (CAPE) et l'ester de l'acide férulique sont des esters α,β-insaturés et sont capables d'activer la voie Nrf2 (Ma *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013). Le CAPE est un composé isolé à partir de la propolis, la résine retrouvée dans les ruches des abeilles. Il est connu pour ses propriétés anti-mitogènes et anti-inflammatoires (Kim *et al.*, 2013) (**Figure 57**).

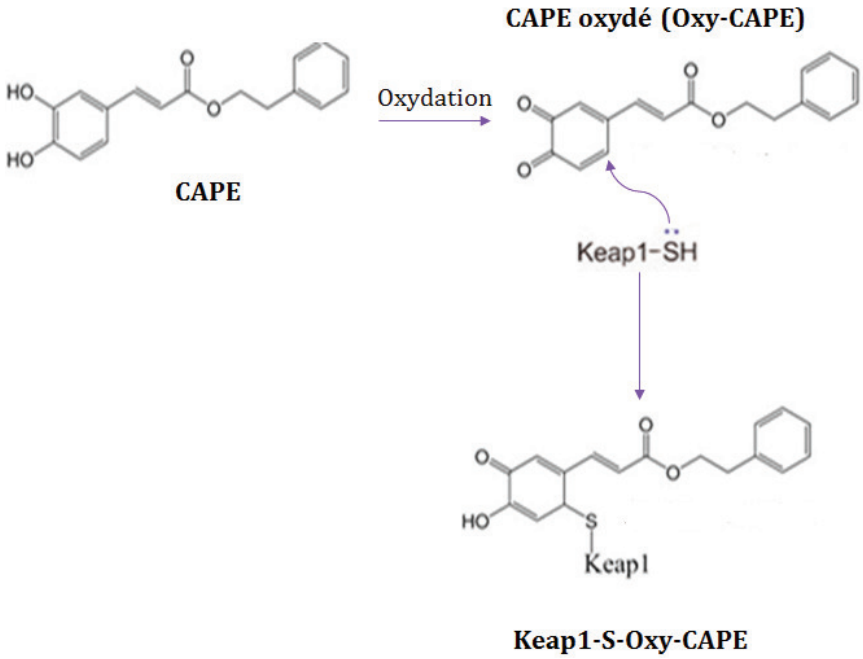


Figure 57 : Mécanisme d'addition de Michael entre CAPE et Keap1 [figure modifiée à partir de (Kim *et al.*, 2013)]

L'acide férulique et ses dérivés retrouvés dans les fruits et légumes possèdent aussi des propriétés protectrices contre l'oxydation des protéines et des lipides (Ma *et al.*, 2011). Parmi les accepteurs de Michael, les chalcones qui sont des flavonoïdes se trouvant dans les plantes et sont connues pour leur propriétés anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-infectieuses.

(2) Les phénols et les quinones oxydables

Les composés phénoliques sont des composés capables de neutraliser directement les ERO et sont utilisés comme des antioxydants (Aboul-Enein *et al.*, 2007). Le premier antioxydant phénolique découvert est le BHA capable d'induire les enzymes antioxydantes telles que HO-1 (Yuan *et al.*, 2006).

Le traitement des cellules hépatiques HepG2 par des flavonoïdes polyphénoliques tels que la quercétine, retrouvée dans les fruits et les légumes, le resveratrol, se trouvant dans la chaire des raisins rouges et par conséquent dans le vin rouge, sont capables d'induire

l'expression de Nrf2 et de ses gènes cibles tels que *ho-1*, *nqo1*, *gst*, *gcs*, *gr* et *gpx* (Tanigawa *et al.*, 2007; Granado-Serrano *et al.*, 2012); (Cheng *et al.*, 2012). Plusieurs études ont montré le rôle protecteur du resveratrol dans différentes maladies cardiovasculaires. Il a été ainsi montré que le resveratrol protège les cardiomyocytes induit par le stress oxydant. Les cardiomyocytes issus des rats Sprague Dawley traitées par le resveratrol puis exposés à l'H_2O_2 montrent une protection plus importante caractérisée par une viabilité cellulaire, des activités SOD, CAT et GPx plus élevées que les rats exposées uniquement à l'H_2O_2 (Movahed *et al.*, 2012).

Le carnosol et l'acide carnosique sont des catéchols se trouvant dans le romarin et sont utilisés comme des antioxydants alimentaires. Ils sont capables d'induire Nrf2 et de diminuer la péroxydation lipidique ainsi que la génération d'ERO. Ils sont capables d'induire l'expression de Nrf2 et de ses gènes ARE tels que *gclc* et *gclm* et d'augmenter le taux intracellulaire de GSH (Chen *et al.*, 2011a)

Plusieurs quinones sont connues induire Nrf2 telles que le t-BHQ, le ter-butylquinone (t-BQ) et le BHT. Il a été montré que le t-BHQ interagit avec les cys151, cys273 et cys288 de Keap1(Zhang and Hannink, 2003; Yamamoto *et al.*, 2008) (**Figure 58**)

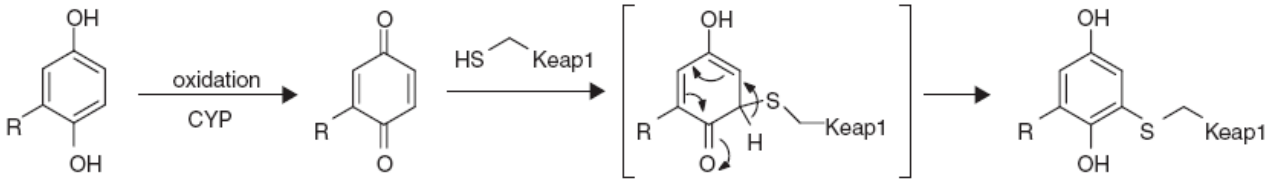


Figure 58 : Interaction de Keap1 avec des fonctions quinones (Hur and Gray, 2011)

(3) Les isothiocyanates (ITC) naturels se retrouvent dans les légumes crucifères tels que le broccoli et le chou. Ils comprennent le sulforaphane et le phenethyl ITC connus pour induire Nrf2 (Magesh *et al.*, 2012). La **Figure 59** montre le mécanisme d'interaction du sulforaphane avec Keap1 (Hu *et al.*, 2011). Il s'agit d'une réaction réversible.

Hu *et al.,* ont montré que le sulphraphane est capable d'interagir avec les cys151, cys241, cys273, cys288, cys319, cys395, cys406, cys434, cys613, cys622 et cys624 de Keap1 (Hu *et al.*, 2011).

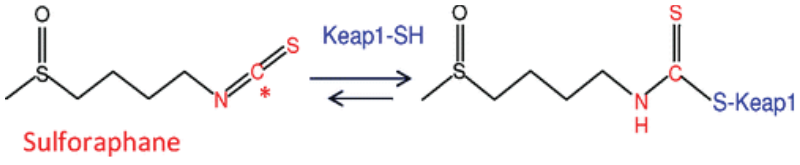
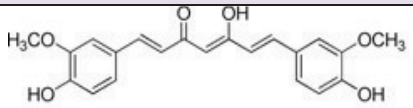
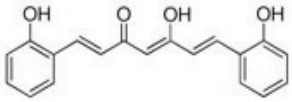
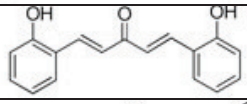
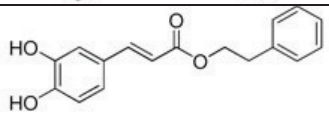
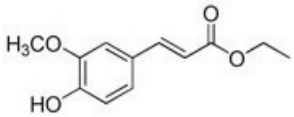
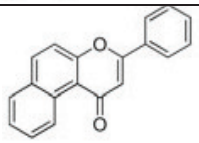
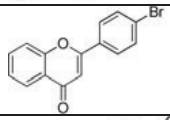
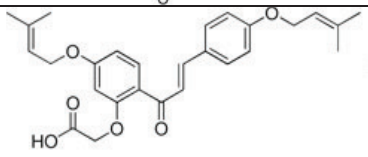
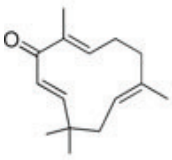
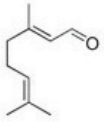
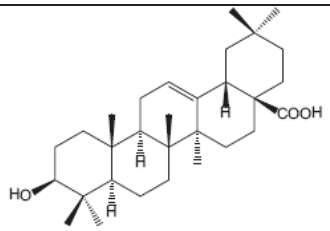
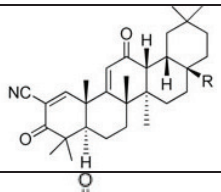
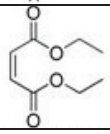
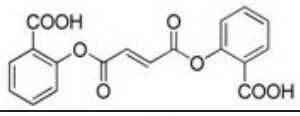
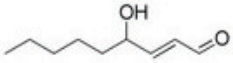
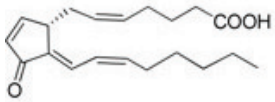
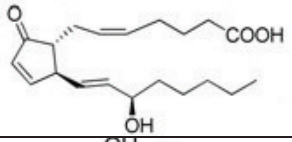
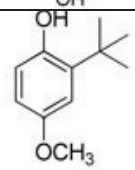
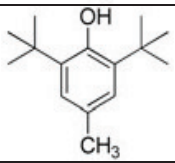
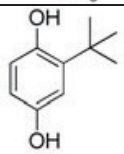
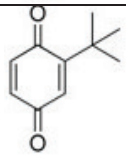
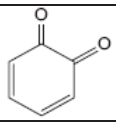


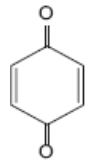
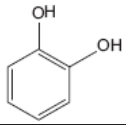
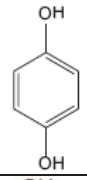
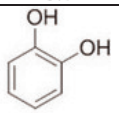
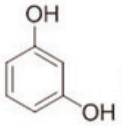
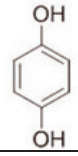
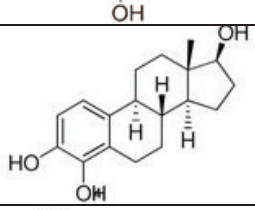
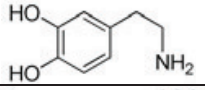
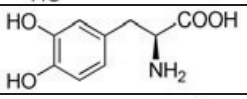
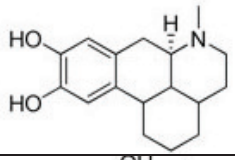
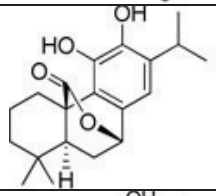
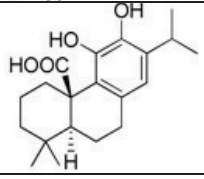
Figure 59 : Mécanisme d'interaction du sulforaphane avec Keap1 (Hu *et al.*, 2011)

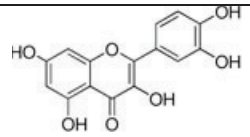
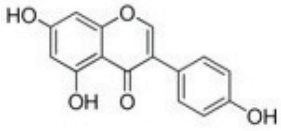
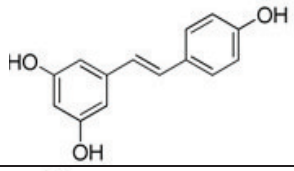
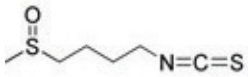
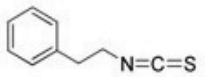
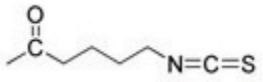
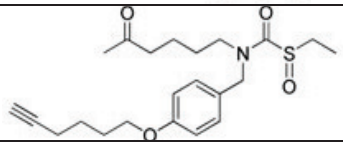
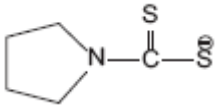
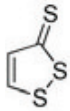
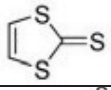
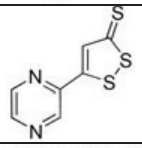
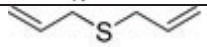
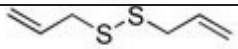
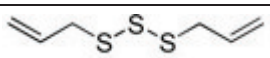
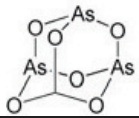
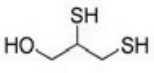
En plus des molécules phytochimiques, les molécules chimiques telles que les molécules allergisantes ont été aussi décrites comme étant des inducteurs des gènes cibles de Nrf2. Les molécules allergisantes comprennent des molécules phytochimiques telles que le géraniol, le cinnamaldéhyde, l'eugenol, l'isoeugenol, tous retrouvés dans les parfums et fragrances (Natsch, 2010).

Le **Tableau 11** résume les différents inducteurs des ARE et de la voie Nrf2.

Classe	Dérivés	Nom	Formule
Les accepteurs de Michael	Les curcuminoïdes	Curcumin	
		Salicylcurcuminoïde	
		Bis[22-hydroxybenzyldiène]acétone	
	L'acide cinnamique	Ester de phénéthyl acide caféique ou Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)	
		Ester de l'acide férulique ou Ferulic acid ethyl ester (EFE)	
	Les flavonoïdes	β-naphtoflavone	
		4-bromoflavone	
	Les Chalcones	Solfalcone	
	Les sesquiterpènes	Zerumbone (dans gingembre)	
		Citral	

Les accepteurs de Michael	L'acide oléanolique	Acide oléanolique	
	Les triterpénoïdes de l'acide oléanolique	2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oic acid (CDDO)	
		Dimethyl maleate (DEM)	
		Bis-salicyl fumarate	
		4-hydroxynonenal (4-HNE)	
	Les prostaglandines (PG) endogènes	15d-PGJ_2	
		PGA_2	
Les quinones et les phénols oxydables	Les composés polyphénoliques	Butylated hydroxyanisole (BHA)	
		Butylated hydroxytoluene (BHT)	
		tert-butylhydroquinone (t-BHQ)	
		tert-butyl-p-quinone	
		ortho-benzoquinone (*o*-BQ)	

Les quinones et les phénols oxydables	Les composés polyphénoliques	*para*-benzoquinone (*p*-BQ)	
		ortho-Hydroquinone (*o*-HQ)	
		para-hydroquinone	
	Les composés diphénoliques	Catechol (1,2-diphénol)	
		Resorsinol (1,3-diphénol)	
	Les composés diphénoliques	Hydroquinone (1,4-diphénol)	
	Les catéchols endogènes	4-hydroxy β17-estradiol	
		Dopamine	
		L-Dopa	
		Apomorphine	
	Les cathéchols	Carnosol	
		Acide carnosique	

Les quinones et les phénols oxydables	Les flavonoïdes polyphénoliques	Quercetine (dans agrumes)	
		Genistein (dans les grains de soya)	
	Les flavonoïdes polyphénoliques	Resveratrol (dans les grappes)	
Les isocyanates et les thiocarbamates	Les isocyanates	Sulforaphane (dans le brocoli et le chou fleur)	
		Phenethyl isothiocyanate (PEITC)	
		6-isothiocyanatohexan-2-one	
	Sulfoxythiocarbamate	S-ethyl (4-hex-5-ynyloxy-benzyl)-(5-oxohexyl)-thiocarbamate sulfoxide	
	Thiocarbamate	Pyrrolidine-1-carbodithioate	
Les dithioethiones et les sulfures de diallyle	Les dithioethiones	3H-1,2-Dithiole-3-thione (D3T)	
		1,3-dithiole-2-thione	
		Oltipraz	
	les sulfures de diallyle	Sulfure de diallyle (DAS)	
		Disulfulre de diallyle (DADS)	
		Trisulfure de diaallyle (DATS)	
Les arsenics trivalents		Trioxyde d'arsenic (ATO)	
Les dimercaptans		2,3-dimercapto-1-propanol (BAL)	

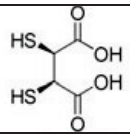
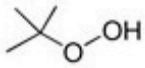
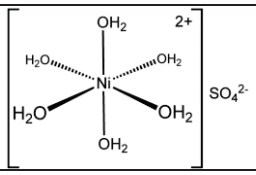
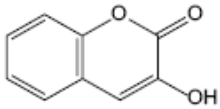
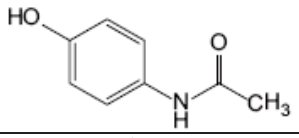
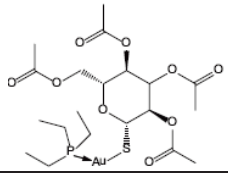
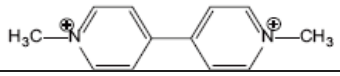
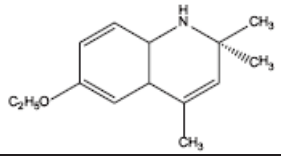
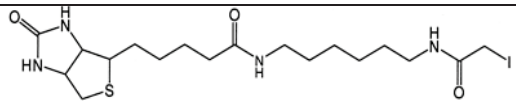
		Acide 2,3-dimercaptosuccinique	
		Acide R-lipoïque	
Les polyènes		Lycopène (dans les tomates)	
Les hydroperoxydes		*t*-butylhydroperoxyde (t-BHP)	
Les métaux		Hg^{2+}, Cd^{2+}, Cr^{6+}	
		$NiSO_4$	
Divers	Coumarine	3-hydrocoumarine	
	Médicaments	Paracétamol	
		Auranofin (Ridaura®)	
	Les produits environnementaux	Paraquat	
		Ethoxynin	
		Les particules de diesel et de silice	
	Molécules biotinylées	N-iodoacetyl-*N*-biotinylhexylenediamine (IAB)	
	Les protéines	p21 et p62	

Tableau 11 : Les différents inducteurs des ARE et de la voie Nrf2 (Baird and Dinkova-Kostova, 2011; Ma and He, 2012; Magesh *et al.*, 2012)

♦ Les inhibiteurs de Nrf2

Tout comme les activateurs de Nrf2, les inhibiteurs de Nrf2 sont variés. Ils comprennent l'acide ascorbique ou la vitamine C (Tarumoto *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2010), l'épigallocatéchine-3-gallate (EGCG), l'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA ou la rétinoïne)

(Wang *et al.*, 2007), le brusatol (Ren *et al.*, 2011), la lutéoline (Tang *et al.*, 2011), l'ochratoxine A (OTA) (Cavin *et al.*, 2007; Boesch-Saadatmandi *et al.*, 2009) et la trigonelline (Arlt *et al.*, 2013).

Tarumoto *et al.,* ont décrit que les cellules leucémiques humaines résistantes (KCL22/SR) à l'imitinib (Gleevec®), molécule anti-cancéreuse inhibitrice des tyrosine kinases, ont une expression génique plus importante de *gcs* que les cellules leucémiques non résistantes (KCL22). Cette forte expression de GCS se traduit par un taux de GSH intracellulaire plus élevé dans les cellules résistantes. Le traitement concomitant de l'imitinib avec l'**acide ascorbique** rend les cellules résistantes sensibles à l'imitinib. Cette sensibilité à l'imitinib est associée à une diminution de l'expression génique de *gcs* et du taux de GSH intracellulaire (Tarumoto *et al.,* 2004). De plus, l'étude effectuée par Wagner *et al.,* montre que l'acide ascorbique contrairement au sulforaphane diminue le taux de GSH intracellulaire et l'expression protéique de la GCS, l'HO-1 et la NQO-1 dans les cellules cancéreuses hépatiques humaines HUH7 (Wagner *et al.*, 2010).

L'**EGCG**, extrait du thé vert, est aussi montré comme un inhibiteur de Nrf2 lorsqu'il est utilisé à des concentrations supérieures à 200 μM. le traitement de la lignée pulmonaire A549, par l'EGCG, induit une diminution de l'expression protéique de Nrf2 et de HO-1. Cette diminution de l'expression de Nrf2 est accompagnée d'une diminution de la phosphorylation de la protéine kinase C (PKC), kinase jouant un rôle important dans la phosphorylation de Nrf2 et sa translocation nucléaire (Kweon *et al.*, 2006).

L'**ATRA**, métabolite naturel du rétinol ou de la vitamine A, est montré aussi comme inhibiteur de Nrf2 en diminuant sa liaison aux séquences ARE. Le traitement des cellules intestinales issues de souris traitées par l'ATRA inhibe l'expression des gènes cibles de Nrf2 telles que la *gclc*, la *gstm5*, la *gsta1/2*, *nqo1* comparée aux cellules contrôles. Par ailleurs, l'ATRA ne diminue pas l'accumulation nucléaire de Nrf2 mais diminue la liaison de Nrf2 aux séquences ARE. En présence de l'ATRA, Nrf2 forme un complexe avec le récepteur alpha de l'acide rétinoïque (RARα) dans le noyau empêchant ainsi la liaison de Nrf2 aux séquences ARE (Wang *et al.*, 2007).

Le **brusatol**, molécule extraite à partir de la plante *Brucea javanica,* utilisée comme un anti-cancéreux, possède aussi une propriété inhibitrice de la voie Nrf2/Keap1. Ren *et al.,* ont montré que le brusatol induit une diminution de l'expression protéique de Nrf2 et de ses gènes cibles tels que GCS, MRP1, MRP2 et NQO-1 dans les cellules cancéreuses. Cette

diminution est due à l'augmentation de l'ubiquitination de Nrf2 en présence du brusatol favorisant ainsi sa dégradation (Ren *et al.*, 2011).

Par ailleurs, la **lutéoline**, flavonoïde retrouvé dans le céleri, le poivron et les carottes, inhibe aussi la transcription des gènes dépendants de Nrf2. Elle est considérée comme un inhibiteur sélectif de Nrf2. Ainsi, dans les cellules cancéreuses pulmonaires humaines A549 qui expriment constitutivement Nrf2, la lutéoline induit la dégradation des ARNm de *nrf2* ce qui explique la diminution drastique de l'expression génique et protéique de Nrf2 et de ses gènes cibles (l'AKR1C1, la GCLC, l'HO-1, la MRP2 et la NQO1). Ceci est aussi accompagné d'une déplétion importante du GSH intracellulaire. L'analyse par l'approche d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) a pu montrer une diminution de l'interaction de Nrf2 avec les séquences ARE des promoteurs de NQO1 et HO-1 au niveau nucléaire dans les cellules A549 en présence de la lutéoline (Tang *et al.*, 2011).

L'**OTA**, une mycotoxine produite par l'*Aspergillus* et le *Penicillium*, présente des effets néphrotoxiques et carcinogènes qui peuvent être liés à l'inhibition de Nrf2. Ainsi, le traitement des cellules cancéreuses tubulaires rénales porcines LLC-PK1 par l'OTA montre une faible translocation nucléaire de Nrf2 accompagnée d'une diminution de l'expression génique de *nrf2* et de ses gènes cibles tels que la *gcs* et la *gst* (Boesch-Saadatmandi *et al.*, 2009).

Récemment, un nouvel inhibiteur de Nrf2 a été décrit. Il s'agit de la **trigonelline** qui est un alkaloïde retrouvé dans le café. Ainsi, les cellules cancéreuses pancréatiques traitées par la trigonelline montrent une diminution de l'accumulation nucléaire de Nrf2 et de l'activité protéasomale. Cette dernière est due à une diminution de l'expression génique et protéique des sous-unités 19S (S5a ou psmd4) et 20S (α5 ou psma5) du protéasome (Arlt *et al.*, 2013).

2.5. Les autres membres de la famille Nrf2

La sous-famille des facteurs de transcription cap'n'collar (CNC) de type zipper à leucines basiques est composée de Nrf2 mais également de NF-E2, Nrf1, Nrf3, de 'BTB and CNC homolog' (Bach) 1 et de Bach2.

Le premier membre identifié a été le facteur de transcription érythroïde NF-E2 dont la déficience a montré chez les souris une anémie ou une forte hémorragie (Shivdasani and Orkin, 1995). Récemment, il a été décrit que la surexpression de NF-E2 joue un rôle dans l'inflammation chronique induite par la production excessive d'ERO. En effet, il est retrouvé

surexprimé dans les mégacaryocytes et les précurseurs érythroïdes et granulocytaires des patients atteints de polyglobulie et de thrombocytopénie (Hasselbalch, 2013). Nrf1 semble posséder un rôle assez proche de celui de Nrf2 dans le contrôle de l'inflammation en régulant négativement l'expression génique d'*inos* et la réponse anti-oxydante (Biswas and Chan, 2010).

Nrf1 possède deux isoformes Nrf1a et Nrf1b régulant toutes les deux l'expression génique de *ho-1*, *nqo-1*, *gclc* et *gclm* (Kwong *et al.*, 2012). Nrf1 est important pour le développement embryonnaire. Ainsi les embryons de souris *nrf1*$^{-/-}$ meurent *in utero* à cause d'une anémie entre le 17ème et le 18ème jour de la gestation (Chan *et al.*, 1998; Copple *et al.*, 2010). Quant à Nrf3, il semble jouer un rôle répresseur de l'expression des gènes antioxydants tels que *nqo1* (Sankaranarayanan and Jaiswal, 2004; Copple *et al.*, 2010). Les souris déficientes pour le gène *nrf3* se développent normalement et ne présentent aucun phénotype anormal (Kobayashi and Yamamoto, 2006). Chevillard et Blank montrent que Nrf3 joue un rôle dans l'inflammation induite par le BHT. Ainsi, les souris *nrf3*$^{-/-}$ développent un syndrome de détresse respiratoire aiguë et une perte de poids plus importante que chez les souris *nrf3*$^{+/+}$. Le marquage immunohistochimique des poumons des souris *nrf3*$^{-/-}$ traitées pendant 3 jours par le BHT, a montré un dommage et une hémorragie alvéolaires qui s'accompagnent d'une pneumonie interstitielle beaucoup plus importants que chez les souris *nrf3*$^{+/+}$ (Chevillard *et al.*, 2010).

Bach1 et Bach2, quant à eux, régulent négativement les gènes antioxydants activés par Nrf2. Bach1 est ubiquitaire et est fortement exprimé dans les organes hématopoïétiques tels que la moelle osseuse. Les souris déficientes pour le gène *bach1* sont viables et fertiles. En absence de stress oxydant ou électrophile, Bach1 s'hétérodimérise avec sMaf dans le noyau pour se lier sur des séquences ARE réprimant ainsi la transcription des gènes cibles de Nrf2. En présence d'un stress oxydant, Bach1 se dissocie des séquences ARE et sera déplacé par Nrf2. Bach1 joue alors le rôle de régulateur négatif de Nrf2 (Dhakshinamoorthy *et al.*, 2005). Kaspar et Jaiswal ont montré que Bach1 quitte le noyau 1 h à 2 h après le traitement des cellules hépatiques humaines HepG2 ou murines Hepa-1 par le t-BHQ. La phosphorylation de la tyrosine 486 de Bach1 par le t-BHQ dans les mêmes cellules est indispensable pour son export nucléaire. Cet export permet alors à Nrf2 de se lier aux séquences ARE (Kaspar and Jaiswal, 2010).

Quant à Bach2, il est surtout abondant dans le cerveau et les LB (Kobayashi and Yamamoto, 2006). Une étude récente montre que Bach2 joue un rôle important dans la régulation de la mort cellulaire en réponse à un stress oxydant. Ainsi, la lignée MCL (mantle

cell lymphoma) traitées avec le Bortezomib (Velcade®), une molécule inhibitrice réversible du protéasome 26S utilisée dans le traitement du lymphome à cellules du manteau, induit la translocation nucléaire de Bach2. Le lymphome à cellules du manteau est une forme rare de lymphome non-Hodgkinien malin affectant les LB dans une région des ganglions lymphatiques appelée la zone manteau. Dans cette même étude, il est montré que la translocation nucléaire de Bach2 est accompagnée d'une diminution de l'expression des gènes antioxydants (*nrf2, cat*, *ho-1*, *sod*,) et anti-apoptotiques (*bcl2*, *bcl-xl)* et de l'augmentation de cellules apoptotiques en réponse au Bortezomib (Chen *et al.*, 2013).

2.6. Les modifications post-traductionnelles du complexe Nrf2/Keap1

2.6.1. La phosphorylation de Nrf2

Plusieurs protéines kinases ont été décrites pour induire la phosphorylation de Nrf2 en réponse à différents *stimuli*. Ces Kinases comprennent la caséine kinase 2 (CK2), la protéine kinase C (PKC), la 'Glycogen synthase kinase 3 beta' (GSK3β), la proteine kinase 'RNA-like endoplasmic reticulum kinase' (PERK), la kinase Fyn et les Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) telles que la kinase 'c-Jun NH_2-terminal kinase' (JNK), la 'phosphatidylinositol 3-kinase' (PI3K) et la kinase 'extracellular signal-regulated kinase' (ERK) (Nguyen *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2009b).

Ainsi il a été décrit que la phosphorylation de Nrf2 se fait en deux phases : une phase précoce impliquant la PKC, la CK2, la PI3K, PERK, p38, ERK et JNK; et une phase tardive impliquant la GSK3β et la kinase Fyn (Kaspar *et al.*, 2009; Niture *et al.*, 2013).

- **La phase précoce de phosphorylation de Nrf2**

La **PKC** joue un rôle important dans la phosphorylation de Nrf2 *via* la Ser40 qui se situe dans le domaine Neh2 (Huang *et al.*, 2002; Niture *et al.*, 2009). Niture *et al.,* ont montré que l'isoforme PKC-δ favorise la phosphorylation de Nrf2 au niveau de sa Ser40 en réponse au t-BHQ ce qui induit la dissociation entre Keap1 et Nrf2 et la translocation de ce dernier vers le noyau (Niture *et al.*, 2009).

Les **MAPK**, qui sont des sérines/thréonines kinases, sont aussi impliquées dans la phosphorylation de Nrf2. Les inducteurs de Nrf2 tels que le t-BHQ, le sulforaphane et les molécules allergisantes comme le DNCB et le $NiSO_4$, activent la voie des MAPK. Le t-BHQ et le sulforaphane activent ERK (Yu *et al.*, 1999) alors que le DNCB et le sulfate de nickel ($NiSO_4$) activent P38, ERK et JNK (Boisleve *et al.*, 2004; Antonios *et al.*, 2009). Sun *et al.,* ont montré

que Nrf2 est phosphorylé au niveau de différents résidus sérine/thréonine tels que la Ser215, la Ser408, la Ser558, la Ser577 et la Thr559. Parmi ces résidus, la Ser215, la Ser408 et la Ser577 participent à la phosphorylation de Nrf2 *via* l'activation de p38, ERK et JNK. Cette étude montre également que la mutation de chacun de ces 5 sites de phosphorylation de Nrf2 n'affecte pas son activité transcriptionnelle pour ses gènes cibles tels que *nqo-1* et *gsta1*. Cependant, la mutation simultanée des 5 sites de phosphorylation de Nrf2 diminue légèrement l'expression génique de *nqo-1*, *ho-1* et *gclm* (Sun *et al.*, 2009b).

Apopa *et al.,* ont monté que le traitement des cellules du neuroblastome humain (IMR-32) par le t-BHQ induit la protéine Nrf2 sous deux états (deux bandes) visualisés par Western blot. Ils montrent que la bande de PM correspond à la forme phosphorylée de Nrf2 par la **CK2** alors que la bande de bas PM correspond à sa forme non phosphorylée. Une fois phosphorylé, Nrf2 transloque dans le noyau pour induire l'expression des gènes antioxydants (Apopa *et al.*, 2008). Ainsi, Pi *et al.,* ont montré que Nrf2 possède 13 sites potentiels de phosphorylation par la CK2 (Pi *et al.*, 2007) et que le domaine trans-activateur, comprenant les domaines Neh4 et Neh5, est identifié comme la région cible pouvant être phosphorylée par la CK2 (*in vitro*) (Apopa *et al.*, 2008).

Wang *et al.,* ont montré que le sulforaphane induit la voie **PI3K** nécessaire à l'activation de Nrf2. Ainsi, l'inhibition de cette voie par l'inhibiteur LY294002 induit une diminution de l'activité de Nrf2 ainsi qu'une diminution de ses gènes cibles tels que la *gclc* et la *gclm* dans les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine (RPE) (Wang *et al.*, 2008). La **Figure 60** montre la phase précoce de phosphorylation de Nrf2

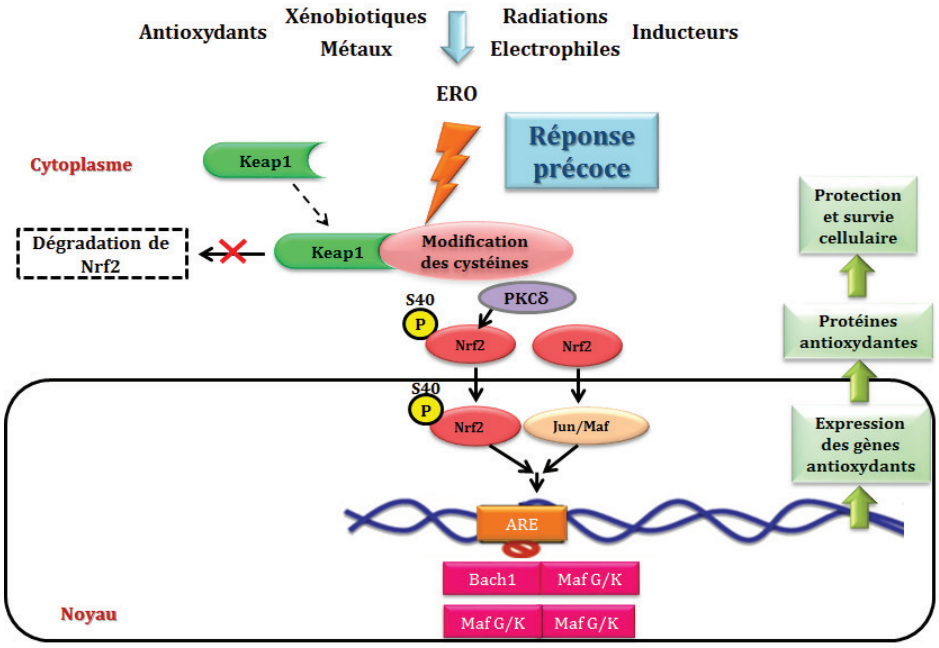


Figure 60 : Phase précoce de phosphorylation de Nrf2 [figure modifiée à partir de (Niture *et al.*, 2013)]

- **La phase tardive de phosphorylation de Nrf2**

La protéine Nrf2 possède 10 sites putatifs de phosphorylation [(S/T)XXX(S/T)] par la G3Kβ, une sérine/thréonine kinase capable de phosphoryler Nrf2 (Salazar *et al.*, 2006). La G3Kβ agit en amont de la kinase Fyn en la phosphorylant au niveau de ses résidus thréonine, actuellement inconnues et induit sa translocation vers le noyau (Jain and Jaiswal, 2007). En effet, Jain et Jaiswal, ont montré que le traitement des cellules HepG2 par l'H_2O_2 permet la phosphorylation de la Tyr216 de la G3Kβ favorisant ainsi son activation. Une fois activée, la G3Kβ phosphoryle la tyrosine kinase Fyn sur ses résidus thréonine. Phosphorylée, Fyn s'accumule dans le noyau et permet la phosphorylation de Nrf2 au niveau de sa Tyr568 permettant ainsi son export nucléaire *via* l'exportine crm1 (chromosomal region maintenance-1) (Jain *et al.*, 2005). Cet export vers le cytoplasme permet l'ubiquitination et la dégradation de Nrf2 par le protéasome (Jain and Jaiswal, 2007) (**Figure 61**).

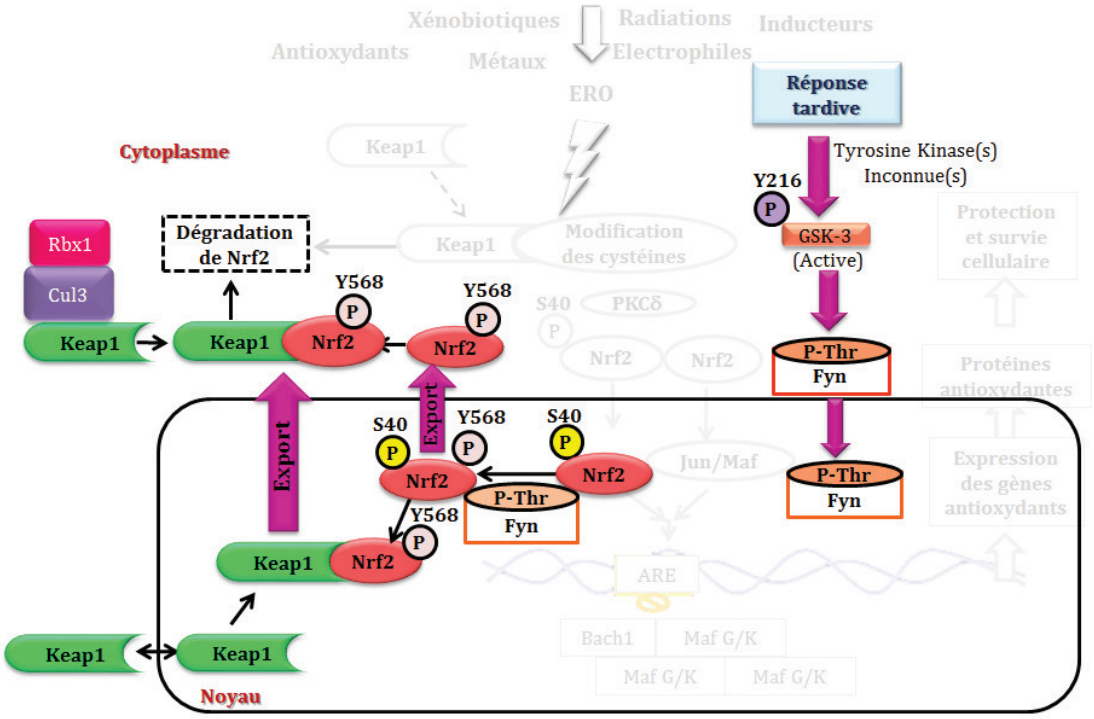


Figure 61 : Phase tardive de phosphorylation de Nrf2 [figure modifiée à partir de (Niture *et al.*, 2013)]

2.6.2. L'acétylation et la désacétylation de Nrf2

La voie Nrf2/Keap1 peut aussi être activée *via* des mécanismes d'acétylation par ces co-activateurs transcriptionnels tels que p300 et CBP [CREB (cAMP Responsive Element Binding protein)-binding protein]. Ces co-activateurs transcriptionnels ont été identifiés au niveau du

domaine de liaison aux séquences ARE dans les cellules hépatiques HepG2 en réponse au t-BHQ (Zhu and Fahl, 2001). CBP se lie à Nrf2 au niveau des deux domaines Neh4 et Neh5 (Katoh *et al.*, 2001). Le complexe p300/CBP permet le recrutement de l'ARN polymérase II favorisant ainsi la transcription des gènes. Sun *et al.,* ont montré dans un modèle de cellules rénales HEK293T traitées par de l'arsenic trivalent [As(III)] que le complexe p300/CBP possède une activité histone acétyltransférase intrinsèque permettant l'acétylation des résidus lysine de Nrf2. Ils ont montré que le domaine de liaison à l'ADN, Neh1, possède la majorité de ses lysines acétylées (Sun *et al.*, 2009a). CBP, en acétylant Nrf2, favorise ainsi la liaison de Nrf2 aux séquences ARE au niveau des promoteurs des gènes de phase II tels que *nqo-1*. La mutation des Lys588 et Lys591 diminuent l'activité transcriptionnelle des gènes cibles de Nrf2. Enfin, la désacétylation de Nrf2 par la désacétylase situin1 (SIRT1) résulte d'un export nucléaire de Nrf2 vers le cytoplasme se traduisant par une diminution de la transcription des gènes cibles de Nrf2 (Kawai *et al.*, 2011).

Cependant, d'autres études montrent que la désacétylation de Nrf2 par l'histone désacétylase 2 (HDAC2) permet sa stabilité et par conséquent une augmentation de la transcription de ses gènes antioxydants (Biswal *et al.*, 2012). Pour mimer l'activité de l'HDAC2 comme celle retrouvée dans la maladie de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), des cellules de la lignée BEAS2B ont été traitées par la trichostatine A (TSA), un inhibiteur non sélectif des HDAC (Mercado *et al.*, 2011). Mercado *et al.,* montre que Nrf2 est associé à HDAC2. Cette dernière inhibe la dégradation de Nrf2 en désacétylant ses résidus lysines. L'inhibition de l'activité de l'HDAC par la TSA, montre une augmentation de l'acétylation de Nrf2 dans les cellules pulmonaires BEAS2B 1 h à 2 h après l'incubation. Adenuga *et al.,* ont montré que les poumons issus des souris *nrf2*$^{-/-}$ présentent une activité désacétylase HDAC2 beaucoup plus réduite que dans les souris *nrf2*$^{+/+}$. L'exposition des souris *nrf2*$^{-/-}$ à la fumée de cigarette pendant trois jours consécutifs montre une diminution de l'expression protéique de l'HDAC2 dans les poumons associée à une inflammation pulmonaire plus importante par rapport aux souris sauvages. Ces souris déficientes en *nrf2* ont également montré une résistance au traitement anti-inflammatoire stéroïdien par le Budesonide (Pulmicort®) contrairement aux souris sauvages (Adenuga *et al.*, 2010).

2.6.3. Ubiquitination et phosphorylation du senseur naturel de Nrf2

Keap1 peut aussi être une cible d'ubiquitination *via* la Cul3, induisant ainsi l'activation de la voie Nrf2/Keap1. Deux études ont montré que des activateurs de Nrf2 tel que le t-BHQ et le

N-iodoacetyl-N-biotinylhexylenediamine (IAB), sont capables d'ubiquitiner Keap1 (Hong *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). L'IAB ubiquitine la Lys298 située dans le domaine IVR de Keap1 (Hong *et al.*, 2005). A l'état basal la phosphorylation constitutive de la Tyr141 de Keap1 est essentielle pour sa stabilisation. Stabilisé, Keap1 se dimérise avec Nrf2 et favorise sa dégradaton *via* le protéasome. Cependant, le stress oxydant ou électrophile induit la déphosphorylation de la Tyr141 de Keap1 rendant ainsi Keap1 instable et non fonctionnel. Nrf2 se détache alors de Keap1 et transloque vers le noyau (Jain *et al.*, 2008). Par ailleurs, le traitement des cellules HepG2 par le t-BHQ induit la phosphorylation de la Tyr85 de Keap1. Cette phosphorylation contrôle l'export de Keap1 vers le noyau sous forme d'un complexe Keap1/Cul3/Rbx1 (Kaspar *et al.*, 2012).

2.7. La régulation indirecte de la voie Nrf2/Keap1

Différentes protéines sont impliquées dans la régulation de la voie Nrf2/Keap1. Certaines protéines modifient le complexe en interagissant soit avec Nrf2 soit avec Keap1 au niveau cytoplasmique ou nucléaire.

2.7.1. Les protéines partenaires de Keap1

- **La prothymorsine alpha**

Plusieurs protéines, autres que Nrf2, sont décrites interagissant avec Keap1. Parmi ces protéines, la prothymorsine alpha (PTMα), une protéine ubiquitaire de faible PM (12.1 kDa), se lie à la région C-terminale du domaine Kelch de Keap1 et assure ainsi sa translocation nucléaire. Niture et Jaiswal montrent que si la majorité de Keap1 est majoritairement exprimée dans le cytoplasme des cellules hépatiques murines Hepa-1, 10% à 15% de Keap1 est retrouvé dans le noyau. La translocation nucléaire de Keap1 se fait toujours sous forme de complexe avec les protéines Cul3 et Rbx1 et nécessite l'association de Keap1 à PTMα. Une fois dans le noyau, le complexe Keap1/Cul3/Rbx1 se dissocie de PTMα et se lie à Nrf2. La liaison de Nrf2 au complexe Keap1/Cul3/Rbx1 assure son ubiquitination et sa dégradation au niveau nucléaire (Niture and Jaiswal, 2009). Ce mécanisme est observé au cours de la phase tardive de phosphorylation de Nrf2 par la tyrosine kinase Fyn sur sa Tyr 568 qui est nécessaire pour la liaison de Nrf2 à Keap1 dans le noyau et l'export du complexe vers le cytoplasme (Jain and Jaiswal, 2006).

♦ La kayryophérine α6

La protéine kayryophérine α6 (KPNA6) appelée aussi importine α7, protéine adaptatrice du transport nucléo-cytoplasmique est aussi décrite comme une protéine d'import nucléaire de Keap1. Sun *et al.,* ont montré qu'à l'état basal, Keap1 se déplace constamment entre le cytoplasme et le noyau. Le motif armadillo (ARM) (a.a 108-536) du domaine C-terminal de KPNA6 interagit avec la région C-terminale du domaine Kelch de Keap1 (a.a 325-609). Une fois Nrf2 libéré de Keap1 en réponse au t-BHQ, KPNA6 interagit avec le domaine Kelch de Keap1 et assure sa translocation dans le noyau. Pour établir l'homéostasie cellulaire, Keap1 se lie à Nrf2 dans le noyau et le complexe Nrf2/Keap1 est transporté vers le cytoplasme grâce aux domaines d'export NES de Keap1 (Sun *et al.*, 2011) (**Figure 62**).

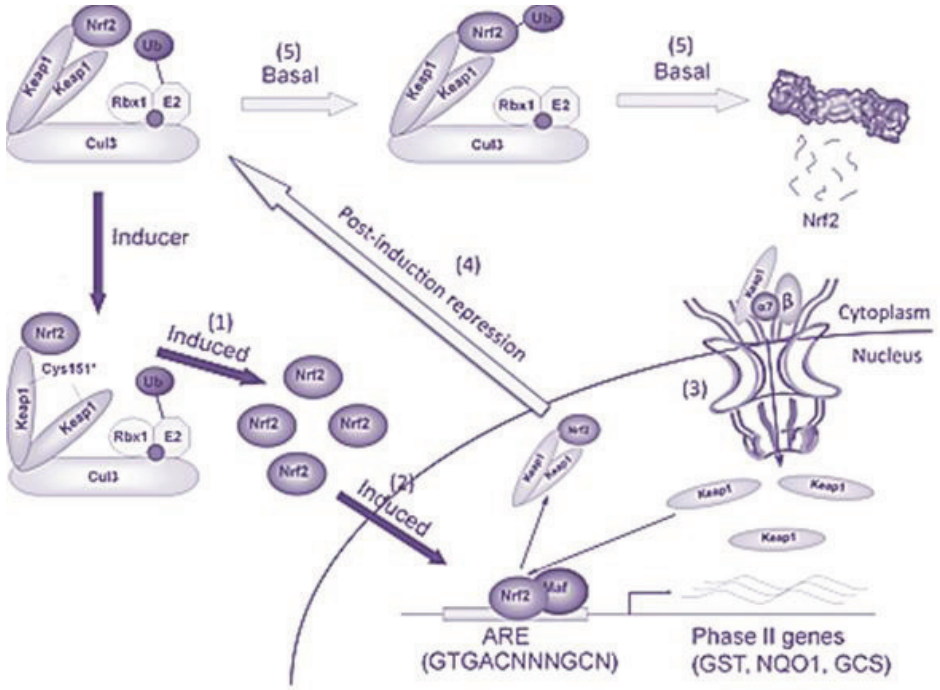


Figure 62 : La voie Nrf2/Keap1 régulée par l'importine α7 (Sun *et al.*, 2011)

♦ L'IKKβ

L'IκB kinase β ou l'IKKβ, l'activateur naturel du facteur de transcription Nuclear Factor (NF)-κB, est aussi identifié comme partenaire de Keap1. NF-κB, formé de deux sous-unités p50 et p65, est impliqué différents mécanismes cellulaires tels que l'inflammation. Son activité peut être régulée par la production intracellulaire d'ERO. IKKβ régule positivement la voie NF-κB en ciblant IkBα, inhibiteur naturel de NF-κB, L'IKKβ phosphoryle les deux résidus sérines d'IκBα (Ser32 et Ser36) favorisant sa dégradation *via* le protéasome. En parallèle,

IKKβ phosphoryle la sous-unité p65 de NF-kB favorisant son activation. L'hétéro-dimère p50/p65, constituant la forme classique de la voie NF- κB, transloque vers le noyau où il va se fixer au niveau de l'ADN pour induire la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation ou l'angiogenèse tels que la *cox-2, l'inos et la cyclin d1* (Tian *et al.*, 2012) (**Figure 63**).

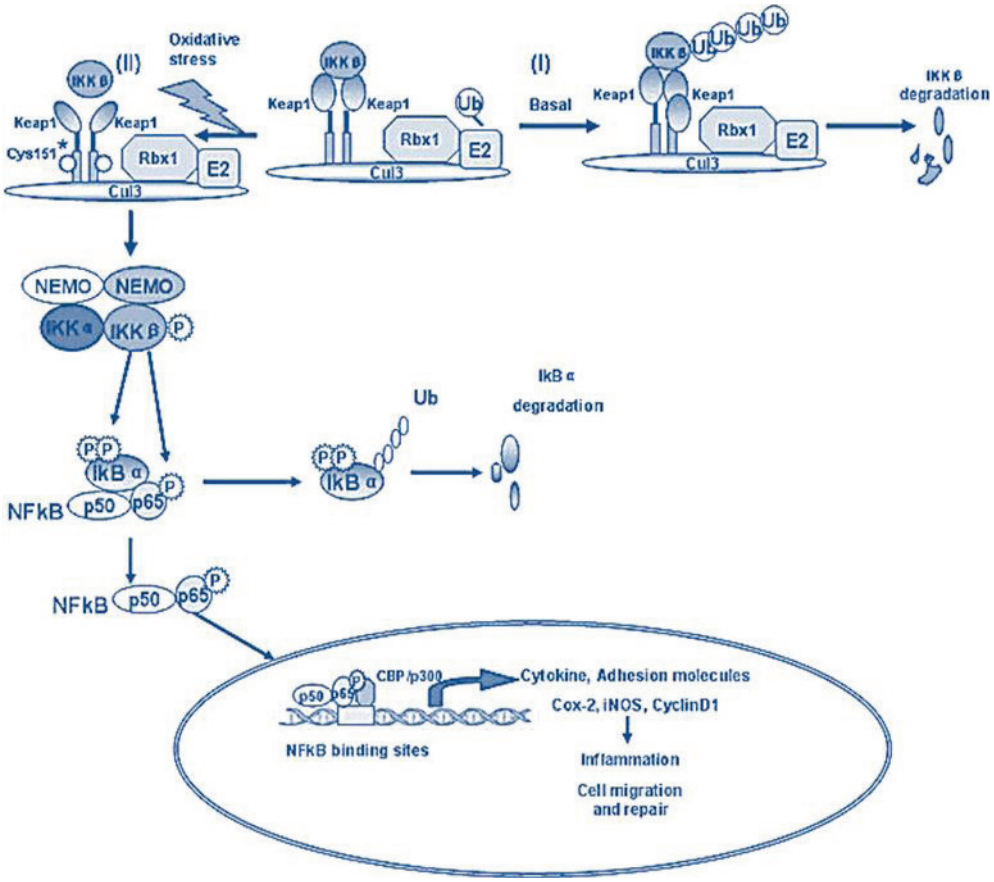


Figure 63 : La régulation de la voie NF-kB par Keap1 (Tian *et al.*, 2012)

Lee *et al.,* ont décrit que Keap1 inhibe la voie NF-κB grâce à sa liaison avec IKKβ au niveau de son motif ETGE (NQE36TGE39) ressemblant à celui de Nrf2 (DEE79TGE82) (Lee *et al.*, 2009).

♦ La sous-unité p65 du facteur de transcription NF-κB

En plus de son interaction avec l'IKKβ, Keap1 peut interagir avec la sous-unité p65 de NF-κB. Yu *et al.,* ont montré, dans les cellules HEK293, que le domaine C-terminal de Keap1 (a.a 1-312) est associé à p65. Cette association entre p65 et Keap1 régule négativement Nrf2 en inhibant sa liaison aux séquences ARE dans le noyau. Ceci se traduit par une inhibition de l'expression des gènes cibles de Nrf2 tels que *gclc*, *gclm*, *ho-1*, *nqo-1*, *sod* et *trx* en présence de

p65. Cette inhibition est levée en utilisant un inhibiteur pharmacologique de l'IKKβ [BAY 11-7082]. La surexpression de p65 favorise la translocation nucléaire de Keap1 et l'ubiquitination de Nrf2 permettant ainsi sa dégradation (Yu *et al.*, 2011).

♦ La phosphoglycérate mutase 5, Bcl-xl et Bcl-2

Lo et Hannink ont montré la présence d'un complexe ternaire comprenant Nrf2, Keap1 et la phosphoglycérate mutase 5 (PGAM5) au niveau mitochondrial. La PGAM5 est une sérine/thréonine phosphatase se trouvant au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Dans les cellules rénales HEK293T, la présence du complexe Keap1/PGAM5 dans la mitochondrie (Lo and Hannink 2008) montre que le motif NxESGE (a.a 77–82) de la région N-terminale de PGAM5 est lié à Keap1. La liaison de PGAM5 à Keap1 favorise son ubiquitination et sa dégradation *via* le protéasome. Cette dégradation est inhibée lorsque les cellules cancéreuses MDA-MB-231 sont traitées par le sulforaphane ou le t-BHQ (Lo and Hannink 2006). Par son domaine C-terminal, PGAM5 peut aussi s'associer à la protéine anti-apoptotique Bcl-xl. Niture *et al.,* ont montré que Keap1 contrôle ainsi la dégradation de Bcl-xl et de PGAM5 *via* le protéasome. La liaison de Keap1 et de Bcl-xl nécessite la présence de PGAM5. Le complexe Nrf2/INrf2/PGAM5/Bcl-xl est présent au niveau mitochondrial et a pu être identifié par un marquage immuno-histochimique (Niture and Jaiswal, 2011a).

En plus de sa liaison à Bcl-xl, Keap1 *via* son domaine DGR peut aussi se lier à la protéine anti-apoptotique Bcl-2 *via* son domaine BH2. Cette liaison induit ainsi l'ubiquitination et la dégradation de Bcl-2 par le protéasome. Le traitement des cellules murines Hepa-1 par le t-BHQ conduit à une dissociation entre Keap1 et Bcl-2. Cette dissociation favorise la phosphorylation de la Ser70 de Bcl-2. Ainsi, le pré-traitement des cellules cancéreuses A549 par le t-BHQ, suivi d'un traitement par l'étoposide, un carcinogène toxique, ou par les rayons UV, induit la phosphorylation de Bcl-2. Bcl-2, ainsi stabilisée, contrôle la survie des cellules cancéreuses pré-traitées par le t-BHQ (Niture and Jaiswal, 2011b) (**Figure 64**).

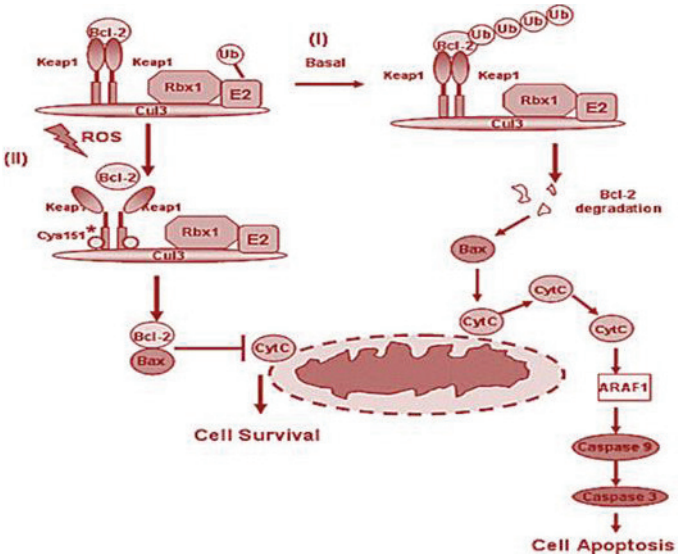


Figure 64 : La régulation de Bcl-2 par Keap1 (Tian *et al.*, 2012)

♦ La protéine de choc thermique Hsp90

La protéine de choc thermique Hsp90 (Heat shock protein 90) participe également à la régulation de la voie Nrf2/Keap1. Niture *et al.,* ont montré que Keap1, peut se lier à la protéine Hsp90 *via* son domaine N-terminal tandis que la protéine Hsp90 se lie *via* son domaine CLD (charged linker domain). La phosphorylation de la thréonine (Thr) 55 de Keap1 par la CK2 est indispensable pour l'interaction de Keap1 avec l'Hsp90 (Niture and Jaiswal, 2010).

♦ La protéine p62

La protéine p62 est une protéine jouant un rôle important dans le mécanisme de l'autophagie. P62 interagit aussi avec Keap1. Cette interaction se fait *via* le motif DPSTGE (a.a 349-354) de la région KIR (Keap1 interacting region) de p62 et le domaine Kelch de Keap1. Cette liaison favorise la stabilisation de Nrf2 inhibant ainsi son ubiquitination et sa dégradation. La surexpression de p62 dans les cellules HEK293T augmente l'expression protéique de Nrf2 et l'expression génique de *ho-1*, *nqo1*, *gclm* et *mrp2* (Lau *et al.*, 2010) (**Figure 65**).

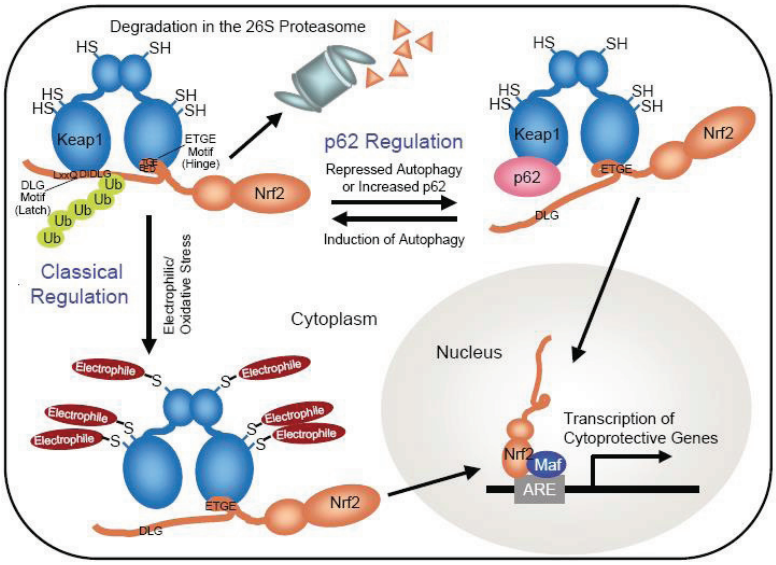


Figure 65 : La régulation de la voie Nrf2/Keap1 par p62 (Komatsu *et al.*, 2010)

2.7.2. Les protéines partenaires de Nrf2

Nrf2 possède d'autres protéines partenaires qui régulent positivement son expression et assurent sa stabilité. Parmi ces partenaires, la protéine p21 et la cavéoline.

- **La protéine P21**

La protéine $p21^{Cip1/WAF1}$ régule plusieurs mécanismes cellulaires tels que l'apoptose. En réponse à un stress oxydant, l'expression de p21 est augmentée pour favoriser la survie cellulaire. Chen *et al.,* ont montré que p21, *via* son motif KRR de son domaine C-terminal, peut interagir avec le motif DLG de Nrf2. De plus, l'augmentation de l'expression de Nrf2 est médiée par p21. Ainsi, à l'état basal, les MEF issus des souris *nrf2*$^{+/+}$ puis transfectées avec des ARN interférents (siRNA) p21 montrent une diminution de l'expression protéique de Nrf2 et de l'expression des gènes cibles de Nrf2 tels que *nqo-1* et *ho-1* par rapport aux cellules contrôles. L'expression protéique diminuée de Nrf2 a été aussi observée dans les cellules cancéreuses HCT116 transfectées par des siRNA p21 à l'état basal et en réponse au t-BHQ ou au sulforaphane. Dans les mêmes conditions, les expressions géniques de *nqo1*, *gpx2*, *mrp2* ont été aussi diminuées. De plus, les foies issus de souris *p21*$^{-/-}$ traitées ou non par le BHA pendant 12 h montrent une expression protéique plus réduite de Nrf2, de NQO1 et de HO-1 comparées aux foies de souris *p21*$^{+/+}$ (Chen *et al.*, 2009) (**Figure 66**).

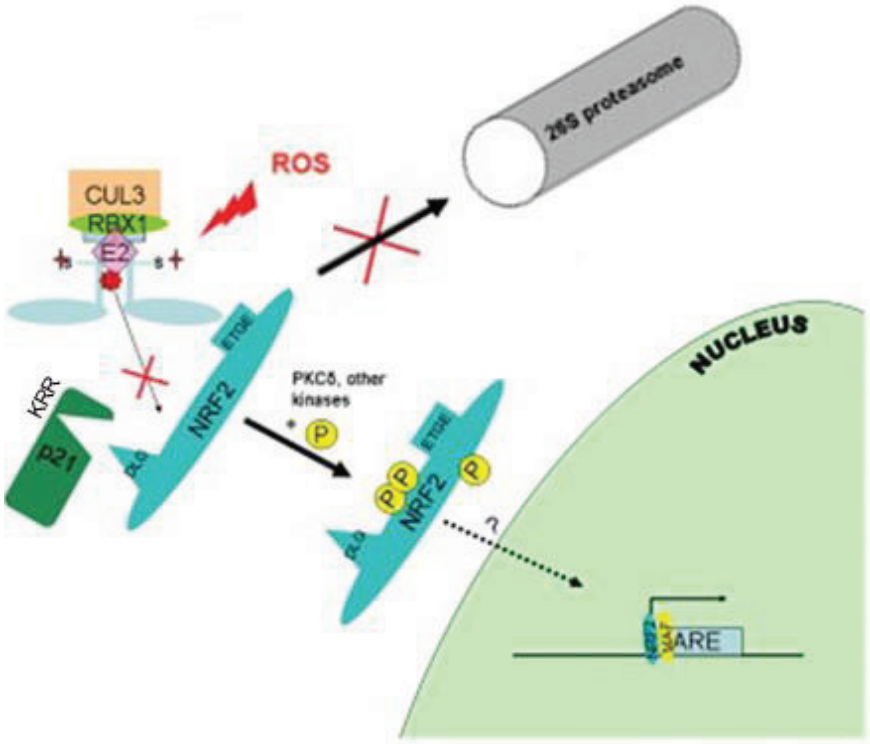


Figure 66 : La régulation de la voie Nrf2/Keap1 par p21 [figure modifiée à partir de (Stepkowski and Kruszewski, 2011)

- **La cavéoline-1**

Récemment, la cavéoline-1 (cav-1) a été identifiée comme étant un partenaire de liaison à Nrf2. La cavéoline-1 est une protéine membranaire retrouvée dans les cavéoles. Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique riches en lipides et en cholestérol. Elles sont impliquées dans l'endocytose et le transport lipidique. La cav-1 est retrouvée dans les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les adipocytes. Récemment, Volonte *et al.,* ont montré que cav-1, *via* son domaine CSD [(Caveolin-1 Scaffolding Domain), a.a 82-101], peut se lie au domaine CBD [(Caveolin-1 Binding Domain), a.a 281-289] de Nrf2 situé entre le domaine Neh5 et Neh6. Ils démontrent aussi que cav-1 est l'inhibiteur endogène de Nrf2. En effet, le traitement des cellules MEF *cav-1*$^{-/-}$ pendant 24 h, par le menadione, composé générant des radicaux libres et activateur de Nrf2, induit une plus forte expression génique de *nqo-1* par rapport aux cellules sauvages. A l'état basal, la cav-1 séquestre Nrf2 dans les cavéoles et le noyau des MEF. En revanche, en réponse à un stress oxydant tel que l'H_2O_2 pendant 48 h, la translocation totale de Nrf2 vers le noyau est permise (Volonte *et al.*, 2013).

Par ailleurs, Zheng *et al.,* ont montré que le traitement, par l'EGCG, des cellules endothéliales porcines invalidées par des siRNA cav-1 induit une plus forte expression

protéique de Nrf2 dans le noyau par rapport aux cellules contrôles. De plus, la liaison de Nrf2 aux séquences ARE était plus augmentée dans les cellules siRNA cav-1 que les cellules contrôles (Zheng et al., 2012). Li *et al.,* montre que la cav-1 inhibe l'expression des gènes antioxydants *via* son interaction avec Nrf2. En effet, le traitement, par le 4-HNE, des cellules épithéliales pulmonaires Beas-2B invalidées en *cav-1* par des ARN interférents induit une plus forte expression protéique des gènes cibles de Nrf2 tels que HO-1, NQO1 et GCLC par rapport aux cellules contrôles. Cette forte expression protéique a été aussi observée dans les fibroblastes issus de souris *cav-1*$^{-/-}$ traitées avec le 4-HNE en comparaison avec les souris sauvages. Ils ont également montré que le traitement des cellules Beas-2B par le 4-HNE montre une augmentation de l'expression protéique de Nrf2 dans le cytoplasme associée à sa diminution nucléaire (Li *et al.*, 2012a).

- **La protéine DJ-1**

La protéine DJ-1 ou PARK7 (parkinson protein 7), jouant un rôle dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, régule positivement Nrf2. DJ-1 protège les cellules neuronales contre le stress oxydant *via* l'oxydation de ses trois cystéines Cys46, Cys56, and Cys106. La présence d'une séquence ARE putative au niveau du promoteur du gène *dj-1* a pu être identifiée (Bitar *et al.*, 2012).

La perte de DJ-1 conduit à la maladie de Parkinson (Ariga *et al.*, 2013). DJ-1 stabilise l'expression protéique de Nrf2 en entrant en compétition avec Keap1 et inhibe sa liaison à Nrf2. En effet, dans les cellules de carcinome hépatique humain (HUH7), l'invalidation de *dj-1* par des siRNA montre une forte diminution de l'expression protéique de Nrf2 par rapport aux cellules contrôles (Clements *et al.*, 2006). DJ-1 a été aussi décrite dans la maladie de BPCO. Chez les patients atteints de BPCO, DJ-1 est défectueuse. En réponse au stress oxydant produit par la fumée de cigarette au niveau pulmonaire, DJ-1 est oxydée au niveau de son résidu cys106. Cette modification conformationnelle de Dj-1 permet sa dégradation *via* le protéasome induisant ainsi une diminution de la stabilisation de Nrf2 favorisant sa dégradation (Malhotra *et al.*, 2008) (**Figure 67**).

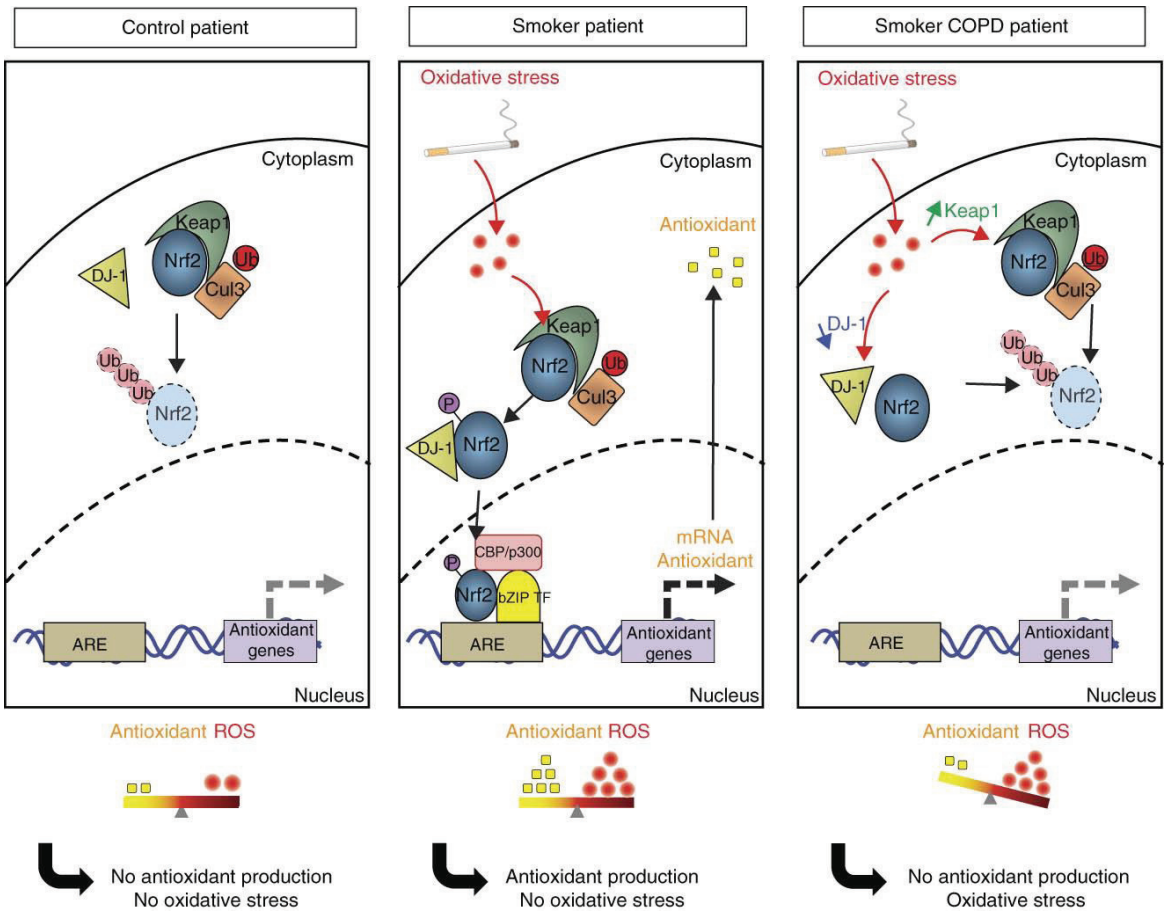


Figure 67 : La régulation de Nrf2 par DJ-1 (Boutten *et al.*, 2010)

3. Le rôle fonctionnel de Nrf2

3.1. Le rôle de Nrf2 dans la fonction cellulaire

3.1.1. Mécanisme de survie

Comme décrit précédemment, Nrf2 est un facteur de transcription important régulant de nombreux gènes parmi lesquels se trouvent les gènes antioxydants et les enzymes de détoxication de phase II. Nrf2 assure ainsi une protection cellulaire contre le stress oxydant et les attaques électrophiles en empêchant l'apoptose (Niture *et al.*, 2010; Niture *et al.*, 2013). L'apoptose est une mort cellulaire programmée de la cellule caractérisée par des modifications morphologiques telles qu'une condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN et un bourgeonnement de la membrane appelé blebbing (Kroemer *et al.*, 2009). Différentes études ont montré alors le rôle de Nrf2 dans la protection cellulaire. Ses gènes cibles tels que *bcl-2*, *bcl-xl* et *ho-1* également décrits comme jouant un rôle protecteur dans la survie cellulaire.

Ainsi, les études visant à étudier le rôle de Nrf2 dans la survie ont souvent utilisé des modèles de souris *nrf2*$^{-/-}$. Ces souris sont viables et reproductibles. En revanche, elles

présentent une sensibilité accrue lorsqu'elles sont exposées aux molécules toxiques ou à un stress oxydant (Itoh *et al.*, 1997). La première étude réalisée par Enomoto *et al.*, montre que les souris *nrf2*$^{-/-}$ présentent une hépatotoxicité plus importante à l'exposition au paracétamol. Cette étude a montré une mortalité uniquement chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ traitées par le paracétamol (300 mg/kg) pendant deux à quatre mois. En revanche, les souris *nrf2*$^{+/+}$ n'ont montré qu'une hépatotoxicité sévère non mortelle. Cette hépatotoxicité sévère est dû à la fois à l'augmentation de l'expression de l'enzyme de phase II, l'UGT1A6, et l'augmentation de l'excrétion du paracétamol *via* une activation dépendante de Nrf2 (Enomoto *et al.*, 2001). Le paracétamol induit aussi l'accumulation nucléaire de la protéine Nrf2 dans les cellules hépatiques issues de souris traitées. Cette activation induit la production de gluthation (GSH) permettant ainsi l'élimination du paracétamol (Goldring *et al.*, 2004).

Zhu *et al.*, ont démontré que les cellules stromales de la moelle osseuse provenant des souris *nrf2*$^{-/-}$ stimulées par le 4-HNE et le 1,4-benzoquinone, molécule produite au cours du métabolisme du benzène, présentent une cytotoxicité plus élevée que les cellules stromales *nrf2*$^{+/+}$ (Zhu *et al.*, 2006). Cette cytotoxicité est associée à une augmentation de la quantité de lactate déshydrogénase (LDH), une enzyme cytosolique. Les fibroblastes embryonnaires murins (MEF) dérivés des souris *nrf2*$^{-/-}$ présentent également une mortalité plus élevée en réponse au ménandione, un inducteur d'ERO (Kwak *et al.*, 2004) ou en réponse au cisplatine, un agent anticancéreux cytotoxique (Cho *et al.*, 2008).

Merchant *et al.*, ont également montré que Nrf2 joue un rôle au cours de l'hématopoïèse et dans la survie des cellules souches hématopoïétiques. Ces dernières issues de progéniteurs (HSPC) de souris *nrf2*$^{-/-}$ étaient plus sensibles à l'apoptose induite par H_2O_2 que les HSPC *nrf2*$^{+/+}$. Dans cette étude, aucune production d'ERO à l'état basal dans les cellules déficientes pour le gène *nrf2* n'a été observée (Merchant *et al.*, 2011). En revanche, une étude récente montre le rôle de Nrf2 dans le contrôle de l'homéostasie redox. A l'état basal, les DC issues de souris *nrf2*$^{-/-}$ sont capables de produire des ERO et présentent un taux de GSH plus faible que les DC *nrf2*$^{+/+}$ (Aw Yeang *et al.*, 2012). Cette production d'ERO était plus élevée dans les DC *nrf2*$^{-/-}$ en réponse à l'H_2O_2 ou au LPS (Aw Yeang *et al.*, 2012).

Le rôle protecteur de Nrf2 au niveau de la peau contre les rayons UVB a été évoqué (Schafer *et al.*, 2010). Des souris transgéniques exprimant constitutivement Nrf2 sous sa forme active (caNrf2) dans les KC de l'épiderme ont été utilisées. Ces souris présentent une diminution du nombre de KC apoptotiques lorsqu'elles sont exposées aux rayons UVB par rapport aux souris contrôles. Cette protection est due, d'une part, à une augmentation de

l'expression des gènes cibles de Nrf2 tels que *nqo1*, *gs*, *gsr* et autres. D'autre part, cette protection est aussi due à une diminution de la production d'ERO dans le KC (Schafer *et al.*, 2010). Ces souris caNrf2 montrent un épaississement épidermique, une hyperkératose et une inflammation ressemblant à une ichtyose lamellaire, maladie cutanée caractérisée par la présence de squames contrairement aux souris contrôles. La surexpression de Nrf2 pourrait ainsi altérer l'homéostasie cutanée *via* une augmentation de l'expression de gènes antioxydants tels que *gclm*, *gclc*, *gsta3* et *nqo1* (Schafer *et al.*, 2012).
Une autre étude montre que les souris *nrf2*$^{-/-}$ exposées aux rayons UVB développe une inflammation cutanée plus importante que celle observée chez les souris *nrf2*$^{+/+}$. Cette inflammation se caractérise par un épaississement important de la peau après exposition aux rayons UVB. Le nombre de cellules apoptotiques au niveau de l'épiderme des souris *nrf2*$^{-/-}$ est deux fois ou neuf fois plus élevé après 8 h ou 8 jours d'exposition aux rayons UVB, L'application cutanée du sulforaphane après 8 h ou 8 jours d'exposition aux rayons UVB a permis une réparation de la peau vers son état basal uniquement chez les souris *nrf2*$^{+/+}$ (Saw *et al.*, 2011). Une autre étude effectuée a montré que Nrf2 assure une protection cellulaire en réponse aux rayons UVA (Tian *et al.*, 2011).

La stabilisation de Nrf2 par le t-BHQ confère aux cellules neuronales une protection contre le stress oxydant. Ainsi, la surexpression de Nrf2 dans les cellules neuronales (IMR-32) montre une diminution de la mortalité de ces cellules lorsqu'elles sont traitées avec l'H_2O_2 par rapport aux cellules ne surexprimant pas Nrf2 (Li *et al.*, 2005).

Un rôle neuroprotecteur du gène cible de Nrf2, *ho-1*, a été également montré par Kaizaki *et al.,* en 2006. En effet, les cellules murines neuronales (HT22) transfectées par des siRNA *ho-1* en présence de H_2O_2 ou de 4-HNE montrent une toxicité augmentée comparée à celles des cellules contrôles. Cette toxicité est observée par une diminution du pourcentage de cellules vivantes dans les cellules invalidées en *ho-1* par rapport aux cellules contrôles (Kaizaki *et al.*, 2006).

Récemment, il a été montré que l'éthyl pyruvate (EP), un intermédiaire métabolique du pyruvate connu pour ses propriétés anti-inflammatoires, induit l'expression protéique de HO-1 (Jang *et al.*, 2012). Dans un modèle murin de choc séptique, une ligature une ponction caecale (CLP ; cecal ligation and puncture) a effectuée chez des souris ho-*1*$^{+/+}$ et *ho-1*$^{-/-}$. Le traitement des souris *ho-1*$^{+/+}$ CLP par l'EP montre une augmentation de leur taux de survie contrairement aux souris *ho-1*$^{-/-}$ CLP. Ces résultats montrent le rôle protecteur de HO-1, induite par l'EP, dans la survie des souris présentant une sépticémie (Jang *et al.*, 2012).

En plus du rôle cytoprotecteur de Nrf2 contre les toxiques et les xénobiotiques *via* la transcription des gènes antioxydants et des enzymes de phase II, Nrf2 peut réguler transcriptionnellement l'apoptose *via* l'induction de gènes anti-apoptotiques tels que *bcl-2* et *bcl-xl* (Niture and Jaiswal, 2012; Niture and Jaiswal, 2013). En effet, l'analyse du promoteur murin du gène *bcl-2* a montré la présence de quatre séquences putatives ARE (AREr1, AREr2, AREr3 et AREF1) (Niture and Jaiswal, 2012). Et celle du promoteur murin du gène *bcl-xl* montre la présence deux séquences putatives d'ARE (ARE-F1 et ARE-F2).

L'étude effectuée par Niture *et al.,* a montré que le traitement des cellules hépatiques tant humaines (HepG2) que murines (Hepa-1), par le t-BHQ ou/et l'étoposide, induit l'expression génique et protéique de Bcl-2. Ils montrent également que le traitement des cellules Hepa-1 avec le t-BHQ stabilise l'expression de Nrf2 et induit l'expression protéique de NQO1 et de Bcl-2 protégeant ainsi ces cellules contre l'agent cytotoxique étoposide en augmentant la survie cellulaire. Une diminution de l'expression protéique du cytochrome c mitochondrial, une augmentation de l'expression protéique du cytochrome c cytosolique et une diminution de l'activité caspase 3/7 sont mesurées lorsque les cellules ont été traitées avec l'étoposide puis le t-BHQ (Niture and Jaiswal, 2012). La stabilisation de Nrf2 dans les cellules Hepa-1 traitées avec le t-BHQ montre une augmentation de l'expression protéique de Bcl-xl, une diminution de la protéine apoptotique Bax et une diminution de l'activité caspase 3/7 (Niture and Jaiswal, 2013).

3.1.2. Mécanisme de mort cellulaire par autophagie

L'autophagie est un mécanisme cellulaire qui consiste en la dégradation du cytoplasme de la cellule par les lysosomes. Ce mécanisme est essentiel pour la survie et l'homéostasie cellulaire (Levine and Kroemer, 2008). Ainsi, en plus de son rôle dans la régulation de l'apoptose, Nrf2 joue aussi un rôle dans l'autophagie. La protéine p62, le substrat sélectif de l'autophagie, constitue le lien entre l'autophagie et Nrf2. L'ATG7 (Autophagy-related protein 7) est une protéine importante dans la formation de l'autophagosome. Komatsu *et al.,* ont montré que l'absence d'autophagie chez les souris *atg7*$^{-/-}$ induit une accumulation plus marquée de p62 dans leurs hépatocytes par rapport aux souris sauvages. Cette accumulation plus marquée chez les souris *atg7*$^{-/-}$ est accompagnée d'un dommage hépatique et d'une forte induction des gènes antioxydants tels que *nqo1* et *gst*. La protéine p62 se lie ainsi à Keap1 *via* son motif KIR (Keap1 interacting region) contenant une séquence STGE permettant la liaison de p62 à Keap1 au site du latch ou du loquet avec une affinité de liaison similaire à celle du

DLG de Nrf2 (Komatsu *et al.*, 2010). Par ailleurs, la présence de 3 arginines, Arg380, Arg415 et Arg483, présentes au niveau du domaine Kelch de Keap1 sont nécessaire à l'interaction de p62 à Keap1. Ces mêmes arginines sont aussi essentielles à l'interaction entre Nrf2 et Keap1 impliquant ainsi une compétition entre p62 et Nrf2 (Lau *et al.*, 2010). Récemment, il a été montré que la fumée de cigarette induit l'autophagie via Nrf2 dans les cellules épithéliales pulmonaires. Ils montrent que Nrf2 régule négativement l'autophagie par la diminution de l'expression protéique de LC3B-I et LC3B-II, deux marqueurs de l'autophagie. Ainsi, l'invalidation de Nrf2 ou de Keap1 dans les cellules épithéliales par siRNA montre une diminution de l'expression protéique de LC3B-I ou une augmentation de LC3B-II, respectivement, en présence de l'extrait de fumée de cigarette. En revanche, la surexpression de p62 diminue l'expression de LC3B en réponse à l'extrait de fumée de cigarette. Ces résultats montrent que Nrf2 régule négativement l'expression de LC3B en réponse à l'extrait de fumée de cigarette *via* la surexpression de p62 (Zhu *et al.*, 2013).

3.2. Le rôle de Nrf2 dans le contrôle de la réponse inflammatoire

La voie Nrf2/Keap1 est impliquée dans le contrôle de pathologies à composante inflammatoire, telles que l'arthrite rhumatoïde, l'asthme, l'athérosclérose, la fibrose pulmonaire, l'emphysème, l'inflammation cérébrale comprenant les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Singh *et al.*, 2010). Les sources d'inflammation sont nombreuses et diverses. Elles incluent les infections virales et microbiennes ; l'exposition aux allergènes, aux radiations et aux toxiques chimiques (Reuter *et al.*, 2010).

Une dérégulation de la voie Nrf2/Keap1 renforce la susceptibilité non seulement au stress oxydant et électrophile, mais également à l'inflammation. Il existe 2 stades dans l'inflammation : aiguë et chronique (Reuter *et al.*, 2010). Durant la phase précoce de l'inflammation, l'activation de Nrf2 inhibe la production de médiateurs inflammatoires comme des cytokines telles que le TNF-α et l'IL-6, des chimiokines telles que le MCP-1, des molécules d'adhésion cellulaires telles que VCAM-1 et ICAM-1, des matrix métalloprotéinases telles que MMP-7, de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2), et inhibe aussi l'induction de l'oxyde nitrique synthase (Kim *et al.*, 2009).

En réponse au LPS bactérien, les PN péritonéaux issus de souris *nrf2*$^{-/-}$ induisent une plus forte production d'ERO, de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α et l'IL-6 et de chimiokines pro-inflammatoires telles que MCP-1 et MIP-2 comparée aux souris sauvages.

Cette production d'ERO, de cytokines et de chimiokines était diminuée uniquement dans les PN *nrf2*$^{+/+}$ pré-traitées avec un triterpénoïde de synthèse inducteur de Nrf2, le 1-[2-cyano-3-,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oyl]imidazole (CDDO-Im) (Thimmulappa *et al.*, 2006b). Les souris *nrf2*$^{-/-}$ ayant une septicémie par l'administration du LPS au niveau péritonéal présentent une mortalité plus élevée par rapport aux souris sauvages. Ces souris *nrf2*$^{-/-}$ ayant une septicémie montrent aussi une plus forte inflammation pulmonaire caractérisée par une augmentation du nombre de macrophage et de PN dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) que celle comparée au LBA de souris *nrf2*$^{+/+}$ (Thimmulappa *et al.*, 2006a). Ainsi Nrf2 contrôle la réaction inflammatoire pulmonaire.

L'inflammation pulmonaire comprend le syndrome de détresse respiratoire aiguë, BPCO, l'asthme, l'emphysème et la fibrose pulmonaire (Boutten *et al.*, 2011). Les cytokines telles que l'IL-10, l'IL-6, l'L-1β ou le TNF-α, les chimiokines telles que le CXCL-9, le CXCL-10 ou le CCL-6; et les molécules d'adhésion cellulaires comme VCAM-1 sont également augmentées chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ comparées aux souris *nrf2*$^{+/+}$ (Thimmulappa *et al.*, 2006a).

L'emphysème pulmonaire est caractérisé par une rupture de l'architecture alvéolaire et un élargissement des espaces alvéolaires dû à une destruction des parois alvéolaires. Il s'accompagne par une accumulation de cellules inflammatoires comme des macrophages ou des PN dans les voies aériennes et le parenchyme pulmonaire (Kim *et al.*, 2010). L'étude clinique effectuée par Goven *et al.,* chez des patients atteints d'emphysème pulmonaire post-tabagique montre que la diminution de l'expression nucléaire de Nrf2 dans les macrophages alvéolaires, associée à une diminution de l'expression génique des enzymes antioxydantes telles que *ho-1*, *gpx2* et *nqo1*, est en corrélation avec la sévérité de la maladie (Goven *et al.*, 2008). De plus, l'étude effectuée par Artaud-Macari *et al.,* montre que le sulforaphane *via* l'activation de Nrf2 diminue le dommage induit par le stress oxydant dans la maladie de fibrose pulmonaire idiopatique. Ainsi, l'effet antifibrotique et antioxydant du sulforaphane n'est observé que dans les fibroblastes pulmonaire issus de patients atteints de fibrose pulmonaire contrairement à ceux transfectés par des siRNA. Cet effet antifibrotique est caractérisé par une diminution de l'expression protéique du collagène I et l'α-actine du muscle lisse, deux protéines impliquées dans la maladie de fibrose pulmonaire (Artaud-Macari *et al.*, 2013).

Les souris *nrf2*$^{-/-}$ sont plus sensibles à l'emphysème induit par l'élastase ou la fumée de cigarette, et montrent une inflammation broncho-alvéolaire plus prononcée avec des marqueurs élevés du stress oxydant et de cellules apoptotiques en comparaison avec les

souris sauvages (Rangasamy *et al.*, 2004). De plus, l'expression de plusieurs enzymes antioxydantes telles que HO-1 et NQO-1 est diminuée dans les poumons et tout particulièrement dans les macrophages de souris *nrf2*$^{-/-}$. Par ailleurs, la transplantation de moelle osseuse de souris *nrf2*$^{+/+}$ à des souris *nrf2*$^{-/-}$ retarde le développement de l'inflammation pulmonaire et de l'emphysème, suite à l'instillation intra-trachéale d'élastase (Ishii *et al.*, 2005).

Malhotra *et al.,* ont montré que les macrophages alvéolaires de patients atteints BPCO et résistants au traitement par les glucocorticoïdes tels que la dexaméthasone, possèdent une HDAC2 S-nitrosylée sur ses Cys262 et Cys274. Afin de mimer cette pathologie (BPCO), des souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$ ont été exposées à la fumée de cigarette pendant un mois et traitées ou non par le sulforaphane pendant 3 jours consécutifs. Les macrophages alvéolaires isolés à partir du lavage bronchoalvéolaire (BAL) de souris *nrf2*$^{+/+}$ traitées par le sulforapahne ont une HDAC2 dénitrosylée. Ainsi le sulphorane en activant Nrf2 restore l'activité de l'HDAC2 (sous sa forme dénitrosylée) et augmente le GSH intracellulaire. Le sulforafane a aussi permi la restauration de la sensibilité de ces macrophages alvéolaires à la dexaméthasone. Ceci n'a été observé que chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ (Malhotra *et al.*, 2011).

L'inflammation cérébrale est la cause principale des maladies neurodégénératives qui réduit la viabilité des neurones. Elle induit une augmentation des cellules immunitaires du système nerveux central telles que les cellules microgliales possédant une fonction phagocytaire. Ces cellules sont capables de produire des ERO afin d'éliminer les pathogènes (Singh *et al.*, 2010).

Plusieurs études mettent en évidence la pertinence de Nrf2 dans la protection des neurones dopaminergiques. Une étude a démontré une connexion moléculaire entre Nrf2 et DJ-1, un gène altéré dans les formes familiales de maladie de Parkinson. DJ-1 est une protéine ubiquitaire exprimée dans les mitochondries ayant des propriétés antioxydantes. Clements et *al.,* ont montré que DJ-1 interagit avec Nrf2 empêchant ainsi son interaction avec Keap1 et par conséquent sa dégradation. Une mutation de DJ-1, comme retrouvée dans la maladie de Parkinson, entraine l'instabilité de Nrf2 et sa dégradation excessive (Clements *et al.*, 2006). Une étude récente montre l'effet neuroptotecteur observé par l'induction de l'expression protéique de Nrf2 ainsi que les protéines antioxydantes et les enzymes de phase II telles que la GCLC, la GCLM, la GR, l'HO-1 et la NQO1 en réponse aux activateurs de Nrf2, les terpénoïdes, dans les cellules du neuroblastome humain (SHSY5Y), les cellules hépatiques et cérébrales. Ces terpénoïdes diminuent le stress oxydant et l'inflammation cérébrale induite

par une molécule neurotoxique, le 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) (Kaidery *et al.*, 2013).

Le déséquilibre de l'équilibre stress oxydant / antioxydants est une des premières manifestations de la maladie d'Alzheimer, qui précède la dégénérescence neurofibrillaire. Dans des conditions non pathologiques, Nrf2 est exprimé dans l'hippocampe tant dans le cytoplasme que le noyau des neurones. Par immunohistochimie, une étude *post-mortem* réalisée sur des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a pu montrer que Nrf2 était prédominant dans le cytoplasme des neurones de l'hippocampe. Cependant, Nrf2 était faiblement exprimé dans le noyau et les plaques amyloïdes (Ramsey *et al.*, 2007). Ils ont également montré une diminution significative l'expression protéique de Nrf2 dans le noyau des neurones et les astrocytes de patients atteints par la maladie d'Alzheimer. En revanche, le niveau cytoplasmique de Nrf2 était identique à celui des patients contrôles (Ramsey *et al.*, 2007).

PRESENTATION DU TRAVAIL

Présentation du travail

L'objectif de ce travail est d'étudier **(1)** le rôle du facteur de transcription Nrf2 dans le contrôle de la survie des DC et **(2)** son rôle dans le contrôle de la réponse inflammatoire d'origine allergique en réponse à des molécules chimiques.

Bien que ces dernières années, de nombreuses études ont démontré le rôle clef de Nrf2 dans le contrôle des réactions inflammatoires médiées par le stress oxydant, aucune étude n'a montré son rôle dans la réaction allergique.

Dans la première partie de ce travail consistant à étudier le rôle de Nrf2 dans la survie cellulaire, des DC issues de progéniteurs murins de la moelle osseuse (BMDC) de souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$ ont été générées. Les deux molécules allergisantes, le DNCB et le CinA, ont été utilisées.

Nous montrons que les BMDC *nrf2*$^{-/-}$ produisent deux fois plus d'ERO que les BMDC *nrf2*$^{+/+}$ en réponse aux DNCB et CinA. Ces deux molécules induisent aussi une augmentation de la mort cellulaire des DC *via* l'activation des caspases impliquées dans la voie mitochondriale ou intrinsèque de l'apoptose. En effet, la mort cellulaire induite par le DNCB ou le CinA est caractérisée par : une augmentation de l'activité caspase 3/7 et une chute plus rapide du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi m$) dans les BMDC *nrf2*$^{-/-}$ comparées aux BMDC *nrf2*$^{+/+}$. La neutralisation des ERO par la NAC, nous a permis de montrer que la mort induite par le DNCB est ERO dépendante celle induite par le CinA est ERO indépendante. La survie des DC est alors régulée par l'expression de *bcl-2*, un gène antiapoptotique, et des gènes antioxydants. L'analyse transcriptomique réalisée sur des BMDC *nrf2*$^{+/+}$ et BMDC *nrf2*$^{-/-}$ traités par le DNCB ou le CinA à différents temps, nous a permis de montrer que Nrf2 joue un rôle d'activateur ou de répresseur de la transcription des gènes et ce en fonction de la molécule testée, du temps de traitement et du gène à transcrire.

Ces résultats montrent alors que Nrf2 favorise la survie des DC *via* la transcription de *bcl-2* et des gènes antioxydants en réponse au DNCB et CinA.

La seconde partie de ce travail a consisté à étudier le rôle du facteur de transcription Nrf2 dans le contrôle des HSC en réponse aux molécules allergisantes. Pour ce faire, nous disposons de souris invalidées pour le gène codant pour *nrf2.* Ce modèle murin nous a permis de développer 2 tests expérimentaux : le Local Lymph Node Assay (LLNA) qui permet de mesurer la phase de sensibilisation et le Mouse Ear Sweling Test (MEST) qui permet de

mesurer à la fois la phase de sensibilisation et la phase d'élicitation. Plusieurs molécules ayant différentes réactivités chimiques ont été testées.

Nos résultats du MEST montrent que Nrf2 joue un rôle dans la phase d'élicitation et/ou de sensibilisation des réactions d'HSC mais également dans la phase d'irritation. Nous observons alors une réponse inflammatoire cutanée plus importante chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ que chez les souris *nrf2*$^{+/+}$ en réponse aux molécules allergisantes. De plus, les résultats du LLNA montrent bien que Nrf2 contrôle la prolifération lymphocytaire en réponse à différentes molécules allergisantes possédant des réactivités chimiques variées.

Afin d'adresser le rôle de Nrf2 dans la phase d'irritation, une molécule irritante, l'huile de croton, a été utilisée. Nos résultats montrent une réponse irritative plus importante chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ que chez les souris *nrf2*$^{+/+}$.

L'étude transcriptomique du tissu cutané des souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$ au cours de la phase de sensibilisation, nous a permis de montrer que Nrf2 régule divers gènes parmi lesquels des gènes antioxydants et des gènes impliqués dans la réparation cutanée. Ceux-ci se trouvent diminuer en réponse au DNCB.

Comme l'irritation et la production d'ERO sont plus importantes chez les souris *nrf2*$^{-/-}$, le rôle de Nrf2 en tant que senseur de signal de danger a été adressé. L'application d'un signal de danger tel que le nickel induit une réaction d'HSC uniquement chez les souris *nrf2*$^{-/-}$.

Par ailleurs, afin d'adresser le rôle des DC dans la réponse immunologique inflammatoire et le rôle de Nrf2 dans les HSC induites par les molécules allergisantes, des transferts adoptifs de DC issues de souris *nrf2*$^{+/+}$ ou *nrf2*$^{-/-}$ ont été réalisés dans les deux génotypes. Nos résultats montrent que les DC jouent un rôle clef dans la réaction inflammatoire d'origine allergique.
En réponse aux molécules allergisantes, les souris *nrf2*$^{-/-}$ présentent une réponse inflammatoire exacerbée comparées aux souris *nrf2*$^{+/+}$. Celle-ci pourrait être due à un défaut de fonction des Treg. En effets, nos résultats préliminaires montrent que les souris *nrf2*$^{-/-}$ présentent deux fois moins de Treg recrutés au niveau cutané comparées aux souris *nrf2*$^{+/+}$ en réponse au DNCB. A l'issue de ce résultat, le rôle de Nrf2 dans la réponse tolérogène a été adressé. Ainsi, les souris *nrf2*$^{-/-}$ rendues tolérantes par le DNTB, molécule connue pour ses propriétés de tolérance, montrent un MEST positif et une exacerbation de la réponse inflammatoire d'origine allergique en réponse au DNCB comparées aux souris *nrf2*$^{+/+}$.

Cette étude montre que Nrf2, en contrôlant le seuil d'irritation cutané, joue un rôle dans la réaction inflammatoire d'origine allergique en régulant à la fois la phase de sensibilisation et

la phase d'élicitation. Nous montrons aussi que Nrf2 régule la tolérance cutanée. Par conséquent, Nrf2 jouerait le rôle de régulateur en réponse aux signaux de danger dans l'HSC.



ARTICLE 1

Article 1

ALLERGIC SKIN INFLAMMATION INDUCED BY CHEMICAL SENSITIZERS IS CONTROLLED BY THE TRANSCRIPTION FACTOR NRF2.

Toxicological Sciences, 2013 Jul;134(1) :39-48.

Zeina El Ali, Cedric Gerbeix, Patrice Hemon, Philipp R. Esser, Stefan F. Martin, Marc Pallardy & Saadia Kerdine-Römer

Les réactions allergiques telles que les réactions d'HSC sont un problème de santé publique. L'incidence de ces réactions est estimée à 20% dans les pays industrialisés. Il s'agit d'une réaction inflammatoire aiguë qui survient suite à des expositions répétées d'une molécule allergisante avec la peau et dans laquelle les DC jouent un rôle essentiel. Les composés chimiques responsables de HSC sont majoritairement des haptènes, molécules de faibles poids moléculaires, qui ne deviennent immunogènes qu'après association stable avec des protéines. L'HSC est composée de deux phases : une phase de sensibilisation et une phase d'élicitation.

Par ailleurs, ces mêmes molécules réactives sont capables de produire des espèces réactives de l'oxygène (ERO) générant ainsi un stress oxydant ou électrophile. Elles sont capables d'activer la voie de détoxication Nrf2/Keap1 en induisant l'accumulation de la protéine Nrf2 dans les cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques. Cette voie Nrf2/Keap1 est centrale pour la détection de composés électrophiles tant endogènes qu'exogènes.

Afin d'étudier le rôle du facteur de transcription Nrf2 dans le contrôle des réactions d'HSC en réponse aux molécules allergisantes, des souris invalidées pour le gène codant pour *nrf2* ont été utilisées. Nous avons développé deux tests expérimentaux : le Local Lymph Node Assay (LLNA) permettant de mesurer la phase de sensibilisation et le Mouse Ear Sweling Test (MEST) qui permet de mesurer à la fois la phase de sensibilisation et la phase d'élicitation. Cinq molécules allergisantes ont été testées : deux molécules connues pour leur affinité pour les résidus cystéines, le dinitrochlorobenzène (DNCB) et le cinnamaldéhyde (CinA); une molécule connue pour sa réactivité mixte envers les résidus cystéines et lysines, l'isophorone diisocyanate (IPDI), une molécule réagissant spécifiquement avec les résidus lysines, l'anhydride trimélitique (TMA) et une dernière molécule irritante, l'huile de croton.

Nos résultats du MEST montrent que le DNCB aux concentrations de 1% et 2% induit une augmentation de l'épaisseur des oreilles. Celle-ci est significative chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ comparées aux souris *nrf2*$^{+/+}$ aux temps 48 h, 72 h et 96 h après le rappel. La sensibilisation

des souris avec le DNCB aux concentrations non irritantes de 0,25% et 0,5% ou avec le CinA n'induit une augmentation de l'épaisseur des oreilles que chez les souris *nrf2*$^{-/-}$.
Par ailleurs, les résultats obtenus par le LLNA montrent que toutes les molécules allergisantes testées, et ce quelle que soit leur réactivité chimique, induisent une augmentation de la prolifération lymphocytaire chez les souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$. Cependant, l'index de stimulation, pour une même concentration, est plus élevé chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ comparées aux souris *nrf2*$^{+/+}$.

De plus, l'application cutanée d'un irritant tel que l'huile de croton (1%) induit une faible irritation, chez les souris *nrf2*$^{+/+}$, qui est augmentée aux fortes concentrations (5% et 10%). Cette augmentation atteint un maximum 24 h après l'application de l'irritant puis diminue progressivement. Chez les souris *nrf2*$^{-/-}$, la réponse irritative est plus élevée que celle observée chez les souris *nrf2*$^{+/+}$ quelle que soit la concentration utilisée. Elle atteind un maximum d'augmentation de l'épaisseur de l'oreille dès 24 h d'application puis perdure. Ces résultats montrent que Nrf2 régule le seuil d'irritation qui est plus bas en son absence.

En résumé, ce travaille montre, pour la première fois, que Nrf2 contrôle la réponse inflammatoire d'origine allergique ainsi que la prolifération lymphocytaire en réponse aux molécules allergisantes, et ce quelle que soit la réactivité chimique.

TOXICOLOGICAL SCIENCES **134(1)**, 39–48 2013
doi:10.1093/toxsci/kft084
Advance Access publication April 5, 2013

Allergic Skin Inflammation Induced by Chemical Sensitizers Is Controlled by the Transcription Factor Nrf2

Zeina El Ali,* Cédric Gerbeix,† Patrice Hemon,*,‡ Philipp R. Esser,§ Stefan F. Martin,§ Marc Pallardy,* and Saadia Kerdine-Römer*,[1]

*UnivSud, INSERM UMR-996, Faculty of Pharmacy, 92296 Châtenay-Malabry, France; †CIToxLAB, BP 563, 27005 Evreux, France; ‡Universud—IFR 141-IPSIT, Faculty of Pharmacy, 92296 Châtenay-Malabry, France; and §Allergy Research Group, Department of Dermatology, University Medical Center Freiburg, 79104 Freiburg, Germany

[1]To whom correspondence should be addressed at INSERM UMR-996, Faculty of Pharmacy, University of Paris-Sud, 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France. Fax: +33-1-4683-5496. E-mail: saadia.kerdine-romer@u-psud.fr.

Received December 31, 2012; accepted March 27, 2013

Allergic contact dermatitis (ACD) is induced by low–molecular weight electrophilic chemicals and metal ions. Chemical contact sensitizers trigger reactive oxygen species production and provoke electrophilic stress, leading to the accumulation of the transcription factor nuclear-related factor 2 (Nrf2) in innate immune cell types. The objective of this work was to identify the role of Nrf2 in the regulation of ACD. We used the local lymph node assay (LLNA) and the mouse ear swelling test (MEST) to study the role of Nrf2 in both the sensitization and elicitation phase in *nrf2* knockout (*nrf2*$^{-/-}$) and wild-type (*nrf2*$^{+/+}$) mice. Five chemicals were used: two compounds known to react with cysteine residues, 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) and cinnamaldehyde (CinA); one sensitizer known to exhibit mixed reactivity to cysteine and lysine residues, isophorone diisocyanate; and one reacting specifically with lysine residues, trimellitic anhydride and croton oil, a well-known irritant. In the MEST assay, DNCB (1 and 2%) induced a significant increase in ear thickness in *nrf2*$^{-/-}$ compared with *nrf2*$^{+/+}$ mice, suggesting a role for Nrf2 in the control of the inflammatory process. When DNCB was used at 0.25 and 0.5% or when mice were treated with CinA, inflammation was found only in *nrf2*$^{-/-}$ mice. In the LLNA, all chemical sensitizers induced an increase of lymphocyte proliferation in *nrf2*$^{-/-}$ compared with *nrf2*$^{+/+}$ mice for the same chemical concentration. These results reveal an important role for Nrf2 in controlling ACD and lymphocyte proliferation in response to sensitizers.

Key Words: **Nrf2; contact hypersensitivity; chemicals sensitizers; irritation; haptens.**

Allergic contact dermatitis (ACD) is a common inflammatory skin disease, with a prevalence of 15–20% in the general population (Thyssen *et al*., 2007). ACD is classified as a delayed hypersensitivity reaction and is composed of two phases: the clinically silent sensitization phase and the inflammatory elicitation phase. Innate immune cells including dendritic cells (DC) play a major role in the initiation of the antigen-specific primary immune response during the initial phase of sensitization (Martin, 2012).

The development of ACD is promoted by skin contact irritation (Uter *et al*., 2005), leading to activation of the innate immune system (Kaplan *et al*., 2012; Martin *et al*., 2011). Skin irritation has the potential to impact on both the induction and the elicitation phase of ACD. Few decades ago, it has been concluded that an adequate level of skin irritation was critical to the optimal development of skin sensitization (Magnuson, 1969).

Chemicals inducing ACD are small compounds called haptens, which have a molecular weight below 500 Da. Covalent interactions with proteins are required for chemicals to become immunogenic and to elicit a specific immune response (Lepoittevin, 2006). Full activation of DC is essential for the establishment of sensitization to haptens. Electrophilic and oxidative stress may be involved in this process (Ade *et al*., 2009; Mizuashi *et al*., 2005). Indeed, reactive oxygen species (ROS) have been found to be produced following treatment with contact sensitizers such as 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) in cells like DC (Byamba *et al*., 2010; Migdal *et al*., 2010). In a mouse model of contact hypersensitivity (CHS), ROS are rapidly produced in the skin following contact sensitizer treatment and play a role in the oxidative and enzymatic degradation of the extracellular matrix component hyaluronic acid (HA) (Esser *et al*., 2012). Fragmentation of HA has been shown to be required for full activation of DC, and antioxidant treatment of mouse skin prevented 2,4,6-trinitrochlorobenzene-induced CHS. These findings underline the role of electrophilic/oxidative stress for the induction of skin inflammation in ACD and modulation of innate immunity.

To prevent an excess accumulation of ROS and electrophilic stress, several phase II detoxification enzymes such as glutathione-S-transferases, NADP(H):quinone oxidoreductase,

© The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Society of Toxicology.
All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

Downloaded from http://toxsci.oxfordjournals.org/ at INSERM on July 8, 2013

glutathione peroxidases, and heme oxygenase are mobilized in cells and mainly regulated by the transcription factor Nrf2.

Under basal conditions, Nrf2 is sequestered in the cytoplasm by its inhibitor, the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), then ubiquitinylated, and constantly degraded by the proteasome. In the presence of oxidative and/or electrophilic stress, Keap1 releases Nrf2, which migrates to the nucleus, and binds to the antioxidant-responsive element sequence, inducing gene transcription (Kensler *et al*., 2007). Keap1 is a thiol-rich protein having three cysteines known to play a role in Nrf2 activation (Yamamoto *et al*., 2008). We recently reported that contact sensitizers induced Nrf2 protein accumulation in the THP1 cell line and in human DC (CD34-DC). Nrf2 protein accumulation was inhibited in cells pretreated with the antioxidant N-acetylcysteine (Ade *et al*., 2009). Ryan *et al.* (2004) showed an upregulation of Nrf2-inducible genes in microarray studies using peripheral blood–derived DC treated with dinitrobenzenesulfonic acid for 24 h. All these results have led to the KeratinoSens assay development based on Nrf2 transcriptional activity for *in vitro* detection of chemical sensitizers (Emter *et al*., 2010).

nrf2-Deficient ($nrf2^{-/-}$) mice have been shown to be more susceptible to sepsis, in association with an augmented expression of several innate immune response genes (Thimmulappa *et al*., 2006). A recent study showed that the allergen ragweed extract (RWE) provoked oxidative stress in DC that was significantly higher in $nrf2^{-/-}$ DC compared with *nrf2* wild-type (WT, $nrf2^{+/+}$) DC (Rangasamy *et al*., 2010). The oxidative stress induced by RWE was accompanied by an upregulation of CD80, CD86, and HLA-DR expression in $nrf2^{-/-}$ DC compared with $nrf2^{+/+}$ DC. Therefore, Nrf2 deficiency may enhance the "innate allergic" immune response.

The objective of this work was to address the role of Nrf2 in ACD. In the MEST assay, a mouse model of CHS, Nrf2 disruption led to an increased inflammatory response to DNCB and allowed a positive response to cinnamaldehyde (CinA). In $nrf2^{-/-}$ mice, nonsensitizing doses of DNCB (0.25 and 0.5%) in WT mice efficiently induced CHS. However, the lowest concentration of DNCB (0.1%) did not induce any response in both genotypes. Moreover, skin contact irritation provoked by croton oil was higher, and inflammation was maintained in $nrf2^{-/-}$ mice compared with WT mice. The local lymph node assay (LLNA) performed with chemicals reacting specifically to cysteine and/or to lysine showed that Nrf2 can control the sensitization phase of ACD.

MATERIALS AND METHODS

Mice. $nrf2^{-/-}$ Mice (Itoh *et al*., 1997) were provided by the RIKEN BRC according to a MTA to Prof S. Kerdine-Römer. Wild-type ($nrf2^{+/+}$) and $nrf2^{-/-}$ mice, investigated in this study, were generated from inbred C57BL/6J background *nrf2* heterozygous mice. The donating investigator reported that these mice were backcrossed to C57BL/6J for at least 10 generations. Mice were housed in a pathogen-free facility and handled in accordance with the principles and procedures outlined in Council Directive 86/609/EEC. Genotyping was performed by PCR using genomic DNA that was isolated from tail snips as described (Itoh *et al*., 1997).

Measurement of ear irritation. Naive mice were treated at day 0 by a single application of different concentrations of DNCB, CinA, trimellitic anhydride (TMA), isophorone diisocyanate (IPDI), or croton oil (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) applied on both ears. Ear thickness was measured both before and at different time points after treatment with a spring-loaded micrometer (Mitutoyo, Kanagawa, Japan). Each ear was measured in triplicate, and the mean of these values was calculated. The percentage of ear thickness increase was then calculated as following: ([mean thickness of both ears [24, 48, 72, or 96 h after application]] − [mean thickness of ears measured before treatment]/[mean thickness of ears measured before treatment] × 1000).

Assay for CHS: the mouse ear swelling test. For DNCB, CHS was induced as described (Martin *et al*., 2008). Briefly, mice were sensitized by one application of 100 µl DNCB solution (0.1, 0.25, 0.5, 1, or 2%, wt/vol dissolved in acetone) or solvent control on the shaved abdomen. Ear thickness was measured on day 5, and mice were then challenged by application of 20 µl DNCB (0.5%) on both ears.

For the moderate hapten CinA, mice were sensitized for 3 consecutive days (day 0, day 1, day 2) by application of 100 µl CinA solution (50 or 75% wt/vol dissolved in acetone) on the shaved abdomen and challenged 5 days after the last sensitization dose with 20 µl CinA (25 or 40% wt/vol dissolved in acetone) on the ears. Increase of ear thickness was measured as described above.

All mouse ear swelling test (MEST) experiments done and termed "vehicle" have been performed as follows: at day 0, the mice received only the solvent (100 µl of acetone) on the shaved abdomen. Five days later, 20 µl of DNCB or CinA was applied on both ears. The group "vehicle" therefore represents the irritant response evoked by a single contact sensitizer application.

LLNA and measurement of lymphocyte proliferation. Standard LLNA protocols were conducted according to GLP procedures (CIToxLAB, Evreux). Briefly, $nrf2^{+/+}$ and $nrf2^{-/-}$ mice received topical applications (25 µl per ear), once a day for 3 consecutive days of DNCB (0.01, 0.05, or 0.1%), CinA (2.5, 5, or 10%), IPDI (0.025, 0.05, or 0.1%), or TMA (0.1, 0.25, or 0.5%) or the vehicle (4/1 acetone/olive oil) on the dorsum of both ears. Five days following the initiation of exposure, all mice received an iv injection of [^{3}H]-labeled thymidine [^{3}H]TdR (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) into their tail vein. Six hours later, animals were sacrificed, and draining auricular lymph nodes (LNC) were excised. A single cell suspension of LNC was prepared by gentle mechanical disaggregation, and the cells were washed and resuspended in trichloroacetic acid (TCA, Sigma-Aldrich) for at least 12 h at 4°C. Precipitates were resuspended in TCA and transferred to an appropriate scintillation fluid (Ultima GoldxR scintillation fluid, PerkinElmer). The incorporation of [^{3}H]TdR by draining LNC was measured by β-scintillation counting and recorded as mean dpm. The stimulation index (SI) for each group was determined by dividing the mean dpm value for the treated group by the mean dpm value for the vehicle control group.

Histological examination. Ears were fixed in 4% buffered paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) overnight, embedded in paraffin, and cut into 7-µm-thick sections. Sections were first deparaffinized, rehydrated, and stained with hematoxylin-eosin (H/E) (Sigma-Aldrich). Mounting was done using a nonaqueous medium (Fisher Bioblock, Illkirch, France). Images were acquired on a Leica DMLB microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) equipped with standard optic objectives and digitized directly with a Sony 3CCD color video camera (Sony, Paris, France), original magnification ×1000.

Statistics. As the data were not normally distributed along the mean to compare the two groups, the Mann-Whitney *U*-test was used. All data are presented as mean values ± SEM. Measurements were considered significant at a p value ≤ 0.05.

Downloaded from http://toxsci.oxfordjournals.org/ at INSERM on July 8, 2013

RESULTS

ACD Induced by a Strong Contact Sensitizer (DNCB) Is Nrf2 Dependent

Because skin irritation is known to play an important role in ACD, we first defined the minimal irritating concentration (MIC) and the maximal nonirritating concentration (MNC) for DNCB in the MEST. MIC and MNC were found to be 1 and 0.5%, respectively. Wild-type mice (*nrf2*$^{+/+}$) and *nrf2* knockout mice (*nrf2*$^{-/-}$) were treated with both concentrations (0.5 or 1% DNCB), the two lower concentrations of MNC (0.1 or 0.25%) and with a higher concentration of MNC (2%) on the shaved abdomen. Five days later, mice were challenged on both ears with 0.5% DNCB for elicitation. The ear thickness increase was measured 24 h postchallenge and every consecutive 24 h during 4 days (Fig. 1a). The results were expressed as % of ear thickness increase. Results showed that when 1 or 2% of DNCB was applied during sensitization, a significantly higher increase of ear thickness was observed in *nrf2*$^{-/-}$ mice compared with *nrf2*$^{+/+}$ mice. In *nrf2*$^{-/-}$ mice, the % of increase reached 40% compared with 20% in *nrf2*$^{+/+}$ mice for 1% of DNCB and 60% compared with 30% in *nrf2*$^{+/+}$ mice for 2% at 48 h postchallenge (Fig. 1b).

When mice were sensitized with the MNC (0.5%) or with lower concentrations (0.1 or 0.25%), no increase of ear thickness was observed in *nrf2*$^{+/+}$ mice compared with vehicle-treated mice (Fig. 1b). In contrast, in *nrf2*$^{-/-}$ mice, 0.25 and 0.5% DNCB induced a positive MEST and provoked a significant increase of ear thickness compared with *nrf2* WT mice. However, the lowest concentration of DNCB (0.1%) did not induce any increase in both genotypes compared with vehicle. In *nrf2*$^{-/-}$ mice, the maximal % of increase was obtained 48 h postchallenge and then reached a plateau (Fig. 1b).

Moreover, the results clearly show that a single application of 0.5% DNCB at the elicitation phase and without prior sensitization (vehicle groups) is irritating only in *nrf2*$^{-/-}$ mice, indicating that Nrf2 impacts DNCB irritation potency (Fig. 1b).

Histology of ear skin using H/E staining showed that the ears of *nrf2*$^{-/-}$ mice were thicker in response to DNCB due to dermal edema and cell infiltration in the dermis (Fig. 1c, slices 6, 8, 10, and 12) compared with minimal changes in the ears of *nrf2*$^{+/+}$ mice (Fig. 1c, slices 5, 7, 9, and 11). These data provided evidence for the role of Nrf2 in the control of ACD induction and underline the role of Nrf2 in controlling the inflammatory response induced by a strong sensitizer such as DNCB.

Nrf2 Controls the Allergic Inflammation Induced by a Moderate Sensitizer

Next, we decided to address the role of Nrf2 using a moderate sensitizer known to induce a moderate irritation. CinA was chosen due to its effect on Nrf2 activation *in vitro* (Ade *et al.*, 2009). We then performed a MEST in response to CinA using the same protocol as for DNCB. The results showed no increase of ear thickness (data not shown). Therefore, we used a modified MEST (Vocanson *et al.*, 2006) (Fig. 2a). Briefly, mice were sensitized daily on 3 consecutive days with 50 or 75% of CinA and were challenged 5 days later with 25 or 50% of CinA, respectively. No CHS was induced by CinA in *nrf2*$^{+/+}$ mice at all concentrations tested. In contrast, in *nrf2*$^{-/-}$ mice, CinA induced an increase of ear thickness depending on the concentration used during sensitization. The % of ear thickness increase obtained 72 h postchallenge reached 30% in *nrf2*$^{-/-}$ sensitized with 75% CinA compared with 12% in *nrf2*$^{-/-}$ sensitized with 50% CinA (Fig. 2b).

Interestingly, both doses of CinA are strongly irritating without prior sensitization (vehicle groups) in *nrf2*$^{-/-}$ mice, whereas no irritation was found in *nrf2*$^{+/+}$ mice. This indicates that, as observed for DNCB, Nrf2 also impacts CinA irritation potency (Fig. 2b).

Histology of ear skin using H/E staining showed that the ear of *nrf2*$^{-/-}$mice in response to CinA was thicker due to dermal edema and cell infiltration in the dermis, but not found in the *nrf2*$^{+/+}$ mice (Fig. 2c). Ears from mice sensitized with CinA (75%) presented a very prominent dermal edema and cell infiltration compared with CinA (50%) showing a concentration-dependent effect (Fig. 2c).

Nrf2 Controls the Proliferation of Lymph Node Cells During the Sensitization Phase of ACD

To study the role of Nrf2 in the control of the sensitization phase of ACD in response to cysteine-reactive sensitizers and non–cysteine-reactive sensitizers, LLNA experiments were performed to determine lymphocyte proliferation. Four compounds were used: DNCB and CinA known for their cysteine specific reactivity, IPDI known to be reactive with cysteine and lysine residues, and TMA known to react specifically with lysine. Concentrations to be tested were first determined in C57BL/6 mice (data not shown). In response to DNCB, we showed that the SI was higher in *nrf2*$^{-/-}$ mice for all the concentrations used in comparison to *nrf2*$^{+/+}$ mice (Fig. 3a). For CinA, the SI was also higher in *nrf2*$^{-/-}$ mice at 2.5 and 5% CinA. At 10% of CinA, no statistical difference between the SI of *nrf2*$^{-/-}$ and *nrf2*$^{+/+}$ mice was found (Fig. 3b). However, the proliferation in response to CinA tended to be higher in *nrf2*$^{-/-}$ compared with *nrf2*$^{+/+}$ (3 mice out of 4) for this concentration (data not shown). For IPDI, for all concentrations used, the SI was considerably higher in *nrf2* KO mice (Fig. 3c). In response to TMA, a well-known respiratory sensitizer, we showed a significant SI increase at 0.25 and 0.5% (Fig. 3d). These results demonstrated that Nrf2 controls lymphocyte proliferation in response to sensitizers reacting specifically with cysteine residues (DNCB and CinA) but also in response to chemicals specific for lysine such as TMA and to mixed reactive compound such as IPDI.

Skin Irritation Is Exacerbated in the Absence of Nrf2

We next studied the role of Nrf2 in response to the irritant croton oil, a well-known irritant not described to induce ACD. *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ mice were treated with different concentrations of croton oil (1, 5, and 10%), and the ear thickness increase was measured every 24 h postapplication during 4 days. The % of ear thickness increase was very low in response to 1%

Downloaded from http://toxsci.oxfordjournals.org/ at INSERM on July 8, 2013

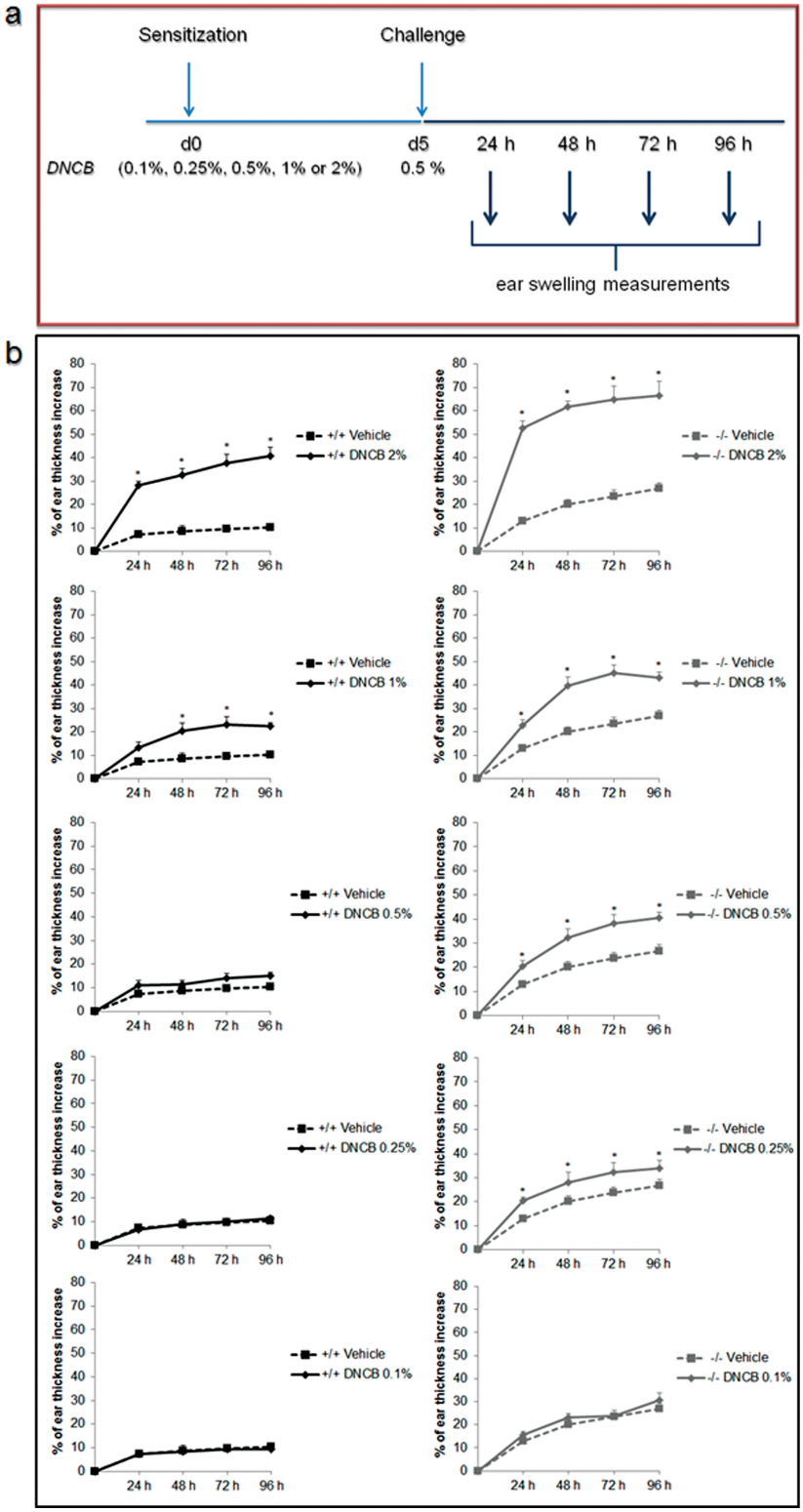


FIG. 1. DNCB increased inflammation in *nrf2*-deficient mice. (a) Experimental protocol. *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ mice were sensitized at day 0 with DNCB (0.1, 0.25, 0.5, 1, or 2%) in acetone on the shaved abdomen and were challenged 5 days later by application of DNCB (0.5%) on both sides of both ears. (b) The ear thickness increase was measured at 24, 48, 72, and 96 h postchallenge. As a control, vehicle-treated mice were only challenged with DNCB (0.5%). Results are expressed as the % of ear thickness increase = ([mean thickness of both ears [24, 48, 72, or 96 h post challenge]] − [mean thickness of ears measured before challenge]/[mean thickness of ears measured before challenge] × 100). Data represent the mean increase of ear thickness ± SEM (mice number $n = 9$),*$p \leq 0.05$. (c) Representative images of H/E staining of ear skin of mice sensitized and challenged with DNCB (0.1, 0.25, 0.5, 1, or 2%) or vehicle, magnification ×1000.

Downloaded from http://toxsci.oxfordjournals.org/ at INSERM on July 8, 2013

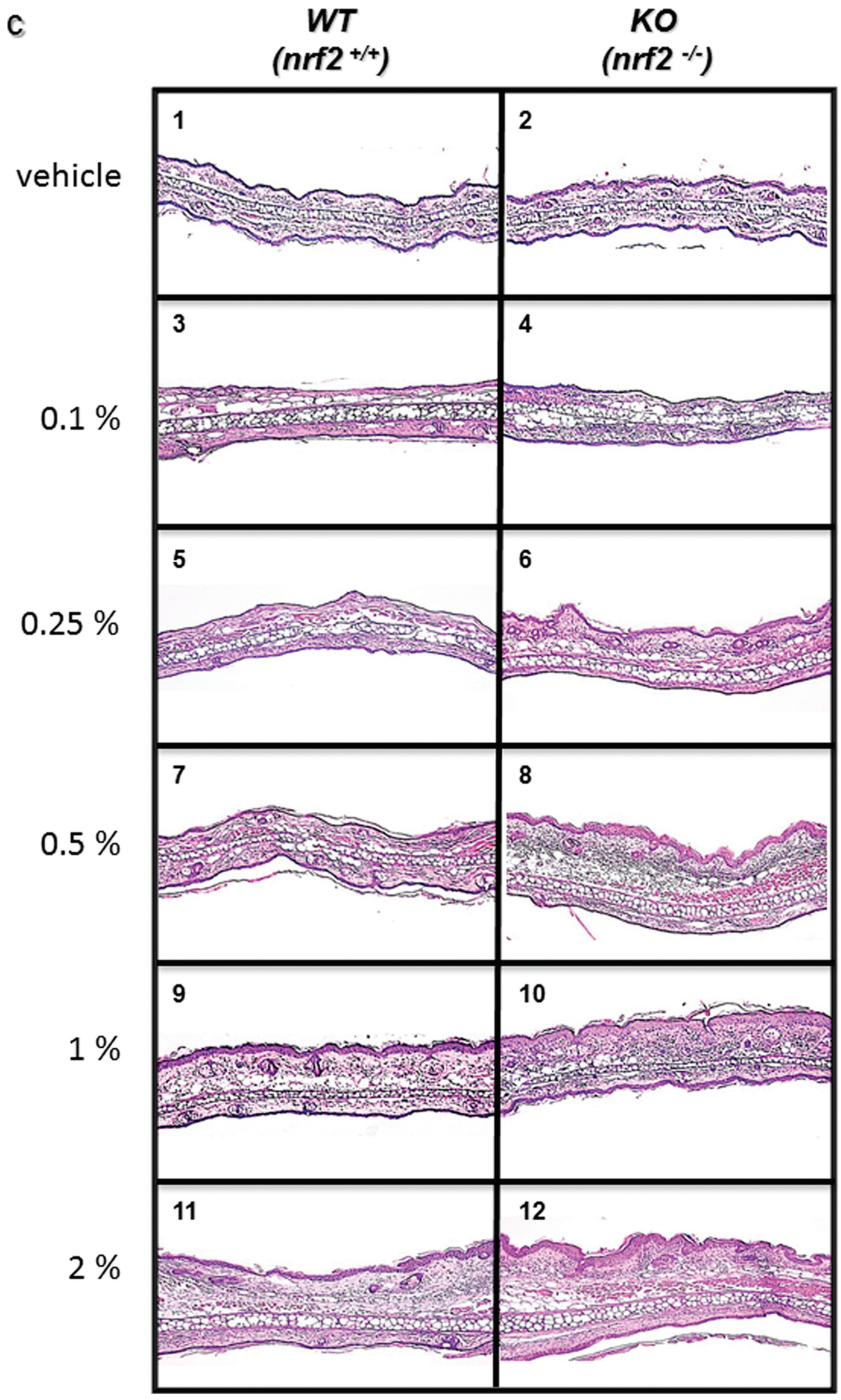


FIG. 1. Continued

croton oil in *nrf2*$^{+/+}$ and increased at higher concentrations (5 and 10%). In *nrf2*$^{+/+}$ mice, the maximum response was reached 24 h postapplication, and the % of ear thickness declined later on (Fig. 4). In *nrf2*$^{-/-}$ mice, the tendency of the response was similar but the magnitude of the response was significantly higher (Fig. 4). Also, the % of ear thickness increased in *nrf2*$^{-/-}$ mice and then reached a plateau 24 h postapplication with 5 or 10% of croton oil compared with that of *nrf2*$^{+/+}$ mice. These data demonstrate that in the absence of Nrf2, irritant contact dermatitis (ICD) was increased and maintained at a high level.

DISCUSSION

Skin inflammation is essential for sensitization to contact allergens and also plays an important role in the recruitment of cells in the elicitation phase (Kaplan *et al.*, 2012; Martin, 2012).

Downloaded from http://toxsci.oxfordjournals.org/ at INSERM on July 8, 2013

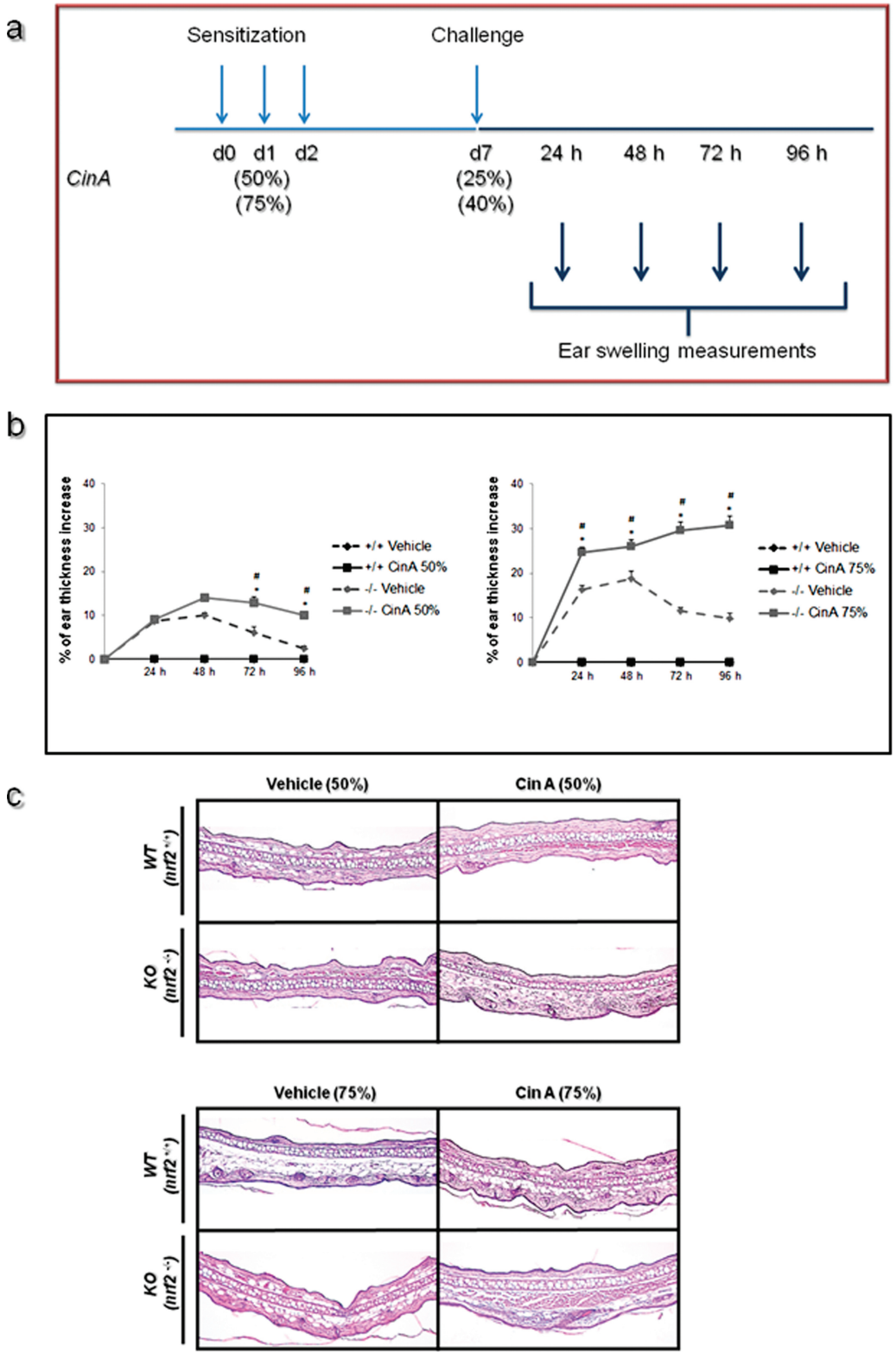


FIG. 2. CinA induced an ear thickness increase in *nrf2*$^{-/-}$ mice in contrast to *nrf2*$^{+/+}$. (a) Experimental protocol. *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ mice were sensitized at day 0, day 1, and day 2 with CinA (50 or 75%) in acetone on the shaved abdomen and were challenged 5 days after the last sensitization by application of CinA (25 or 40%) on both sides of both ears. (b) The ear thickness increase was measured at 24, 48, 72, and 96 h postchallenge. As a control, vehicle-treated mice were only challenged with CinA (25 or 40%). Results are expressed as the % of ear thickness increase as described in Figure 1. Data represent the mean increase of ear thickness ± SEM (mice number = 7), *$p \leq 0.05$. (c) Representative images of H/E staining of ear skin of mice sensitized and challenged with CinA (50 or 75%) or vehicle, magnification ×1000.

Downloaded from http://toxsci.oxfordjournals.org/ at INSERM on July 8, 2013

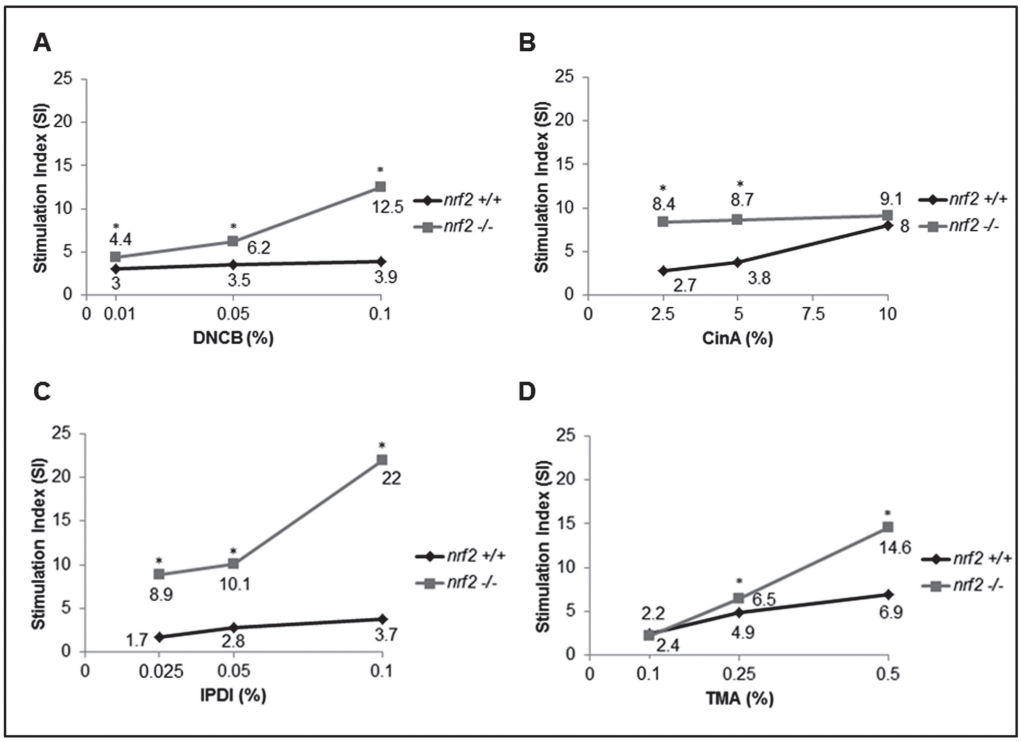


FIG. 3. Chemical sensitizers triggered a higher lymphocyte proliferation in *nrf2*-deficient mice using LLNA in a dose-dependent manner. LLNA was performed as mentioned in Materials and Methods section. Results are expressed by the SI, SI = dpm treated/dpm control, $n = 4$ mice. (A) DNCB, (B) CinA, (C) IPDI, and (D) TMA. *$p \leq 0.05$.

During the sensitization phase, DC are activated, migrate to the draining lymph nodes, and induce the priming of hapten-specific T cells (Kissenpfennig *et al.*, 2005). Direct modifications of the cellular microenvironment by chemical sensitizers are mandatory for DC maturation and migration (Ainscough *et al.*, 2012; Martin, 2012). Nrf2 is induced in response to contact sensitizers in DC (Ade *et al.*, 2009) and also in keratinocytes (Emter *et al.*, 2010) and is probably involved in the regulated cellular response to pro-oxidant and electrophilic stress in these cells (Divkovic *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2005). Nrf2 has also been reported to control airway inflammation in response to ovalbumin in mice (Rangasamy *et al.*, 2005).

In our study, the results show that *nrf2*-deficient mice (*nrf2*$^{-/-}$) exhibit an increased CHS response to both strong and moderate contact sensitizers known to react with cysteine residues. We show that DNCB (1 and 2%), a strong contact sensitizer, induces a higher ear swelling response in *nrf2*$^{-/-}$ mice compared with *nrf2*$^{+/+}$ mice. These results suggest that Nrf2 controls inflammation during the elicitation phase. In response to lower concentrations of DNCB (0.25 and 0.5%), *nrf2*$^{-/-}$ mice developed a positive MEST, whereas in *nrf2*$^{+/+}$ mice, inflammation was not observed. Furthermore, the MEST was negative in both genotypes in response to 0.1% of DNCB, suggesting that *nrf2* KO mice are not predisposed to an enhanced immune response to chemical allergens. This observation shows that the threshold for an inflammatory responses in the skin in *nrf2*$^{-/-}$ mice needed to elicit CHS is lower compared with *nrf2*$^{+/+}$ mice.

The results obtained in response to croton oil confirm that *nrf2*$^{-/-}$ mice are more susceptible to ICD. Bonneville *et al.* (2007) have shown in C57BL/6 and Balb/c mice that the magnitude of ICD was correlated with the intensity of ACD and related to the concentration of the chemicals. Furthermore, the increased ROS production in *nrf2*-deficient mice (Yeang *et al.*, 2012) might contribute to a stronger activation of DC (Bruchhausen *et al.*, 2003). Because the strength of the inflammatory response, i.e., of the irritant effect of the sensitizer, determines whether constitutive immunoregulation can be overcome, our findings indicate that Nrf2 critically regulates the threshold in this process. Thus, the activation of Nrf2 by chemical sensitizers may play the role of a sensor controlling and limiting the inflammatory response and consequently the magnitude of ACD. Interestingly, in old mice (20 months and older), CHS in response to dinitrofluorobenzene was attenuated compared with younger mice (6 months old), and old *nrf2*$^{-/-}$ mice had an even lower ear swelling response than old *nrf2*$^{+/+}$ mice (Kim *et al.*, 2008). This was attributed to accentuated age-related cumulative oxidative stress, which impairs Th1 immunity.

In response to CinA, a moderate sensitizer, no positive MEST was observed in *nrf2*$^{+/+}$ mice. The modified MEST, according to Vocanson *et al.* (2006), allowed a

Downloaded from http://toxsci.oxfordjournals.org/ at INSERM on July 8, 2013

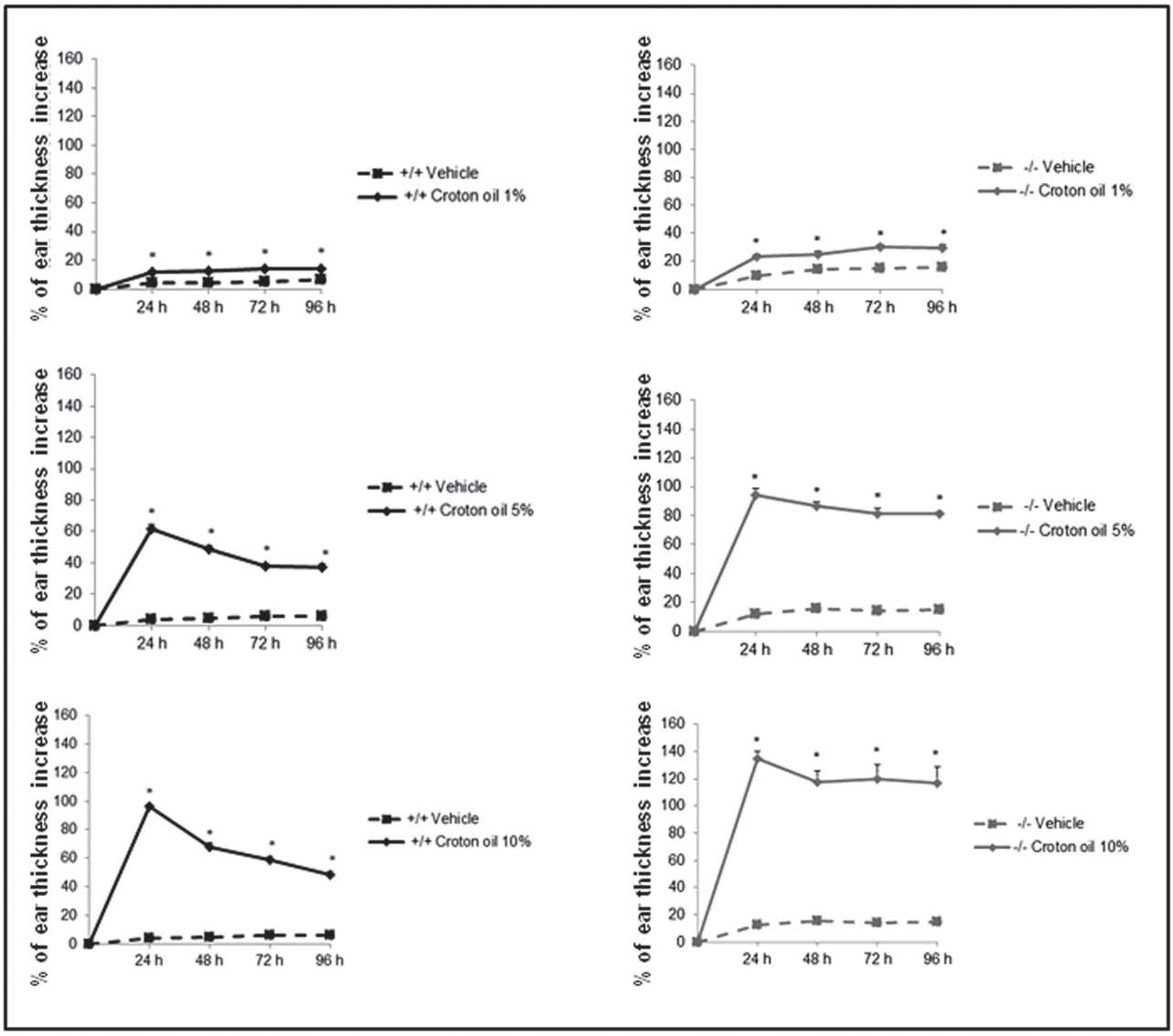


FIG. 4. Croton oil induced a dose-dependent higher irritation in *nrf2*-deficient mice compared with WT mice. *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ mice received at day 0 on both sides of both ears croton oil 1, 5, and 10% in acetone/olive oil (4:1). The ear thickness increase was measured 24, 48, 72, and 96 h postapplication. As control, vehicle mice received acetone/olive oil on both ears. Results are expressed as the % of ear thickness increase. Data represent the mean increase of ear thickness ± SEM (n = 7 mice), representative of two independent experiments. *$p \leq 0.05$.

positive CHS in *nrf2*$^{-/-}$ mice in which the ear swelling was induced. Recent studies have described that CHS reactions in response to CinA or other weak sensitizers occurred in mice depleted of CD4^{+} cells including regulatory lymphocytes (Treg) (Lass *et al*., 2008; Vocanson *et al*., 2006). Other studies have described a correlation between the activation of Nrf2 induced by chemicals such as antroquinonol and the enhancement of Treg cells activity (Tsai *et al*., 2012). There is also a hypothesis involving the DC because DC deficient for *nrf2* have an activated phenotype (data not shown) and an increased antigen-specific CD8 T-cell stimulation capacity (Yeang *et al*., 2012). In the absence of Nrf2, DC are more sensitive to a danger signal (LPS) and produce more ROS (Yeang *et al*., 2012). Furthermore, it has been shown that ROS production plays a role in the upregulation of surface molecules such as CD86, CD40, and HLA-DR known to be important for DC function in response to DNCB (Byamba *et al*., 2010; Mizuashi *et al*., 2005).

Moreover, DC derived from bone marrow of *nrf2* KO mice did show lower basal glutathione (GSH) levels (Yeang *et al*., 2012). DNCB and CinA, known to be detoxified by GSH, would be less trapped in such cells. The consequence would be an increase of the concentration of chemicals available in *nrf2* KO cells, leading to a higher CHS.

Downloaded from http://toxsci.oxfordjournals.org/ at INSERM on July 8, 2013

Following our hypothesis that Nrf2 may affect the sensitization phase by modifying the cellular microenvironment and/or DC phenotype, we addressed the effect of Nrf2 on lymphocyte proliferation during the sensitization phase. We used the LLNA, a model currently used to measure the potential for a chemical to be a sensitizer.

Our LLNA data show that lymphocyte proliferation is higher in *nrf2*$^{-/-}$ mice in response to DNCB, CinA, IPDI, and TMA. The concentrations used for all chemicals tested were in the range of the EC3 defined previously in CBA/J mice (Loveless *et al*., 2010). EC3 is the concentration defined as the amount of chemical that is required to induce (1) a response of a magnitude that defines skin sensitizing potential and (2) an accepted arbitrary augmentation of lymphocyte proliferation proving an effect of the chemical. Working close to the EC3 is important because it is a concentration that defines an effect in the LLNA and probably close to the threshold of stimulation. Our study shows, for the first time, that the absence of Nrf2 affects sensitization to both cysteine- and/or lysine-reactive compounds. Moreover, our data concerning DNCB confirm and expand on the observation made by Van der Veen *et al*. (2012) even if the concentrations of DNCB used in this study were higher with regard to the EC3 of DNCB (~0.08%).

Our study highlights that Nrf2 plays a major role in the control of both phases of ACD: sensitization and elicitation. Nrf2 crucially impacts the irritation potency of the contact sensitizers, suggesting a control of the inflammatory process that may play the role of danger signal during the sensitization phase. However, *nrf2* deficiency and the concomitant higher ROS production in *nrf2*$^{-/-}$ mice could also contribute to a higher basal activation level of innate cells such as DC, augmenting the capacity of these cells to elicit an adaptive immune response. Finally, Nrf2 deficiency leads to an increased inflammatory response during the elicitation phase, suggesting that Nrf2 may also play a role in the regulation of inflammation through a defect in Treg function (Josefowicz *et al*., 2012; Krishnamoorthy *et al*., 2012; Saadoun *et al*., 2011).

FUNDING

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); Agence Nationale de la Recherche (ANR 11-CESA-015-01—Allergochem.); the Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES EST-2010/2/081-AllerChem); the Domaine d'intérêt majeur (DIM) de l'Ile de France "Santé et environnement" (to Z.E.A.).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Valérie Domergue, Pauline Robert, and the Institut Fédératif de Recherche IPSIT for excellent technical assistance for animal testing. We also thank Roy Forster, chief scientist from CIToxLAB.

REFERENCES

Ade, N., Leon, F., Pallardy, M., Peiffer, J. L., Kerdine-Romer, S., Tissier, M. H., Bonnet, P. A., Fabre, I., and Ourlin, J. C. (2009). HMOX1 and NQO1 genes are upregulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: Role of the Keap1/Nrf2 pathway. *Toxicol. Sci*. **107,** 451–460.

Ainscough, J. S., Frank Gerberick, G., Dearman, R. J., and Kimber, I. (2012). Danger, intracellular signaling, and the orchestration of dendritic cell function in skin sensitization. *J. Immunotoxicol* [published online ahead of print September 7, 2012].

Bonneville, M., Chavagnac, C., Vocanson, M., Rozieres, A., Benetiere, J., Pernet, I., Denis, A., Nicolas, J. F., and Hennino, A. (2007). Skin contact irritation conditions the development and severity of allergic contact dermatitis. *J. Invest. Dermatol*. **127,** 1430–1435.

Bruchhausen, S., Zahn, S., Valk, E., Knop, J., and Becker, D. (2003). Thiol antioxidants block the activation of antigen-presenting cells by contact sensitizers. *J. Invest. Dermatol*. **121,** 1039–1044.

Byamba, D., Kim, T. G., Kim, D. H., Je, J. H., and Lee, M. G. (2010). The Roles of Reactive Oxygen Species Produced by Contact Allergens and Irritants in Monocyte-derived Dendritic Cells. *Ann. Dermatol*. **22,** 269–278.

Divkovic, M., Pease, C. K., Gerberick, G. F., and 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.

Emter, R., Ellis, G., and Natsch, A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **245,** 281–290.

Esser, P. R., Wölfle, U., Dürr, C., von Loewenich, F. D., Schempp, C. M., Freudenberg, M. A., Jakob, T., and Martin, S. F. (2012). Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation. *PLoS One* **7,** e41340.

Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., *et al.* (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **236,** 313–322.

Josefowicz, S. Z., Lu, L. F., and Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: Mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol*. **30,** 531–564.

Kang, K. W., Lee, S. J., and Kim, S. G. (2005). Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal*. **7,** 1664–1673.

Kaplan, D. H., Igyarto, B. Z., and Gaspari, A. A. (2012). Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat. Rev. Immunol*. **12,** 114–124.

Kensler, T. W., Wakabayashi, N., and Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. **47,** 89–116.

Kim, H. J., Barajas, B., Wang, M., and Nel, A. E. (2008). Nrf2 activation by sulforaphane restores the age-related decrease of T(H)1 immunity: Role of dendritic cells. *J. Allergy Clin. Immunol*. **121,** 1255–1261.e7.

Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhé, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C. H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D., *et al.* (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.

Krishnamoorthy, N., Khare, A., Oriss, T. B., Raundhal, M., Morse, C., Yarlagadda, M., Wenzel, S. E., Moore, M. L., Peebles, R. S., Jr, Ray, A.,

Downloaded from http://toxsci.oxfordjournals.org/ at INSERM on July 8, 2013

et al. (2012). Early infection with respiratory syncytial virus impairs regulatory T cell function and increases susceptibility to allergic asthma. *Nat. Med.* **18,** 1525–1530.

Lass, C., Vocanson, M., Wagner, S., Schempp, C. M., Nicolas, J. F., Merfort, I., and Martin, S. F. (2008). Anti-inflammatory and immune-regulatory mechanisms prevent contact hypersensitivity to Arnica montana L. *Exp. Dermatol.* **17,** 849–857.

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

Loveless, S. E., Api, A. M., Crevel, R. W., Debruyne, E., Gamer, A., Jowsey, I. R., Kern, P., Kimber, I., Lea, L., Lloyd, P., *et al.* (2010). Potency values from the local lymph node assay: Application to classification, labelling and risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **56,** 54–66.

Magnuson, H. J. (1969). The R.T. Johnstone Memorial Lecture. Rx–a periodic examination program for occupational health. *J. Occup. Med.* **11,** 349–354.

Martin, S. F. (2012). Allergic contact dermatitis: Xenoinflammation of the skin. *Curr. Opin. Immunol.* **24,** 720–729.

Martin, S. F., Dudda, J. C., Bachtanian, E., Lembo, A., Liller, S., Dürr, C., Heimesaat, M. M., Bereswill, S., Fejer, G., Vassileva, R., *et al.* (2008). Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* **205,** 2151–2162.

Martin, S. F., Esser, P. R., Weber, F. C., Jakob, T., Freudenberg, M. A., Schmidt, M., and Goebeler, M. (2011). Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy* **66,** 1152–1163.

Migdal, C., Foggia, L., Tailhardat, M., Courtellemont, P., Haftek, M., and Serres, M. (2010). Sensitization effect of thimerosal is mediated in vitro via reactive oxygen species and calcium signaling. *Toxicology* **274,** 1–9.

Mizuashi, M., Ohtani, T., Nakagawa, S., and Aiba, S. (2005). Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* **124,** 579–586.

Rangasamy, T., Guo, J., Mitzner, W. A., Roman, J., Singh, A., Fryer, A. D., Yamamoto, M., Kensler, T. W., Tuder, R. M., Georas, S. N., *et al.* (2005). Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J. Exp. Med.* **202,** 47–59.

Rangasamy, T., Williams, M. A., Bauer, S., Trush, M. A., Emo, J., Georas, S. N., and Biswal, S. (2010). Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2 inhibits the maturation of murine dendritic cells by ragweed extract. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **43,** 276–285.

Ryan, C. A., Gildea, L. A., Hulette, B. C., Dearman, R. J., Kimber, I., and Gerberick, G. F. (2004). Gene expression changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* **150,** 301–316.

Saadoun, D., Rosenzwajg, M., Joly, F., Six, A., Carrat, F., Thibault, V., Sene, D., Cacoub, P., and Klatzmann, D. (2011). Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N. Engl. J. Med.* **365,** 2067–2077.

Thimmulappa, R. K., Lee, H., Rangasamy, T., Reddy, S. P., Yamamoto, M., Kensler, T. W., and Biswal, S. (2006). Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J. Clin. Invest.* **116,** 984–995.

Thyssen, J. P., Linneberg, A., Menné, T., and Johansen, J. D. (2007). The epidemiology of contact allergy in the general population–prevalence and main findings. *Contact Dermatitis* **57,** 287–299.

Tsai, P. Y., Ka, S. M., Chang, J. M., Lai, J. H., Dai, M. S., Jheng, H. L., Kuo, M. T., Chen, P., and Chen, A. (2012). Antroquinonol differentially modulates T cell activity and reduces interleukin-18 production, but enhances Nrf2 activation, in murine accelerated severe lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* **64,** 232–242.

Uter, W., Johansen, J. D., Orton, D. I., Frosch, P. J., and Schnuch, A. (2005). Clinical update on contact allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **5,** 429–436.

van der Veen, J. W., Gremmer, E. R., Vermeulen, J. P., van Loveren, H., and Ezendam, J. (2013). Induction of skin sensitization is augmented in Nrf2-deficient mice. *Arch Toxicol.* **87,** 763–766.

Vocanson, M., Hennino, A., Cluzel-Tailhardat, M., Saint-Mezard, P., Benetiere, J., Chavagnac, C., Berard, F., Kaiserlian, D., and Nicolas, J. F. (2006). CD8+ T cells are effector cells of contact dermatitis to common skin allergens in mice. *J. Invest. Dermatol.* **126,** 815–820.

Yamamoto, T., Suzuki, T., Kobayashi, A., Wakabayashi, J., Maher, J., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2008). Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol. Cell. Biol.* **28,** 2758–2770.

Yeang, H. X., Hamdam, J. M., Al-Huseini, L. M., Sethu, S., Djouhri, L., Walsh, J., Kitteringham, N., Park, B. K., Goldring, C. E., and Sathish, J. G. (2012). Loss of transcription factor nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) leads to dysregulation of immune functions, redox homeostasis, and intracellular signaling in dendritic cells. *J. Biol. Chem.* **287,** 10556–10564.

Downloaded from http://toxsci.oxfordjournals.org/ at INSERM on July 8, 2013



ARTICLE 2

Article 2

THE TRANSCRIPTION FACTOR NRF2 CONTROLS DENDRITIC CELLS SURVIVAL THROUGH *bcl-2* AND ANTIOXIDANT GENE EXPRESSION

Zeina El Ali, Claudine Deloménie, Marc Pallardy & Saadia Kerdine-Römer

En préparation

Les DC sont des cellules présentatrices de l'antigène jouant un rôle majeur dans la réponse immunitaire primaire pouvant être activées par des molécules allergisantes. Parmi ces molécules, le dinitrochlorobenzène (DNCB) ou le cinnamaldehyde (CinA), des composés électrophiles, sont connus pour induire une production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Elles génèrent un stress chimique ou oxydant perçu par les DC comme un signal de danger et induisant alors leur maturation. Ces molécules allergisantes sont aussi capables d'activer la voie de détoxication Nrf2/Keap1. Cette voie est centrale pour la détection des composés électrophiles. A l'état basal et en absence de stress chimique ou oxydant, Nrf2 est couplé à son répresseur cytosolique Keap1 qui assure sa dégradation *via* le protéasome. En présence d'un stress, Nrf2 transloque dans le noyau et induit l'expression des gènes antioxydants tels que l'*hème-monooxygénase1 (hmox1)*, la *cat*, la *glutathion péroxydase* (*gpx*) et des enzymes de phase II telles que la *NADPH quinone oxydoréductase (nqo1) et glutathione-s-transférase (gst*). Nous avons démontré que les molécules allergisantes comme le DNCB ou le CinA induisent l'accumulation de Nrf2 dans les DC humaines.

Afin d'étudier le rôle de Nrf2 dans la survie cellulaire, des DC issues de la moelle osseuse (BMDC) des souris $nrf2^{+/+}$ et des souris $nrf2^{-/-}$ ont été traitées par le DNCB ou le CinA pendant 24 h. L'annexinV et le 7-AminoActinomycine D (7-AAD) ont été utilisés pour mesurer les cellules apoptotiques et les cellules nécrotiques respectivement. Nos résultats montrent une augmentation (1) des cellules apoptotiques et (2) une diminution des cellules vivantes en l'absence de Nrf2. De plus, une augmentation de l'activité caspase-3/7 et une chute rapide du potentiel mitochondrial membranaire ($\Delta\Psi m$) ont été observées dans les DC $nrf2^{-/-}$ comparées aux DC $nrf2^{+/+}$ en réponse au DNCB ou le CinA. Une plus forte production d'ERO a été également mesurée dans les DC $nrf2^{-/-}$ comparées aux DC $nrf2^{+/+}$ en réponse aux deux molécules testées. Le traitement des DC par la N-acétylcystéine (NAC), une molécule antioxydante utilisée comme précurseur de glutathion, a permis de diminuer l'apoptose des cellules $nrf2^{-/-}$ induite par le DNCB mais pas celle induite par le CinA. Ces résultats montre alors que le DNCB et le CinA induisent l'apoptose des DC *via* l'activation des caspases

dépendantes de la voie mitochondriale ou intrinsèque. Cette apoptose induite, dans les BMDC *nrf2*$^{-/-}$, par ces deux molécules est contrôlée par la production d'ERO en réponse au DNCB.

Par une approche de PCR quantitative, nous montrons que Nrf2 régule positivement l'expression génique de *bcl-2*, un gène anti-apoptotique, en réponse au DNCB ou au CinA. Par ailleurs, afin d'élargir le spectre des gènes régulés par Nrf2 dans les DC en réponse aux deux molécules allergisantes à différents temps (4 h, 8 h et 24 h), un PCR array contenant 43 gènes a été réalisé. Ces 43 gènes ont été divisés en deux catégories : 24 gènes impliqués dans la réponse immunitaire et 19 gènes dans la réponse antioxydante. L'analyse du PCR array montre clairement qu'aux temps précoces (4 h et 8 h) l'absence de Nrf2 retarde la transcription des gènes antioxydants et des enzymes de détoxication et ce en réponse au DNCB ou au CinA. Cependant, à 24h en réponse aux deux molécules, Nrf2 semble jouer un rôle répresseur de ces gènes. Ainsi, 26 gènes sont réprimés en réponse au DNCB contre 14 gènes en réponse au CinA. Ceci montre que Nrf2 peut jouer un rôle activateur ou répresseur de la transcription des gènes et ce en fonction de la molécule testée, du temps de traitement et du gène à transcrire. Ainsi, notre étude montre que Nrf2 régule positivement *bcl-2, ho-1, la nqo-1, gsr, gpx* et la *monoxyde d'azote synthase (nos2)* en réponse au DNCB ou au CinA.

En résumé, ce travail montre que le facteur de transcription Nrf2 joue un rôle dans la survie cellulaire *via* la transcription du gène *bcl-2* et assure une protection des DC *via* les gènes antioxydants contre le stress oxydant induit par les molécules allergisantes. De plus, notre étude met en évidence pour la première fois dans la DC murine, des gènes impliqués dans la détoxication et la réponse immunitaire régulés par Nrf2 en réponse au DNCB et au CinA.

ORIGINAL RESEARCH COMMUNICATION

THE TRANSCRIPTION FACTOR NRF2 CONTROLS DENDRITIC CELLS SURVIVAL THROUGH *BCL-2* AND ANTIOXYDANT GENE EXPRESSION

[*]Zeina El Ali, [§]Claudine Deloménie, [#]Marcel Bonay, [*]Marc Pallardy & [*]Saadia Kerdine-Römer

*: INSERM, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry – France

UniverSud, INSERM UMR-996 "Cytokines, Chemokines and immunopathology", Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France

§: IFR141 IPSIT, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry – France

[#]EA4497, UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, Université de Versailles Saint Quentin & Service de Physiologie-Explorations Fonctionnelles, Hôpital Ambroise Paré, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, France

Short title: Nrf2 controls DC survival.

Corresponding author: Prof. Saadia Kerdine-Römer, INSERM UMR-996; Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste. Clément, F-92296 Châtenay-Malabry

Tel: 00 33 (0) 1 4683 5779, Fax: 00 33 (0) 1 4683 5496

e-mail: saadia.kerdine-romer@u-psud.fr

Key words: allergy, dendritic cells, Nrf2, contact sensitizers, apoptosis, *bcl-2*

ABSTRACT

***Aims*:** Dendritic cells (DC) are known to play a major role during contact allergy induced by contact sensitizers, such as dinitrochlorobenzene (DNCB) or cinnamaldehyde (CinA). Such chemicals can generate a chemical or oxidative stress perceived as a danger signal by DC and are potent inducers of Nrf2, the main pathway responsible for cell defense against oxidative stress. To elucidate the role of Nrf2 in DC survival, two models were used: human DC derived from monocytes (MoDC) and murine bone marrow DC (BMDC) derived from mice (*nrf2*$^{+/+}$, *nrf2*$^{-/-}$) were treated with DNCB or CinA. ***Results*:** Results showed an increase of apoptotic cells and a decrease of living cells in the absence of Nrf2 in response to DNCB and CinA. Mitochondrial-dependent caspase activation pathway was involved in DC apoptosis induced by contact sensitizers. This apoptosis was controlled by ROS in response to DNCB. Using a dedicated PCR array, we found that Nrf2 positively regulated *bcl-2* gene expression in response to both sensitizers also and known to play a role in antioxidant response or DC maturation (*catalase*, *hmox1*, *nqo1, gsr, gpx, nos2, cxcl10, ccl3, cxcl1*). ***Innovation*:** This study demonstrates that common mechanisms of apoptosis seem to be involved in the response to contact sensitizers in DC when *nrf2* is absent which delayed the transcriptional activation of genes involved in antioxidant mechanisms and survival. ***Conclusions*:** Altogether, our results show that Nrf2 controls DC apoptosis in response to contact sensitizers and specific genes are involved in the regulation of detoxification and the immune response.

INTRODUCTION

Allergic contact dermatitis (ACD) is known to be induced by contact sensitizers, low molecular weight compounds (< 500 Da) (34, 55). These compounds have electrophilic properties binding covalently to nucleophilic residues from cutaneous proteins and leading to the formation of a hapten-carrier complex with immunogenic properties (14).

ACD is a common skin disease involving dendritic cells (DC) known to play a key role in this pathology (34). DC are professional antigen presenting cells that can induce a primary immune response (6, 7, 53). We have shown that DNCB and nickel are perceived as danger signals because they induce the activation of DC signaling pathway mimicking toll like receptor (TLR) agonists activation (1, 9). In addition, contact sensitizers like DNCB alter the redox glutathione (GSH/GSSG) balance in MoDC (37). This contact sensitizer and others like dinitrofluorobenzene (DNFB), trinitrochlorobenzene (TNCB) are also able to provoke the production of reactive oxygen species (ROS) in BMDC (16) or MoDC (10, 17) leading to apoptosis (11, 13, 24, 44, 45).

The main pathway responsible for cell defense against oxidative stress and maintaining the cellular redox balance at physiological levels is the nuclear factor 2 related factor 2 (Nrf2) (52). Nrf2, a basic leucine zipper member of the cap 'n' collar family of transcription factors (49), is the principal regulator of the antioxidant response element (ARE)-driven cellular defense genes. Briefly, under homeostatic conditions, Nrf2 is associated in the cytoplasm to an actin-binding protein named Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) (30). Keap1 functions as a suppressor of Nrf2 by retaining it in the cytosol and enhancing its proteasomal degradation (32). In the presence of a chemical stress, oxidants or electrophiles, Keap1's conformation is modified leading to the release of Nrf2 and its nuclear translocation where it heterodimerizes with other transcription factors such as members of the small Maf (musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene) family (38). Binding of these heterodimers to the consensus sequence ARE allows the transcriptional activation of many target genes [*heme oxygenase-1* (*hmox1), NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (nqo1), glutathione-S-transferase (gst*)] (56). Evidence supporting the pivotal role of Nrf2 in the protection against oxidative/electrophilic stress comes, in part, from studies conducted in Nrf2-Knockout (KO, *nrf2*$^{-/-}$) mice. These studies showed that the decreased levels of phase II detoxification enzymes and antioxidant proteins make *nrf2*$^{-/-}$ mice highly sensitive to cytotoxic electrophiles

compared with *nrf2*$^{+/+}$ (wild-type) mice (29). In addition, Murine Embryonic Fibroblasts (MEF) isolated from *nrf2*$^{-/-}$ mice showed higher level of cell death in response to the treatment with the redox-cycling ROS generator menandione and the GSH-depleting anticancer agent cisplatin (22). Thus, Nrf2-mediated antioxidant response represents a critically important cellular redox homeostasis and limits oxidative damage (21).

Since contact sensitizers are potent inducers of the Keap1/Nrf2 pathway, the main objective of this work was to study the role of Nrf2 in the control of DC survival. For this purpose, two models of DC were used: human dendritic cells derived from monocytes (MoDC) and murine bone marrow dendritic cells (BMDC) derived from mice (*nrf2*$^{+/+}$, *nrf2*$^{-/-}$). These DC were stimulated with two well-known sensitizers DNCB and CinA.

Our data clearly show that Nrf2 controls cell death-induced by chemicals sensitizers. DNCB and CinA activated intrinsic pathway of apoptosis in *nrf2*$^{-/-}$ DC, observed by an increase of caspase-3/7 activity and a loss of the mitochondrial membrane potential in *nrf2*$^{-/-}$ DC compared to *nrf2*$^{+/+}$ DC in response to both chemicals. ROS production by DNCB and CinA was exacerbated in *nrf2*$^{-/-}$ DC compared to DC from *nrf2*$^{+/+}$ mice and pre-treatment with the ROS scavenger N-acetylcysteine (NAC) rescued DNCB-treated cells from apoptosis in nrf2$^{-/-}$ DC. Moreover, our results demonstrate that Nrf2, induced by both sensitizers in DC, regulated the expression of the anti-apoptotic gene bcl-2. Using a RT-qPCR array approach, we also showed that detoxification and immune genes appear to be regulated by Nrf2 in DC in response to DNCB and CinA. Altogether, our results allow us to coordinate events how Nrf2 controls apoptosis and underlie some new putative genes.

RESULTS

Nrf2 controls DC survival in response to contact sensitizers.

To assess the role of Nrf2 in DC survival, For this purpose, bone marrow dendritic cells (BMDC) derived from *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ mice were treated for 24 h with DNCB (10 µM) or CinA (100 µM). Nrf2-deficient BMDC treated with DNCB or CinA showed an increase of dead cells as measured by AnV and 7-AAD staining. Results showed that apoptosis was triggered 24 h after DNCB or CinA treatments in *nrf2*$^{-/-}$ BMDC compared to *nrf2*$^{+/+}$ BMDC (Figure 1A). The percentage of apoptotic cells (AnV^{+}/7-AAD^{-} & AnV^{+}/7-AAD^{+}) was significantly increased in *nrf2*$^{-/-}$ BMDC compared to *nrf2*$^{+/+}$ BMDC in the presence of DNCB (48% to 80%) or CinA (52% to 75%). In contrast, the percentage of living cells represented by AnV^{-}/7-AAD^{-} decreased significantly in the presence of DNCB (48% to 14%) or CinA (47% to 22%) in Nrf2-deficient BMDC compared to WT BMDC (Fig. 1A).

To evaluate the protective role of Nrf2 in the survival of human DC derived from monocytes (MoDC), we first measured the expression of Nrf2 protein in MoDC. At day 5 of differentiation, MoDC were treated with DNCB (10 µM) or CinA (100 µM) for different times (Fig. 1B). Our results showed that Nrf2 was expressed after 2 h of treatment and this accumulation persisted at 4 h and 6 h in response to DNCB and CinA compared to DMSO. To address the role of Nrf2 in human DC, MoDC were transfected with small interfering RNA (siRNA) to invalidate *in vitro nrf2* transcripts (supplementary data 1) and were then treated with DNCB or CinA for 18 h. The results showed an increase of dead cells, measured by Annexin V (AnV) and 7-AAD and analyzed by flow cytometry. Knocking down *nrf2* in MoDC (*nrf2*$^{-/-}$ MoDC, siRNA *nrf2*) induced a significant increase of the percentage of both apoptotic cells (AnV^{+}/7-AAD^{-} & AnV^{+}/7-AAD^{+}) compared to control cells (siRNA Rd). In *nrf2*$^{-/-}$ MoDC compared to *nrf2*$^{+/+}$ MoDC, the percentage of apoptotic cells increased from 44% to 64% in the presence of DNCB and increased from 31% to 52% in response to CinA. In addition, a significant decrease of the percentage of living cells (AnV^{-}/7-AAD^{-}) was observed in response to DNCB (50% to 28%) or CinA (62% to 46%) in *nrf2*$^{-/-}$ MoDC compared to *nrf2*$^{+/+}$ MoDC (Fig.1C).

Taken together, these results demonstrated the cytoprotective effect of Nrf2 in response to contact sensitizers in both models of DC, MoDC and BMDC.

Nrf2 deficiency induces a rapid loss of mitochondrial membrane potential (ΔΨm) and a higher caspase-3/7 activity in response to contact sensitizers.

To characterize the mechanism of cell death induced by the two contact sensitizers DNCB and CinA, mitochondrial membrane potential (ΔΨm) and caspase-3/7 activities were measured by flow cytometry in DC. We conducted our study using *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ BMDC. The results, expressed as % DIOC6(3)^{low} cells, showed a delayed loss of ΔΨm in response to CinA compared to DNCB in *nrf2*$^{+/+}$ BMDC. In the absence of Nrf2, a significant increase of % DIOC3(6)^{low} cells was observed for all tested times for each sensitizer (Fig. 2A),.

To measure caspase-3/7 activity, we used NucView^{TM} 488 caspase-3/7 substrate. CinA didn't induce any significant increase of caspase-3/7 activity in *nrf2*$^{+/+}$ BMDC over the time while a slight effect was observed with DNCB 24 h post treatment ($P < 0.1$).

In *nrf2*$^{-/-}$ BMDC treated with DNCB or CinA at 6 h and 24 h, a significant increase of caspase-3/7 activity was observed compared to *nrf2*$^{+/+}$ BMDC (Fig. 2B). These data demonstrate that the intrinsic apoptotic pathway is implicated in *nrf2*$^{-/-}$ BMDC cell death induced by chemical sensitizers. Cell death provoked by such molecules involved both an induction of caspase-3/7 activity and a rapid loss of ΔΨm in *nrf2*$^{-/-}$ treated with DNCB or CinA (Fig. 2).

The ROS production increase involved in BMDC apoptosis in the absence of Nrf2 is correlated with the down regulation of *bcl-2* gene expression in response to both contact sensitizers.

Since ROS are known to be important for the induction of apoptosis (51), we have evaluated the ability of BMDC to produce ROS in response to contact sensitizers. ROS production was measured by flow cytometry using H2DCF-DA, a membrane permeable non-fluorescent dye producing a green fluorescence when the cleaved dye is oxidized by ROS. ROS levels reached a peak 30 min after the treatment with DNCB or CinA and then decreased gradually compared to the control (DMSO) in the both *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ BMDC. ROS production was higher in response to DNCB (25%) compared to CinA (12%). In the absence of Nrf2, a higher production of ROS in BMDC was measured in response to DNCB and CinA in a time dependent manner (Fig. 3A). Moreover, ROS production was slightly higher in the absence of Nrf2 under basal conditions.

To evaluate if apoptosis induced by DNCB or CinA in Nrf2-deficient BMDC is mediated by ROS, we treated BMDC with NAC, an antioxidant scavenger which quenches ROS

production. As we show, ROS production was reversed when cells were pre-treated for 2 h with NAC, (Fig. 3B). We then evaluated whether treatment with antioxidants inhibited the apoptosis induced by DNCB or CinA in Nrf2-deficient BMDC (Fig. 3C). *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ BMDC were pre-treated (for 2 h) with NAC, washed and then incubated for 24 h with DNCB or CinA. As we described in figure 1, DNCB induced an increase of total apoptotic cells and a decrease of living cells in Nrf2-deficient DC (Fig. 3C). When BMDC were pre-treated with NAC, an increase of the % of living cells (11.6 % to 57.5 %) and a decrease of the % of total apoptotic cells (78.8 % to 31 %) were observed in *nrf2*$^{-/-}$ BMDC in response to DNCB. In response to CinA, a slight difference of the % of living cells between cells NAC pre-treated (28.1%) or not (19.8%) was seen. Taken together, these data indicate that in response to DNCB and CinA, the Nrf2 deficiency enhances ROS production, mainly responsible of DNCB-induced cell death. For CinA, ROS faintly control CinA-induced cell death in *nrf2*$^{-/-}$ BMDC.

The Bcl-2 protein has been shown to be regulated by oxidative stress and bcl-2 gene expression has also been found to be affected by Nrf2 at the transcriptional level. *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ BMDC were treated for 4 h and 8 h with DNCB or CinA and *bcl-2* gene expression was measured by RT-qPCR. Results revealed that DNCB and CinA treatment increased *bcl-2* mRNA in *nrf2*$^{+/+}$ BMDC over time (Fig. 4). However, in *nrf2*$^{-/-}$ BMDC treated with DNCB or CinA, *bcl-2* mRNA levels were significantly lower compared to their respective control cells (*nrf2*$^{+/+}$) at 8 h (Fig. 4). Taken together, our data demonstrate that Nrf2 regulates positively *bcl-2* gene expression in BMDC in response to DNCB and CinA.

Antioxidant and cell survival genes are controlled by Nrf2 in response to sensitizers.

Nrf2 is a multiorgan protector against xenobiotic stress and Nrf2 target genes are involved in several key survival pathways such as NQO1 as well as the antioxidative enzyme HO-1 (8, 26, 46). Moreover, Nrf2 has been shown to a critical regulator of the innate immune response in response to LPS (Thimmulappa et al., 2006). To understand how Nrf2 controls genes involved in antioxidation and immunity, a RT-qPCR array designed for 43 genes target genes was conducted to analyze both *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ BMDC after 4 h, 8 h and 24 h treatment with DNCB or CinA or DMSO vehicle. The screening was performed on a pool of 3 independent experiments, each individual sample being previously validated by measuring the expression of two known target genes of Nrf2 (*hmox1* and *nqo1*). The studied target genes comprised six

functional classes, according to GeneOntology annotation (http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi), which were grouped into two major categories (Fig. 5A), including genes relative to defense against oxidative stress and to immune response-related events.

Results were expressed as mRNA fold change in compound-treated *vs* DMSO treated cells, and either up- (red), down- (green) or not (black) regulated. Fold-changes in the range 0.76-1.32 fell within the technical variability of the assay, and thus were considered as a stable gene expression (Fig. 5B). This screening allowed us to identify number of genes which were significantly up- or down-regulated in *nrf2*$^{+/+}$ and/or *nrf2*$^{-/-}$ BMDC treated with DNCB (Fig. 6A) or CinA (Fig. 6B) compared to DMSO for each functional class considered.

The results showed that nrf2 disruption markedly blocked the up-regulation of the gene cluster related to antioxidant processes at 4 h and 8 h of treatment with DNCB or CinA, together with a massive down-regulation of this gene group under DNCB treatment. Thus, *nrf2*$^{+/+}$ BMDC overexpressed a maximal number of genes from this functional class at 8 h of treatments (i.e. 10 or 12 of the 19 genes studied in the presence of DNCB or CinA, respectively) while in *nrf2*$^{-/-}$ BMDC, this number was lowered by 10-fold (DNCB) or 2-fold (CinA). At 24 h, the transcriptional activation of oxidation-related genes was markedly delayed and unlocked at latest time of treatment, leading to a significantly higher proportion of up-regulated genes in *nrf2*$^{-/-}$ than in *nrf2*$^{+/+}$ BMDC with DNCB or CinA. Regarding the immune response gene cluster, nrf2 deficiency similarly delayed the transcriptional activation in response to DNCB. If counts of up-regulated immunity genes appeared similar in *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ BMDC treated with CinA, transcriptional activation was significantly delayed and all modulated genes at 24-h treatment in *nrf2* deficient BMDC were up-regulated (Fig.6B). The global transcriptional activation effect which was observed in *nrf2*$^{-/-}$ BMDC in all functional classes studied could be explained by a repressor activity of Nrf2 transcription factor (Supplementary data 2).

DISCUSSION

Cells have developed an adaptive defense mechanism in response to oxidative and chemical stress that leads to a rapid and efficient expression of detoxifying enzymes (phase II enzymes) and antioxidant pathway (23) mainly mediated *via* the Nrf2 transcription factor. We have previously reported that Nrf2 is induced in the presence of contact sensitizers (DNCB and CinA) but not in the presence of irritants CD34-DC (2, 35). Several studies also described a major role of Nrf2 in cell survival against chemicals (25, 42).

Our hypothesis implies that Nrf2 is induced in response to chemical sensitizers conferring a protection against chemical stress and allowing DC survival. The objective of this study was to elucidate the role of Nrf2 in DC in response to contact sensitizers and define news candidates in the regulation of survival and function of the DC.

In our study, the results showed a time dependent accumulation of Nrf2 protein with both chemicals in MoDC (DNCB & CinA) 2 h post treatment. Stabilization of Nrf2 was maintained up to 6 h after both treatments. It has been demonstrated that the stabilization of Nrf2 confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells (31), cardiomyocytes (47), hepatocytes (36) and pancreatic cells (57).

To address the role of Nrf2 in DC survival in response to contact sensitizers, MoDC transfected with siRNA (Nrf2) or *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ BMDC were treated with DNCB and CinA. Results showed a significant increase of dead cells and a significant decrease of living cells in *nrf2*-deficient BMDC or in MoDC nrf2 invalidated, in response to both chemical sensitizers. These results showed that Nrf2 played a pivotal role in the survival of both human and murine DC. Our results are consistent with numerous studies revealing the pivotal role of Nrf2 in protection against injuries induced by toxics (cadmium, cisplatin, cyclosporine A) (3, 12, 50).

Our results showed that deficiency of Nrf2 increase mitochondrial changes an alteration of the mitochondrial potential induced by DNCB or CinA in BMDC. Secondly, an higher increase of caspase-3/7 activity was observed at 6 h and 24 h post treatment with DNCB and CinA in *nrf2*$^{-/-}$ BMDC compared to *nrf2*$^{+/+}$ BMDC. These results demonstrated that DNCB and CinA activated the intrinsic pathway of apoptosis also called ‘mitochondrial pathway’ and agreed with the results published by Cruz *et al*., showing that apoptotic death of skin DC occurs after exposure to the sensitizer DNFB (15).

Oxidative stress can play an important role in the initiation of cell death and it has been shown that ROS and the alteration of mitochondrial membrane potential are linked. As it has been described by Byamba *et al.,* we found that DNCB induced ROS production in *nrf2*$^{+/+}$ BMDC (10). In our hands, CinA also induced ROS production but less than DNCB. In *nrf2*$^{-/-}$ BMDC, this ROS production was significantly higher upon DNCB or CinA treatments. However, *nrf2*$^{-/-}$ BMDC showed a significant increase of ROS levels under basal conditions as recently showed by Yeang and collaborators and have a lower basal GSH levels (5). It is not excluded that DNCB and CinA, known to be detoxified by GSH, would be less trapped in *nrf2*$^{-/-}$ BMDC resulting in an increase of the concentration of chemicals available. To address the role of ROS and GSH, BMDC were pre-treated with NAC to increase levels of glutathione in cells and also to interact directly with ROS. The results showed that NAC significantly prevented sensitizers-induced ROS generation and decreased DNCB-triggered apoptosis in *nrf2*$^{-/-}$ BMDC. However, NAC had a very low effect on CinA-induced apoptosis in *nrf2*$^{-/-}$ BMDC although CinA could react *via* Michael's addition on Cys residues. These results indicate that ROS-dependent activation by DNCB is critically required for apoptosis in BMDC and extensively less by CinA. Exacerbation of contact hypersensitivity (CHS) in response to various sensitizers seen in *nrf2*$^{-/-}$ mice (16) could be due in part to higher apoptotic DC perceived as danger signals. Esser *et al.,* showed that pre-treatment with NAC reduced ROS production and contact hypersensitivity induced *in vivo* by TNCB (17).

Apoptosis is an extremely fine-tuned regulatory network consisting of pro- and anti-apoptotic factors. Bcl-2 family proteins, composed greater than six anti-apoptotic members including Bcl-2 and many pro-apoptotic members, regulate cell death and survival (41). It has been recently identified an ARE in the reverse strand of the *bcl-2* promoter that was found to be essential for the up-regulation of Bcl-2 response to chemical/radiation. In our study, Bcl2 induced by DNCB and CinA, well known contact sensitizers involved in CHS, could promoted the survival of DCs and contribute to a better stimulation of lymphocytes by mature DCs. Indeed, it has been shown Bcl-2 enhance the immunogenicity of DCs in inducing antigen-specific immune responses (18, 43).

Nrf2, by itself, does not have any antioxidant function. Previous studies showed that Nrf2 is inactivated in the cytoplasm and that oxidative or chemical stress activate Nrf2 by allowing its translocation into the nucleus and then inducing the expression of its target

antioxidant genes (*hmox1*, *nqo1*, *gst*, *gclc*) (29, 39, 40). The transcriptomic screening study allow us to show that the absence of Nrf2 markedly delays the transcriptional activation of genes involved in antioxidant mechanisms and could explain the ROS production observed in *nrf2*$^{-/-}$ BMDC. Nrf2 could also exhibit a massive transcriptional repressor activity involving all functional classes of genes studied. Conversely, at initial times of treatment kinetics, Nrf2 could be associated to either activator or repressor activity according to the compound and the functional class of genes. Nrf2 acts as transcriptional repressor for *il1b* and *il12a* or as an activator for *gsr, catalase, gpx, nos2*.

Our current study reveals that survival of DC in response to DNCB and CinA is controlled by Nrf2 which participates in *bcl-2* mRNA activation of transcription in response to both sensitizers. We have also identified some new candidate genes regulated by Nrf2 in response to DNCB and CinA in DC. Some of these genes are involved in detoxification mechanisms (*catalase, gsr, gpx1, gsta4, gstm, nos2*) regulating to GSH and ROS production while others are involved in apoptosis/survival pathway such as *il1b*, *ccl3, cxcl1 and il12a*. Therefore, a speculative model of regulation is proposed where *bcl-2* and some other genes could contribute to DC survival trough Nrf2 pathway in response to contact sensitizers (Fig. 7). Consequently, Nrf2 could be either activator or repressor of gene transcription, according to the target gene, compound and treatment time considered. As it has been already described for Nrf2 in CHS, the Keap1–Nrf2 regulatory system seems to have a double role in skin allergy. Kim *et al.* (27) have shown that CHS is reduced in the absence of Nrf2 in response to DNFB while El Ali *et al.* (16) have shown that CHS is reduced when Nrf2 is present.

INNOVATION

Activation of Nrf2 controls inflammation during contact allergy, known to involve DC. This study is the first showing that Nrf2 can control DC survival in response to contact sensitizers. DC death observed in the absence of Nrf2 involved the intrinsic apoptotic pathway and was mediated or not by ROS production, depending on the contact sensitizer. A transcriptomic analysis showed that apoptosis controlled by Nrf2 is in correlation with *bcl-2* transcription and also other clusters of genes regulating detoxification or immune response.

MATERIALS AND METHODS

Generation of dendritic cells from human monocyte (MoDC) and bone marrow dendritic cells (BMDC)

The method for generating human MoDC was performed as previously described (4). Briefly, Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were purified from buffy coats obtained from Etablissement Français du Sang (EFS, Rungis, France) by density centrifugation with Ficoll gradient (PAA Laboratories GmbH, Pashing, Austria). Monocytes were isolated from the mononuclear fraction through magnetic positive selection using MiniMacs separation columns (Miltenyi Biotec, Bergish Glabash, Germany) and anti-CD14 antibodies coated on magnetic beads following provider's instructions (Direct CD14 isolation kit, Miltenyi Biotec, Bergish Glabash, Germany). Monocytes were cultured at $1x10^6$ cells/ml in the presence of GM-CSF (550 U/ml) and IL-4 (550 U/ml) (both from Miltenyi Biotec, Bergish Glabash, Germany) in RPMI 1640 containing Glutamax I supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mg/ml streptomycine and 100 U/ml penicillin (RPMIc) (all from Gibco Invitrogen, Paisley, UK). Within 5 days, monocytes differenciate into dendritic cells.

The method for generating murine BMDC was carried out according to previous publication (33) with slight modifications. Briefly, bone marrow was collected from femurs and tibias of 6 to 12 weeks old C57BL/6 *nrf2* $^{+/+}$ and *nrf2* $^{-/-}$ mice (19) from the specific pathogen-free facility. A single-cell suspension was prepared and erythrocytes were lysed. After 2 washes, bone marrow cells were counted and seeded at $3x10^6$ cells per 100 mm in bacteriological petri dishes (ϕ100, Gosselin, Hazebrouck, France) in 10 ml in IMDM containing 10% heat inactivated fetal calf serum, 0.1 mg/ml streptomycine and 100 U/ml penicillin (IMDMc) (all from Gibco Invitrogen, Paisley, UK). The culture media was supplemented with 10% GM-CSF culture supernatant from the cell line (J558) transfected with the murine GM-CSF gene (kindly provided by Sebastian Amigorena, Institut Curie-France) and β-mercaptoethanol (50 µM, Sigma). At day 3, 10 ml of IMDMc, 10% of GM-CSF culture supernatant and 50 µM β-mercaptoethanol were added to the petri dishes. At day 7, half of the culture supernatant was collected, centrifuged and the cell pellet was resuspended in 10 ml fresh IMDMc, 10% of GM-CSF culture supernatant and 50 µM β-mercaptoethanol. At day 10, non-adherent cells and loosely adherent cells were collected by gentle pipeting and then centrifuged. The cells

were then washed twice with IMDMc and incubated at 1 x 10^6 cells/ml according to different protocols.

Mice*nrf2*$^{-/-}$ mice (20) were provided by the RIKEN BRC according to a MTA to Prof. S. Kerdine-Römer. Wild-type (*nrf2*$^{+/+}$) and *nrf2*$^{-/-}$ mice, investigated in the present study, were generated from inbred C57BL/6J background *nrf2* heterozygous mice. The donating investigator reported that these mice were backcrossed to C57BL/6J for at least 10 generations. Mice were housed in a pathogen-free facility and handled in accordance with the principles and procedures outlined in Council Directive 86/609/EEC. Genotyping was performed by PCR using genomic DNA that was isolated from tail snips as described (20).

Chemical treatement

MoDC or BMDC were washed twice and then incubated at 1x10^6 cells/ml. Cells were then treated with dinitrochlorobenzene [DNCB 10 µM, Sigma, St Louis, USA] or cinnamaldehyde [CinA 100 µM, Sigma, St Louis, USA] for different period of time according to protocols. DNCB and CinA were dissolved in DMSO at 0.1% as a final concentration.

NAC pre-treatment

At day 10 of differentiation, *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ BMDC were washed twice with serum free medium at the concentration of 2 x10^6 cells/ml and then pre-treated with NAC (25 mM) for 2 h. The cells were then washed twice with complete medium and then re-suspended at 1 x10^6 cells/ml for further treatments.

Western blot analysis

Cultured DC (10^6 cells/ml) were washed in cold PBS before lysis in lysis buffer (20 mM Tris pH 7.4, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 7.4, 1% Triton, 25 mM β-glycerophophate, 1 mM Na3VO4, 2 mM sodium pyrophosphate, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 5 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml leupeptin and 5 µg/ml pepstatin). The homogenates were centrifugated at 15,000 rpm for 20 min at 4°C. Equal amounts of denaturated protein were loaded onto 10 % SDS-PAGE gel and transferred on PVDF membrane (Amersham Biosciences, Les Ulis, France). Membranes were then incubated with Abs directed against Nrf2 (H-300, Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, USA). Immunoreactive bands were detected by

chemiluminescence (ECL solution, Amersham Biosciences, Les Ulis, France). P38 MAPK was used as a loading control and revealed with Abs raised against p38 MAPK (Cell Signaling Technology, Ozyme, St-Quentin en Yvelines, France). Bands were measured using the ImageLab software (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France).

Electroporation of MoDC with siRNA

This protocol was performed according to Larangé *et al.,* (28). Briefly, at day 5 of differentiation, MoDC were washed once with serum-free medium and once with PBS. Cells were then resuspended in serum-free medium at $40x10^6$ cells/ml. Equivalent amounts of non-silencing control siRNA (20 µM, Rd siRNA from Qiagen, Courtaboeuf, France) or Nrf2 siRNA (20 µM, ID s9492, Ambion Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were transferred into 4 mm cuvette (Biorad, Marnes-La-Coquette, France) and filled up to a final volume of 100 µl with serum-free medium. $4x10^6$ cells were added and pulsed in a GenePulser II (Biorad, Marnes-La-Coquette, France) (300V, 150 µF). Cells were then resuspended in complete medium with GM-CSF (550 U/ml) and IL-4 (550 U/ml) at a concentration of 10^6 cells/ml for 18 h.

Measurement of apoptosis by Annexin V/7-AAD staining

After 24 h of treatment with chemicals, DC were washed twice with cold PBS and then resuspended in 1X Binding buffer (BD Biosciences, France) at a concentration of $1x10^6$ cells/ml. Cells were then stained and incubated with PE Annexin V and 7-AAD (BD Biosciences, France) for 15 min at RT (25°C) in the dark. Cells were then diluted with 1X binding buffer. The stained cells were analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur™ cell analyzer using the CellQuest™ software (Becton Dickinson, France).

The apoptotic cells stained with both AnV and 7-AAD. The results were expressed by the percentage of living cell ($AnV^-/7\text{-}AAD^-$), total apoptotic cells ($AnV^+/7\text{-}AAD^-$ & $AnV^+/7\text{-}AAD^+$).

Assessment of mitochondrial membrane potential

For assessment of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi m$), BMDC were stained by the cationic lipophilic fluorochrome 3,3'-dihexyloxacarbo-cyanide iodide [$DiOC_6(3)$] (100 nM, Molecular Probes, Cergy Pontoise, France) for 30 min in the dark at 37°C. After different time

of treatment with DNCB or CinA, the stained cells were analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur™ cell analyzer using the CellQuest™ software (Becton Dickinson). The results were expressed by the percentage of DiOC6(3) low cells.

Measurement of caspase-3/7 activity

Caspase-3/7 activity was determined by flow cytometry using NucView™ assay. NucView™ 488 caspase-3 substrate (Biotium Inc., USA) is a cell membrane-permeable caspase substrate designed for detecting caspase-3/7 activity within cells. The substrate is cleaved by caspase-3/7 in the cytoplasm of apoptotic cells, releasing a fluorescent DNA dye that is able to enter the nucleus and stain the DNA. Briefly, after 24 h of treatment with DNCB or CinA, *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ BMDC were washed once with PBS 1X and then stained with NucView™ 488 caspase-3 substrate (5 µM) for 30 min at RT in the dark. The stained cells were analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur™ cell analyzer using the CellQuest™ software (Becton Dickinson). The results were expressed as the percentage of positive cells.

ROS production

Intracellular ROS production was detected using the specific dye 2′-7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) from FluoProbes (Interchim), as described by Royall and Ischiropoulos (48). H2DCFDA, a membrane-permeable probe, was de-acetylated to a non-fluorescent product 2′-7′-dichlorodihydrofluorescein (H2DCF) by cellular esterases and was oxidized by ROS to a fluorescent product 2′-7′-dichlorofluorescein (DCF). Briefly, cells were seeded at 2x10^6 cells/ml in IMDMc and loaded for 30 min in the dark with 20 µM H2DCFDA before treatment with the two contact sensitizers (DNCB or CinA). After incubation, cells were washed with culture medium. After different time of treatment with DNCB or CinA, green DCF fluorescence was analysed by flow cytometry using the FL1-H wavelength band on 10000 cells using CellQuest™ software (Becton Dickinson). The results were expressed using mean fluorescent intensity (MFI).

Total RNA isolation

nrf2 $^{+/+}$ and *nrf2* $^{-/-}$ BMDC (10^6 cells/ml) were treated with DNCB or CinA for 4 h, 8 h and 24 h. The protocol was performed as previously described (28). Briefly, total RNA was extracted

after lysis of cells in TRIzol reagent (Invitrogen) by the guanidium thiocyanate method according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was measured by reading the absorbance at 260 nm using a BioMate™ 3 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), and purity was checked by measuring absorbance at 230 and 280 nm. RNA integrity evaluated by capillary electrophoresis using RNA 6000 Nano chips and the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) was considered suitable when RIN > 8.0 (RNA Integrity Number).

RT-qPCR analysis

For quantification of mRNA expression, single-stranded cDNA was reverse-transcribed from 1 µg of total RNA, with random hexamers and oligo-dT priming using the iSCRIPT enzyme (Bio-Rad), according to the manufacturer's instructions. Custom StellARray™ qPCR plates (Lonza) were designed with two 48-well arrays per plate, including 42 target genes, 5 reference genes and one negative control. Single-stranded cDNA synthesized from 5 ng of total RNA was amplified using the SYBR® Premix Ex taq™ (Takara) reagent according to manufacturer's instructions, in 20 µl reaction volumes. Three separate cDNA samples from each biological condition studied were validated through the expression profile of several genes, and then pooled to be used in the qPCR array screening. 'No RT' controls were amplified on all genes to check genomic DNA contamination, and melting curve analysis was performed to assess the purity of the PCR products. GeNorm in qBase PLUS tool (54) was used to select 18S and Ppib genes as references for normalization of mRNA expression results. The relative amount of transcript expression in samples was determined using the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method where $\Delta\Delta Cq = (Cq_{target} - Cq_{reference})_{sample} - (Cq_{target} - Cq_{reference})_{calibrator}$. The technical variability range of Cq values in the screening assay was estimated to 0.40 from replicate measurements, thus only fold-changes < 0.76 ($=2^{-0.40}$) or > 1.32 ($=2^{0.40}$) were considered biologically relevant, and called significant. Final results were expressed as the n-fold differences in target gene expression either in *nrf2* $^{-/-}$ compared to *nrf2* $^{+/+}$, or in compound treated *vs* DMSO vehicle treated cells.

bcl-2 forward primer: 5'-CAA CCC AAT GCC CGC TGT GC-3'

bcl-2 reverse primer : 5'-GAG AAG TCA TCC CCA GCC CG-3'

Statistical analysis

The comparison of two data groups was analyzed by Mann-Whitney's U test. A P value of < 0.05 was considered statistically significant. Data were analyzed with Statistica version 7.1 software. A Pearson correlation coefficient was used to measure the similarity of gene expression fold-changes between screening and repeated RT-qPCR measurements, and between different treatment conditions from the screening assay. A Fischer's exact tets was performed to analyze contingency tables of up- and down- regulated genes in cells from both Nrf2 genotypes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Chrisptophe Lemaire for his technical and scientific discussions. We also thank Valérie Domergue, Pauline Robert, and the Institut Fédératif de Recherche IPSIT for excellent technical assistance for animal testing. We are grateful to Dr Guido Grentzmann for heplful discussion.

We thank the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); the Agence Nationale de la Recherche (ANR 11-CESA-015-01—Allergochem); the Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES EST-2010/2/081-AllerChem); the Domaine d'intérêt majeur (DIM) de l'Ile de France "Santé et environnement" (to Z.E.A.) and the Region Ile-de-France for funding the equipments of IFR141 IPSIT.

ABBREVIATIONS

ACD: allergic contact dermatitis

BMDC: bone marrow dendritic cells

CinA: cinnamaldehyde

CHS: contact hypersensitivity

DNCB: 2,4-dinitrochlorobenzene

Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1

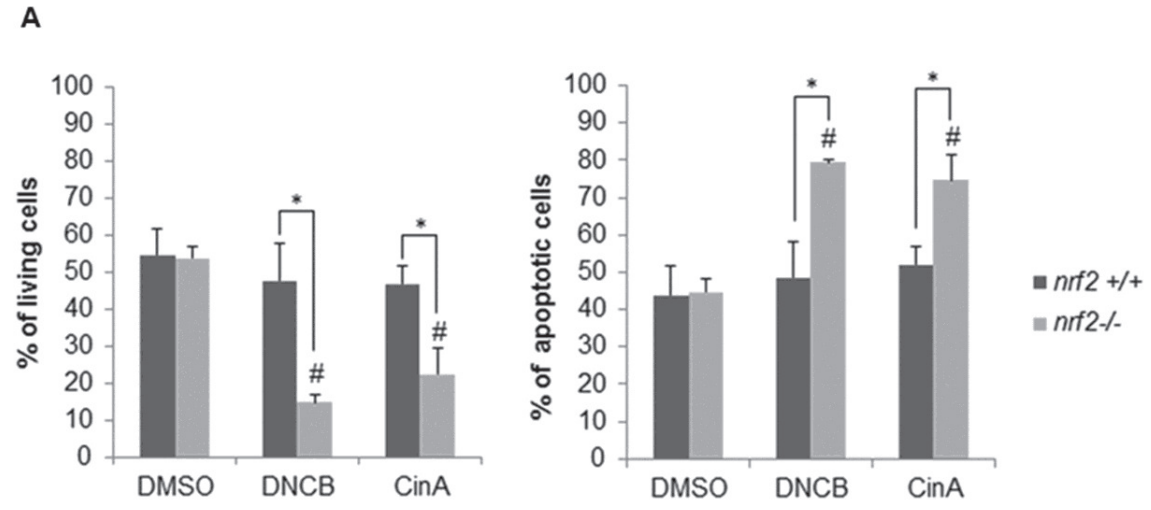
MoDC: dendritic cells derived from monocytes

Nrf2: nuclear factor 2 related factor 2

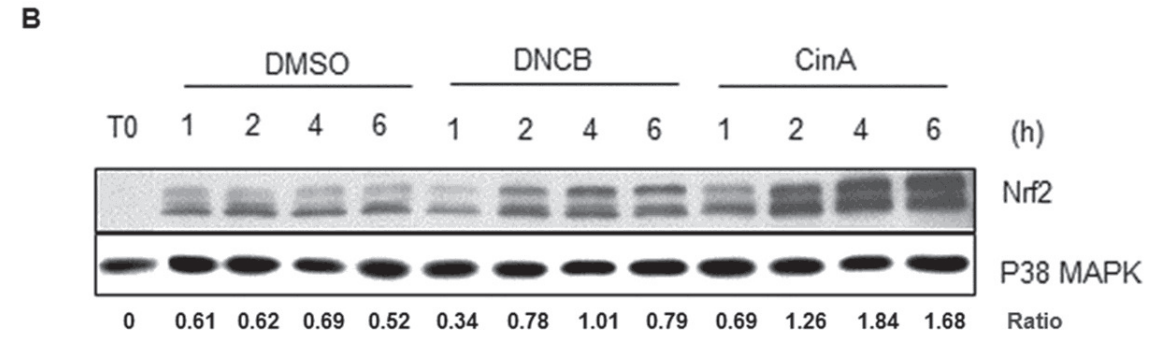
ROS: reactive oxygen species

Figure 1

BMDC



MoDC



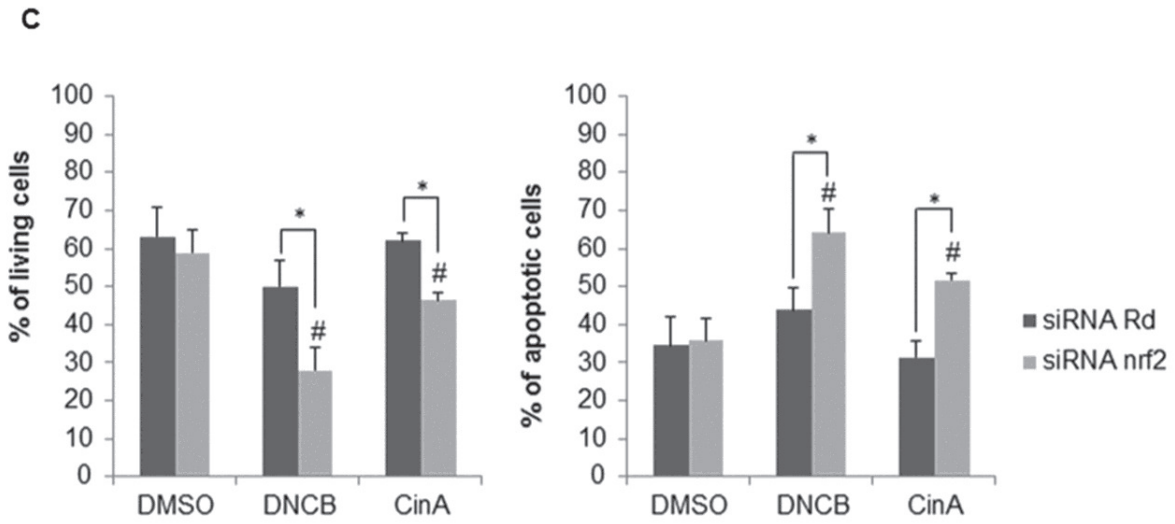


Figure 2

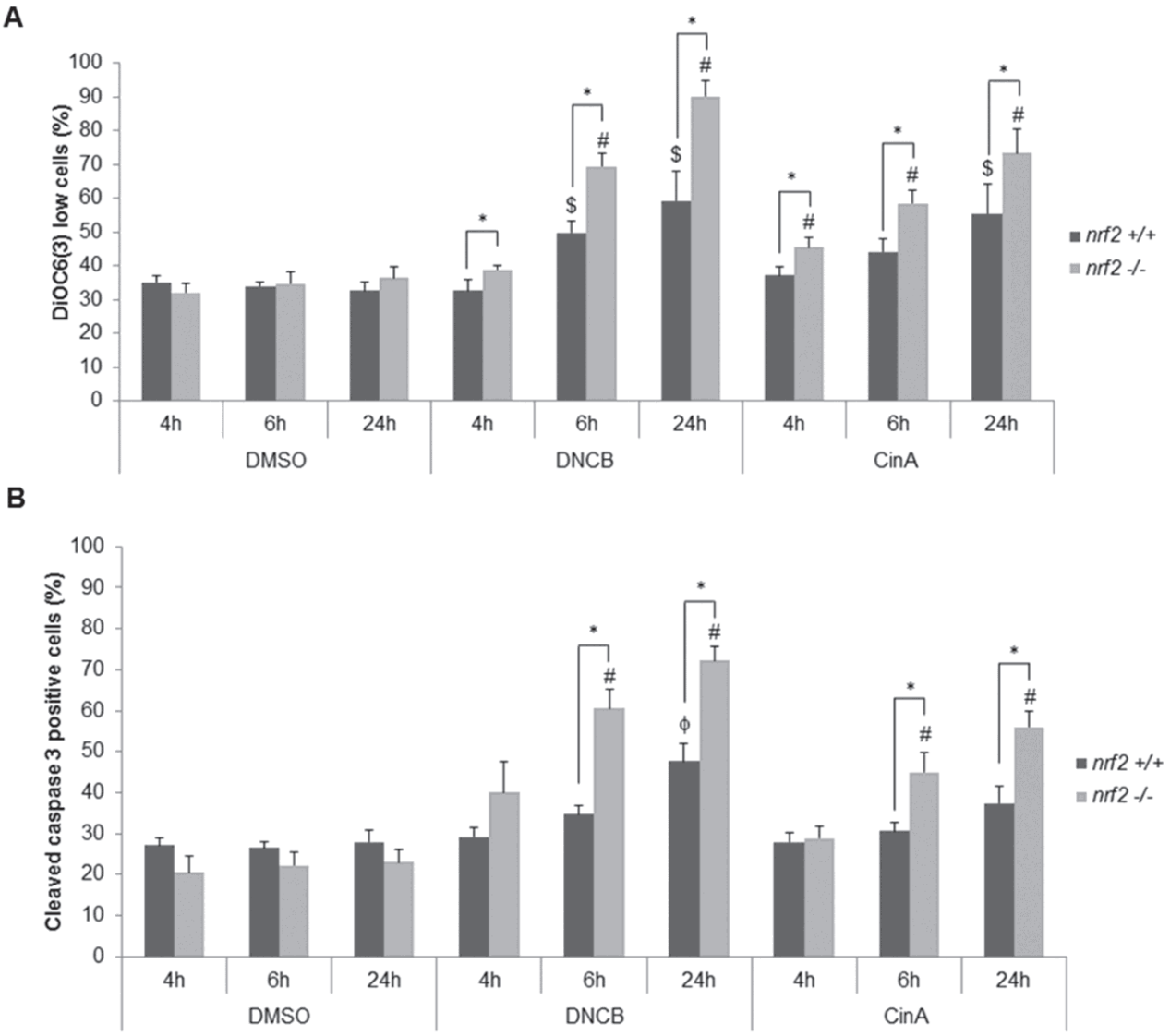

A
DiOC6(3) low cells (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
4h
6h
24h
DMSO
DNCB
CinA
nrf2 +/+
nrf2 -/-
B
Cleaved caspase 3 positive cells (%)

Figure 3

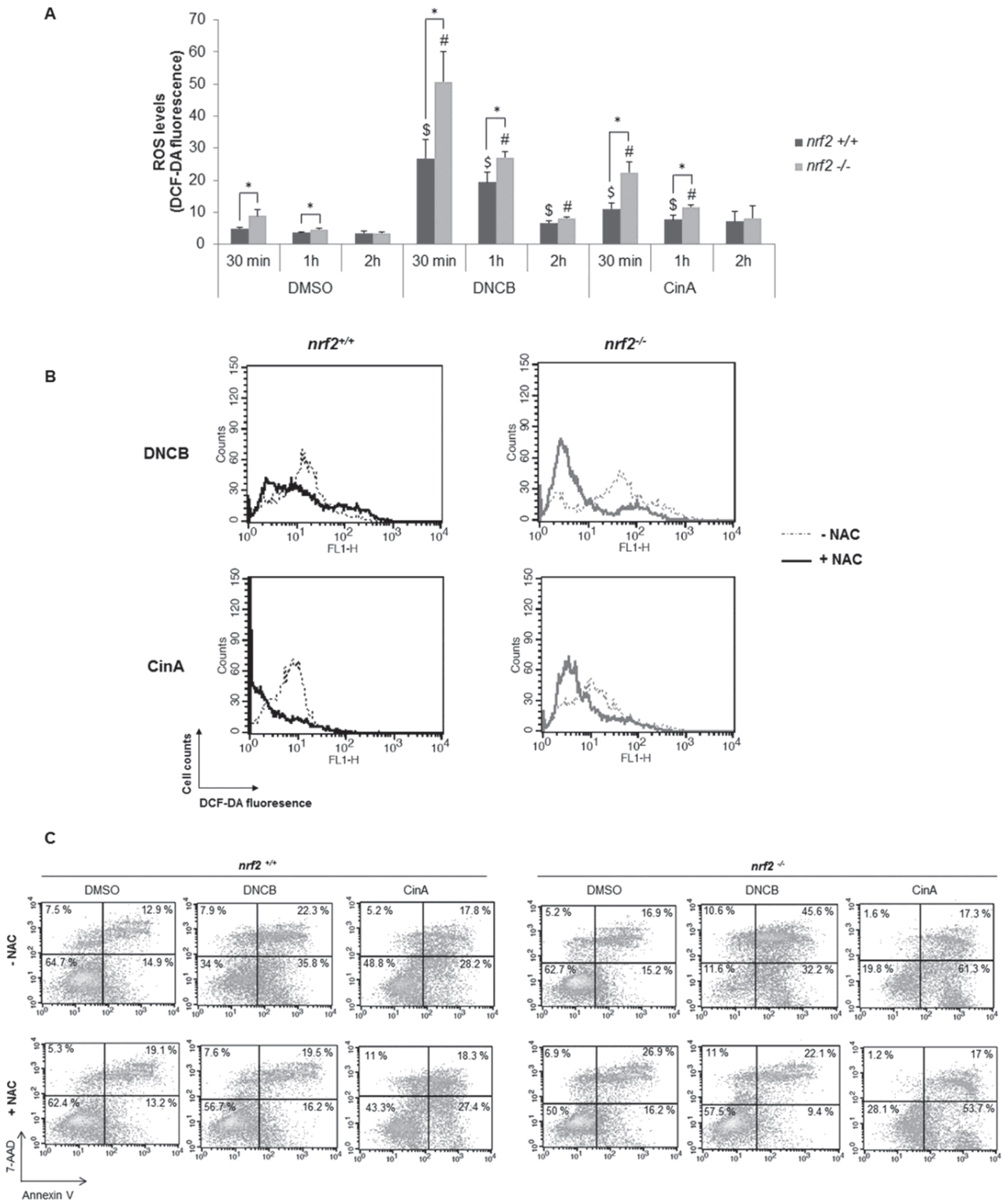

A
ROS levels (DCF-DA fluorescence)
nrf2 +/+
nrf2 -/-
30 min
1h
2h
DMSO
DNCB
CinA
B
nrf2+/+
nrf2-/-
DNCB
CinA
Counts
FL1-H
- NAC
+ NAC
Cell counts
DCF-DA fluoresence
C
nrf2 +/+
nrf2 -/-
DMSO
DNCB
CinA
- NAC
+ NAC
7-AAD
Annexin V

Figure 4:

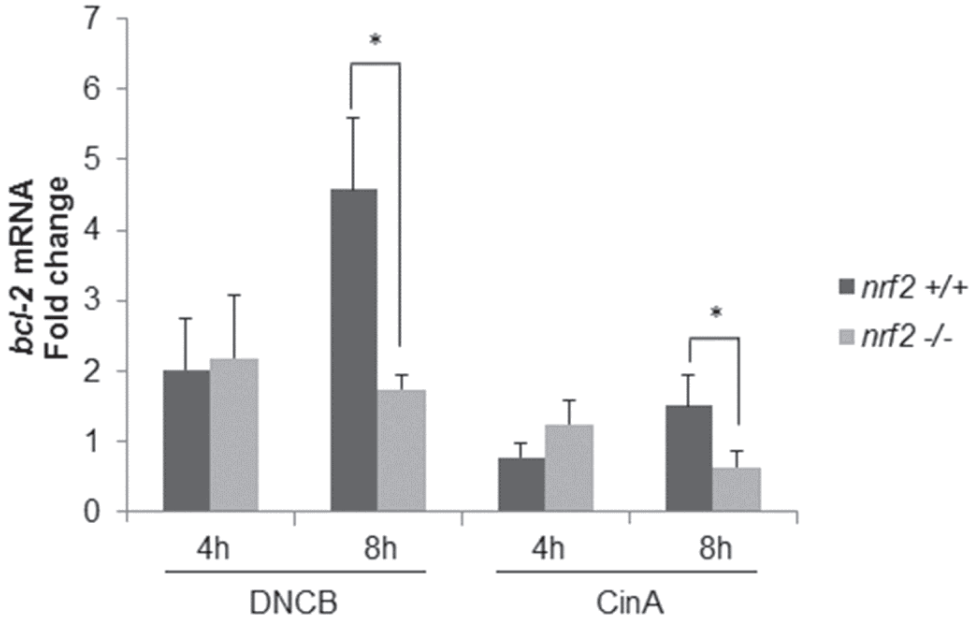
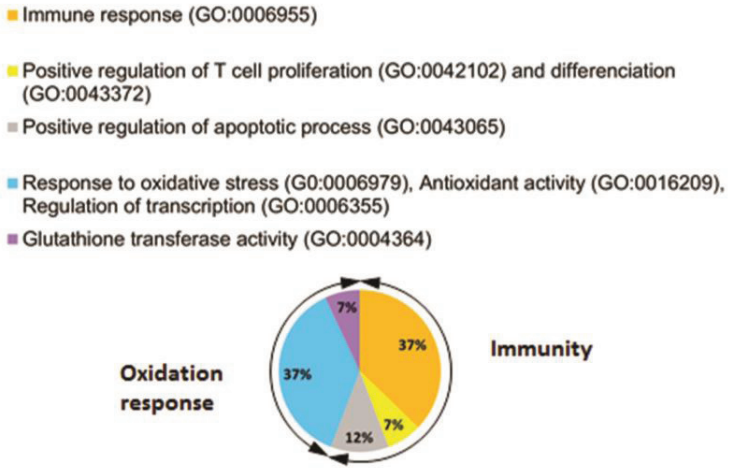

bcl-2 mRNA
Fold change
7
6
5
4
3
2
1
0
*
*
4h
8h
4h
8h
DNCB
CinA
nrf2 +/+
nrf2 -/-

Figure 5

A



B

GO terms	Gene	DNCB nrf2 +/+ 4h	DNCB nrf2 +/+ 8h	DNCB nrf2 +/+ 24h	DNCB nrf2 -/- 4h	DNCB nrf2 -/- 8h	DNCB nrf2 -/- 24h	CinA nrf2 +/+ 4h	CinA nrf2 +/+ 8h	CinA nrf2 +/+ 24h	CinA nrf2 -/- 4h	CinA nrf2 -/- 8h	CinA nrf2 -/- 24h
GO:0006955	*B2m*	0.46	0.80	1.42	0.64	0.67	1.03	0.68	1.17	0.96	1.07	1.35	1.42
	Cd20	0.12	2.22	0.20	n/a	0.05	0.43	2.06	3.00	0.58	2.70	1.43	3.99
	Cd22	0.49	0.73	3.65	0.63	1.44	5.13	0.52	1.02	0.75	0.86	1.25	1.94
	Cd3	0.58	2.28	0.49	0.62	1.23	1.94	0.63	1.50	0.45	0.75	0.89	1.88
	Cd4	0.78	1.42	0.85	1.34	1.32	2.24	0.84	1.36	0.75	1.30	0.65	2.06
	Cd5	0.64	0.78	0.97	0.49	0.40	0.35	0.76	1.22	0.88	0.74	0.47	0.77
	Ccr7	0.85	0.88	2.11	0.88	1.25	2.51	0.79	1.04	1.15	0.86	1.33	1.61
	Cxcl1	1.01	2.66	3.52	0.43	0.96	11.16	1.82	4.23	0.39	0.96	1.40	7.11
	Cxcl10	0.44	3.20	0.52	0.98	0.38	1.67	1.22	1.35	0.99	1.01	0.47	3.51
	Cxcr4	0.70	0.37	0.81	1.08	0.73	0.35	0.74	0.47	0.78	1.15	0.78	1.12
	Ifng	1.11	1.11	0.09	0.24	0.39	1.22	1.56	0.76	0.23	0.71	0.75	2.20
	Il10	0.90	2.28	0.49	0.62	0.30	1.20	0.68	1.86	0.45	1.04	1.40	3.00
	Il12a	0.01	0.30	0.11	0.75	0.44	1.80	0.05	1.65	0.37	3.35	1.84	3.76
	Il12b	0.92	0.80	1.32	0.63	0.87	0.88	0.59	0.95	0.60	0.55	0.81	1.00
	Il1a	0.75	1.84	0.70	1.97	0.98	1.49	1.28	3.62	0.87	1.19	1.08	4.15
	Il1b	4.85	0.59	2.97	4.99	3.84	9.69	3.94	0.94	1.63	3.49	2.80	3.84
GO:0042102	*Cd80*	1.11	1.63	4.29	1.18	2.17	6.74	1.00	2.14	1.98	1.70	3.11	6.66
GO:0043372	*Cd83*	0.49	0.41	0.96	0.60	0.58	0.88	0.41	0.58	0.99	0.87	0.64	1.44
	Cd86	1.10	0.71	2.36	0.85	1.08	2.79	1.05	0.89	0.75	0.99	0.90	1.53
GO:0043065	*Casp1*	0.77	1.45	1.10	0.53	0.55	0.48	0.94	1.23	1.31	0.88	1.39	1.33
	Casp3	0.92	1.02	0.73	0.89	0.77	0.68	0.99	1.31	0.86	0.71	1.20	1.27
	Casp9	1.14	0.74	0.65	0.59	0.97	0.83	1.08	0.60	0.68	0.65	1.02	0.85
	Gsk3b	1.61	1.01	0.93	0.89	1.23	0.90	1.11	0.83	0.55	1.15	0.75	0.92
	Hmgb1	0.68	0.99	0.41	0.52	0.23	0.76	0.84	0.92	0.50	0.91	0.30	1.54
GO:0006979	*Cat*	1.29	2.20	1.18	0.54	0.74	0.49	2.06	2.70	1.00	0.91	1.48	1.08
GO:0016209	*Gpx1*	0.55	1.02	1.69	1.09	1.07	1.26	0.65	1.39	0.96	1.00	0.77	1.25
GO:0006355	*Gpx2*	1.94	1.59	0.15	0.45	0.42	1.63	1.72	0.60	0.29	0.79	1.95	2.14
	Gpx5	1.28	1.34	0.12	1.01	0.19	2.79	1.09	1.35	0.46	2.77	4.73	3.51
	Gpx6	0.30	1.58	7.10	0.18	0.12	1.50	1.37	1.61	0.35	16.05	0.87	1.79
	Gpx7	0.51	0.86	0.55	0.32	0.26	0.81	0.84	0.63	0.36	1.01	0.54	1.38
	Gsr	1.77	1.67	1.39	0.52	0.58	0.92	1.88	2.10	1.07	0.83	0.86	1.57
	Hmox1	9.84	7.99	1.01	3.67	3.69	2.28	22.66	6.99	1.05	10.29	6.21	1.70
	Keap1	1.08	1.23	0.66	0.54	0.69	1.16	1.11	1.66	0.68	0.81	2.79	1.31
	Nfkb1	0.95	0.53	1.37	0.98	1.16	1.38	0.83	0.75	0.93	1.21	1.07	1.28
	Nos2	0.84	2.32	0.22	0.42	0.29	2.17	0.67	1.51	14.62	0.41	0.84	3.45
	Nqo1	2.59	4.34	1.62	0.68	0.36	1.35	3.10	7.92	1.01	1.24	0.75	2.25
	Nrf1	0.51	0.85	0.61	0.61	0.90	1.37	0.64	1.09	0.66	0.82	0.95	1.43
	Sod1	0.73	0.83	0.77	0.35	0.40	0.75	0.88	1.09	0.82	0.46	0.47	0.96
	Sod2	0.83	0.88	0.51	0.85	0.43	0.99	1.00	1.08	0.45	1.27	0.79	1.98
	Txnrd2	0.84	0.98	0.77	0.62	0.63	1.07	0.62	1.10	0.48	0.93	0.70	1.08
GO:0004364	*Gsta4*	1.17	1.77	0.32	0.19	0.35	1.58	1.66	4.11	n/a	1.53	2.40	2.16
	Gstm1	0.71	1.44	4.47	0.66	0.70	3.16	1.09	2.70	2.41	0.73	0.57	2.17
	Gstt1	0.76	0.65	0.46	0.31	0.69	2.77	0.56	1.67	0.40	1.00	1.27	2.52

Figure 6

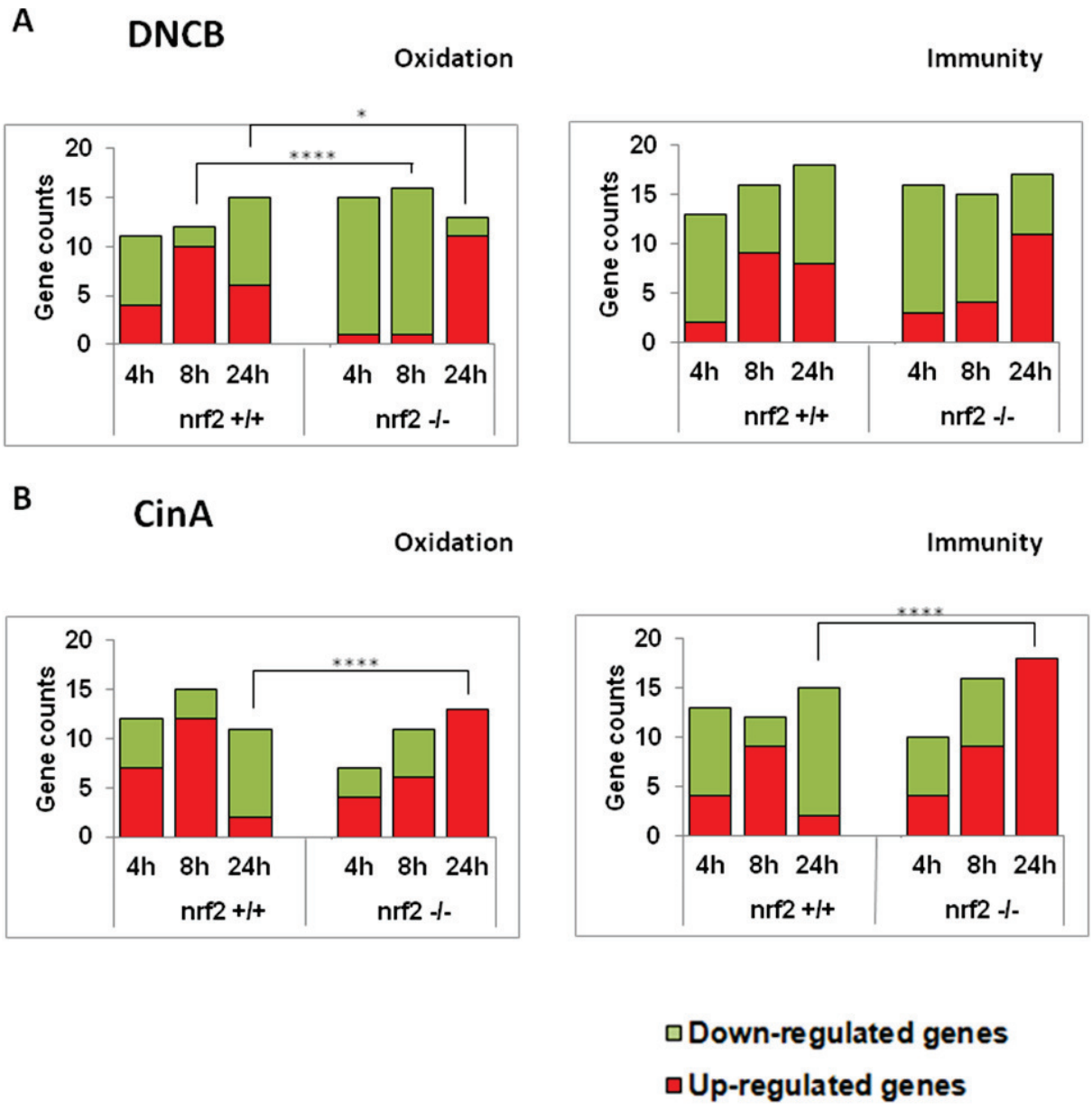
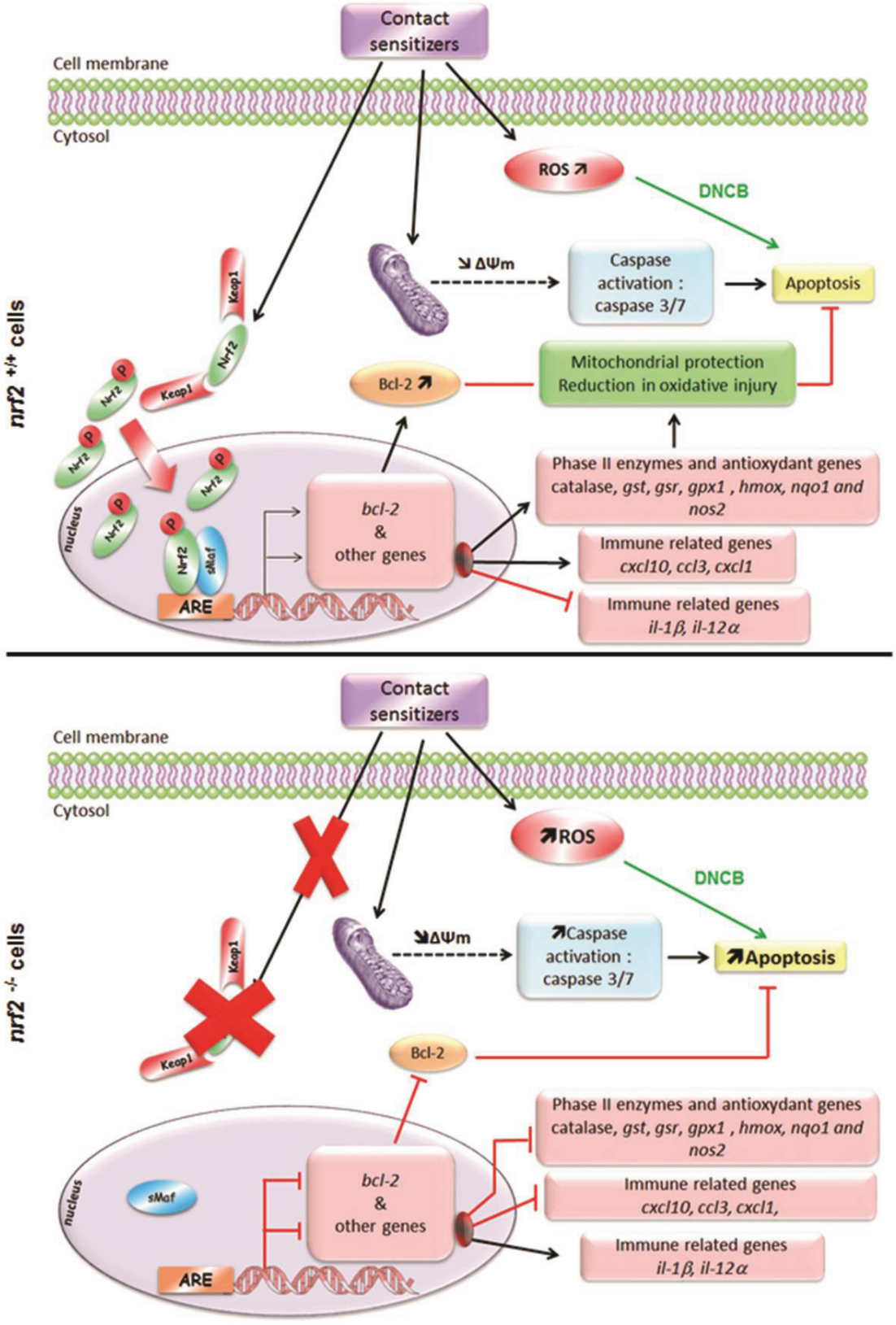
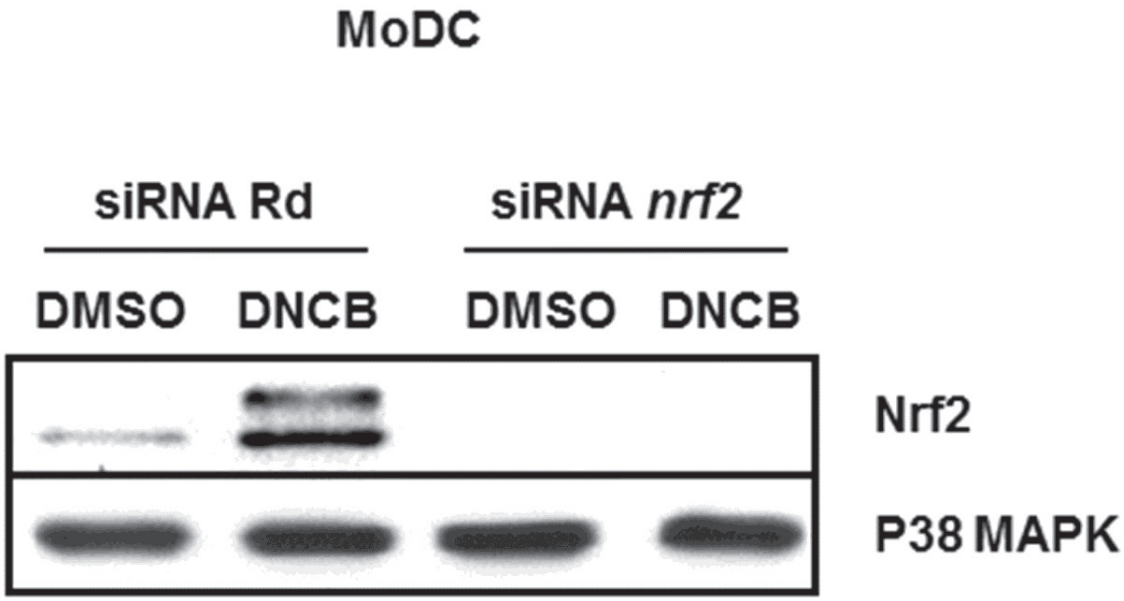

A
DNCB
Oxidation
Immunity
Gene counts
20
15
10
5
0
4h 8h 24h 4h 8h 24h
nrf2 +/+
nrf2 -/-
*
****
B
CinA
Oxidation
Immunity
Down-regulated genes
Up-regulated genes

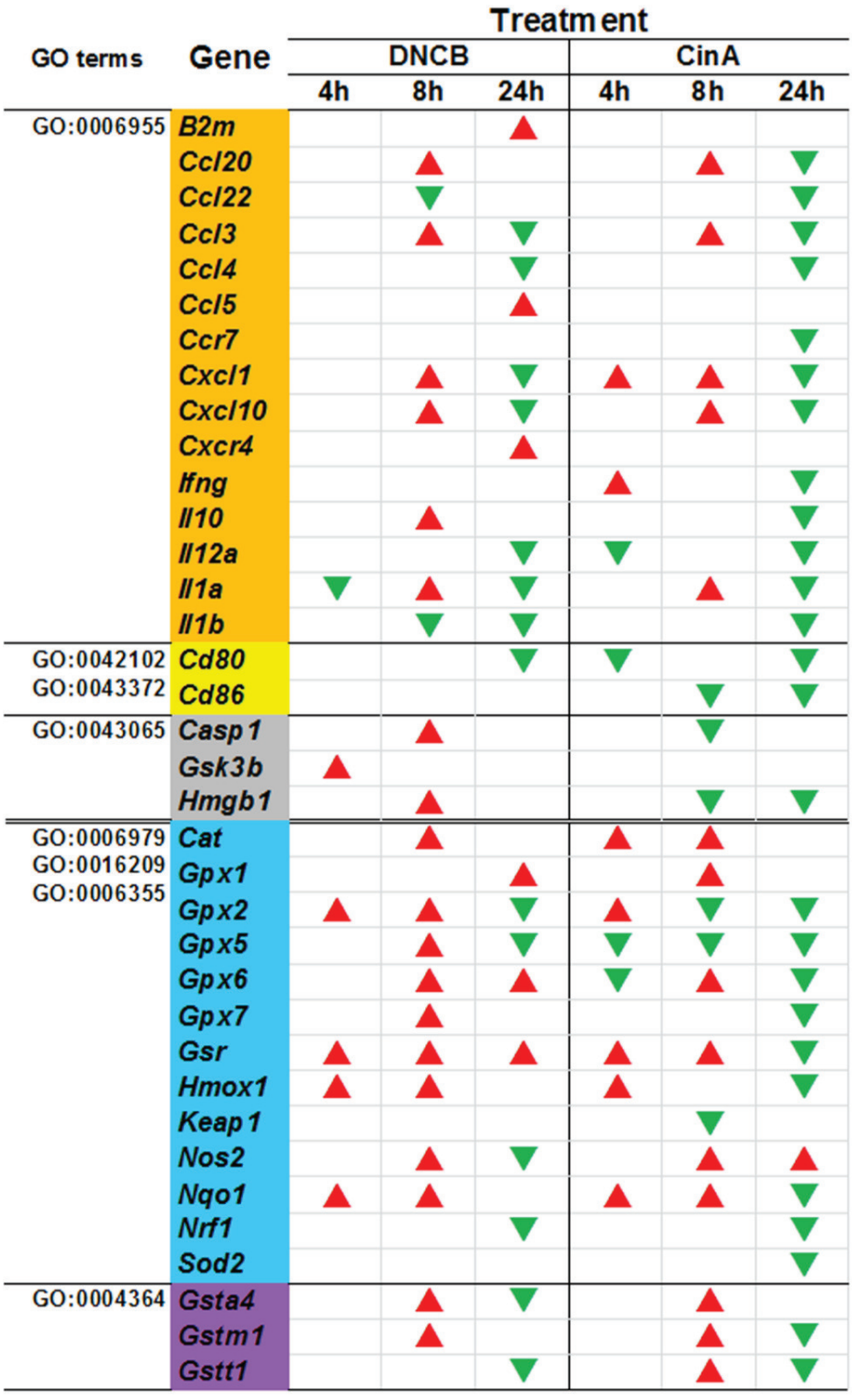
Figure 7


Contact sensitizers
Cell membrane
Cytosol
ROS ↗
DNCB
↘ ΔΨm
Caspase activation : caspase 3/7
Apoptosis
nrf2 +/+ cells
Keap1
Nrf2
P
Bcl-2 ↗
Mitochondrial protection
Reduction in oxidative injury
Phase II enzymes and antioxydant genes
catalase, gst, gsr, gpx1 , hmox, nqo1 and nos2
nucleus
bcl-2 & other genes
Immune related genes
cxcl10, ccl3, cxcl1
Immune related genes
il-1β, il-12α
sMaf
ARE
Contact sensitizers
Cell membrane
Cytosol
↗ROS
DNCB
↘ΔΨm
↗Caspase activation : caspase 3/7
↗Apoptosis
nrf2 -/- cells
Keap1
Bcl-2
Phase II enzymes and antioxydant genes
catalase, gst, gsr, gpx1 , hmox, nqo1 and nos2
nucleus
sMaf
bcl-2 & other genes
Immune related genes
cxcl10, ccl3, cxcl1,
Immune related genes
il-1β, il-12α
ARE

Supplementary data 1



Supplemental data 2



FIGURES LEGENDS:

Figure 1: *Nrf2 controls DC survival in response to contact sensitizers.*

(**A**) Nrf2 controls DC survival in response to contact sensitizers in BMDC. Bone marrow dendritic cells (BMDC) derived from *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ mice were treated with DNCB (10 μM) or CinA (100 μM) for 24 h. These results were analyzed by flow cytometry. Apoptotic ($AnV^+/7\text{-}AAD^-$) and necrotic ($AnV^-/7\text{-}AAD^+$) cells were measured by Annexin V (AnV) and 7-Amino-actinomycin D (7-AAD) staining respectively. The $AnV^+/7\text{-}AAD^+$ cells represent late apoptotic cells. **(B)** Nrf2 protein accumulation in MoDC in response to contact sensitizers. DC derived from human monocytes and purified from peripheral blood (MoDC) were cultured with GM-CSF (550 U/ml) and IL-4 (550 U/ml) for 5 days. Cells were then washed and treated with DNCB (10 μM) or CinA (100 μM) for the indicated times. Nrf2 protein expression was measured by Western blot. P38 MAPK was used as a loading control. Data represent one representative experiment out of three. **(C)** Nrf2 controls DC survival in response to contact sensitizers in MoDC. MoDC were transfected with *nrf2* siRNA or not (random siRNA) and were then treated with DNCB (10 μM) or CinA (100 μM) for 18 h. These data represent the mean of three independent experiments ± SEM. #: treated cells compared to DMSO in siRNA *nrf2* or *nrf2* $^{-/-}$, # * $P \leq 0.05$, Mann Whitney U-test.

Figure 2: *Nrf2 deficiency triggers BMDC apoptosis through the intrinsic pathway.*

(A & B) BMDC from *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ mice were treated with DNCB (10 μM) or CinA (100 μM) for 4 h, 6 h and 24 h. These results were analyzed by flow cytometry. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi m$) and caspase-3/7 activity were measured using DiOC6(3) and NucView™ respectively. For caspase-3/7 activity, results were expressed as the percentage of positive cells while for $\Delta\Psi m$ loss, results were expressed as the percentage of DiOC6(3)

low cells. These data represent the mean ± SEM of 3 independent experiments. #: treated cells compared to DMSO in *nrf2*$^{-/-}$ cells, ϕ $: treated cells compared to DMSO in *nrf2*$^{+/+}$ cells, *# $P < 0.05, ϕ P < 0.1, Mann Whitney U-test

Figure 3: *The ROS production increase is involved in BMDC apoptosis in the absence of Nrf2 in response to both contact sensitizers.*

(A) BMDC from *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ mice were treated with DNCB (10 µM) or CinA (100 µM) for 30 min, 1 h and 2 h. These results were analyzed by flow cytometry. ROS production was measured using H2DCF-DA probe. Results were expressed using mean fluorescent intensity (MFI). These data represent the mean ± SEM of 3 independent experiments.

(B) BMDC from *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ mice were pre-treated with NAC for 2 h, washed and then treated with DNCB (10 µM) or CinA (100 µM) for 1 h. These results were analyzed by flow cytometry. ROS production was measured using H2DCF-DA probe. Data represent one representative experiment out of 3.

(C) BMDC from *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ mice were pre-treated with NAC for 2 h, washed and then treated with DNCB (10 µM) or CinA (100 µM) for 24 h. These results were analyzed by flow cytometry. Apoptotic ($AnV^+/7\text{-}AAD^-$) and necrotic ($AnV^-/7\text{-}AAD^+$) cells were measured by Annexin V (AnV) and 7-Amino-actinomycin D (7-AAD) staining respectively. The $AnV^+/7\text{-}AAD^+$ cells represent late apoptotic cells. These data represent one experiment out of three. #: treated compared to DMSO in *nrf2*$^{-/-}$, $: treated cells compared to DMSO in *nrf2*$^{+/+}$, * # $P < 0.05, Mann Whitney U-test.

Figure 4: Nrf2 positively regulates *bcl-2* gene expression in response to contact sensitizers. BMDC from *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ mice were treated with DNCB (10 µM) or CinA (100 µM) for 4 h and 8 h. *bcl-2* gene expression was measured by RT-qPCR using Bio-Rad CFX. Results are

expressed as Fold change. These data represent the mean ± SEM of 3 independent experiments. * P < 0.05, Mann Whitney U-test.

Figure 5: *Functional annotation of screened genes expression in qPCR array*

The analyzed genes by RT-qPCR array were involved for 44% (19 genes) in antioxidant related processes, and for 56% (24 genes) in immunity-related processes, according to the associated GO terms.

Figure 6: *Clustering of data expression from 19 antioxidant–related genes and 23 immunity-related genes in DC.* (**A)** BMDC from *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ mice were treated with DNCB (10 µM) or CinA (100 µM) for 4 h, 8 h and 24 h. Gene expression from 43 target genes was measured in RT-qPCR arrays. Results are expressed as mRNA fold change in compound-treated *vs* DMSO-treated cells, either up- (red), down- (green) or not (black) regulated. Fold-changes values in the range 0.76-1.32 fell within the technical variability of the screening assay, and thus were considered stable expression. These data were obtained from the pool of three independent experiments. The genes which were significantly up- or down-regulated in *nrf2*$^{+/+}$ and/or *nrf2*$^{-/-}$ dendritic cells treated with DNCB **(B)** or CinA **(A)** compared to DMSO cells, were counted in each functional class considered.

Figure 7: *Proposed mechanism of apoptosis controlled by Nrf2 in response to contact sensitizers in nrf2*$^{+/+}$ *and nrf2*$^{-/-}$ *DC*. In *nrf2*$^{+/+}$ DC, contact sensitizers like DNCB or CinA induce Nrf2 activation leading to *bcl-2*, phase II enzymes, antioxidant genes (*catalase, gsr, gst, gpx1, hmox, nqo1, and nos2)* and some immune related genes' expression (*cxcl10, ccl3, cxcl1*). In contrast, other immune related genes seems to be down-regulated (*il-1β, il-12α*). Alternatively, these compounds induce a ROS production, a loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$m) and a slight activation of caspase-3/7 leading to apoptosis. In *nrf2*$^{-/-}$ DC, Nrf2

deficiency leads to the abolition of *bcl-2*, detoxification genes (*catalase, gsr, gst, gpx1, hmox, nqo1, and nos2*) and some immune related genes (*cxcl10, ccl3, cxcl1*). Other immune related genes seem to be up-regulated (*il-1β, il-12α*). Furthermore, a massive ROS production, a rapid loss of $\Delta\Psi m$ and an activation of caspase-3/7 lead to apoptosis in response to both chemicals. Apoptosis induced by DNCB in the absence of Nrf2, seems to be regulated by ROS (⟶).

⟶ : induction

⊣ : inhibition

Supplementary data 1: *Verification of siRNA nrf2 knockdown efficiency in MoDC.*

As described in material and methods, at day 5 of differentiation, MoDC were washed then transfected with either silencing control siRNA (siRNA Rd, 20 µM) or siRNA *nrf2* (20 µM). Cells were then resuspended in complete medium with GM-CSF (550 U/ml) and IL-4 (550 U/ml) at a concentration of 10^6 cells/ml for 18 h. After 18 h of transfection, MoDC siRNA Rd or siRNA *nrf2* were treated with DNCB for 4 h. The siRNA *nrf2* knockdown efficiency was checked by measuring Nrf2 protein expression by Western blot. P38 MAPK was used as a loading control. Data represent one representative experiment out of three.

Supplementary data 2: *Identification of transcriptional target genes of Nrf2*

BMDC from *nrf2*$^{+/+}$ and *nrf2*$^{-/-}$ 43 target genes was measured in RT-qPCR array.

Here are presented the genes for which an up-regulated expression pattern is observed in *nrf2*$^{+/+}$ cells and lowered or reversed in *nrf2*$^{-/-}$ cells, at each time of treatment with DNCB or CinA, i.e. the target genes transcriptionally activated by Nrf2 (▲), and those for which an up-regulated expression pattern is observed in *nrf2*$^{-/-}$ cells and lowered or reversed in *nrf2*$^{+/+}$ cells, i.e. the target genes transcriptionally repressed by Nrf2 (▼).

REFERENCES

1. **Ade N, Antonios D, Kerdine-Romer S, Boisleve F, Rousset F, and Pallardy M**. NF-kappaB plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO(4) but not by DNCB. *Toxicol Sci* 99: 488-501, 2007.
2. **Ade N, Leon F, Pallardy M, Peiffer JL, Kerdine-Romer S, Tissier MH, Bonnet PA, Fabre I, and Ourlin JC**. 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, 2009.
3. **Aleksunes LM, Goedken MJ, Rockwell CE, Thomale J, Manautou JE, and Klaassen CD**. Transcriptional Regulation of Renal Cytoprotective Genes by Nrf2 and Its Potential Use as a Therapeutic Target to Mitigate Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 335: 2-12, 2010.
4. **Antonios D, Rousseau P, Larange A, Kerdine-Romer S, and Pallardy M**. Mechanisms of IL-12 synthesis by human dendritic cells treated with the chemical sensitizer NiSO4. *J Immunol* 185: 89-98, 2010.
5. **Aw Yeang HX, Hamdam JM, Al-Huseini LM, Sethu S, Djouhri L, Walsh J, Kitteringham N, Park BK, Goldring CE, and Sathish JG**. Loss of transcription factor nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) leads to dysregulation of immune functions, redox homeostasis, and intracellular signaling in dendritic cells. *J Biol Chem* 287: 10556-10564, 2012.
6. **Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, and Palucka K**. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767-811, 2000.
7. **Banchereau J, and Steinman RM**. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252, 1998.
8. **Banerjee P, Basu A, Wegiel B, Otterbein LE, Mizumura K, Gasser M, Waaga-Gasser AM, Choi AM, and Pal S**. Heme oxygenase-1 promotes survival of renal cancer cells through modulation of apoptosis- and autophagy-regulating molecules. *J Biol Chem* 287: 32113-32123, 2012.
9. **Boisleve F, Kerdine-Romer S, Rougier-Larzat N, and Pallardy M**. Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF-alpha and MAPK. *J Invest Dermatol* 123: 494-502, 2004.
10. **Byamba D, Kim TG, Kim DH, Je JH, and Lee MG**. The Roles of Reactive Oxygen Species Produced by Contact Allergens and Irritants in Monocyte-derived Dendritic Cells. *Ann Dermatol* 22: 269-278, 2010.
11. **Cao TT, Ma L, Kandpal G, Warren L, Hess JF, and Seabrook GR**. Increased nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2 activity protects SH-SY5Y cells against oxidative damage. *J Neurochem* 95: 406-417, 2005.
12. **Chen J, and Shaikh ZA**. Activation of Nrf2 by cadmium and its role in protection against cadmium-induced apoptosis in rat kidney cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 241: 81-89, 2009.
13. **Choi YH, and Park HS**. Apoptosis induction of U937 human leukemia cells by diallyl trisulfide induces through generation of reactive oxygen species. *J Biomed Sci* 19: 50, 2012.
14. **Christensen AD, and Haase C**. Immunological mechanisms of contact hypersensitivity in mice. *APMIS* 120: 1-27, 2012.
15. **Cruz MT, Duarte CB, Goncalo M, Figueiredo A, Carvalho AP, and Lopes MC**. The sensitizer 2,4-dinitrofluorobenzene activates caspase-3 and induces cell death in a skin dendritic cell line. *International journal of toxicology* 22: 43-48, 2003.
16. **El Ali Z, Gerbeix C, Hemon P, Esser PR, Martin SF, Pallardy M, and Kerdine-Romer S**. Allergic skin inflammation induced by chemical sensitizers is controlled by the transcription factor Nrf2. *Toxicol Sci* 134: 39-48, 2013.
17. **Esser PR, Wolfle U, Durr C, von Loewenich FD, Schempp CM, Freudenberg MA, Jakob T, and Martin SF**. Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation. *PLoS One* 7: e41340, 2012.
18. **Hou WS, and Van Parijs L**. A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat Immunol* 5: 583-589, 2004.
19. **Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, and Nabeshima Y**. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and biophysical research communications* 236: 313-322, 1997.

20. **Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, and Nabeshima Y**. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 313-322, 1997.
21. **Itoh K, Mimura J, and Yamamoto M**. Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. *Antioxid Redox Signal* 13: 1665-1678, 2010.
22. **Jung KA, and Kwak MK**. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules* 15: 7266-7291, 2010.
23. **Kang KW, Lee SJ, and Kim SG**. Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 7: 1664-1673, 2005.
24. **Kannan K, and Jain SK**. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP* 7: 153-163, 2000.
25. **Kaspar JW, Niture SK, and Jaiswal AK**. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 47: 1304-1309, 2009.
26. **Kawamoto S, Flynn JP, Shi Q, Sakr SW, Luo J, and Allen MD**. Heme oxygenase-1 induction enhances cell survival and restores contractility to unvascularized three-dimensional adult cardiomyocyte grafts implanted in vivo. *Tissue Eng Part A* 17: 1605-1614, 2011.
27. **Kim HJ, Barajas B, Wang M, and Nel AE**. Nrf2 activation by sulforaphane restores the age-related decrease of T(H)1 immunity: role of dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 121: 1255-1261 e1257, 2008.
28. **Larange A, Antonios D, Pallardy M, and Kerdine-Romer S**. Glucocorticoids inhibit dendritic cell maturation induced by Toll-like receptor 7 and Toll-like receptor 8. *J Leukoc Biol* 91: 105-117, 2012.
29. **Lee JM, and Johnson JA**. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 37: 139-143, 2004.
30. **Lee OH, Jain AK, Papusha V, and Jaiswal AK**. An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance. *J Biol Chem* 282: 36412-36420, 2007.
31. **Li J, Johnson D, Calkins M, Wright L, Svendsen C, and Johnson J**. Stabilization of Nrf2 by tBHQ confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells. *Toxicol Sci* 83: 313-328, 2005.
32. **Lo SC, Li X, Henzl MT, Beamer LJ, and Hannink M**. Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *EMBO J* 25: 3605-3617, 2006.
33. **Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, and Schuler G**. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223: 77-92, 1999.
34. **Martin SF, Esser PR, Weber FC, Jakob T, Freudenberg MA, Schmidt M, and Goebeler M**. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy* 66: 1152-1163, 2011.
35. **Migdal C, Botton J, El Ali Z, Azoury ME, Guldemann J, Gimenez-Arnau E, Lepoittevin JP, Kerdine-Romer S, and Pallardy M**. Reactivity of chemical sensitizers toward amino acids in cellulo plays a role in the activation of the Nrf2-ARE pathway in human monocyte dendritic cells and the THP-1 cell line. *Toxicol Sci* 133: 259-274, 2013.
36. **Miura T, Shinkai Y, Jiang HY, Iwamoto N, Sumi D, Taguchi K, Yamamoto M, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Cho AK, and Kumagai Y**. Initial response and cellular protection through the Keap1/Nrf2 system during the exposure of primary mouse hepatocytes to 1,2-naphthoquinone. *Chemical research in toxicology* 24: 559-567, 2011.
37. **Mizuashi M, Ohtani T, Nakagawa S, and Aiba S**. Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J Invest Dermatol* 124: 579-586, 2005.
38. **Motohashi H, Katsuoka F, Engel JD, and Yamamoto M**. Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6379-6384, 2004.
39. **Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, Yang CS, and Pickett CB**. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 278: 4536-4541, 2003.
40. **Nguyen T, Yang CS, and Pickett CB**. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic Biol Med* 37: 433-441, 2004.
41. **Niture SK, and Jaiswal AK**. INrf2 (Keap1) targets Bcl-2 degradation and controls cellular apoptosis. *Cell Death Differ* 18: 439-451, 2011.

42. **Niture SK, Kaspar JW, Shen J, and Jaiswal AK**. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol* 244: 37-42, 2010.
43. **Nopora A, and Brocker T**. Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo. *J Immunol* 169: 3006-3014, 2002.
44. **Park J, and Choi C**. Contribution of mitochondrial network dynamics to intracellular ROS signaling. *Commun Integr Biol* 5: 81-83, 2012.
45. **Park SH, Kim JH, Chi GY, Kim GY, Chang YC, Moon SK, Nam SW, Kim WJ, Yoo YH, and Choi YH**. Induction of apoptosis and autophagy by sodium selenite in A549 human lung carcinoma cells through generation of reactive oxygen species. *Toxicol Lett* 212: 252-261, 2012.
46. **Radjendirane V, Joseph P, Lee YH, Kimura S, Klein-Szanto AJ, Gonzalez FJ, and Jaiswal AK**. Disruption of the DT diaphorase (NQO1) gene in mice leads to increased menadione toxicity. *J Biol Chem* 273: 7382-7389, 1998.
47. **Reuland DJ, Khademi S, Castle CJ, Irwin DC, McCord JM, Miller BF, and Hamilton KL**. Upregulation of phase II enzymes through phytochemical activation of Nrf2 protects cardiomyocytes against oxidant stress. *Free radical biology & medicine* 56: 102-111, 2013.
48. **Royall JA, and Ischiropoulos H**. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescin and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H2O2 in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 302: 348-355, 1993.
49. **Shen G, Hebbar V, Nair S, Xu C, Li W, Lin W, Keum YS, Han J, Gallo MA, and Kong AN**. Regulation of Nrf2 transactivation domain activity. The differential effects of mitogen-activated protein kinase cascades and synergistic stimulatory effect of Raf and CREB-binding protein. *J Biol Chem* 279: 23052-23060, 2004.
50. **Shin DH, Park HM, Jung KA, Choi HG, Kim JA, Kim DD, Kim SG, Kang KW, Ku SK, Kensler TW, and Kwak MK**. The NRF2-heme oxygenase-1 system modulates cyclosporin A-induced epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *Free Radical Biology and Medicine* 48: 1051-1063, 2010.
51. **Simon HU, Haj-Yehia A, and Levi-Schaffer F**. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 5: 415-418, 2000.
52. **Stepkowski TM, and Kruszewski MK**. Molecular cross-talk between the NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 50: 1186-1195, 2011.
53. **Toebak MJ, Gibbs S, Bruynzeel DP, Scheper RJ, and Rustemeyer T**. Dendritic cells: biology of the skin. *Contact Dermatitis* 60: 2-20, 2009.
54. **Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, and Speleman F**. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3: 2002.
55. **Vocanson M, Hennino A, Rozieres A, Poyet G, and Nicolas JF**. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy* 64: 1699-1714, 2009.
56. **Watai Y, Kobayashi A, Nagase H, Mizukami M, McEvoy J, Singer JD, Itoh K, and Yamamoto M**. Subcellular localization and cytoplasmic complex status of endogenous Keap1. *Genes Cells* 12: 1163-1178, 2007.
57. **Yang B, Fu J, Zheng H, Xue P, Yarborough K, Woods CG, Hou Y, Zhang Q, Andersen ME, and Pi J**. Deficiency in the nuclear factor E2-related factor 2 renders pancreatic beta-cells vulnerable to arsenic-induced cell damage. *Toxicol Appl Pharmacol* 264: 315-323, 2012.

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Résultats complémentaires

1. Reactivite chimique et Nrf2

De nombreuses études montent que Nrf2 est activé par des molécules électrophiles à réactivité Cys (Yamamoto *et al.*, 2008; Natsch, 2010; Li *et al.*, 2012b; Migdal *et al.*, 2013; Natsch *et al.*, 2013). Nous avons récemment montré que les molécules chimiques ayant des réactivités envers les résidus Lys ou Lys / Cys induisent l'accumulation protéique de Nrf2 dans les cellules de la lignée THP1 et dans les DC humaines (Migdal *et al.*, 2013). Parmis ces molécules chimiques, certaines induisent préférentiellement des allergies respiratoires (récativité Lys) quant aux autres des allergies cutanées (récativités Cys) ou mixtes (récativité mixte). Pour aborder le rôle de Nrf2 dans la réactivité chimique, différents haptènes ont été étudiés selon leur réactivité tels que le TNCB à réactivité Cys, deux isocyanates à réactivité Cys et Lys [l'isophorone diisocyanate (IPDI) & toluène diisocyanate (TDI)] et deux anhydrides à réactivité Lys [l'anhydride trimélitique (TMA) et l'anhydride phtalique (PA)]. Deux modèles expérimentaux ont été utilisés : le Mouse Ear Sweling Test (MEST) et le le Local Lymph Node Assay (LLNA) afin de démontrer le lien de la réactivité chimique et de Nrf2 dans le contrôle de la réponse allergique.

Le TNCB, à la concentration de 1%, induit une augmentation plus importante de l'épaisseur des oreilles chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ comparées aux souris *nrf2*$^{+/+}$ (**Figure 68**).

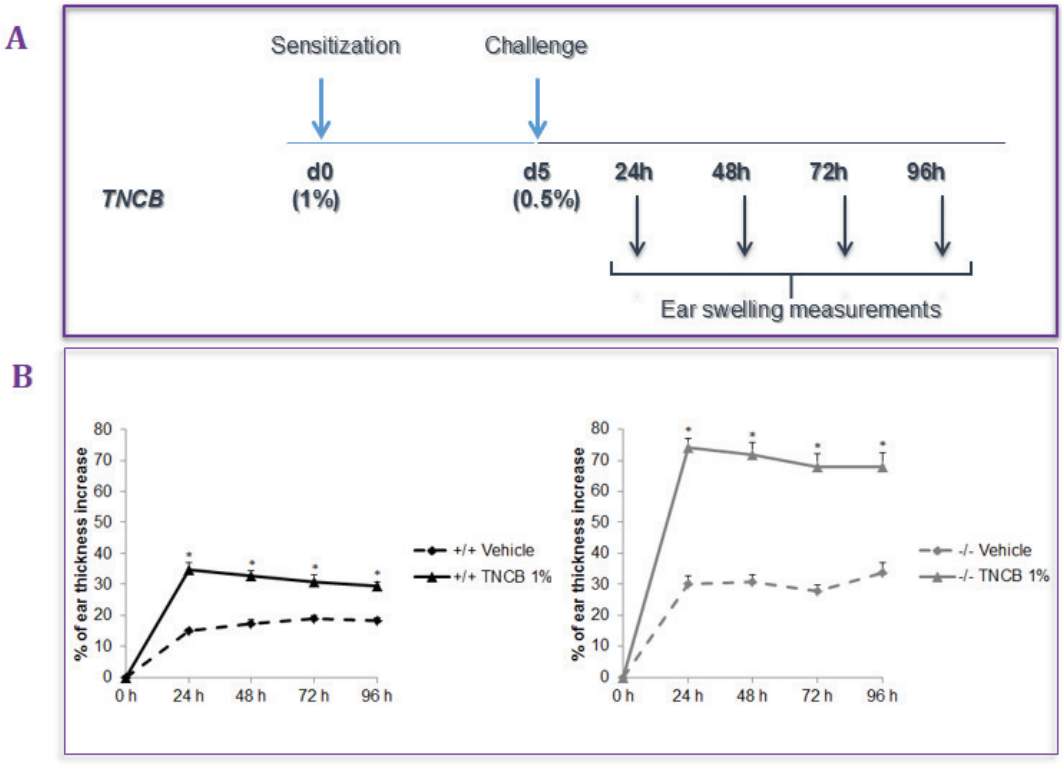
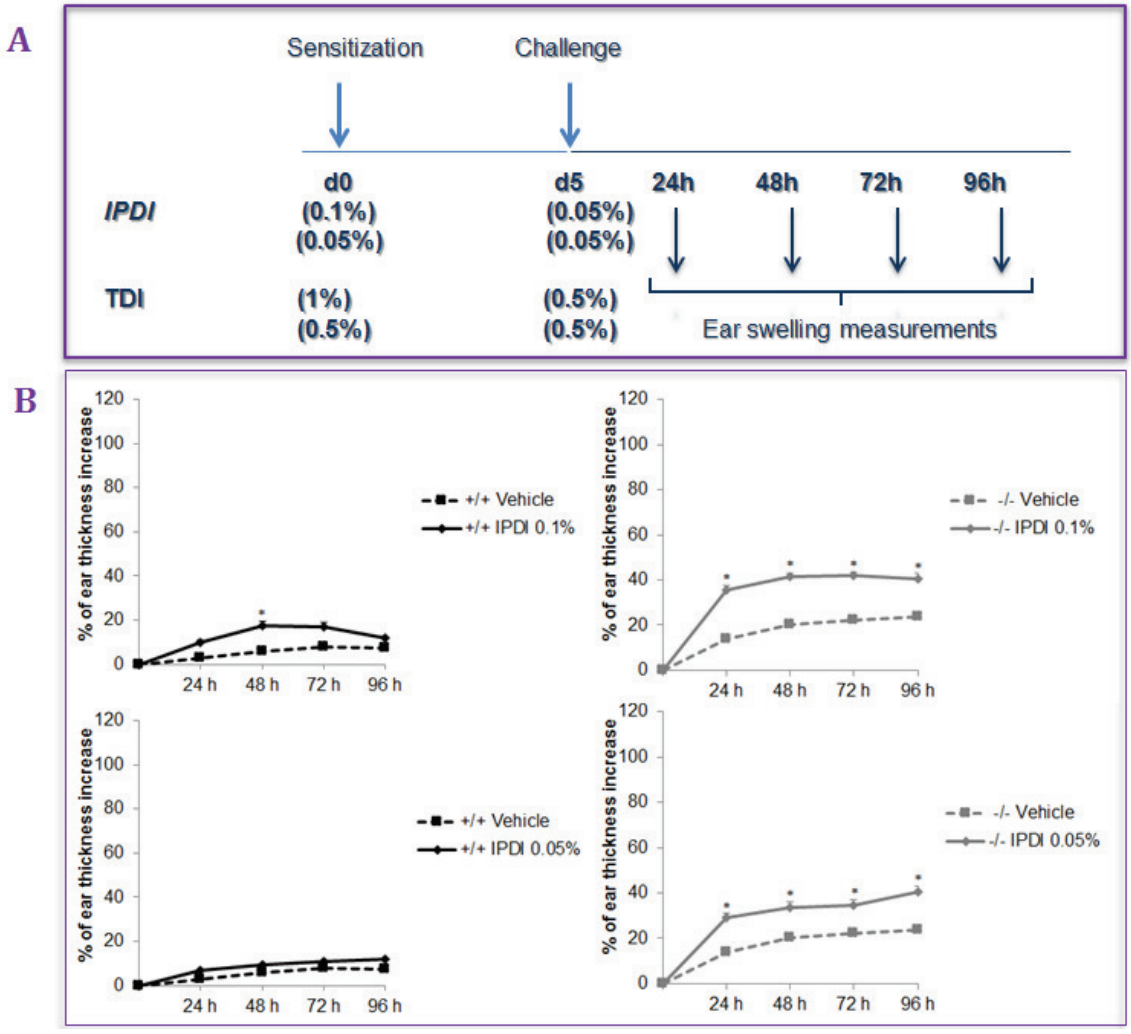


Figure 68 : Nrf2 contrôle l'inflammation cutanée induite par le TNCB. **(A)** Protocole expérimental. Les souris *nrf2*$^{+/+}$ & *nrf2*$^{-/-}$ ont été sensibilisées à j0 par une application sur l'abdomen rasé par le TNCB (1%) dissous dans l'acétone puis 5 jours plus tard les souris ont reçu une application de TNCB (0,5%) sur les deux côtés des 2 oreilles. **(B)** L'augmentation de l'épaisseur des oreilles a été mesurée 24 h, 48 h, 72 h et 96 h après le rappel. Les souris contrôles (véhicule) ont uniquement reçu une application de TNCB (0,5%) au niveau des oreilles à j5. Les résultats sont exprimés en % d'augmentation de l'épaisseur des oreilles = [(moyenne de l'épaisseur des deux oreilles (24, 48, 72 ou 96 h après le rappel) – (moyenne de l'épaisseur des oreilles mesurée avant le rappel)] / moyenne de l'épaisseur des oreilles avant le rappel) x 100]. Les résultats représentent la moyenne de l'augmentation de l'épaisseur des oreilles ± SEM (n = 9 souris), *P ≤0,05.

Les résultats du MEST, concernant la famille des isocyanates, montrent que l'IPDI et le TDI aux concentrations respectives de 0,1% et de 1% induisent une réponse inflammatoire cutanée exacerbée chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ comparées aux souris *nrf2*$^{+/+}$. En revanche, aux concentrations non irritantes de 0,05% d'IPDI et de 0,5% de TDI, l'augmentation de l'épaisseur des oreilles n'est observée que chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ (**Figure 69**). Pour la famille des anhydrides comprenant le PA et le TMA, un MEST modifié, comme celui utilisé pour le CinA, a été effectué (El Ali *et al.*, 2013). Ainsi, en réponse au PA ou au TMA à la concentration non irritante de 10%, le MEST est négatif chez les souris *nrf2*$^{+/+}$ mais positif chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ (**Figure 70**).



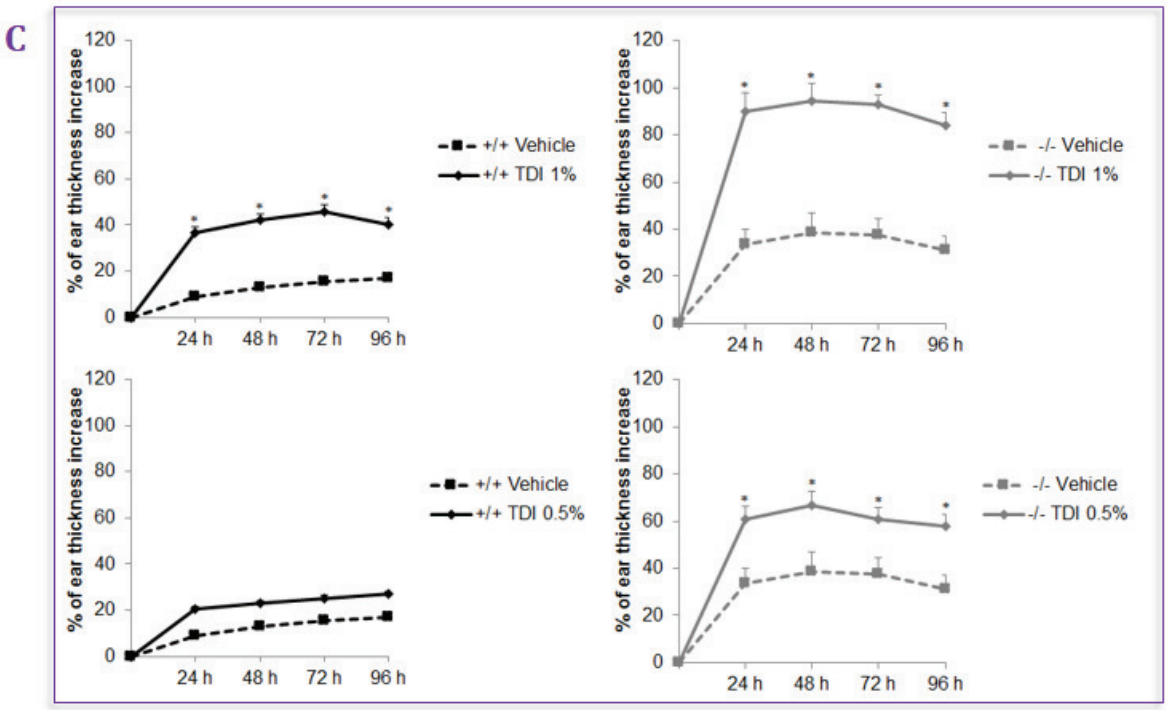
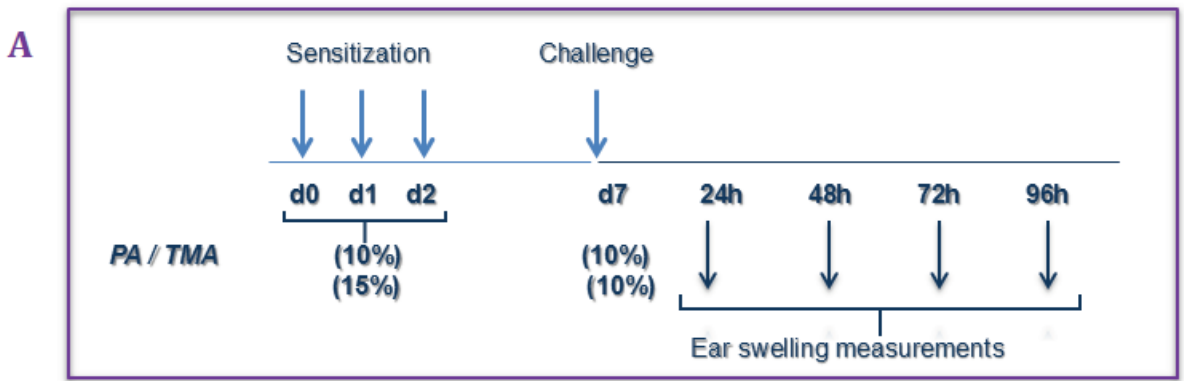


Figure 69 : Les molécules d'isocyanates augmentent l'inflammation cutanée chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ comparées aux souris *nrf2*$^{+/+}$. **(A)** Protocole expérimental. Les souris *nrf2*$^{+/+}$ & *nrf2*$^{-/-}$ ont été sensibilisées à j0 par une application cutanée, au niveau de l'abdomen, d'IPDI (0,1% ou 0,05%) ou de TDI (1% ou 0,5%) dissous dans l'acétone puis 5 jours plus tard les souris ont reçu une application d'IPDI (0,05%) ou TDI (0,5%) sur les deux côtés des 2 oreilles. **(B & C)** L'augmentation de l'épaisseur des oreilles a été mesurée 24 h, 48 h, 72 h et 96 h après le rappel. Les souris contrôle (véhicules) ont uniquement reçu une application d'IPDI (0,05%) **(B)** ou de TDI (0,5%) **(C)** au niveau des oreilles à j5. Les résultats sont exprimés en % de l'augmentation de l'épaisseur des oreilles comme décrit dans la figure 78. Les résultats représentent la moyenne de l'augmentation de l'épaisseur des oreilles ± SEM (n = 7 souris), *P ≤0,05.



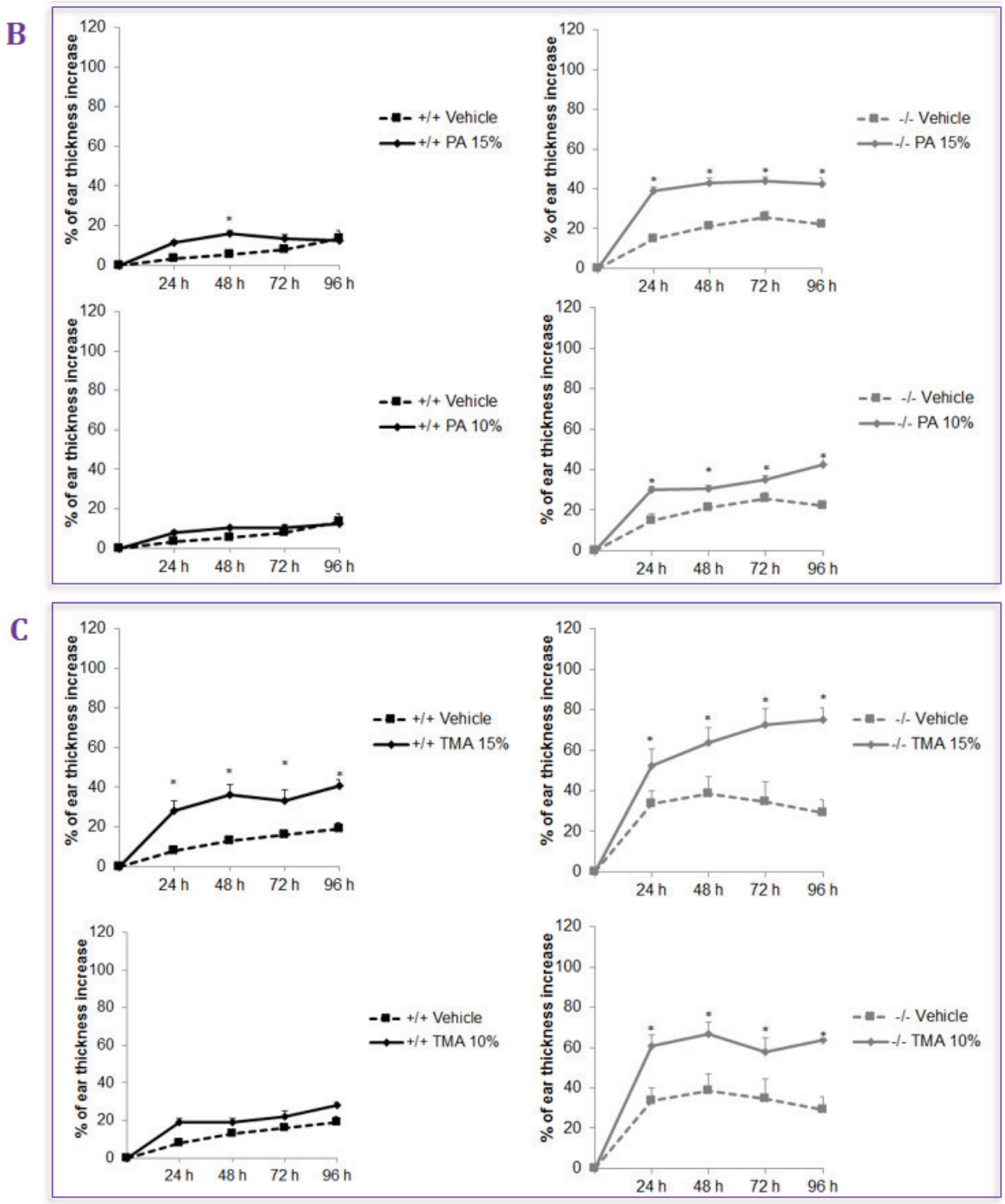


Figure 70 : Les molécules d'anhydrides induisent une inflammation cutanée chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ comparées aux souris *nrf2*$^{+/+}$. **(A)** Protocole expérimental. Les souris *nrf2*$^{+/+}$ & *nrf2*$^{-/-}$ ont été sensibilisées à j0, j1, j2 par le PA ou le TMA (15% ou 10%) dissous dans l'acétone puis 5 jours après la dernière sensibilisation, les souris ont reçu une application de PA ou TMA (10%) sur les deux côtés des 2 oreilles. **(B & C)** L'augmentation de l'épaisseur des oreilles a été mesurée 24 h, 48 h, 72 h et 96 h après le rappel. Les souris contrôles (véhicules) ont uniquement reçu une application de PA **(B)** ou TMA **(C)** (10%) au niveau des oreilles à j5. Les résultats sont exprimés en % de l'augmentation de l'épaisseur des oreilles comme décrit dans la figure 78. Les résultats représentent la moyenne de l'augmentation de l'épaisseur des oreilles ± SEM (n = 7 souris), *P ≤0,05.

Nos résultats du LLNA montrent que toutes les molécules testées (IPDI, TDI, PA et TMA) induisent une augmentation de la prolifération lymphocytaire chez les souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$. Pour une même concentration, cette prolifération lymphocytaire est plus élevée chez les souris *nrf2*$^{-/-}$comparées aux souris *nrf2*$^{+/+}$. Pour l'IPDI, le TDI, le PA et le TMA une corrélation a été établie entre la prolifération lymphocytaire, exprimée en index de stimulation (IS), et le niveau d'irritation d'une même molécule testée chez les souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$. Pour les isocyanates, l'augmentation de l'IS chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ est accompagnée d'un niveau d'irritation plus élevé par rapport aux souris *nrf2*$^{+/+}$. En revanche, ceci n'est pas vrai pour les anhydrides (**Tableau 12**).

A

Dose PA (%)	*nrf2*$^{+/+}$		*nrf2* $^{-/-}$	
	SI	Irritation level	SI	Irritation level
0.25	-	-	7.21	I
0.5	4.98	I	13.11	I
1	7	II	14.48	II
2.5	10.61	III	-	-

B

Dose TMA (%)	*nrf2*$^{+/+}$		*nrf2*$^{-/-}$	
	SI	Irritation level	SI	Irritation level
0.1	2.43	II	2.18	I
0.25	4.85	II	8.6	I
0.5	6.86	II	17.69	I

C

Dose IPDI (%)	*nrf2*$^{+/+}$		*nrf2*$^{-/-}$	
	SI	Irritation level	SI	Irritation level
0.01	0.82	I	-	-
0.025	1.67	I	9.75	II
0.05	2.81	I	11.23	II
0.1	5.05	I	23.74	II

D

Dose TDI (%)	*nrf2*$^{+/+}$		*nrf2*$^{-/-}$	
	SI	Irritation level	SI	Irritation level
0.1	6.26	I	11.72	I
0.25	9.47	I	22.52	II
0.5	9.94	I	30.02	III

Tableau 12: Tableau comparatif entre l'index de stimulation (IS) et le niveau d'irritation des différentes molécules chimiques. **(A)** anhydride phtalique, **(B)** anhydride triméllitique, **(C)** Isophorone diisocyanate (IPDI), **(D)** toluène diisocyante (TDI). Le LLNA a été effectué comme décrit dans la section Matériels et Méthodes de l'article 1. Les résultats sont exprimés en IS, IS = dpm traitées / dpm contrôle, n=4 souris pour PA & TDI ou n=8 pour TMA ou IPDI correspondant à deux expériences indépendantes.

Parmi les molécules chimiques connues pour induire des HSC, le nickel est un des métaux plus allergisants. Il a été démontré que le nickel n'induit une HSC que s'il est associé à un irritant ou s'il est oxydé (Artik *et al.*, 1999). Récemment, il a été démontré que ce métal active le TLR4 humain et n'induit aucune réaction d'HSC chez la souris si le TLR4 n'a pas été humanisé chez la souris. Le nickel se lie à trois résidus histidines présents au niveau du TLR4 humain et absents au niveau du TLR4 murin justifiant l'incapacité du nickel à induire une HSC chez la souris (Schmidt *et al.*, 2010). Comme l'irritation et la production d'ERO sont plus importantes chez les souris *nrf2*$^{-/-}$, le rôle de Nrf2 en tant que senseur de signal de danger a été adressé. Les MEST effectués chez les souris *nrf2*$^{+/+}$ & *nrf2*$^{-/-}$ montrent que seules les souris *nrf2*$^{-/-}$ recevant le nickel développent une HSC (**Figure 71**).

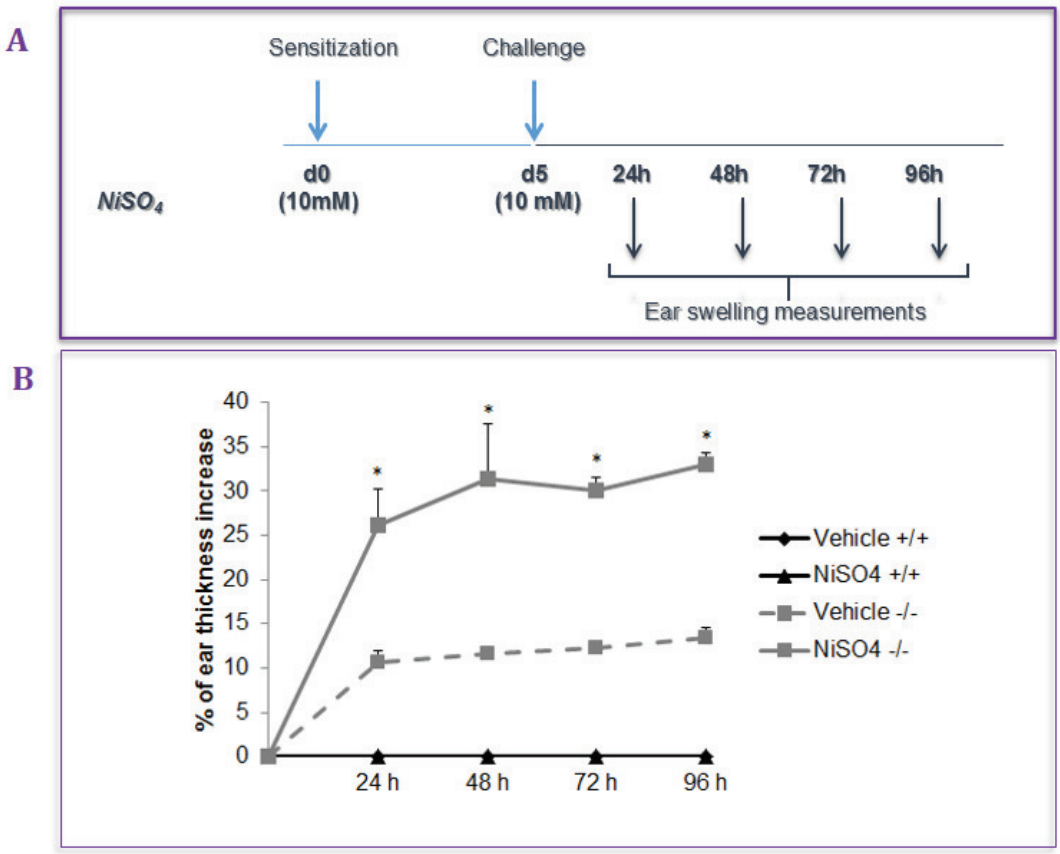


Figure 71 : Le $NiSO_4$ n'induit une HSC que chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ **(A)** Protocole expérimental. Les souris *nrf2*$^{+/+}$ & *nrf2*$^{-/-}$ ont été sensibilisées à j0 par une injection intra-dermale au niveau de l'abdomen par le $NiSO_4$ (10 mM) dissous dans du PBS puis les souris ont reçu une injection intra-dermale par le NiSO4 (10 mM) au niveau des 2 oreilles. **(B)** L'augmentation de l'épaisseur des oreilles a été mesurée 24 h, 48 h, 72 h et 96 h après le rappel. Les souris contrôles (véhicules) ont uniquement reçu une injection intra-dermale de $NiSO_4$ (10 mM) au niveau des oreilles à j5. Les résultats sont exprimés en % de l'augmentation de l'épaisseur des oreilles comme décrit dans la figure 78. Les résultats représentent la moyenne de l'augmentation de l'épaisseur des oreilles ± SEM (n = 2 souris), *P ≤0,05.

2. NRF2 ET CELLULES DENDRITIQUES

Les DC contrôlent les phases de sensibilisation et d'élicitation au cours de l'EAC (Gomez de Aguero *et al.*, 2012; Martin, 2012). Nous avons ainsi ensuite adressé le rôle des DC et de Nrf2 dans les HSC induites par les molécules allergisantes. Pour ce faire, des transferts adoptifs de DC issues de souris *nrf2*$^{+/+}$ ou *nrf2*$^{-/-}$ ont été réalisés dans les deux génotypes (**Figure 72**).

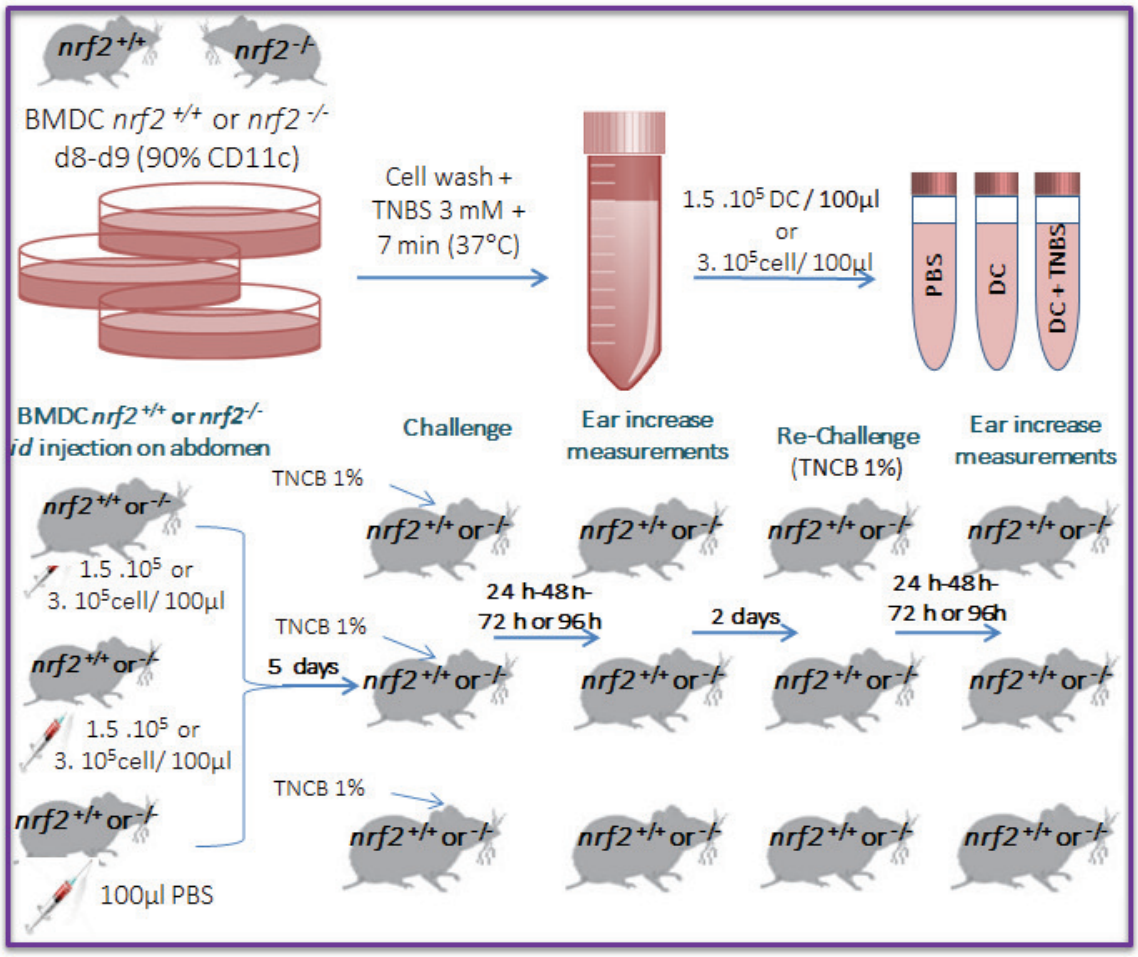
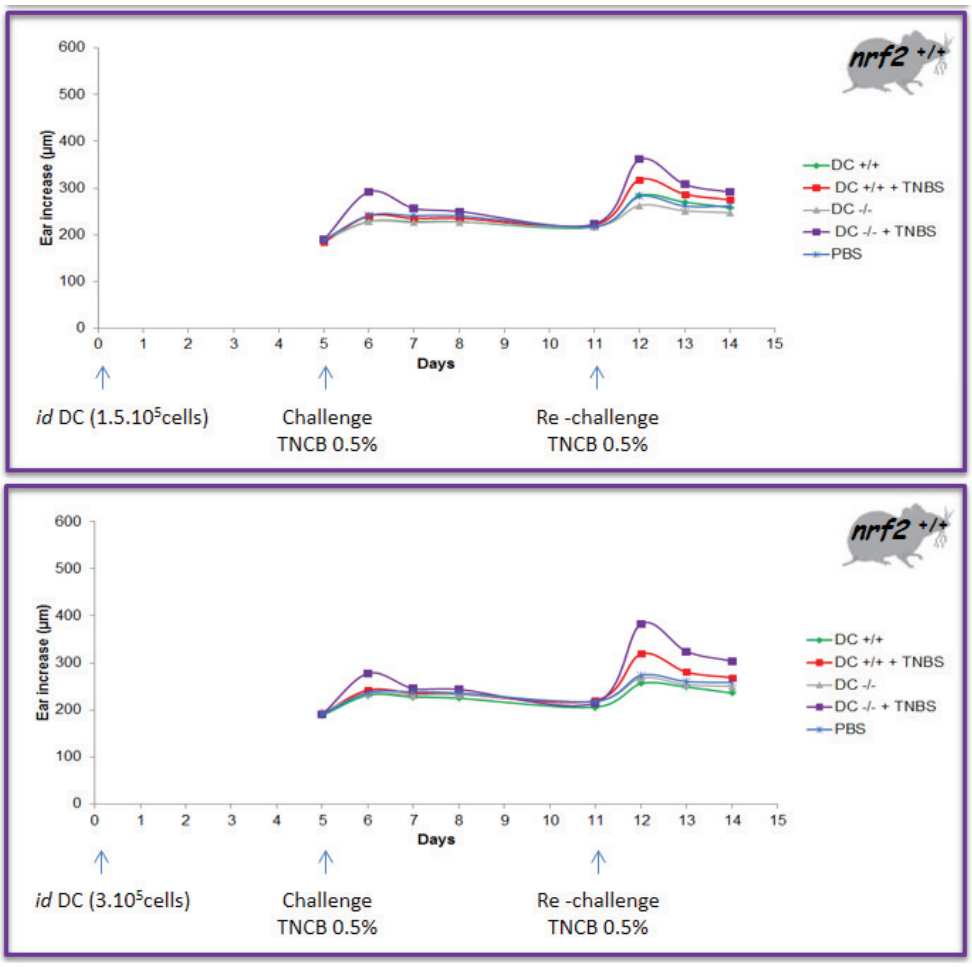


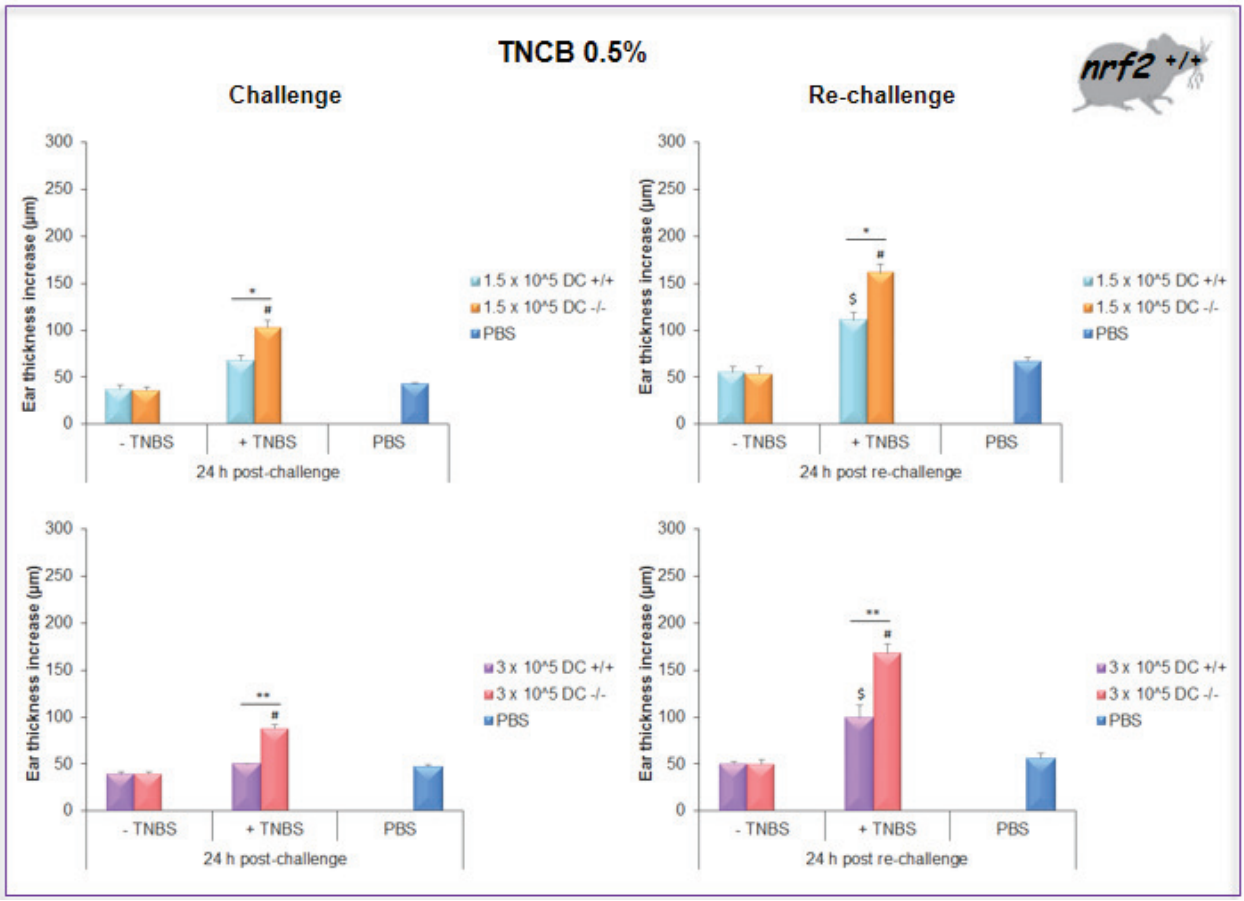
Figure 72: Protocole expérimental. Les DC *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$ issues de la moelle osseuse ont été lavées une fois avec du PBS puis chargées avec l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) pendant 7 min à 37°C. Ces cellules ont été ensuite lavées, comptées puis reprises à la concentration de 1,5 x 10^5 ou 3 x 10^5 DC/100 µl. Les souris *nrf2*$^{+/+}$ ou *nrf2*$^{-/-}$ ont été ensuite sensibilisées par une injection intra-dermale des DC *nrf2*$^{+/+}$ou *nrf2*$^{-/-}$ préparées. 5 jours plus tard, toutes les souris ont reçu une application cutanée de TNCB (1% ou 0,5%) au niveau des 2 côtés des 2 oreilles. 2 jours après la dernière mesure de l'épaisseur des oreilles, les souris ont reçu un second rappel en appliquant le TNCB (0,5% ou 1%) au niveau des 2 oreilles. L'augmentation de l'épaisseur des oreilles a été mesurée 24 h, 48 h, 72 h et 96 h après les deux rappels. Les souris contrôles ont reçu à j0 une injection intra-dermale de PBS puis une application de TNCB 0,5% ou 1% à j5.

Nos résultats montrent que les DC jouent un rôle clef dans la réaction inflammatoire d'origine allergique. Ainsi, deux concentrations de DC (1,5 x 10^5 DC ou 3 x 10^5 DC) et deux

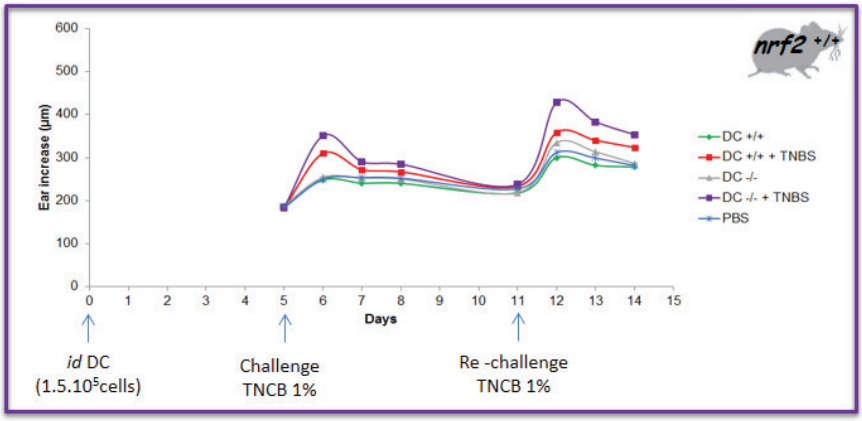
concentrations de TNCB (1% ou 0,5%) ont été utilisées. Afin de mimer la phase de sensibilisation, les souris ont reçu, à j0, une injection intradermique de DC chargées *in vitro* par l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS). Cinq jours plus tard, le rappel a eu lieu par une application de TNCB (1% ou 0,5%) au niveau des oreilles et l'épaisseur des oreilles a été ensuite mesurée. Afin de disséquer le rôle des DC au cours de la réponse allergique suite à des expositions répétées, les souris *nrf2*$^{+/+}$ ou *nrf2*$^{-/-}$ ont reçu un second rappel de TNCB à la même concentration qu'au cours du premier rappel (**Figure 73**). Nous montrons que la réaction d'HSC n'est observée que si la sensibilisation est réalisée *via* des DC *nrf2*$^{-/-}$ chargées de TNBS (DC *nrf2*$^{-/-}$), et ce quelle que soit la concentration de DC injectées (1,5 x 10^6 DC/100 µl ou 3 x 10^6/100 µl). La réaction inflammatoire atteint un maximum de réponse 24 h après le rappel puis diminue progressivement au cours du temps quelle que soit la concentration de DC ou de TNCB testée en rappel (**Figure 73**). Suite au second rappel, la réponse inflammatoire cutanée est majorée quelle que soit l'origine des DC transférées cependant cette réponse inflammatoire reste supérieure lors de transfert de DC *nrf2*$^{-/-}$ +TNBS (**Figure 73**).



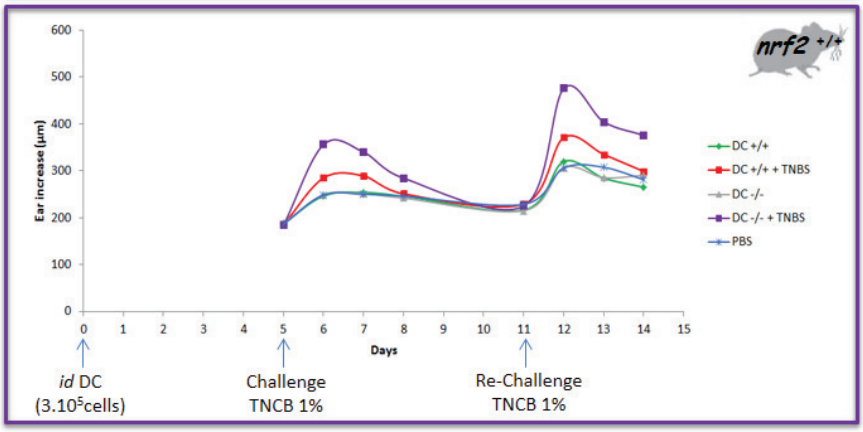
C


TNCB 0.5%
Challenge
Re-challenge
nrf2 +/+
Ear thickness increase (µm)
1.5 x 10^5 DC +/+
1.5 x 10^5 DC -/-
PBS
3 x 10^5 DC +/+
3 x 10^5 DC -/-
- TNBS
+ TNBS
24 h post-challenge
24 h post re-challenge

D


nrf2 +/+
Ear increase (µm)
Days
DC +/+
DC +/+ + TNBS
DC -/-
DC -/- + TNBS
PBS
id DC
(1.5.10⁵cells)
Challenge
TNCB 1%
Re -challenge
TNCB 1%

E


nrf2 +/+
Ear increase (µm)
Days
DC +/+
DC +/+ + TNBS
DC -/-
DC -/- + TNBS
PBS
id DC
(3.10⁵cells)
Challenge
TNCB 1%
Re-Challenge
TNCB 1%

F

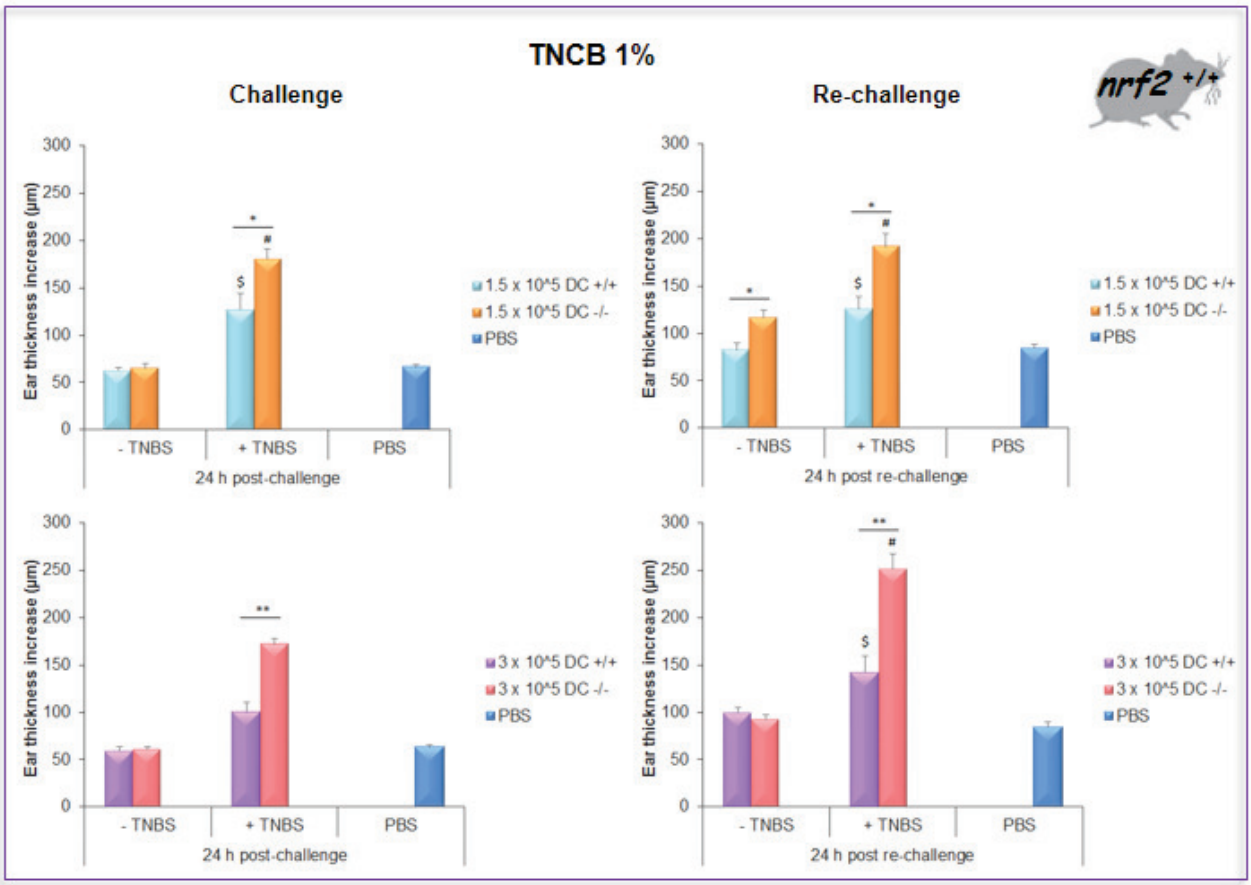


Figure 73: Les DC *nrf2*$^{+/+}$ contrôlent les réactions d'hypresensibilités cutanées en réponse au TNCB chez les souris *nrf2*$^{+/+}$. Les DC *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$ issues de la moelle osseuse ont été lavées une fois avec du PBS puis chargées avec le TNBS pendant 7 min à 37°C. Ces cellules ont été ensuite lavées, comptées puis reprises à la concentration de 1,5 x 10^5 ou 3 x 10^5 DC/100 µl. Les souris *nrf2*$^{+/+}$ ont été ensuite sensibilisées par une injection intra-dermale des DC *nrf2*$^{+/+}$ou *nrf2*$^{-/-}$ préparées. 5 jours plus tard, toutes les souris ont reçu une application cutanée de TNCB (1% ou 0,5%) au niveau des 2 côtés des 2 oreilles. 2 jours après la dernière mesure de l'épaisseur des oreilles, les souris ont reçu un second rappel en appliquant le TNCB (0,5% ou 1%) au niveau des 2 oreilles. L'augmentation de l'épaisseur des oreilles a été mesurée 24 h, 48 h, 72 h et 96 h après les deux rappels. Les souris contrôles ont reçu à j0 une injection intra-dermale de PBS puis une application de TNCB 0,5% ou 1% à j5. Les résultats sont exprimés en % de l'augmentation de l'épaisseur des oreilles comme décrit dans la figure 70. Les résultats représentent la moyenne de l'augmentation de l'épaisseur des oreilles ± SEM (n = 5 souris), *P ≤0,05. **(A)** 1,5 x 10^5 DC / TNCB 0,5%, **(B)** 3 x 10^5 DC / TNCB 0,5%, **(D)** 1,5 x 10^5 DC / TNCB 1%, **(E)** 3 x 10^5 DC / TNCB 1%.

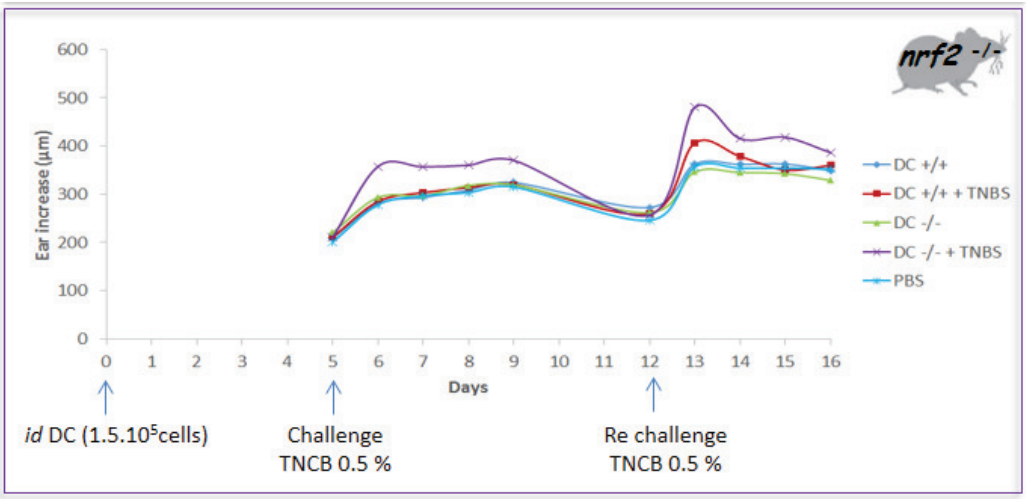
(C & F) Les DC *nrf2*$^{-/-}$ montrent une réponse exacerbée d'HSC en réponse au TNCB à 24 h comparées aux DC *nrf2*$^{+/+}$. Les résultats sont exprimés en augmentation de l'épaisseur des oreilles ± SEM (n = 5 souris), $: DC *nrf2*$^{+/+}$ +TNBS *vs* DC *nrf2*$^{+/+}$ -TNBS # : DC *nrf2*$^{-/-}$ + TNBS *vs* DC *nrf2*$^{-/-}$ -TNBS, $#*P < 0,05; **P < 0,01; Mann-Whitney U-test, +TNBS : avec TNBS, -TNBS : sans TNBS

Des expériences miroirs de transfert de DC (*nrf2*$^{+/+}$ ou *nrf2*$^{-/-}$) chez des souris *nrf2*$^{-/-}$ montrent qu'à la plus faible concentration de DC (1,5 x 10^5 DC), la réaction d'HSC n'est observée que chez les souris ayant reçues des *DC nrf2*$^{-/-}$ +TNBS (**Figure 74A**).

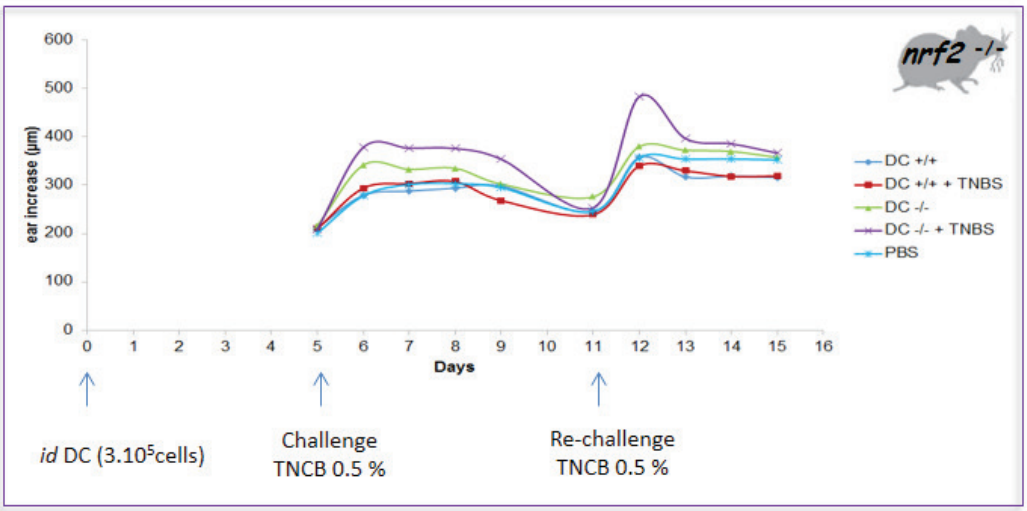
Ces expériences de tranfert de DC nous permettent de montrer qu'à la plus forte concentration de DC (3 x 10^5), la réponse inflammatoire cutanée est induite quelle que soit l'origine des DC transférées (DC *nrf2*$^{+/+}$+TNBS ou DC *nrf2*$^{-/-}$+TNBS) (**Figure 74B**). Cependant, la réponse est exacerbée en réponse aux DC *nrf2*$^{-/-}$+TNBS. Cette réaction inflammatoire atteint son maximum d'amplitude 24 h après le rappel puis diminue pour atteindre un plateau au cours du temps. Par ailleurs, nous montrons que l'injection de DC *nrf2*$^{-/-}$ (3 x 10^5) non chargées induit une augmentation de l'épaisseur des oreilles significative par rapport aux DC *nrf2*$^{+/+}$ (**Figure 74C**).

Ces résultats montrent que, *via* les DC, Nrf2 joue un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire spécifique en réponse aux molécules allergisantes (**Figure 75**).

A



B



C

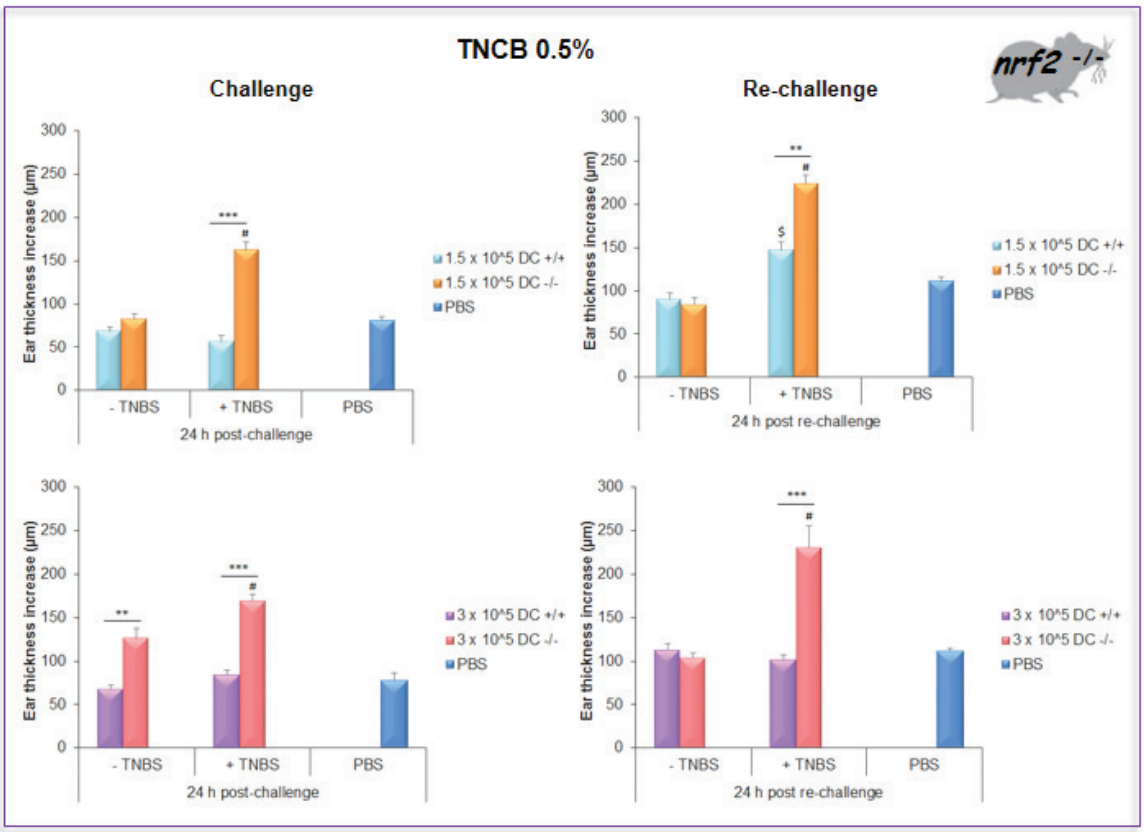


Figure 74 : Les DC *nrf2*$^{+/+}$ contrôlent la réaction d'HSC en réponse au TNCB dans les souris *nrf2*$^{+/+}$. Les DC *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$ issues de la moelle osseuse ont été lavées une fois avec du PBS puis chargées avec le TNBS pendant 7 min à 37°C. Ces cellules ont été ensuite lavées, comptées puis reprises à la concentration de 1,5 x 10^5 ou 3 x 10^5 DC/100 µl. Les souris *nrf2*$^{+/+}$ ont été ensuite sensibilisées par une injection intra-dermale avec les DC *nrf2*$^{+/+}$ou *nrf2*$^{-/-}$ préparées. 5 jours plus tard, toutes les souris ont reçu une application cutanée de TNCB (1% ou 0,5%) au niveau des 2 côtés des 2 oreilles. 2 jours après la dernière mesure de l'épaisseur des oreilles, les souris ont reçu un second rappel en appliquant le TNCB (0,5% ou 1%) au niveau des 2 oreilles. L'augmentation de l'épaisseur des oreilles a été mesurée 24 h, 48 h, 72 h et 96 h après les deux rappels. Les souris contrôles ont reçu à j0 une injection intra-dermale de PBS puis une application de TNCB 0,5% ou 1% à j5. Les résultats sont exprimés en % de l'augmentation de l'épaisseur des oreilles comme décrit dans la figure 78. Les résultats représentent la moyenne de l'augmentation de l'épaisseur des oreilles ± SEM (n = 5 souris), *P ≤0,05. **(A)** 1,5 x 10^5 DC / TNCB 0,5%, **(B)** 3 x 10^5 DC / TNCB 0,5%,
(C) Les DC *nrf2*$^{-/-}$ montrent une réponse exacerbée d'HSC en réponse au TNCB à 24 h comparées aux DC *nrf2*$^{+/+}$. Les résultats sont exprimés en augmentation de l'épaisseur des oreilles ± SEM (n = 5 souris), $: DC *nrf2*$^{+/+}$ +TNBS *vs* DC *nrf2*$^{+/+}$ -TNBS # : DC *nrf2*$^{-/-}$ + TNBS *vs* DC *nrf2*$^{-/-}$ -TNBS, $#P < 0,05; **P < 0,01; ***P<0,001, Mann-Whitney U-test, +TNBS : avec TNBS, -TNBS : sans TNBS

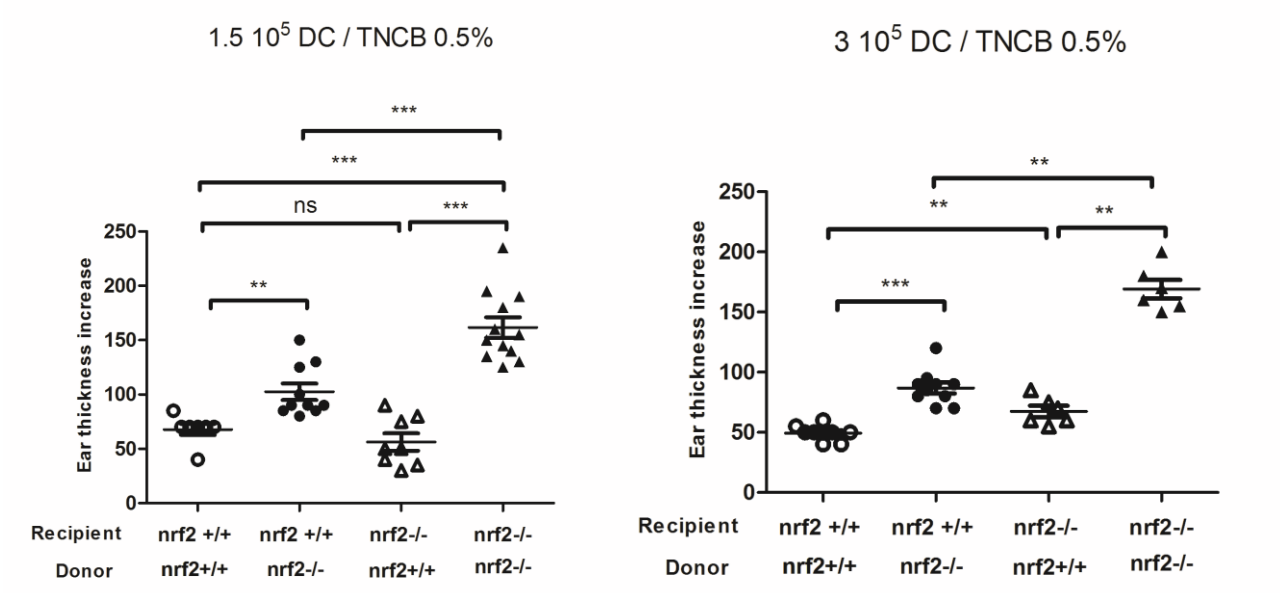


Figure 75: Les DC *nrf2*$^{-/-}$ génèrent une inflammation cutanée plus importante chez les souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$ en réponse au TNCB. A j0, les souris *nrf2*$^{+/+}$ (cercles) et *nrf2*$^{-/-}$ (triangles) ont été sensibilisées par une injection intra-dermale par des DC *nrf2*$^{+/+}$ (symboles blancs) ou des DC *nrf2*$^{-/-}$ (symboles noirs) chargées in vitro par du TNBS. 5 jours plus tard, toutes les souris ont reçu une application cutanée de TNCB (0,5%) au niveau des 2 oreilles. Les résultats sont exprimés en augmentation de l'épaisseur des oreilles 24 h après le rappel, (n= 8-12 oreilles correspondants à 4-6 souris / groupe). **P<0,01; ***P<0,001; Mann-Whitney U-test. ns : non-significatif

L'analyse du phénotype des DC *nrf2*$^{-/-}$ a permis de montrer qu'elles sont plus inflammatoires que les DC *nrf2*$^{+/+}$. En effet, à l'état basal, les DC *nrf2*$^{-/-}$ présentent un phénotype de DC activées et matures caractérisé par une plus forte expression des molécules de co-stimulation telles que le CD86 () et une plus forte expression génique des cytokines pro-inflammatoires telles que l'*il-6* et l'*il-12p40* (résultats Romain Génard, 2ème année de Thèse) (**Figure 76**).

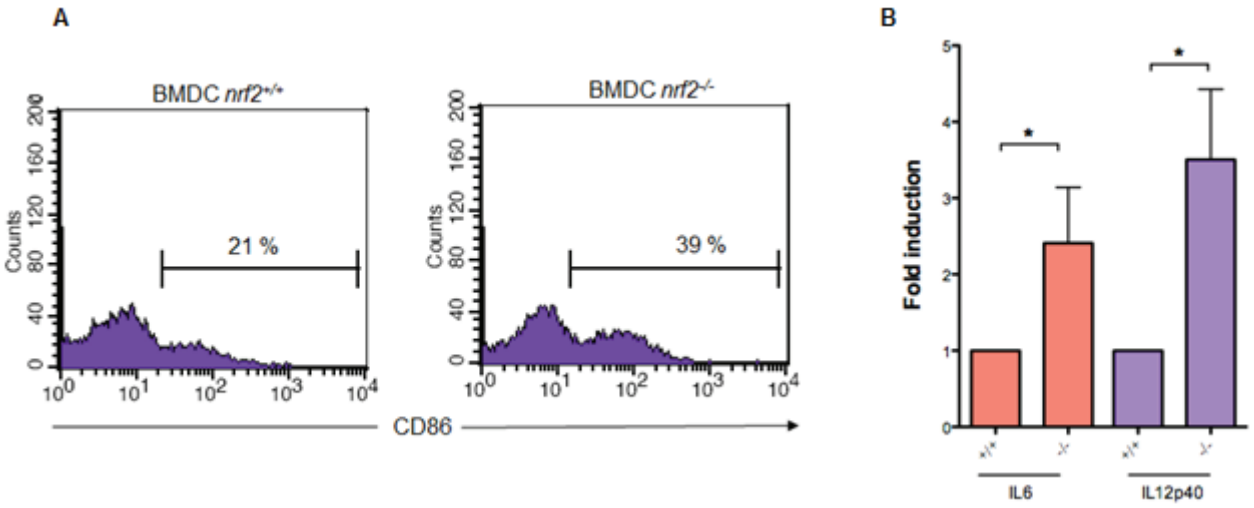


Figure 76: Caractérisation du phénotype membranaire et cytokinique des DC *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$ à l'état basal. Les DC issues de la moelle osseuse des souris *nrf2*$^{+/+}$ ou *nrf2*$^{-/-}$ ont été différenciées pendant 9 jours en présence du surnageant de GM-CSF issu de la lignée cellulaire J558 transfectées par le gène murin de *gm-csf*. (A) Les BMDC *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$ ont été lavées, marquées avec l'Ac anti-CD86 puis analysées par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en % de cellules positives. (B) Aj9, les BMDC *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$ ont été lavées puis rétro-transcrites. Les expressions géniques de l'il-6 et de l'il-12p40 ont été mesurées par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés selon la méthode du ΔΔCt où le fold induction correspond au ratio (Rn) $Rn = \frac{(1+E)^{-\Delta Ct\ gène\ cible}}{(1+E)^{-\Delta Ct\ gène\ référence}} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ avec $\Delta Ct = Ct_{\text{échantillon traité}} - Ct_{\text{échantillon non traité}}$ et E = 1.

De plus, l'analyse de 43 gènes par PCR array a permis de dessiner le profil d'expression des gènes dans les DC *nrf2*$^{+/+}$ et les DC *nrf2*$^{-/-}$ à l'état basal (**Figure 77**).

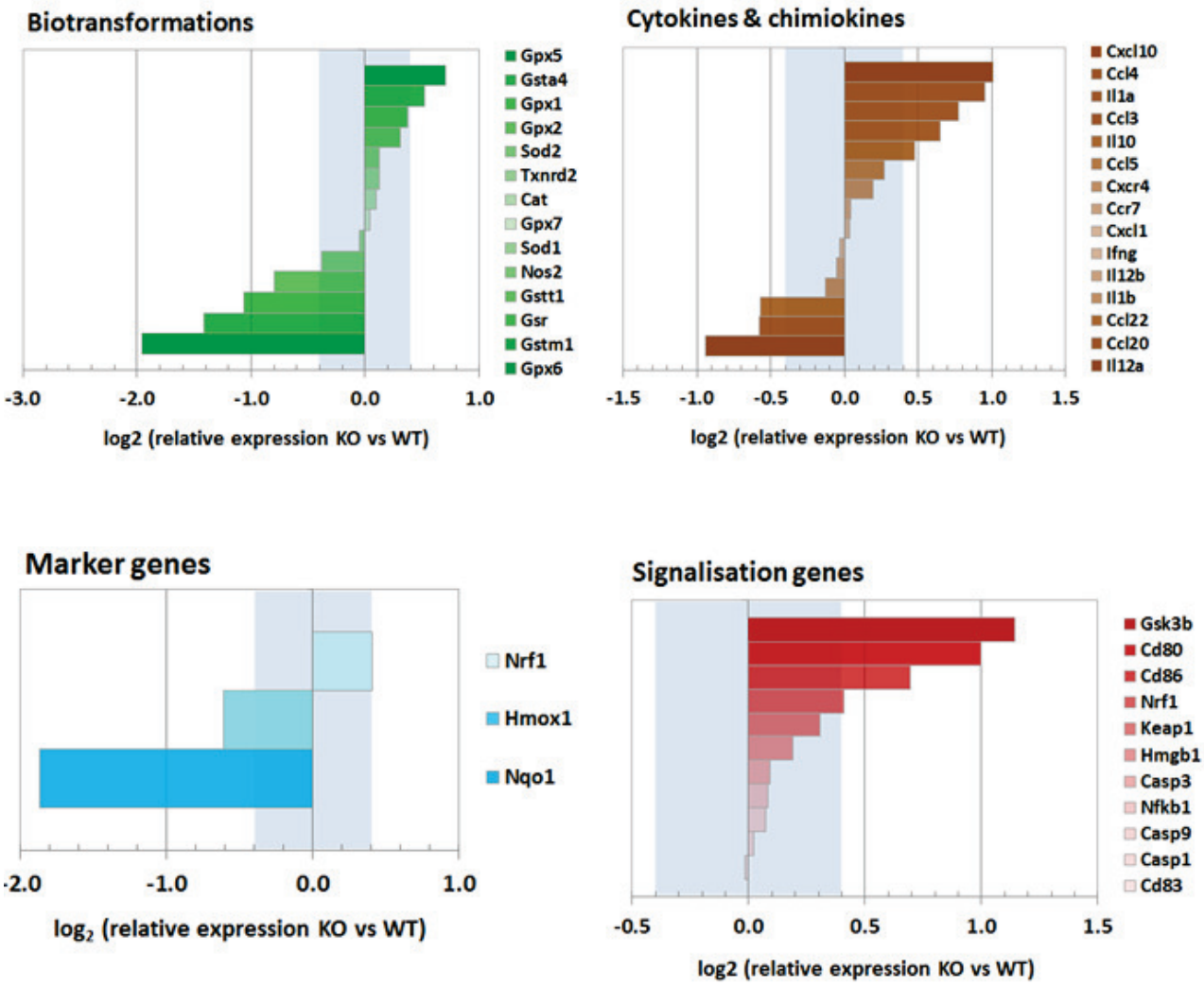


Figure 77 : Expression basale des différents gènes réprimés ou surexprimés dans les DC *nrf2*$^{-/-}$ comparées aux DC *nrf2*$^{+/+}$. Les résultats sont exprimés en "fold induction". La zone grisée correspond à la variabilité technique de mesures de ΔCq ($-0{,}40 < \log_2 \text{ratio} < 0{,}40$) correspondant aux valeurs non significatives.

3. Nrf2 & Lymphocytes T

L'exacerbation de la réaction inflammatoire en l'absence de Nrf2 en réponse aux molécules allergisantes cutanées peut se justifier par un défaut de la fonction des DC ou bien aussi par un défaut de la fonction des cellules participant à la résolution de l'inflammation telles que les Treg (Lass *et al.*, 2008; Vocanson *et al.*, 2010; Saadoun *et al.*, 2011; Josefowicz *et al.*, 2012; Krishnamoorthy *et al.*, 2012).

Nos résultats préliminaires montrent qu'à l'état basal, aucune différence du nombre de Treg n'est observée chez les souris *nrf2*$^{+/+}$ ou *nrf2*$^{-/-}$. En revanche, les souris *nrf2*$^{-/-}$ présentent deux fois moins de Treg recrutés au niveau cutané comparées aux souris *nrf2*$^{+/+}$ en réponse au DNCB (**Figure 78**). En réponse au CinA, aucun recrutement de Treg (Foxp3^{+}) n'a été détecté dans les deux génotypes 48 h après le rappel (**Figure 79**).

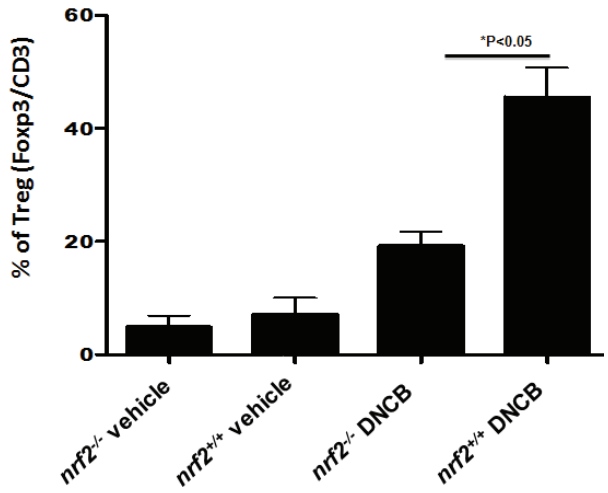


Figure 78: Caractérisation des Treg dans les souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$. A j0, les souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$ ont été sensibilisées au niveau de l'abdomen rasé avec le DNCB 1% dissout dans l'acétone. 5 jours plus tard, les souris reçoivent une application du DNCB 0,5% au niveau des deux côtés des deux oreilles. Les souris contrôles (véhicule) ont uniquement reçues une application de DNCB 0,5% à j5 au niveau des deux oreilles. 48 h après le rappel, les souris sont sacrifiées et des marquages immunohistochimiques (Foxp3/LTCD3) sont effectués. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules positives.

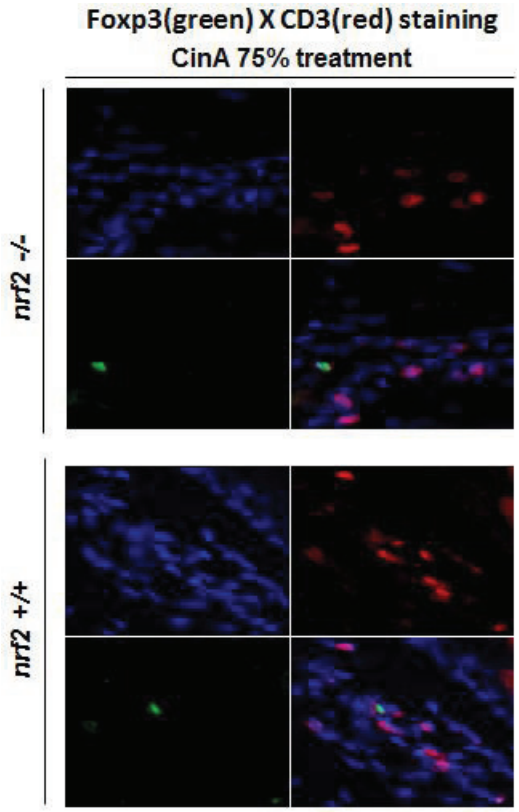


Figure 79: Absence de recrutement de Treg chez les souris *nrf2*$^{+/+}$ ou *nrf2*$^{-/-}$ sensibilisées au CinA 75%. A j-2, j-1 et j0 les souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2* $^{-/-}$ ont été sensibilisées au niveau de l'abdomen rasé par le CinA 75% dissout dans l'acétone. 5 jours après la dernière sensibilisation, les souris ont reçu une application de CinA 40% au niveau des deux côtés des deux oreilles. Les souris contrôles (véhicule) ont uniquement reçu une application de CinA 40% à j5 au niveau des deux oreilles. 48 h après le rappel, les souris sont sacrifiées et des marquages immunohistochimiques [Foxp3 (vert) /LTCD3 (rouge)] ont été effectués.

Nous avons ensuite étudié le rôle de Nrf2 dans la réponse tolérogène en réponse au DNCB. Pour ce faire, des souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$ sont rendues tolérantes par le dinitrocyanobenzène (DNTB) selon le protocole de Gomez de Aguero *et al.,* 2012. Nous montrons que les souris *nrf2*$^{+/+}$ rendues tolérantes par le DNTB ne montrent aucune réaction d'HSC en réponse au DNCB comparées aux souris non rendues tolérantes (**Figure 80**).

tout comme décrit par Gomez de Aguero *et al.,* (Gomez de Aguero *et al.*, 2012). En revanche, les souris *nrf2*$^{-/-}$ rendues tolérantes par le DNTB montrent un MEST positif et une exacerbation de la réponse inflammatoire d'origine allergique en réponse au DNCB comparées aux souris contrôles (**Figure 80**). Ainsi, l'absence de Nrf2 ne contrôle plus la tolérance cutanée induite par les molécules allergisantes.

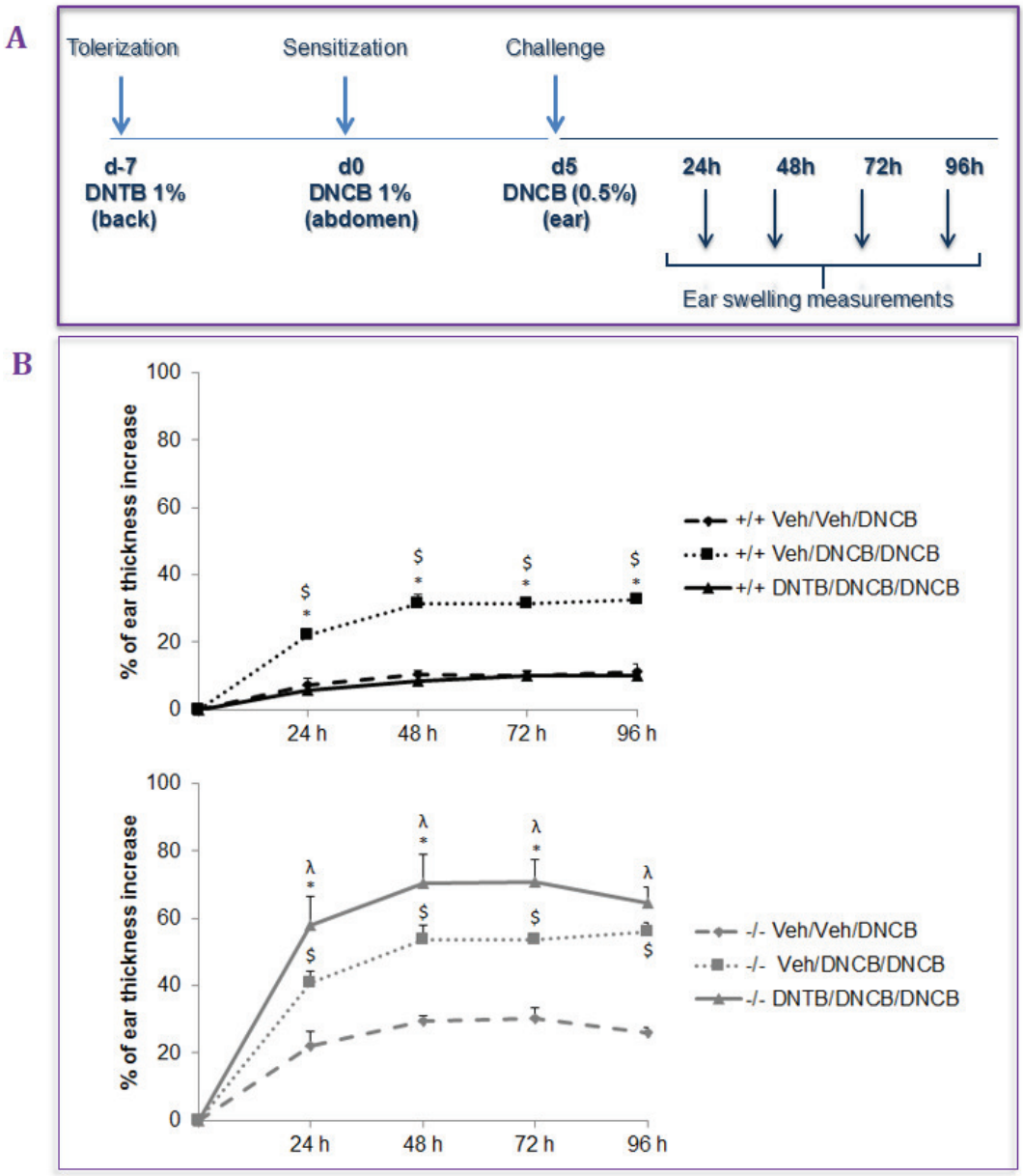


Figure 80: Absence de la réponse tolérogène chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ pré-traitées par le DNTB contrairement aux souris *nrf2*$^{+/+}$. A j0, les souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$ ont été rendues tolérantes par une application cutanée de DNTB (1%) au niveau de l'abdomen. Une semaine plus tard, les souris ont été sensibilisées par une application cutanée de DNCB (1%) au niveau du dos. 5 jours plus tard, les souris ont reçu une application de DNCB (0,5%) au niveau des 2 oreilles. L'augmentation de l'épaisseur des oreilles a été mesuré 24 h, 48h, 72 h et 96 h après le rappel. Les souris contrôles (veh) ont uniquement reçu une application de DNCB (0,5%) à j5. Les résultats sont exprimés en % de l'augmentation de l'épaisseur des oreilles ± SEM (n = 7 souris),

* : Veh/DNCB/DNCB *vs* DNTB/DNCB/DNCB. $: Veh/Veh/DNCB *vs* Veh/DNCB/DNCB, λ : Veh/Veh/DNCB *vs* DNTB/DNCB/DNCB, *# λ P ≤0,05

DISCUSSION

Discussion

Les réactions allergiques telles que les réactions d'hypersensibilité de contact (HSC) sont un problème de santé publique. L'incidence de ces réactions est estimée à 20% dans les pays industrialisés (Peiser *et al.*, 2012). Il s'agit d'une réaction inflammatoire aiguë qui survient suite à des expositions répétées d'une molécule allergisante avec la peau et dans laquelle les DC jouent un rôle essentiel (Martin *et al.*, 2011). Les composés chimiques responsables de l'HSC sont majoritairement des haptènes, molécules de faibles poids moléculaires, qui ne deviennent immunogènes qu'après association stable avec des protéines (Lepoittevin, 2006). L'HSC est composée de deux phases : une phase de sensibilisation et une phase d'élicitation. Au cours de la phase de sensibilisation, les DC activées par l'haptène, migrent vers les ganglions lymphatiques pour induire une réponse immunitaire primaire spécifique de l'haptène (Kissenpfennig *et al.*, 2005). Une fois activées, les DC passent alors d'un état dit 'immature' à un état dit 'mature' caractérisé par une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation (CD86, CD80, CD40) et des antigènes de CMH-II (Banchereau and Steinman, 1998).

En 1994, Matzinger a introduit la théorie du 'signal de danger'. Ce signal déterminera si la reconnaissance de l'Ag conduira à la tolérance ou à une réponse immunitaire effectrice (Matzinger, 1994). Ainsi, l'activation des DC peut se faire soit directement par l'haptène perçu comme un signal de danger soit par les autres signaux de dangers produits dans le microenvironnement cutané (Martin *et al.*, 2011). Ces derniers sont produits lors de dommages tissulaires, d'une réaction inflammatoire, d'un stress ou bien d'une mort cellulaire (Cumberbatch *et al.*, 2001a; Cumberbatch *et al.*, 2001b; Vabulas *et al.*, 2002; Antonopoulos *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2010). Tous ces signaux de dangers participent à la maturation complète des DC (Gallucci and Matzinger, 2001). Celle-ci est caractérisée par une augmentation des molécules de co-stimulation (CD86, CD80 et CD40) en présence des haptènes tels que le DNCB (Mizuashi *et al.*, 2005; Byamba *et al.*, 2010).

In vitro, les molécules allergisantes telles que le DNCB induisent la production d'ERO (Byamba *et al.*, 2010) qui participent à l'augmentation des marqueurs membranaires de co-stimulation tels que le CD86 dans les DC humaines (Mizuashi *et al.*, 2005).

Les haptènes, molécules réactives intrinsèquement ou *via* métabolisation ou oxydation, sont capables d'induire un stress chimique. Parmi les voies de détoxication en réponse aux xénobiotiques, la voie Nrf2/Keap1 est une voie centrale pour la détection de composés

électrophiles tant endogènes qu'exogènes par la cellule (Itoh *et al.*, 2004; Kensler *et al.*, 2007). Ces dernières années, de nombreuses études ont démontré le rôle clef du facteur de transcription Nrf2 dans le contrôle des réactions inflammatoires médiées par le stress oxydant (Motohashi and Yamamoto, 2004; Chen *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2013).

Nous avons montré que les molécules allergisantes cutanées telles que le DNCB et le CinA, contrairement aux irritants tels que le chlorure de benzalkonium et le dodécylsulfate de sodium (SDS), induisent l'accumulation protéique de Nrf2 et les expressions de ses gènes cibles tels que *nqo1* et *ho-1* dans les DC humaines (Ade *et al.*, 2009). L'utilisation d'un modèle *in vitro* de lignée humaine de KC appelé KeratinoSens a permis de montrer que de nombreux composés chimiques connus pour être des molécules allergisantes cutanées activent la voie Nrf2 (Emter *et al.*, 2010).

A ce jour, quatre méthodes *in vitro*, actuellement en pré-validation, ont été développées pour mesurer le pouvoir sensibilisant cutané des molécules chimiques. Il s'agit du Direct Reactivity Peptide Assay (DRPA), du Myeloid U937 Skin Sensitization Test (MUSST), du human Cell Line Activation Test (h-CLAT) et du KeratinoSens (Natsch *et al.*, 2013). Tous ces tests intègrent la réaction allergique : le DRPA prend en compte la réactivité chimique de l'haptène, le KeratinoSens intègre la capacité d'une molécule à induire l'activité transcriptionelle de gènes dont le promoteur possède des séquences ARE et quant aux tests MUSST et hCLAT, ils prennent en considération la capacité des haptènes à induire l'activation des DC.

Si certains auteurs proposent un rôle de Nrf2 dans le caractère allergisant des produits chimiques, aucune étude n'a défini sa fonction dans les cellules de l'immunité et n'a montré son rôle dans l'allergie cutanée. Pour adresser le rôle de Nrf2 dans les cellules de l'immunité et dans l'allergie cutanée, nous avons choisi de travailler dans un modèle de souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$.

Nos résultats montrent que les DC *nrf2*$^{-/-}$ produisent deux fois plus d'ERO que les DC *nrf2*$^{+/+}$ en réponse aux DNCB et CinA. Cette production atteint un maximum 30 min après la stimulation par les molécules mais ne perdure pas. De plus, une production basale d'ERO est uniquement observée dans les DC *nrf2*$^{-/-}$. Ces résultats sont en corrélation avec ce qui est décrit par Yeang *et al.,* montrant que les DC *nrf2*$^{-/-}$ sont plus sensibles à un signal de danger tel que le LPS et produisent plus d'ERO comparées aux DC *nrf2*$^{+/+}$. Par ailleurs, à l'état basal, les

DC *nrf2*$^{-/-}$ ont un taux de glutathion intracellulaire plus faible que celui des DC *nrf2*$^{+/+}$ (Aw Yeang *et al.*, 2012). Ainsi, les DC *nrf2*$^{-/-}$ seraient plus vulnérables à un stress oxydant.

De plus, les molécules allergisantes induisent une augmentation du nombre des DC *nrf2*$^{-/-}$ en apoptose à 24 h. Cette mort cellulaire est accompagnée d'une augmentation de l'activité caspase-3/7 et d'une chute plus rapide du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi$m) dans les DC *nrf2*$^{-/-}$ comparées aux DC *nrf2*$^{+/+}$ en réponse au DNCB ou au CinA. Ainsi, le DNCB et le CinA induisent la mort cellulaire des DC *via* l'activation des caspases impliquées dans la voie mitochondriale ou intrinsèque de l'apoptose.

La neutralisation des ERO par la NAC a permis de montrer que la mort induite par le DNCB est ERO dépendante tout comme décrite par Liu *et al.,* et d'autres (Circu and Aw, 2010; Liu et al., 2010; Sharma et al., 2012). En revanche, l'apoptose induite par le CinA est moins sensible à la production des ERO. Il est décrit que le DNCB peut se fixer aux fonctions thiols des protéines *via* une réaction de substitution, ainsi le DNCB en présence de NAC serait neutralisé et ses effets antagonisés. Cependant, ceci ne peut être exclu pour le CinA car tout comme le DNCB, le CinA peut se fixer aux fonctions thiols *via* une réaction de Michael.

Dans les BMDC *nrf2*$^{+/+}$, le DNCB et le CinA induisent l'expression génique de *bcl-2*, démontrée être régulée par Nrf2 (Niture and Jaiswal, 2012) tandis que cette expression n'est pas induite par ces deux haptènes dans les BMDC *nrf2*$^{-/-}$. Par conséquent, tout comme décrit par Brunelle et Letai (Brunelle and Letai, 2009), l'expression de Bcl-2 participerait au contrôle de l'apoptose induite par les molécules allergisantes, et ce *via* Nrf2. L'étude de l'apoptose des DC (*bcl-2*$^{-/-}$) induite par le DNCB et CinA nous permettrait de confirmer le rôle de cette protéine dans la survie des DC (*nrf2*$^{+/+}$).

L'analyse de 43 gènes par PCR array a permis d'analyser le profil d'expression des gènes dans les DC *nrf2*$^{+/+}$ et les DC *nrf2*$^{-/-}$ stimulées par le DNCB ou le CinA pendant 4 h, 8 h ou 24 h. En réponse au DNCB ou au CinA, Nrf2 régule positivement *ho-1*, *nqo-1*, *gsr, gpx,* jouant un rôle détoxifiant et la *monoxyde d'azote synthase (nos2),* jouant un rôle dans la maturation de la DC (Wong *et al.*, 2004). Ainsi, Nrf2 contrôle l'apoptose des DC activées par les molécules allergisantes *via* l'induction d'ARNm codant pour *bcl-2* et pour un nombre de gènes impliqués dans la réponse anti-oxydante (*gst, nqo1, ho-1, gsr, cat*) (El Ali *et al.*, article en préparation).

Afin d'adresser le rôle de Nrf2 dans l'allergie cutanée en réponse à ces différents composés chimiques, nous avons développé deux tests dans un modèle de souris invalidées pour le gène codant pour *nrf2* : le Local Lymph Node Assay (LLNA) afin de mesurer la phase

de sensibilisation et le Mouse Ear Sweling Test (MEST) afin de mesurer à la fois la phase de sensibilisation et la phase d'élicitation.

Nos résultats du MEST montrent qu'en absence de Nrf2, toutes les molécules chimiques testées sont capables d'induire une réaction inflammatoire d'origine allergique (augmentation de l'épaisseur de l'oreille). Cependant pour une même concentration testée, certains composés chimiques n'induisent aucune augmentation de l'épaisseur de l'oreille chez les souris *nrf2*$^{+/+}$. C'est ainsi que le DNCB à des concentrations non irritantes de 0,25% ou 0,5% n'induit une augmentation de l'épaisseur des oreilles que chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ (El Ali *et al.*, 2013). Quant aux résultats obtenus par le LLNA, toutes les molécules testées (le DNCB, le CinA, l'IPDI, le TDI, le PA et le TMA) induisent une augmentation de la prolifération lymphocytaire chez les souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$. Nos résultats concernant le DNCB sont en corrélation avec l'étude effectuée par Van der Veen *et al*. (van der Veen *et al.*, 2013). L'index de stimulation (IS), pour une même concentration, est plus élevé chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ comparées aux souris *nrf2*$^{+/+}$. Par conséquent, Nrf2 contrôle la prolifération des cellules au sein des ganglions drainants au cours de la phase de sensibilisation. Des résultats préliminaires montrent que le nombre de DC migrant aux ganglions est plus élevé chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ que les chez les souris *nrf2*$^{+/+}$. Ainsi, Nrf2 contrôle la réponse inflammatoire cutanée ainsi que la prolifération lymphocytaire en réponse à des molécules allergisantes quelle que soit leur réactivité chimique. Ces résultats soulignent également le rôle clef de Nrf2 dans le contrôle régulateur des signaux de danger.

Par ailleurs, ces effets d'exacerbation de la réponse inflammatoire chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ ne sont pas dus à un défaut immunitaire global de réponse chez ces souris car en réponse à la plus faible concentration testée de 0,1% de DNCB, aucune réponse inflammatoire n'est induite dans les deux génotypes. Enfin, en réponse au CinA, les souris *nrf2*$^{-/-}$ développent une HSC tout comme les souris déficientes en lymphocytes T CD4, décrites par Vocanson *et al.*, (Vocanson *et al.*, 2006). Par conséquent, le seuil de sensibilité de la réponse inflammatoire cutanée responsable d'une HSC est plus bas en absence du facteur de transcription Nrf2. Nrf2 semble alors réguler l'amplitude de la réponse allergique et pourrait contrôler la réponse Treg. Nos résulats préliminaires de tolérance confirment que Nrf2 participerait bine à la régulation de la tolérance cuatnée, soit len contôlant la migration des lymphocytes Treg au site cutané ou en contrôlant la fonction suppressive des Treg.

L'analyse de 92 gènes par qPCR du tissu cutané de souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$ sensibilisées par le DNCB [ANR AllergoChem, collaboration avec Hervé Groux, Société ImmunoSearch] a permis de montrer que Nrf2 régule positivement les gènes *ho-1, nqo-1, gclc, gclm, txnr, ugt1a1, ugt1a9, il-7r, jun, il-19, il12rb1, cxcr1, ccr2, mmp3, mmp9, mmp10, mmp12, cyp1b1, cyp1a1, hsp90aa1, cd44, il-23, nos3, notch3, mkp1, gata2 et bcl-2* et négativement les gènes *il-1b, tnf, C-type lectin domain family 4 (clec4e), Proteasome activator complex subunit 2 (psme2), dihydrofolate réductase, ccl20 et ccl27*. Chez les souris *nrf2*$^{-/-}$, une diminution de l'expression de certains gènes impliqués dans la réparation cutanée tels que les *mmp* est mesurée. Les MMP sont des protéases qui assurent la dégradation de la matrice extracellulaire et des molécules d'adhésion afin d'assurer une réparation cutanée (Page-McCaw *et al.*, 2007). Suite à la sensibilisation cutanée par le DNCB, nous observons que les *mmp* sont induites. Leur expression augmente vraisemblablement pour assurer un remodelage tissulaire (Gill and Parks, 2008). En l'absence de Nrf2, les expressions des *mmp* sont considérablement faibles en réponse au DNCB illustrant une mauvaise réparation tissulaire en corrélation avec l'inflammation cutanée exacerbée chez les souris déficientes. Les gènes impliqués dans l'inflammation sont également augmentés tels que l'*il-b*, le *tnf* et la *nos3* chez les souris *nrf2*$^{-/-}$. Ainsi le tissu cutané des souris *nrf2*$^{-/-}$ sensibilisées au DNCB possède un défaut de défense antioxydante, un problème de cicatrisation cutanée et un phénotype inflammatoire. L'analyse d'un ensemble de gènes, par PCR array dans les DC stimulées *in vitro* par le DNCB & le CinA, montre également que le facteur de transcription Nrf2 régule négativement l'expression de gènes codant pour l'*il-1b, cd86, cd80, ccl20* et régule positivement un ensemble de gènes impliqués dans la réponse anti-oxydante (El Ali *et al.*, papier en préparation).

L'absence du facteur de transcription Nrf2 induit des dommages tissulaires par absence d'un nombre de protéines régulant la cicatrisation et le remodelage tissulaire. Par ailleurs, le contrôle de cytokines telles que le IL-1β, le TNF-α ou le CCL20 participe à l'exacerbation de la réponse inflammatoire et au recrutement éventuel de lymphocytes Th17 au tissu enflammé (Pennino *et al.*, 2010). Toute molécule chimique possède un effet irritant pouvant participer à l'émergence d'une réaction allergique. Comme l'irritation cutanée fait le lit de l'allergie' (Bonneville *et al.*, 2007), la régulation de l'irritation par Nrf2 a été étudiée. Nous montrons que la réponse irritative est plus importante chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ que chez les souris *nrf2*$^{+/+}$ et perdure en réponse à un puissant irritant qu'est l'huile de croton. Par conséquent, Nrf2 contrôle également l'irritation cutanée.

Nous montrons que les DC *nrf2*$^{-/-}$ expriment plus de *cd86, cd80, cxcl10, ccl4, il-1a, ccl3* que les DC *nrf2*$^{+/+}$ mais expriment moins d'*il-12a*. Ces résultats montrent alors que les DC *nrf2*$^{-/-}$ possèdent un phénotype de DC activées (Rangasamy *et al.*, 2010; Merchant *et al.*, 2011). Ainsi en absence de Nrf2, les DC sont plus inflammatoires et pourraient être perçues comme un signal de danger. Par ailleurs, en réponse aux molécules sensibilisantes, ces mêmes DC meurent par apoptose, dont les corps apoptiques pourraient être perçus comme de nouveaux signaux de danger. C'est pourquoi, ces souris *nrf2*$^{-/-}$ induiraient une plus forte réponse inflammatoire à de plus faibles doses de molécules allergisantes. Par ailleurs, Nrf2 semble avoir d'autres effets tant sur le remodelage cutanée et par conséquent l'irritation des produits cutanés.

Cette étude est la première à mettre en évidence le rôle du facteur de transcription Nrf2 dans la régulation de la réaction inflammatoire en réponse aux molécules allergisantes. Nous montrons que Nrf2 joue un rôle clef dans l'HSC, contrôlerait les fonctions des DC et/ou des lymphocytes Treg en réponse aux molécules allergisantes. Nrf2 serait un senseur de la reconnaissance des signaux de danger.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Jusqu'à présent de nombreuses études ont démontré le rôle clef du facteur de transcription Nrf2 dans le contrôle des réactions inflammatoires médiées par le stress oxydant (Motohashi and Yamamoto, 2004; Chen *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2013). Cependant, aucune étude n'a montré son rôle dans l'allergie cutanée.

Il a été montré que Nrf2 est activé en réponse à des molécules allergisantes (Natsch and Emter, 2008; Natsch *et al.*, 2013) et non pas en réponse aux molécules irritantes (Ade *et al.*, 2009). Notre travail a permis, pour la première fois, de montrer le rôle de Nrf2 dans (**1**) le contrôle de la survie des DC *via* l'expression de *bcl-2* et de ses gènes cibles antioxydants et (**2**) le contrôle de la réaction inflammatoire d'origine allergique en réponse à des molécules chimiques, et ce quelle que soit leur réactivité.

Dans ce travail, nous montrons que Nrf2 joue le rôle de senseur du signal de danger. L'accumulation de ce facteur de transcription en réponse aux molécules allergisantes dans les DC participe à un rôle protecteur. En effet, en son absence, l'expression de gènes codant pour *bcl-2* et d'autres gènes antioxydants sont moins voir plus du tout exprimés dans les DC stimulées par les molécules allergisantes. Ainsi, les DC meurent par apoptose *via* un mécanisme caspase dépendant. Selon les molécules chimiques allergisantes, le mécanisme semble ERO dépendant.

Ce facteur de transcription Nrf2 est démontré dans ce travail comme jouant un rôle clef dans la réponse allergique cutanée. Nrf2 est central dans la régulation de la réponse inflammatoire cutanée tant spécifique (HSC) que non spécifique (irritation). Par ailleurs, Nrf2 contrôle également la prolifération cellulaire au sein des ganglions drainant au point d'exposition (LLNA). Cette régulation de la réponse inflammatoire en réponse aux molécules chimiques n'est pas exclusive aux composés à réactivité Cys. Les composés connus pour induire des allergies respiratoires telles que les anhydrides (TMA & PA) sont contrôlés aussi par Nrf2. L'expérience en réponse au Nickel, signal de danger (Boisleve *et al.*, 2004), quant à elle, souligne le rôle de Nrf2 en tant que senseur de ce signal.

L'analyse transcriptomique du tissu cutané au cours de la phase de sensibilisation, nous a permis d'identifier différents gènes antioxydants, des enzymes de phase II et des gènes impliqués dans l'inflammation qui sont régulés par Nrf2. Cette étude montre aussi que Nrf2 régule positivement les gènes impliqués dans la réparation cutanée tels que les *mmp*, ainsi

que d'autres gènes tels que l'*il-24* & l'*il-19*, toutes deux réprimées chez les souris *nrf2*$^{-/-}$ en réponse au DNCB.

Nous avons également montré que Nrf2 régule l'état inflammatoire des DC qui contribue à une exacerbation de la réponse spécifique et régule la tolérance cutanée en réponse aux molécules chimiques allergisantes. Nrf2 jouerait un rôle clef dans la tolérance cutanée *via* les DC.

Ainsi ce travail ouvre de nombreuses perspectives : ① quel est rôle exact de Nrf2 dans la fonction des DC ?, ② quel est le rôle de Nrf2 dans l'activation d'une réponse tolérante ?, ③ quel est rôle de Nrf2 dans la régulation d'autres acteurs cellulaires de la réponse HSC ?

Nous envisageons, en collaboration avec Sandrine Henri (Marseille - Luminy, INSERM U1104 et CNRS UMR-7280), d'étudier les différentes sous-populations de DC cutanées à l'homéostasie afin de savoir si Nrf2 les contrôle. Nous étudierons également la migration des DC vers les ganglions drainants après sensibilisation ainsi que les sous-populations lymphocytaires activés au sein du ganglion. Des résultats préliminaires effectués au cours de la phase de sensibilisation suite à une application du FITC montrent que les DC *nrf2*$^{-/-}$ migrent plus rapidement que les DC *nrf2*$^{+/+}$.

Comme les souris *nrf2*$^{-/-}$ présentent un seuil d'irritation et de sensibilisation beaucoup plus faible que les souris *nrf2*$^{+/+}$, les différentes populations de DC cutanées présentes dans les souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$ seront caractérisées. Pour cela, nous disposerons de souris *nrf2* floxées (Collaboraton Jaiswal, USA) afin de travailler spécifiquement sur les DC invalidées en *nrf2* dans la souris. A l'état basal, le tissu cutané des souris *nrf2*$^{+/+}$ et *nrf2*$^{-/-}$ sera également étudié afin de savoir si les souris *nrf2* présentent un défaut cutané.

L'absence de Nrf2 montre une exacerbation de la réaction inflammatoire en réponse aux molécules allergisantes. Notre étude de tolérance montre bien le rôle de Nrf2 dans la régulation de la réponse inflammatoire. A partir de l'observation faite montrant que les souris *nrf2*$^{-/-}$ possèdent moins de LT régulateurs en réponse au DNCB, nous proposons de réaliser des croisements de souris *nrf2*$^{-/-}$ avec des souris Foxp3-GFP, dont dispose l'unité UMR-996. Ceci nous permettra d'étudier le rôle de Nrf2 dans la distribution des Treg en réponse à des molécules allergisantes.

La réaction inflammatoire d'origine allergique est caractérisée par un afflux de différentes cellules vers la peau telles que les LT (Akiba *et al.*, 2002), les neutrophiles (Mocsai, 2013), les mastocytes (Theoharides and Kalogeromitros, 2006; Theoharides *et al.*, 2012) et les macrophages (Sato *et al.*, 1998; McCormick *et al.*, 2000). La caractérisation des différentes populations de cellules infiltrant la peau après la phase de sensibilisation ou d'élicitation sera également étudiée. Nos résultats préliminaires montrent que les souris *nrf2*$^{-/-}$ présentent plus de neutrophiles dans la peau en réponse au DNCB.

Nrf2 est exprimé dans les neutrophiles et régulé négativement en réponse à de *stimuli* tels que le LPS (Zhang *et al.*, 2004). Par ailleurs, Weber *et al.,* ont montré que l'absence des neutrophiles au cours de la phase de sensibilisation ou d'élicitation diminue la réponse inflammatoire d'origine allergique (Weber *et al.,* ERGECD 2012). Afin d'adresser le rôle des neutrophiles dans le modèle de souris *nrf2*$^{-/-}$, des croisements de souris mrp8 (myeloid related protein8)-cre et de souris *nrf2*^{flox} seront réalisés (Stroncek *et al.*, 2005). Ainsi nous pourrons étudier le rôle de Nrf2 et des neutrophiles dans la réponse inflammatoire d'origine allergique.

Toutes ces études nous permettront d'identifier les différents acteurs impliqués dans la réponse inflammatoire cutanée d'origine allergique contrôlés par Nrf2. *In fine*, ces travaux contribueront à une meilleure connaissance au cours des allergies des mécanismes de régulation par Nrf2, protéine constituant une nouvelle cible thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

A

Aboul-Enein, H. Y., I. Kruk, A. Kladna, K. Lichszteld and T. Michalska (2007). "Scavenging effects of phenolic compounds on reactive oxygen species." Biopolymers **86**(3): 222-230.

Adam, J., W. J. Pichler and D. Yerly (2011). "Delayed drug hypersensitivity: models of T-cell stimulation." Br J Clin Pharmacol **71**(5): 701-707.

Ade, N., F. Leon, M. Pallardy, J. L. Peiffer, S. Kerdine-Romer, M. H. Tissier, P. A. Bonnet, I. Fabre and J. C. Ourlin (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**(2): 451-460.

Adenuga, D., S. Caito, H. Yao, I. K. Sundar, J. W. Hwang, S. Chung and I. Rahman (2010). "Nrf2 deficiency influences susceptibility to steroid resistance via HDAC2 reduction." Biochemical and biophysical research communications **403**(3-4): 452-456.

Ainscough, J. S., G. Frank Gerberick, R. J. Dearman and I. Kimber (2012). "Danger, intracellular signaling, and the orchestration of dendritic cell function in skin sensitization." J Immunotoxicol.

Ak, T. and I. Gulcin (2008). "Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin." Chem Biol Interact **174**(1): 27-37.

Akdis, M., O. Palomares, W. van de Veen, M. van Splunter and C. A. Akdis (2012). "TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection." J Allergy Clin Immunol **129**(6): 1438-1449; quiz1450-1431.

Akiba, H., J. Kehren, M. T. Ducluzeau, M. Krasteva, F. Horand, D. Kaiserlian, F. Kaneko and J. F. Nicolas (2002). "Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8+ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis." Journal of immunology **168**(6): 3079-3087.

Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.

Alam, J., D. Stewart, C. Touchard, S. Boinapally, A. M. Choi and J. L. Cook (1999). "Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene." The Journal of biological chemistry **274**(37): 26071-26078.

Albanesi, C. (2010). "Keratinocytes in allergic skin diseases." Curr Opin Allergy Clin Immunol **10**(5): 452-456.

Albanesi, C., C. Scarponi, S. Sebastiani, A. Cavani, M. Federici, S. Sozzani and G. Girolomoni (2001). "A cytokine-to-chemokine axis between T lymphocytes and keratinocytes can favor Th1 cell accumulation in chronic inflammatory skin diseases." J Leukoc Biol **70**(4): 617-623.

Alcaide, P., S. L. King, C. J. Dimitroff, Y. C. Lim, R. C. Fuhlbrigge and F. W. Luscinskas (2007). "The 130-kDa glycoform of CD43 functions as an E-selectin ligand for activated Th1 cells in vitro and in delayed-type hypersensitivity reactions in vivo." The Journal of investigative dermatology **127**(8): 1964-1972.

Aleksic, M., C. K. Pease, D. A. Basketter, M. Panico, H. R. Morris and A. Dell (2007). "Investigating protein haptenation mechanisms of skin sensitisers using human serum albumin as a model protein." Toxicol In Vitro **21**(4): 723-733.

Alvarez, D., E. H. Vollmann and U. H. von Andrian (2008). "Mechanisms and consequences of dendritic cell migration." Immunity **29**(3): 325-342.

Andrews, N. C., H. Erdjument-Bromage, M. B. Davidson, P. Tempst and S. H. Orkin (1993). "Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein." Nature **362**(6422): 722-728.

Antonios, D., N. Ade, S. Kerdine-Romer, H. Assaf-Vandecasteele, A. Larange, H. Azouri and M. Pallardy (2009). "Metallic haptens induce differential phenotype of human dendritic cells through activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways." Toxicol In Vitro **23**(2): 227-234.

Antonopoulos, C., M. Cumberbatch, J. B. Mee, R. J. Dearman, X. Q. Wei, F. Y. Liew, I. Kimber and R. W. Groves (2008). "IL-18 is a key proximal mediator of contact hypersensitivity and allergen-induced Langerhans cell migration in murine epidermis." J Leukoc Biol **83**(2): 361-367.

Apopa, P. L., X. He and Q. Ma (2008). "Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells." J Biochem Mol Toxicol **22**(1): 63-76.

Aptula, A. O., D. W. Roberts and C. K. Pease (2007). "Haptens, prohaptens and prehaptens, or electrophiles and proelectrophiles." Contact Dermatitis **56**(1): 54-56.

Aractingi, S., F. Aubin, M. F. Avril, H. Bachelez, M. Bagot, A. Barbaud, N. Basset-Seguin, J. C. Beani, C. Bedane, F. Berard, P. Berbis, P. Bernard, M. Beylot-Barry, C. Bodemer, J. M. Bonnetblanc, F. Boralevi, I. Bourgault-Villada, F. Cambazard, F. Carsuzaa, F. Caux, J. Chevrant-Breton, O. Chosidow, A. Claudy, P. Couppie, B. Cribier, B. Crickx, E. Delaporte, O. Dereure, V. Descamps, M. S. Doutre, B. Dreno, N. Dupin, M. Faure, C. Frances, F. Grange, J. J. Grob, G. Guillet, B. Guillot, S. H. Rabia, P. Humbert, M. d'Incan, P. Joly, D. Jullien, J. P. Lacour, L. Laroche, C. Lebbe, M. T. Leccia, D. Leroy, D. Lipsker, C. Lok, G. Lorette, L. Machet, E. Mahe, L. Martin, J. Mazereeuw-Hautier, L. Meunier, L. Misery, P. Modiano, J. J. Morand, P. Morel, L. Mortier, P.

Musette, J. F. Nicolas, J. P. Ortonne, C. Paul, F. Piette, C. Prost, J. Revuz, M. A. Richard, J. C. Roujeau, P. Saiag, J. L. Schmutz, P. Souteyrand, J. F. Stalder, P. E. Stoebner, A. Taieb, L. Thomas, P. Thomas, P. Vabres, L. Vaillant, L. Verneuil, M. Viguier, D. Wallach, P. Wolkenstein, C. Drobacheff and Cedef (2012). "Mucocutaneous Allergies in children and adults: contact eczema." Ann Dermatol Vener **139**(11): A78-A84.

Arens, R. and S. P. Schoenberger (2010). "Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation." Immunol Rev **235**(1): 190-205.

Ariga, H., K. Takahashi-Niki, I. Kato, H. Maita, T. Niki and S. M. Iguchi-Ariga (2013). "Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease." Oxidative medicine and cellular longevity **2013**: 683920.

Arlt, A., S. Sebens, S. Krebs, C. Geismann, M. Grossmann, M. L. Kruse, S. Schreiber and H. Schafer (2013). "Inhibition of the Nrf2 transcription factor by the alkaloid trigonelline renders pancreatic cancer cells more susceptible to apoptosis through decreased proteasomal gene expression and proteasome activity." Oncogene **32**(40): 4825-4835.

Artaud-Macari, E., D. Goven, S. Brayer, A. Hamimi, V. Besnard, J. Marchal-Somme, Z. E. Ali, B. Crestani, S. Kerdine-Romer, A. Boutten and M. Bonay (2013). "Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 nuclear translocation induces myofibroblastic dedifferentiation in idiopathic pulmonary fibrosis." Antioxidants & redox signaling **18**(1): 66-79.

Arthur, J. C., J. D. Lich, Z. Ye, I. C. Allen, D. Gris, J. E. Wilson, M. Schneider, K. E. Roney, B. P. O'Connor, C. B. Moore, A. Morrison, F. S. Sutterwala, J. Bertin, B. H. Koller, Z. Liu and J. P. Ting (2010). "Cutting edge: NLRP12 controls dendritic and myeloid cell migration to affect contact hypersensitivity." Journal of immunology **185**(8): 4515-4519.

Artik, S., K. Haarhuis, X. Wu, J. Begerow and E. Gleichmann (2001). "Tolerance to nickel: oral nickel administration induces a high frequency of anergic T cells with persistent suppressor activity." J Immunol **167**(12): 6794-6803.

Askenase, P. W., M. Szczepanik, A. Itakura, C. Kiener and R. A. Campos (2004). "Extravascular T-cell recruitment requires initiation begun by Valpha14+ NKT cells and B-1 B cells." Trends Immunol **25**(8): 441-449.

Aw Yeang, H. X., J. M. Hamdam, L. M. Al-Huseini, S. Sethu, L. Djouhri, J. Walsh, N. Kitteringham, B. K. Park, C. E. Goldring and J. G. Sathish (2012). "Loss of transcription factor nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) leads to dysregulation of immune functions, redox homeostasis, and intracellular signaling in dendritic cells." The Journal of biological chemistry **287**(13): 10556-10564.

Awasthi, A. and V. K. Kuchroo (2009). "Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection." Int Immunol **21**(5): 489-498.

B

Baird, L. and A. T. Dinkova-Kostova (2011). "The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway." Arch Toxicol **85**(4): 241-272.

Balogun, E., M. Hoque, P. Gong, E. Killeen, C. J. Green, R. Foresti, J. Alam and R. Motterlini (2003). "Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element." Biochem J **371**(Pt 3): 887-895.

Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.

Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-252.

Bangert, C., P. M. Brunner and G. Stingl (2011). "Immune functions of the skin." Clin Dermatol **29**(4): 360-376.

Banning, A., S. Deubel, D. Kluth, Z. Zhou and R. Brigelius-Flohe (2005). "The GI-GPx gene is a target for Nrf2." Mol Cell Biol **25**(12): 4914-4923.

Basketter, D., A. Dooms-Goossens, A. T. Karlberg and J. P. Lepoittevin (1995). "The chemistry of contact allergy: why is a molecule allergenic?" Contact Dermatitis **32**(2): 65-73.

Bedard, K. and K. H. Krause (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." Physiol Rev **87**(1): 245-313.

Bedoui, S., P. G. Whitney, J. Waithman, L. Eidsmo, L. Wakim, I. Caminschi, R. S. Allan, M. Wojtasiak, K. Shortman, F. R. Carbone, A. G. Brooks and W. R. Heath (2009). "Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells." Nature immunology **10**(5): 488-495.

Benson, A. M., R. P. Batzinger, S. Y. Ou, E. Bueding, Y. N. Cha and P. Talalay (1978). "Elevation of hepatic glutathione S-transferase activities and protection against mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene by dietary antioxidants." Cancer Res **38**(12): 4486-4495.

Benson, M. J., K. Pino-Lagos, M. Rosemblatt and R. J. Noelle (2007). "All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation." The Journal of experimental medicine **204**(8): 1765-1774.

Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-238.

Biedermann, T., M. Kneilling, R. Mailhammer, K. Maier, C. A. Sander, G. Kollias, S. L. Kunkel, L. Hultner and M. Rocken (2000). "Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2." The Journal of experimental medicine **192**(10): 1441-1452.

Bischoff, S. C. (2007). "Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data." Nature reviews. Immunology **7**(2): 93-104.

Biswal, S., R. K. Thimmulappa and C. J. Harvey (2012). "Experimental therapeutics of Nrf2 as a target for prevention of bacterial exacerbations in COPD." Proc Am Thorac Soc **9**(2): 47-51.

Biswas, M. and J. Y. Chan (2010). "Role of Nrf1 in antioxidant response element-mediated gene expression and beyond." Toxicol Appl Pharmacol **244**(1): 16-20.

Bitar, M. S., C. Liu, A. Ziaei, Y. Chen, T. Schmedt and U. V. Jurkunas (2012). "Decline in DJ-1 and decreased nuclear translocation of Nrf2 in Fuchs endothelial corneal dystrophy." Invest Ophthalmol Vis Sci **53**(9): 5806-5813.

Blauvelt, A., H. Asada, V. Klaus-Kovtun, D. J. Altman, D. R. Lucey and S. I. Katz (1996). "Interleukin-15 mRNA is expressed by human keratinocytes Langerhans cells, and blood-derived dendritic cells and is downregulated by ultraviolet B radiation." J Invest Dermatol **106**(5): 1047-1052.

Board, P. G. and D. Menon (2013). "Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology." Biochim Biophys Acta **1830**(5): 3267-3288.

Boesch-Saadatmandi, C., A. E. Wagner, A. C. Graeser, C. Hundhausen, S. Wolffram and G. Rimbach (2009). "Ochratoxin A impairs Nrf2-dependent gene expression in porcine kidney tubulus cells." J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) **93**(5): 547-554.

Boisleve, F., S. Kerdine-Romer, N. Rougier-Larzat and M. Pallardy (2004). "Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF-alpha and MAPK." The Journal of investigative dermatology **123**(3): 494-502.

Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig and R. M. Steinman (2002). "Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance." The Journal of experimental medicine **196**(12): 1627-1638.

Bonneville, M., C. Chavagnac, M. Vocanson, A. Rozieres, J. Benetiere, I. Pernet, A. Denis, J. F. Nicolas and A. Hennino (2007). "Skin contact irritation conditions the development and severity of allergic contact dermatitis." The Journal of investigative dermatology **127**(6): 1430-1435.

Borkowski, T. A., J. J. Letterio, A. G. Farr and M. C. Udey (1996). "A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells." The Journal of experimental medicine **184**(6): 2417-2422.

Bouaziz, J. D., K. Yanaba and T. F. Tedder (2008). "Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation." Immunol Rev **224**: 201-214.

Boutten, A., D. Goven, E. Artaud-Macari and M. Bonay (2011). "[Protective role of Nrf2 in the lungs against oxidative airway diseases]." Medecine sciences : M/S **27**(11): 966-972.

Boutten, A., D. Goven, J. Boczkowski and M. Bonay (2010). "Oxidative stress targets in pulmonary emphysema: focus on the Nrf2 pathway." Expert Opin Ther Targets **14**(3): 329-346.

Brieger, K., S. Schiavone, F. J. Miller, Jr. and K. H. Krause (2012). "Reactive oxygen species: from health to disease." Swiss Med Wkly **142**: w13659.

Brigelius-Flohe, R. and M. Maiorino (2013). "Glutathione peroxidases." Biochim Biophys Acta **1830**(5): 3289-3303.

Brunelle, J. K. and A. Letai (2009). "Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family." J Cell Sci **122**(Pt 4): 437-441.

Byamba, D., T. G. Kim, D. H. Kim, J. H. Je and M. G. Lee (2010). "The Roles of Reactive Oxygen Species Produced by Contact Allergens and Irritants in Monocyte-derived Dendritic Cells." Ann Dermatol **22**(3): 269-278.

C

Cai, Y., X. Shen, C. Ding, C. Qi, K. Li, X. Li, V. R. Jala, H. G. Zhang, T. Wang, J. Zheng and J. Yan (2011). "Pivotal role of dermal IL-17-producing gammadelta T cells in skin inflammation." Immunity **35**(4): 596-610.

Campbell, J. J., G. Haraldsen, J. Pan, J. Rottman, S. Qin, P. Ponath, D. P. Andrew, R. Warnke, N. Ruffing, N. Kassam, L. Wu and E. C. Butcher (1999). "The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells." Nature **400**(6746): 776-780.

Campos, R. A., M. Szczepanik, A. Itakura, M. Akahira-Azuma, S. Sidobre, M. Kronenberg and P. W. Askenase (2003). "Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant Valpha14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity." The Journal of experimental medicine **198**(12): 1785-1796.

Campos, R. A., M. Szczepanik, A. Itakura, M. Lisbonne, N. Dey, M. C. Leite-de-Moraes and P. W. Askenase (2006). "Interleukin-4-dependent innate collaboration between iNKT cells and B-1 B cells controls adaptative contact sensitivity." Immunology **117**(4): 536-547.

Cattani, F., A. Gallese, M. Mosca, P. Buanne, L. Biordi, S. Francavilla, G. Coletti, L. Pellegrini, G. Melillo and R. Bertini (2006). "The role of CXCR2 activity in the contact hypersensitivity response in mice." Eur Cytokine Netw **17**(1): 42-48.

Cavani, A., O. De Pita and G. Girolomoni (2007). "New aspects of the molecular basis of contact allergy." Curr Opin Allergy Clin Immunol **7**(5): 404-408.

Cavin, C., T. Delatour, M. Marin-Kuan, D. Holzhauser, L. Higgins, C. Bezencon, G. Guignard, S. Junod, J. Richoz-Payot, E. Gremaud, J. D. Hayes, S. Nestler, P. Mantle and B. Schilter (2007). "Reduction in antioxidant defenses may contribute to ochratoxin A toxicity and carcinogenicity." Toxicol Sci **96**(1): 30-39.

Chan, J. Y., M. Kwong, R. Lu, J. Chang, B. Wang, T. S. Yen and Y. W. Kan (1998). "Targeted disruption of the ubiquitous CNC-bZIP transcription factor, Nrf-1, results in anemia and embryonic lethality in mice." Embo J **17**(6): 1779-1787.

Chanas, S. A., Q. Jiang, M. McMahon, G. K. McWalter, L. I. McLellan, C. R. Elcombe, C. J. Henderson, C. R. Wolf, G. J. Moffat, K. Itoh, M. Yamamoto and J. D. Hayes (2002). "Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice." The Biochemical journal **365**(Pt 2): 405-416.

Chen, A. I., A. J. McAdam, J. E. Buhlmann, S. Scott, M. L. Lupher, Jr., E. A. Greenfield, P. R. Baum, W. C. Fanslow, D. M. Calderhead, G. J. Freeman and A. H. Sharpe (1999). "Ox40-ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell:T cell interactions." Immunity **11**(6): 689-698.

Chen, C. C., H. L. Chen, C. W. Hsieh, Y. L. Yang and B. S. Wung (2011a). "Upregulation of NF-E2-related factor-2-dependent glutathione by carnosol provokes a cytoprotective response and enhances cell survival." Acta Pharmacol Sin **32**(1): 62-69.

Chen, Q., Y. C. Kim, A. Laurence, G. A. Punkosdy and E. M. Shevach (2011b). "IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF-beta-induced Foxp3+ T cells in vivo." Journal of immunology **186**(11): 6329-6337.

Chen, W., Z. Sun, X. J. Wang, T. Jiang, Z. Huang, D. Fang and D. D. Zhang (2009). "Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response." Mol Cell **34**(6): 663-673.

Chen, X. L., G. Dodd, S. Thomas, X. Zhang, M. A. Wasserman, B. H. Rovin and C. Kunsch (2006). "Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(5): H1862-1870.

Chen, Z., E. F. Pittman, J. Romaguera, L. Fayad, M. Wang, S. S. Neelapu, P. McLaughlin, L. Kwak and N. McCarty (2013). "Nuclear Translocation of B-Cell-Specific Transcription Factor, BACH2, Modulates ROS Mediated Cytotoxic Responses in Mantle Cell Lymphoma." PloS one **8**(8): e69126.

Cheng, A. S., Y. H. Cheng, C. H. Chiou and T. L. Chang (2012). "Resveratrol upregulates Nrf2 expression to attenuate methylglyoxal-induced insulin resistance in Hep G2 cells." J Agric Food Chem **60**(36): 9180-9187.

Chevillard, G., Z. Nouhi, D. Anna, M. Paquet and V. Blank (2010). "Nrf3-deficient mice are not protected against acute lung and adipose tissue damages induced by butylated hydroxytoluene." FEBS Lett **584**(5): 923-928.

Chipinda, I., J. M. Hettick and P. D. Siegel (2011). "Haptenation: chemical reactivity and protein binding." J Allergy (Cairo) **2011**: 839682.

Cho, H. Y., S. P. Reddy and S. R. Kleeberger (2006). "Nrf2 defends the lung from oxidative stress." Antioxidants & redox signaling **8**(1-2): 76-87.

Cho, J. M., S. Manandhar, H. R. Lee, H. M. Park and M. K. Kwak (2008). "Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: implication to cancer cell resistance." Cancer Lett **260**(1-2): 96-108.

Christensen, A. D. and C. Haase (2012). "Immunological mechanisms of contact hypersensitivity in mice." Apmis **120**(1): 1-27.

Chu, C. C., P. Di Meglio and F. O. Nestle (2011). "Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases." Semin Immunol **23**(1): 28-41.

Clark, R. A., B. Chong, N. Mirchandani, N. K. Brinster, K. Yamanaka, R. K. Dowgiert and T. S. Kupper (2006). "The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin." Journal of immunology **176**(7): 4431-4439.

Clark, R. A. and T. S. Kupper (2007). "IL-15 and dermal fibroblasts induce proliferation of natural regulatory T cells isolated from human skin." Blood **109**(1): 194-202.

Clements, C. M., R. S. McNally, B. J. Conti, T. W. Mak and J. P. Ting (2006). "DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(41): 15091-15096.

Conrad, C., S. Meller and M. Gilliet (2009). "Plasmacytoid dendritic cells in the skin: to sense or not to sense nucleic acids." Semin Immunol **21**(3): 101-109.

Copple, I. M., C. E. Goldring, N. R. Kitteringham and B. K. Park (2010). "The keap1-nrf2 cellular defense pathway: mechanisms of regulation and role in protection against drug-induced toxicity." Handb Exp Pharmacol(196): 233-266.

Cornejo, P., R. Vargas and L. A. Videla (2013). "Nrf2-regulated phase-II detoxification enzymes and phase-III transporters are induced by thyroid hormone in rat liver." Biofactors.

Crapo, J. D., T. Oury, C. Rabouille, J. W. Slot and L. Y. Chang (1992). "Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(21): 10405-10409.

Cumberbatch, M., R. J. Dearman, C. E. Griffiths and I. Kimber (2003). "Epidermal Langerhans cell migration and sensitisation to chemical allergens." Apmis **111**(7-8): 797-804.

Cumberbatch, M., R. J. Dearman and I. Kimber (1997a). "Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 beta for migration." Adv Exp Med Biol **417**: 125-128.

Cumberbatch, M., R. J. Dearman and I. Kimber (1997b). "Stimulation of Langerhans cell migration in mice by tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 beta." Adv Exp Med Biol **417**: 121-124.

D

D'Autreaux, B. and M. B. Toledano (2007). "ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 813-824.

D'Cruz, L. M. and L. Klein (2005). "Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling." Nature immunology **6**(11): 1152-1159.

Dallas, S., D. S. Miller and R. Bendayan (2006). "Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system." Pharmacol Rev **58**(2): 140-161.

Debenedictis, C., S. Joubeh, G. Zhang, M. Barria and R. F. Ghohestani (2001). "Immune functions of the skin." Clin Dermatol **19**(5): 573-585.

Derrickson, D. and Tortora, G. (2007). Principes d'anatomie et de physiologie, chapter 5, page 155-160.

Dhakshinamoorthy, S., A. K. Jain, D. A. Bloom and A. K. Jaiswal (2005). "Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants." J Biol Chem **280**(17): 16891-16900.

Dilulio, N. A., T. Engeman, D. Armstrong, C. Tannenbaum, T. A. Hamilton and R. L. Fairchild (1999). "Groalpha-mediated recruitment of neutrophils is required for elicitation of contact hypersensitivity." Eur J Immunol **29**(11): 3485-3495.

Divkovic, M., C. K. Pease, G. F. Gerberick and D. A. Basketter (2005). "Hapten-protein binding: from theory to practical application in the in vitro prediction of skin sensitization." Contact Dermatitis **53**(4): 189-200.

Doutre, M. S. (2009). "Cutaneous immune system." Ann Dermatol Vener **136**: S257-S262.

Dreno, B. (2009). "Anatomy and physiology of skin and cutaneous annexes." Ann Dermatol Vener **136**: S247-S251.

Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev **82**(1): 47-95.

Dubois, B., L. Chapat, A. Goubier, M. Papiernik, J. F. Nicolas and D. Kaiserlian (2003). "Innate CD4+CD25+ regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8+ T cells mediating skin inflammation." Blood **102**(9): 3295-3301.

Dudeck, A., J. Dudeck, J. Scholten, A. Petzold, S. Surianarayanan, A. Kohler, K. Peschke, D. Vohringer, C. Waskow, T. Krieg, W. Muller, A. Waisman, K. Hartmann, M. Gunzer and A. Roers (2011). "Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens." Immunity **34**(6): 973-984.

Dustin, M. L. (2008). "T-cell activation through immunological synapses and kinapses." Immunol Rev **221**: 77-89.

Dzionek, A., Y. Sohma, J. Nagafune, M. Cella, M. Colonna, F. Facchetti, G. Gunther, I. Johnston, A. Lanzavecchia, T. Nagasaka, T. Okada, W. Vermi, G. Winkels, T. Yamamoto, M. Zysk, Y. Yamaguchi and J. Schmitz (2001). "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction." J Exp Med **194**(12): 1823-1834.

E

Ebert, L. M., P. Schaerli and B. Moser (2005). "Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues." Mol Immunol **42**(7): 799-809.

Eggler, A. L., E. Small, M. Hannink and A. D. Mesecar (2009). "Cul3-mediated Nrf2 ubiquitination and antioxidant response element (ARE) activation are dependent on the partial molar volume at position 151 of Keap1." The Biochemical journal **422**(1): 171-180.

El Ali, Z., C. Gerbeix, P. Hemon, P. R. Esser, S. F. Martin, M. Pallardy and S. Kerdine-Romer (2013). "Allergic Skin Inflammation Induced by Chemical Sensitizers Is Controlled by the Transcription Factor Nrf2." Toxicol Sci.

Emter, R., G. Ellis and A. Natsch (2010). "Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro." Toxicol Appl Pharmacol **245**(3): 281-290.

Engel, D., U. Dobrindt, A. Tittel, P. Peters, J. Maurer, I. Gutgemann, B. Kaissling, W. Kuziel, S. Jung and C. Kurts (2006). "Tumor necrosis factor alpha- and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells are rapidly recruited to the bladder in urinary tract infection but are dispensable for bacterial clearance." Infect Immun **74**(11): 6100-6107.

Engeman, T., A. V. Gorbachev, D. D. Kish and R. L. Fairchild (2004). "The intensity of neutrophil infiltration controls the number of antigen-primed CD8 T cells recruited into cutaneous antigen challenge sites." J Leukoc Biol **76**(5): 941-949.

Engeman, T. M., A. V. Gorbachev, R. P. Gladue, P. S. Heeger and R. L. Fairchild (2000). "Inhibition of functional T cell priming and contact hypersensitivity responses by treatment with anti-secondary lymphoid chemokine antibody during hapten sensitization." J Immunol **164**(10): 5207-5214.

Enk, A. H. and S. I. Katz (1992). "Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10." J Immunol **149**(1): 92-95.

Enomoto, A., K. Itoh, E. Nagayoshi, J. Haruta, T. Kimura, T. O'Connor, T. Harada and M. Yamamoto (2001). "High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes." Toxicol Sci **59**(1): 169-177.

Erickson, A. M., Z. Nevarea, J. J. Gipp and R. T. Mulcahy (2002). "Identification of a variant antioxidant response element in the promoter of the human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene. Revision of the ARE consensus sequence." The Journal of biological chemistry **277**(34): 30730-30737.

Esser, P. R., U. Wolfle, C. Durr, F. D. von Loewenich, C. M. Schempp, M. A. Freudenberg, T. Jakob and S. F. Martin (2012). "Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation." PLoS One **7**(7): e41340.

F

Faraci, F. M. and S. P. Didion (2004). "Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(8): 1367-1373.

Fitzpatrick (2007). Atlas en couleurs de dermatologie clinique, Medecine-Sciences.

Flier, J., D. M. Boorsma, P. J. van Beek, C. Nieboer, T. J. Stoof, R. Willemze and C. P. Tensen (2001). "Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of skin inflammation." J Pathol **194**(4): 398-405.

Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2005). "A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells." Nature immunology **6**(11): 1142-1151.

Forster, R., A. Braun and T. Worbs (2012). "Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics." Trends Immunol **33**(6): 271-280.

Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf and M. Lipp (1999). "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs." Cell **99**(1): 23-33.

Fritz, J. H., S. E. Girardin, C. Fitting, C. Werts, D. Mengin-Lecreulx, M. Caroff, J. M. Cavaillon, D. J. Philpott and M. Adib-Conquy (2005). "Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists." Eur J Immunol **35**(8): 2459-2470.

Fukunaga, A., N. M. Khaskhely, Y. Ma, C. S. Sreevidya, K. Taguchi, C. Nishigori and S. E. Ullrich (2010). "Langerhans cells serve as immunoregulatory cells by activating NKT cells." Journal of immunology **185**(8): 4633-4640.

G

Galli, S. J. and I. Hammel (1984). "Unequivocal delayed hypersensitivity in mast cell-deficient and beige mice." Science **226**(4675): 710-713.

Gallucci, S. and P. Matzinger (2001). "Danger signals: SOS to the immune system." Curr Opin Immunol **13**(1): 114-119.

Gardes-Albert, M., D. Bonnefont-Rousselot, Z. Abedinzadeh and D. Jore (2003). "Reactive oxygen species. How oxygen may become toxic?" Actual Chimique(11-12): 91-96.

Garg, A., M. M. Chren, L. P. Sands, M. S. Matsui, K. D. Marenus, K. R. Feingold and P. M. Elias (2001). "Psychological stress perturbs epidermal permeability barrier homeostasis: implications for the pathogenesis of stress-associated skin disorders." Arch Dermatol **137**(1): 53-59.

Gehrie, E., W. Van der Touw, J. S. Bromberg and J. C. Ochando (2011). "Plasmacytoid dendritic cells in tolerance." Methods Mol Biol **677**: 127-147.

Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk and C. G. Figdor (2000). "Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses." Cell **100**(5): 575-585.

Gerlini, G., H. P. Hefti, M. Kleinhans, B. J. Nickoloff, G. Burg and F. O. Nestle (2001). "Cd1d is expressed on dermal dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells." The Journal of investigative dermatology **117**(3): 576-582.

Ginhoux, F., K. Liu, J. Helft, M. Bogunovic, M. Greter, D. Hashimoto, J. Price, N. Yin, J. Bromberg, S. A. Lira, E. R. Stanley, M. Nussenzweig and M. Merad (2009). "The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs." J Exp Med **206**(13): 3115-3130.

Girard-Madoux, M. J., J. M. Kel, B. Reizis and B. E. Clausen (2012). "IL-10 controls dendritic cell-induced T-cell reactivation in the skin to limit contact hypersensitivity." J Allergy Clin Immunol **129**(1): 143-150 e141-110.

Girardi, M., J. Lewis, E. Glusac, R. B. Filler, L. Geng, A. C. Hayday and R. E. Tigelaar (2002). "Resident skin-specific gammadelta T cells provide local, nonredundant regulation of cutaneous inflammation." The Journal of experimental medicine **195**(7): 855-867.

Godfrey, D. I. and S. P. Berzins (2007). "Control points in NKT-cell development." Nature reviews. Immunology **7**(7): 505-518.

Goel, A., A. B. Kunnumakkara and B. B. Aggarwal (2008). "Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic." Biochemical pharmacology **75**(4): 787-809.

Goldring, C. E., N. R. Kitteringham, R. Elsby, L. E. Randle, Y. N. Clement, D. P. Williams, M. McMahon, J. D. Hayes, K. Itoh, M. Yamamoto and B. K. Park (2004). "Activation of hepatic Nrf2 in vivo by acetaminophen in CD-1 mice." Hepatology **39**(5): 1267-1276.

Gomez de Aguero, M., M. Vocanson, F. Hacini-Rachinel, M. Taillardet, T. Sparwasser, A. Kissenpfennig, B. Malissen, D. Kaiserlian and B. Dubois (2012). "Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8(+) T cells and activating Foxp3(+) regulatory T cells." The Journal of clinical investigation **122**(5): 1700-1711.

Goossens, A. (2006). "How to test for allergic contact dermatitis to cosmetics?" Rev Fr Allergol **46**(3): 244-247.

Goossens, A. and J. P. Lepoittevin (2003). "Contact allergy to cosmetics and their perfume components: new clinical, chemical and diagnostic aspects." Rev Fr Allergol **43**(5): 294-300.

Gorbachev, A. V., N. A. DiIulio and R. L. Fairchild (2001). "IL-12 augments CD8+ T cell development for contact hypersensitivity responses and circumvents anti-CD154 antibody-mediated inhibition." Journal of immunology **167**(1): 156-162.

Gorbachev, A. V. and R. L. Fairchild (2001). "Induction and regulation of T-cell priming for contact hypersensitivity." Crit Rev Immunol **21**(5): 451-472.

Goubier, A., B. Dubois, H. Gheit, G. Joubert, F. Villard-Truc, C. Asselin-Paturel, G. Trinchieri and D. Kaiserlian (2008). "Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance." Immunity **29**(3): 464-475.

Goubier, A., M. Vocanson, C. Macari, G. Poyet, A. Herbelin, J. F. Nicolas, B. Dubois and D. Kaiserlian (2013). "Invariant NKT cells suppress CD8(+) T-cell-mediated allergic contact dermatitis independently of regulatory CD4(+) T cells." The Journal of investigative dermatology **133**(4): 980-987.

Goven, D., A. Boutten, V. Lecon-Malas, J. Marchal-Somme, N. Amara, B. Crestani, M. Fournier, G. Leseche, P. Soler, J. Boczkowski and M. Bonay (2008). "Altered Nrf2/Keap1-Bach1 equilibrium in pulmonary emphysema." Thorax **63**(10): 916-924.

Gozzelino, R., V. Jeney and M. P. Soares (2010). "Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1." Annual review of pharmacology and toxicology **50**: 323-354.

Granado-Serrano, A. B., M. A. Martin, L. Bravo, L. Goya and S. Ramos (2012). "Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells: Involvement of p38." Chem Biol Interact **195**(2): 154-164.

Gregori, S., D. Tomasoni, V. Pacciani, M. Scirpoli, M. Battaglia, C. F. Magnani, E. Hauben and M. G. Roncarolo (2010). "Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway." Blood **116**(6): 935-944.

Gregorio, J., S. Meller, C. Conrad, A. Di Nardo, B. Homey, A. Lauerma, N. Arai, R. L. Gallo, J. Digiovanni and M. Gilliet (2010). "Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons." The Journal of experimental medicine **207**(13): 2921-2930.

Griffin, M. D., W. Lutz, V. A. Phan, L. A. Bachman, D. J. McKean and R. Kumar (2001). "Dendritic cell modulation by 1alpha,25 dihydroxyvitamin D3 and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6800-6805.

Grimbaldeston, M. A., S. Nakae, J. Kalesnikoff, M. Tsai and S. J. Galli (2007). "Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B." Nature immunology **8**(10): 1095-1104.

Gros, E. and N. Novak (2012). "Cutaneous dendritic cells in allergic inflammation." Clin Exp Allergy **42**(8): 1161-1175.

Gschwandtner, M., K. Schakel, T. Werfel and R. Gutzmer (2011). "Histamine H(4) receptor activation on human slan-dendritic cells down-regulates their pro-inflammatory capacity." Immunology **132**(1): 49-56.

Guilliams, M., S. Henri, S. Tamoutounour, L. Ardouin, I. Schwartz-Cornil, M. Dalod and B. Malissen (2010). "From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets." Eur J Immunol **40**(8): 2089-2094.

Gunther, C., K. Blau, U. Forster, A. Viehweg, G. Wozel and K. Schakel (2013). "Reduction of inflammatory slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells in psoriatic skin of patients treated with etanercept." Exp Dermatol **22**(8): 535-540.

Gunther, C., J. Starke, N. Zimmermann and K. Schakel (2012). "Human 6-sulfo LacNAc (slan) dendritic cells are a major population of dermal dendritic cells in steady state and inflammation." Clin Exp Dermatol **37**(2): 169-176.

Gurish, M. F. and K. F. Austen (2012). "Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets." Immunity **37**(1): 25-33.

Gutowska-Owsiak, D. and G. S. Ogg (2012). "The epidermis as an adjuvant." The Journal of investigative dermatology **132**(3 Pt 2): 940-948.

Guttman-Yassky, E., M. A. Lowes, J. Fuentes-Duculan, J. Whynot, I. Novitskaya, I. Cardinale, A. Haider, A. Khatcherian, J. A. Carucci, R. Bergman and J. G. Krueger (2007). "Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis." J Allergy Clin Immunol **119**(5): 1210-1217.

H

Habif *et al.,* (2012). Maladies cutanées, diagnostic et traitement, 2ème edition, Elsevier Masson

Haniffa, M., A. Shin, V. Bigley, N. McGovern, P. Teo, P. See, P. S. Wasan, X. N. Wang, F. Malinarich, B. Malleret, A. Larbi, P. Tan, H. Zhao, M. Poidinger, S. Pagan, S. Cookson, R. Dickinson, I. Dimmick, R. F. Jarrett, L. Renia, J. Tam, C. Song, J. Connolly, J. K. Chan, A. Gehring, A. Bertoletti, M. Collin and F. Ginhoux (2012). "Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells." Immunity **37**(1): 60-73.

Hansel, A., C. Gunther, W. Baran, M. Bidier, H. M. Lorenz, M. Schmitz, M. Bachmann, T. Dobel, A. H. Enk and K. Schakel (2013). "Human 6-sulfo LacNAc (slan) dendritic cells have molecular and functional features of an important pro-inflammatory cell type in lupus erythematosus." J Autoimmun **40**: 1-8.

Hardison, S. E. and G. D. Brown (2012). "C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity." Nature immunology **13**(9): 817-822.

Harvey, C. J., R. K. Thimmulappa, A. Singh, D. J. Blake, G. Ling, N. Wakabayashi, J. Fujii, A. Myers and S. Biswal (2009). "Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress." Free Radic Biol Med **46**(4): 443-453.

Hasselbalch, H. C. (2013). "A role of NF-E2 in chronic inflammation and clonal evolution in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis?" Leuk Res.

Hayashi, A., H. Suzuki, K. Itoh, M. Yamamoto and Y. Sugiyama (2003). "Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts." Biochemical and biophysical research communications **310**(3): 824-829.

He, D., L. Wu, H. K. Kim, H. Li, C. A. Elmets and H. Xu (2009). "IL-17 and IFN-gamma mediate the elicitation of contact hypersensitivity responses by different mechanisms and both are required for optimal responses." Journal of immunology **183**(2): 1463-1470.

Heath, W. R. and F. R. Carbone (2013). "The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells." Nature immunology **14**(10): 978-985.

Henri, S., L. F. Poulin, S. Tamoutounour, L. Ardouin, M. Guilliams, B. de Bovis, E. Devilard, C. Viret, H. Azukizawa, A. Kissenpfennig and B. Malissen (2010). "CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells." J Exp Med **207**(1): 189-206.

Hirata, T., G. Merrill-Skoloff, M. Aab, J. Yang, B. C. Furie and B. Furie (2000). "P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration." The Journal of experimental medicine **192**(11): 1669-1676.

Homey, B., H. Alenius, A. Muller, H. Soto, E. P. Bowman, W. Yuan, L. McEvoy, A. I. Lauerma, T. Assmann, E. Bunemann, M. Lehto, H. Wolff, D. Yen, H. Marxhausen, W. To, J. Sedgwick, T. Ruzicka, P. Lehmann and A. Zlotnik (2002). "CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation." Nat Med **8**(2): 157-165.

Honda, T., G. Egawa, S. Grabbe and K. Kabashima (2013). "Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis." The Journal of investigative dermatology **133**(2): 303-315.

Honda, T., T. Matsuoka, M. Ueta, K. Kabashima, Y. Miyachi and S. Narumiya (2009). "Prostaglandin E(2)-EP(3) signaling suppresses skin inflammation in murine contact hypersensitivity." J Allergy Clin Immunol **124**(4): 809-818 e802.

Honda, T., Y. Miyachi and K. Kabashima (2011a). "Regulatory T cells in cutaneous immune responses." J Dermatol Sci **63**(2): 75-82.

Honda, T., A. Otsuka, H. Tanizaki, Y. Minegaki, K. Nagao, H. Waldmann, M. Tomura, S. Hori, Y. Miyachi and K. Kabashima (2011b). "Enhanced murine contact hypersensitivity by depletion of endogenous regulatory T cells in the sensitization phase." J Dermatol Sci **61**(2): 144-147.

Hong, F., K. R. Sekhar, M. L. Freeman and D. C. Liebler (2005). "Specific patterns of electrophile adduction trigger Keap1 ubiquitination and Nrf2 activation." The Journal of biological chemistry **280**(36): 31768-31775.

Hsieh, T. C., X. Lu, Z. Wang and J. M. Wu (2006). "Induction of quinone reductase NQO1 by resveratrol in human K562 cells involves the antioxidant response element ARE and is accompanied by nuclear translocation of transcription factor Nrf2." Med Chem **2**(3): 275-285.

Hu, C., A. L. Eggler, A. D. Mesecar and R. B. van Breemen (2011). "Modification of keap1 cysteine residues by sulforaphane." Chem Res Toxicol **24**(4): 515-521.

Hu, R., C. Xu, G. Shen, M. R. Jain, T. O. Khor, A. Gopalkrishnan, W. Lin, B. Reddy, J. Y. Chan and A. N. Kong (2006). "Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice." Cancer Lett **243**(2): 170-192.

Huang, B. W., P. D. Ray, K. Iwasaki and Y. Tsuji (2013). "Transcriptional regulation of the human ferritin gene by coordinated regulation of Nrf2 and protein arginine methyltransferases PRMT1 and PRMT4." Faseb J **27**(9): 3763-3774.

Huang, H. C., T. Nguyen and C. B. Pickett (2002). "Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription." The Journal of biological chemistry **277**(45): 42769-42774.

Hur, W. and N. S. Gray (2011). "Small molecule modulators of antioxidant response pathway." Curr Opin Chem Biol **15**(1): 162-173.

Igyarto, B. Z. and D. H. Kaplan (2012). "Antigen presentation by Langerhans cells." Curr Opin Immunol.

Iida, K., K. Itoh, Y. Kumagai, R. Oyasu, K. Hattori, K. Kawai, T. Shimazui, H. Akaza and M. Yamamoto (2004). "Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis." Cancer Res **64**(18): 6424-6431.

Imbesi, S., P. L. Minciullo, S. Isola and S. Gangemi (2011). "Allergic contact dermatitis: immune system involvement and distinctive clinical cases." Allergol Immunopathol (Madr) **39**(6): 374-377.

Inohara, N. and G. Nunez (2003). "NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis." Nature reviews. Immunology **3**(5): 371-382.

Ishii, N., T. Takahashi, P. Soroosh and K. Sugamura (2010). "OX40-OX40 ligand interaction in T-cell-mediated immunity and immunopathology." Adv Immunol **105**: 63-98.

Ishii, T., K. Itoh, S. Takahashi, H. Sato, T. Yanagawa, Y. Katoh, S. Bannai and M. Yamamoto (2000). "Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages." The Journal of biological chemistry **275**(21): 16023-16029.

Ishii, Y., K. Itoh, Y. Morishima, T. Kimura, T. Kiwamoto, T. Iizuka, A. E. Hegab, T. Hosoya, A. Nomura, T. Sakamoto, M. Yamamoto and K. Sekizawa (2005). "Transcription factor Nrf2 plays a pivotal role in protection against elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema." J Immunol **175**(10): 6968-6975.

Iskander, K., R. J. Barrios and A. K. Jaiswal (2008). "Disruption of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene in mice leads to radiation-induced myeloproliferative disease." Cancer Res **68**(19): 7915-7922.

Islam, S. A. and A. D. Luster (2012). "T cell homing to epithelial barriers in allergic disease." Nat Med **18**(5): 705-715.

Itakura, A., M. Szczepanik, R. A. Campos, V. Paliwal, M. Majewska, H. Matsuda, K. Takatsu and P. W. Askenase (2005). "An hour after immunization peritoneal B-1 cells are activated to migrate to lymphoid organs where within 1 day they produce IgM antibodies that initiate elicitation of contact sensitivity." Journal of immunology **175**(11): 7170-7178.

Itoh, K., T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, T. Oyake, N. Hayashi, K. Satoh, I. Hatayama, M. Yamamoto and Y. Nabeshima (1997). "An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements." Biochemical and biophysical research communications **236**(2): 313-322.

Itoh, K., K. Igarashi, N. Hayashi, M. Nishizawa and M. Yamamoto (1995). "Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins." Mol Cell Biol **15**(8): 4184-4193.

Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2010). "Regulation of adaptive immunity by the innate immune system." Science **327**(5963): 291-295.

J

Jain, A. K., D. A. Bloom and A. K. Jaiswal (2005). "Nuclear import and export signals in control of Nrf2." J Biol Chem **280**(32): 29158-29168.

Jain, A. K. and A. K. Jaiswal (2006). "Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2." The Journal of biological chemistry **281**(17): 12132-12142.

Jain, A. K. and A. K. Jaiswal (2007). "GSK-3beta acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2." The Journal of biological chemistry **282**(22): 16502-16510.

Jain, A. K., S. Mahajan and A. K. Jaiswal (2008). "Phosphorylation and dephosphorylation of tyrosine 141 regulate stability and degradation of INrf2: a novel mechanism in Nrf2 activation." The Journal of biological chemistry **283**(25): 17712-17720.

Jakob, T. and M. C. Udey (1998). "Regulation of E-cadherin-mediated adhesion in Langerhans cell-like dendritic cells by inflammatory mediators that mobilize Langerhans cells in vivo." Journal of immunology **160**(8): 4067-4073.

Jang, H. J., Y. M. Kim, K. Tsoyi, E. J. Park, Y. S. Lee, H. J. Kim, J. H. Lee, Y. Joe, H. T. Chung and K. C. Chang (2012). "Ethyl pyruvate induces heme oxygenase-1 through p38 mitogen-activated protein kinase activation by depletion of glutathione in RAW 264.7 cells and improves survival in septic animals." Antioxid Redox Signal **17**(6): 878-889.

Ji, L., H. Li, P. Gao, G. Shang, D. D. Zhang, N. Zhang and T. Jiang (2013). "Nrf2 pathway regulates multidrug-resistance-associated protein 1 in small cell lung cancer." PloS one **8**(5): e63404.

Jigorel, E., M. Le Vee, C. Boursier-Neyret, Y. Parmentier and O. Fardel (2006). "Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes." Drug Metab Dispos **34**(10): 1756-1763.

Jin, Y. and T. M. Penning (2007). "Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication." Annual review of pharmacology and toxicology **47**: 263-292.

Joffre, O. P., E. Segura, A. Savina and S. Amigorena (2012). "Cross-presentation by dendritic cells." Nature reviews. Immunology **12**(8): 557-569.

Jonuleit, H. and E. Schmitt (2003). "The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations." Journal of immunology **171**(12): 6323-6327.

Jullien, D. and M. Faure (2000). "[Contact eczema. Etiology, physiopathology, diagnosis, treatment]." Rev Prat **50**(1): 61-68.

Jung, K. A. and M. K. Kwak (2010). "The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants." Molecules **15**(10): 7266-7291.

K

Kabashima, K., D. Sakata, M. Nagamachi, Y. Miyachi, K. Inaba and S. Narumiya (2003). "Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells." Nat Med **9**(6): 744-749.

Kaech, S. M. and W. Cui (2012). "Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation." Nature reviews. Immunology **12**(11): 749-761.

Kaidery, N. A., R. Banerjee, L. Yang, N. A. Smirnova, D. M. Hushpulian, K. T. Liby, C. R. Williams, M. Yamamoto, T. W. Kensler, R. R. Ratan, M. B. Sporn, M. F. Beal, I. G. Gazaryan and B. Thomas (2013). "Targeting Nrf2-mediated gene transcription by extremely potent synthetic triterpenoids attenuate dopaminergic neurotoxicity in the MPTP mouse model of Parkinson's disease." Antioxidants & redox signaling **18**(2): 139-157.

Kaisho, T. (2012). "Pathogen sensors and chemokine receptors in dendritic cell subsets." Vaccine **30**(52): 7652-7657.

Kaizaki, A., S. Tanaka, K. Ishige, S. Numazawa and T. Yoshida (2006). "The neuroprotective effect of heme oxygenase (HO) on oxidative stress in HO-1 siRNA-transfected HT22 cells." Brain Res **1108**(1): 39-44.

Kalesnikoff, J. and S. J. Galli (2008). "New developments in mast cell biology." Nature immunology **9**(11): 1215-1223.

Kang, K. W., S. J. Lee, J. W. Park and S. G. Kim (2002). "Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress." Mol Pharmacol **62**(5): 1001-1010.

Kapeta, S., N. Chondrogianni and E. S. Gonos (2010). "Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts." The Journal of biological chemistry **285**(11): 8171-8184.

Kaplan, D. H., B. Z. Igyarto and A. A. Gaspari (2012). "Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis." Nat Rev Immunol **12**(2): 114-124.

Kaplan, D. H., A. Kissenpfennig and B. E. Clausen (2008). "Insights into Langerhans cell function from Langerhans cell ablation models." Eur J Immunol **38**(9): 2369-2376.

Kapsenberg, M. L. (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." Nature reviews. Immunology **3**(12): 984-993.

Karlberg, A. T., M. A. Bergstrom, A. Borje, K. Luthman and J. L. Nilsson (2008). "Allergic contact dermatitis--formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers." Chem Res Toxicol **21**(1): 53-69.

Karsak, M., E. Gaffal, R. Date, L. Wang-Eckhardt, J. Rehnelt, S. Petrosino, K. Starowicz, R. Steuder, E. Schlicker, B. Cravatt, R. Mechoulam, R. Buettner, S. Werner, V. Di Marzo, T. Tuting and A. Zimmer (2007). "Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system." Science **316**(5830): 1494-1497.

Kaspar, J. W. and A. K. Jaiswal (2010). "Antioxidant-induced phosphorylation of tyrosine 486 leads to rapid nuclear export of Bach1 that allows Nrf2 to bind to the antioxidant response element and activate defensive gene expression." The Journal of biological chemistry **285**(1): 153-162.

Kaspar, J. W., S. K. Niture and A. K. Jaiswal (2009). "Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress." Free Radic Biol Med **47**(9): 1304-1309.

Kaspar, J. W., S. K. Niture and A. K. Jaiswal (2012). "Antioxidant-induced INrf2 (Keap1) tyrosine 85 phosphorylation controls the nuclear export and degradation of the INrf2-Cul3-Rbx1 complex to allow normal Nrf2 activation and repression." J Cell Sci **125**(Pt 4): 1027-1038.

Kataoka, K., M. Noda and M. Nishizawa (1994). "Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun." Mol Cell Biol **14**(1): 700-712.

Katoh, Y., K. Itoh, E. Yoshida, M. Miyagishi, A. Fukamizu and M. Yamamoto (2001). "Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription." Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms **6**(10): 857-868.

Katsuoka, F., H. Motohashi, T. Ishii, H. Aburatani, J. D. Engel and M. Yamamoto (2005). "Genetic evidence that small maf proteins are essential for the activation of antioxidant response element-dependent genes." Mol Cell Biol **25**(18): 8044-8051.

Katsuyama, M., K. Matsuno and C. Yabe-Nishimura (2012). "Physiological roles of NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme." J Clin Biochem Nutr **50**(1): 9-22.

Kawai, Y., L. Garduno, M. Theodore, J. Yang and I. J. Arinze (2011). "Acetylation-deacetylation of the transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) regulates its transcriptional activity and nucleocytoplasmic localization." The Journal of biological chemistry **286**(9): 7629-7640.

Kerppola, T. K. and T. Curran (1994). "A conserved region adjacent to the basic domain is required for recognition of an extended DNA binding site by Maf/Nrl family proteins." Oncogene **9**(11): 3149-3158.

Keum, Y. S., Y. H. Han, C. Liew, J. H. Kim, C. Xu, X. Yuan, M. P. Shakarjian, S. Chong and A. N. Kong (2006). "Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD[P]H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) by a phenolic antioxidant, butylated hydroxyanisole (BHA) and its metabolite, tert-butylhydroquinone (tBHQ) in primary-cultured human and rat hepatocytes." Pharm Res **23**(11): 2586-2594.

Kim, H., W. Kim, S. Yum, S. Hong, J. E. Oh, J. W. Lee, M. K. Kwak, E. J. Park, D. H. Na and Y. Jung (2013). "Caffeic acid phenethyl ester activation of Nrf2 pathway is enhanced under oxidative state: Structural analysis and

potential as a pathologically targeted therapeutic agent in treatment of colonic inflammation." Free Radic Biol Med **65C**: 552-562.

Kim, J., Y. N. Cha and Y. J. Surh (2009). "A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders." Mutation research **690**(1-2): 12-23.

Kim, J., Y. N. Cha and Y. J. Surh (2010). "A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders." Mutat Res **690**(1-2): 12-23.

Kim, Y. J., J. Y. Ahn, P. Liang, C. Ip, Y. Zhang and Y. M. Park (2007). "Human prx1 gene is a target of Nrf2 and is up-regulated by hypoxia/reoxygenation: implication to tumor biology." Cancer Res **67**(2): 546-554.

Kimber, I., M. A. Travis, S. F. Martin and R. J. Dearman (2012). "Immunoregulation of skin sensitization and regulatory T cells." Contact Dermatitis **67**(4): 179-183.

Kish, D. D., X. Li and R. L. Fairchild (2009). "CD8 T cells producing IL-17 and IFN-gamma initiate the innate immune response required for responses to antigen skin challenge." Journal of immunology **182**(10): 5949-5959.

Kish, D. D., N. Volokh, W. M. Baldwin, 3rd and R. L. Fairchild (2011). "Hapten application to the skin induces an inflammatory program directing hapten-primed effector CD8 T cell interaction with hapten-presenting endothelial cells." Journal of immunology **186**(4): 2117-2126.

Klaassen, C. D. and A. L. Slitt (2005). "Regulation of hepatic transporters by xenobiotic receptors." Curr Drug Metab **6**(4): 309-328.

Kobayashi, M. and M. Yamamoto (2006). "Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species." Adv Enzyme Regul **46**: 113-140.

Kobayashi, Y. (1997). "Langerhans' cells produce type IV collagenase (MMP-9) following epicutaneous stimulation with haptens." Immunology **90**(4): 496-501.

Kobayashi, Y., M. Matsumoto, M. Kotani and T. Makino (1999). "Possible involvement of matrix metalloproteinase-9 in Langerhans cell migration and maturation." J Immunol **163**(11): 5989-5993.

Koch, F., U. Stanzl, P. Jennewein, K. Janke, C. Heufler, E. Kampgen, N. Romani and G. Schuler (1996). "High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10." The Journal of experimental medicine **184**(2): 741-746.

Komatsu, M., H. Kurokawa, S. Waguri, K. Taguchi, A. Kobayashi, Y. Ichimura, Y. S. Sou, I. Ueno, A. Sakamoto, K. I. Tong, M. Kim, Y. Nishito, S. Iemura, T. Natsume, T. Ueno, E. Kominami, H. Motohashi, K. Tanaka and M. Yamamoto (2010). "The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1." Nat Cell Biol **12**(3): 213-223.

Kondo, S., F. Kooshesh, B. Wang, H. Fujisawa and D. N. Sauder (1996). "Contribution of the CD28 molecule to allergic and irritant-induced skin reactions in CD28 -/- mice." Journal of immunology **157**(11): 4822-4829.

Korenori, Y., S. Tanigawa, T. Kumamoto, S. Qin, Y. Daikoku, K. Miyamori, M. Nagai and D. X. Hou (2013). "Modulation of Nrf2/Keap1 system by Wasabi 6-methylthiohexyl isothiocyanate in ARE-mediated NQO1 expression." Mol Nutr Food Res **57**(5): 854-864.

Krasteva, M., J. Kehren, M. Sayag, M. T. Ducluzeau, M. Dupuis, J. Kanitakis and J. F. Nicolas (1999). "Contact dermatitis II. Clinical aspects and diagnosis." Eur J Dermatol **9**(2): 144-159.

Krishnaswamy, J. K., T. Chu and S. C. Eisenbarth (2013). "Beyond pattern recognition: NOD-like receptors in dendritic cells." Trends Immunol.

Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky and G. Melino (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ **16**(1): 3-11.

Kurokawa, H., H. Motohashi, S. Sueno, M. Kimura, H. Takagawa, Y. Kanno, M. Yamamoto and T. Tanaka (2009). "Structural basis of alternative DNA recognition by Maf transcription factors." Mol Cell Biol **29**(23): 6232-6244.

Kwak, M. K., M. Ramos-Gomez, N. Wakabayashi and T. W. Kensler (2004). "Chemoprevention by 1,2-dithiole-3-thiones through induction of NQO1 and other phase 2 enzymes." Methods Enzymol **382**: 414-423.

Kwak, M. K., N. Wakabayashi, J. L. Greenlaw, M. Yamamoto and T. W. Kensler (2003a). "Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway." Mol Cell Biol **23**(23): 8786-8794.

Kwak, M. K., N. Wakabayashi, K. Itoh, H. Motohashi, M. Yamamoto and T. W. Kensler (2003b). "Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival." The Journal of biological chemistry **278**(10): 8135-8145.

Kweon, M. H., V. M. Adhami, J. S. Lee and H. Mukhtar (2006). "Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate." The Journal of biological chemistry **281**(44): 33761-33772.

Kwong, E. K., K. M. Kim, P. J. Penalosa and J. Y. Chan (2012). "Characterization of Nrf1b, a novel isoform of the nuclear factor-erythroid-2 related transcription factor-1 that activates antioxidant response element-regulated genes." PloS one **7**(10): e48404.

Lachapelle JM and Maibach HI (2009). Patch testing and prick testing. A practical guide. Berlin: Springer; page 33-70

Lande, R., J. Gregorio, V. Facchinetti, B. Chatterjee, Y. H. Wang, B. Homey, W. Cao, B. Su, F. O. Nestle, T. Zal, I. Mellman, J. M. Schroder, Y. J. Liu and M. Gilliet (2007). "Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide." Nature **449**(7162): 564-569.

Landsteiner, K. and J. Jacobs (1935). "Studies on the Sensitization of Animals with Simple Chemical Compounds." The Journal of experimental medicine **61**(5): 643-656.

Lau, A., W. Tian, S. A. Whitman and D. D. Zhang (2013). "The predicted molecular weight of Nrf2: it is what it is not." Antioxidants & redox signaling **18**(1): 91-93.

Lau, A., X. J. Wang, F. Zhao, N. F. Villeneuve, T. Wu, T. Jiang, Z. Sun, E. White and D. D. Zhang (2010). "A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62." Mol Cell Biol **30**(13): 3275-3285.

Le Bras, M., M. V. Clement, S. Pervaiz and C. Brenner (2005). "Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death." Histol Histopathol **20**(1): 205-219.

Lebre, M. C., P. Kalinski, P. K. Das and V. Everts (1999). "Inhibition of contact sensitizer-induced migration of human Langerhans cells by matrix metalloproteinase inhibitors." Arch Dermatol Res **291**(7-8): 447-452.

Lee, D. F., H. P. Kuo, M. Liu, C. K. Chou, W. Xia, Y. Du, J. Shen, C. T. Chen, L. Huo, M. C. Hsu, C. W. Li, Q. Ding, T. L. Liao, C. C. Lai, A. C. Lin, Y. H. Chang, S. F. Tsai, L. Y. Li and M. C. Hung (2009). "KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF-kappaB signaling by targeting IKKbeta." Mol Cell **36**(1): 131-140.

Lee, J. M., M. J. Calkins, K. Chan, Y. W. Kan and J. A. Johnson (2003). "Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis." J Biol Chem **278**(14): 12029-12038.

Lepoittevin, J. P. (2006). "Metabolism versus chemical transformation or pro- versus prehaptens?" Contact Dermatitis **54**(2): 73-74.

Lepoittevin, J. P. and B. Cribier (1998). "[Physiopathology of contact eczema]." Ann Dermatol Vener **125**(11): 775-782.

Lerbaek, A., H. Bisgaard, T. Agner, K. Ohm Kyvik, C. N. Palmer and T. Menne (2007). "Filaggrin null alleles are not associated with hand eczema or contact allergy." Br J Dermatol **157**(6): 1199-1204.

Levine, B. and G. Kroemer (2008). "Autophagy in the pathogenesis of disease." Cell **132**(1): 27-42.

Li, J., D. Johnson, M. Calkins, L. Wright, C. Svendsen and J. Johnson (2005). "Stabilization of Nrf2 by tBHQ confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells." Toxicol Sci **83**(2): 313-328.

Li, W., H. Liu, J. S. Zhou, J. F. Cao, X. B. Zhou, A. M. Choi, Z. H. Chen and H. H. Shen (2012a). "Caveolin-1 inhibits expression of antioxidant enzymes through direct interaction with nuclear erythroid 2 p45-related factor-2 (Nrf2)." The Journal of biological chemistry **287**(25): 20922-20930.

Li, Y., J. D. Paonessa and Y. Zhang (2012b). "Mechanism of chemical activation of Nrf2." PloS one **7**(4): e35122.

Lillig, C. H. and A. Holmgren (2007). "Thioredoxin and related molecules--from biology to health and disease." Antioxid Redox Signal **9**(1): 25-47.

Liu, K., C. Waskow, X. Liu, K. Yao, J. Hoh and M. Nussenzweig (2007). "Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice." Nat Immunol **8**(6): 578-583.

Long, D. J., 2nd, R. L. Waikel, X. J. Wang, L. Perlaky, D. R. Roop and A. K. Jaiswal (2000). "NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 deficiency increases susceptibility to benzo(a)pyrene-induced mouse skin carcinogenesis." Cancer Res **60**(21): 5913-5915.

Loser, K. and S. Beissert (2009). "Regulation of cutaneous immunity by the environment: an important role for UV irradiation and vitamin D." Int Immunopharmacol **9**(5): 587-589.

Lou, H., S. Du, Q. Ji and A. Stolz (2006). "Induction of AKR1C2 by phase II inducers: identification of a distal consensus antioxidant response element regulated by NRF2." Mol Pharmacol **69**(5): 1662-1672.

Lowes, M. A., F. Chamian, M. V. Abello, J. Fuentes-Duculan, S. L. Lin, R. Nussbaum, I. Novitskaya, H. Carbonaro, I. Cardinale, T. Kikuchi, P. Gilleaudeau, M. Sullivan-Whalen, K. M. Wittkowski, K. Papp, M. Garovoy, W. Dummer, R. M. Steinman and J. G. Krueger (2005). "Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide

synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a)." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 19057-19062.

Lu, S. C. (2013). "Glutathione synthesis." Biochim Biophys Acta **1830**(5): 3143-3153.

Luckey, U., M. Maurer, T. Schmidt, N. Lorenz, B. Seebach, M. Metz and K. Steinbrink (2011). "T cell killing by tolerogenic dendritic cells protects mice from allergy." The Journal of clinical investigation **121**(10): 3860-3871.

Luther, S. A., H. L. Tang, P. L. Hyman, A. G. Farr and J. G. Cyster (2000). "Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12694-12699.

M

Ma, J., J. H. Wang, Y. J. Guo, M. S. Sy and M. Bigby (1994). "In vivo treatment with anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 antibodies inhibits contact sensitization-induced migration of epidermal Langerhans cells to regional lymph nodes." Cell Immunol **158**(2): 389-399.

Ma, Q. (2013). "Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity." Annual review of pharmacology and toxicology **53**: 401-426.

Ma, Q. and X. He (2012). "Molecular basis of electrophilic and oxidative defense: promises and perils of Nrf2." Pharmacol Rev **64**(4): 1055-1081.

Ma, Z. C., Q. Hong, Y. G. Wang, Q. D. Liang, H. L. Tan, C. R. Xiao, X. L. Tang, S. Shao, S. S. Zhou and Y. Gao (2011). "Ferulic acid induces heme oxygenase-1 via activation of ERK and Nrf2." Drug Discov Ther **5**(6): 299-305.

MacLeod, A. K., M. McMahon, S. M. Plummer, L. G. Higgins, T. M. Penning, K. Igarashi and J. D. Hayes (2009). "Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: demonstration that the KEAP1-NRF2 pathway, and not the BACH1-NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds." Carcinogenesis **30**(9): 1571-1580.

Macleod, A. S. and W. L. Havran (2011). "Functions of skin-resident gammadelta T cells." Cellular and molecular life sciences : CMLS **68**(14): 2399-2408.

Magcwebeba, T., S. Riedel, S. Swanevelder, P. Bouic, P. Swart and W. Gelderblom (2012). "Interleukin-1alpha Induction in Human Keratinocytes (HaCaT): An In Vitro Model for Chemoprevention in Skin." J Skin Cancer **2012**: 393681.

Magesh, S., Y. Chen and L. Hu (2012). "Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents." Med Res Rev **32**(4): 687-726.

Maher, J. M., X. Cheng, A. L. Slitt, M. Z. Dieter and C. D. Klaassen (2005). "Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver." Drug Metab Dispos **33**(7): 956-962.

Mahnke, K., Y. Qian, J. Knop and A. H. Enk (2003). "Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells." Blood **101**(12): 4862-4869.

Malhotra, D., R. Thimmulappa, A. Navas-Acien, A. Sandford, M. Elliott, A. Singh, L. Chen, X. Zhuang, J. Hogg, P. Pare, R. M. Tuder and S. Biswal (2008). "Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1." Am J Respir Crit Care Med **178**(6): 592-604.

Malhotra, D., R. K. Thimmulappa, N. Mercado, K. Ito, P. Kombairaju, S. Kumar, J. Ma, D. Feller-Kopman, R. Wise, P. Barnes and S. Biswal (2011). "Denitrosylation of HDAC2 by targeting Nrf2 restores glucocorticosteroid sensitivity in macrophages from COPD patients." The Journal of clinical investigation **121**(11): 4289-4302.

Manandhar, S., J. M. Cho, J. A. Kim, T. W. Kensler and M. K. Kwak (2007). "Induction of Nrf2-regulated genes by 3H-1, 2-dithiole-3-thione through the ERK signaling pathway in murine keratinocytes." Eur J Pharmacol **577**(1-3): 17-27.

Manavalan, J. S., P. C. Rossi, G. Vlad, F. Piazza, A. Yarilina, R. Cortesini, D. Mancini and N. Suciu-Foca (2003). "High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells." Transpl Immunol **11**(3-4): 245-258.

Mani, M., T. Golmohammadi, S. Khaghani, Z. Zamani, K. Azadmanesh, R. Meshkini and P. Pasalar (2013a). "Homocysteine induces heme oxygenase-1 expression via transcription factor Nrf2 activation in HepG2 cell." Iran Biomed J **17**(2): 93-100.

Mani, M., S. Khaghani, T. Gol Mohammadi, Z. Zamani, K. Azadmanesh, R. Meshkani, P. Pasalar and E. Mostafavi (2013b). "Activation of Nrf2-Antioxidant Response Element Mediated Glutamate Cysteine Ligase Expression in Hepatoma Cell line by Homocysteine." Hepat Mon **13**(5): e8394.

Mariathasan, S. and D. M. Monack (2007). "Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation." Nat Rev Immunol **7**(1): 31-40.

Martin-Fontecha, A., A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2009). "Dendritic cell migration to peripheral lymph nodes." Handbook of experimental pharmacology(188): 31-49.

Martin, S. F., J. C. Dudda, E. Bachtanian, A. Lembo, S. Liller, C. Durr, M. M. Heimesaat, S. Bereswill, G. Fejer, R. Vassileva, T. Jakob, N. Freudenberg, C. C. Termeer, C. Johner, C. Galanos and M. A. Freudenberg (2008). "Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity." The Journal of experimental medicine **205**(9): 2151-2162.

Martin, S. F., P. R. Esser, F. C. Weber, T. Jakob, M. A. Freudenberg, M. Schmidt and M. Goebeler (2011). "Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis." Allergy **66**(9): 1152-1163.

Martinon, F., O. Gaide, V. Petrilli, A. Mayor and J. Tschopp (2007). "NALP inflammasomes: a central role in innate immunity." Semin Immunopathol **29**(3): 213-229.

Martinon, F., A. Mayor and J. Tschopp (2009). "The inflammasomes: guardians of the body." Annu Rev Immunol **27**: 229-265.

Martinon, F., V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel and J. Tschopp (2006). "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." Nature **440**(7081): 237-241.

Martinon, F. and J. Tschopp (2005). "NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens." Trends Immunol **26**(8): 447-454.

Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol **12**: 991-1045.

Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." Science **296**(5566): 301-305.

Maurer, M., W. Seidel-Guyenot, M. Metz, J. Knop and K. Steinbrink (2003). "Critical role of IL-10 in the induction of low zone tolerance to contact allergens." The Journal of clinical investigation **112**(3): 432-439.

McCormick, T. S., S. R. Stevens and K. Kang (2000). "Macrophages and cutaneous inflammation." Nat Biotechnol **18**(1): 25-26.

McCully, M. L., K. Ladell, S. Hakobyan, R. E. Mansel, D. A. Price and B. Moser (2012). "Epidermis instructs skin homing receptor expression in human T cells." Blood **120**(23): 4591-4598.

McHale, J. F., O. A. Harari, D. Marshall and D. O. Haskard (1999). "Vascular endothelial cell expression of ICAM-1 and VCAM-1 at the onset of eliciting contact hypersensitivity in mice: evidence for a dominant role of TNF-alpha." Journal of immunology **162**(3): 1648-1655.

McLafferty, E., C. Hendry and F. Alistair (2012). "The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin." Nurs Stand **27**(3): 35-42.

McMahon, M., N. Thomas, K. Itoh, M. Yamamoto and J. D. Hayes (2004). "Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron." The Journal of biological chemistry **279**(30): 31556-31567.

Mee, J. B., C. Antonopoulos, S. Poole, T. S. Kupper and R. W. Groves (2005). "Counter-regulation of interleukin-1alpha (IL-1alpha) and IL-1 receptor antagonist in murine keratinocytes." The Journal of investigative dermatology **124**(6): 1267-1274.

Mekori, Y. A. and S. J. Galli (1985). "Undiminished immunologic tolerance to contact sensitivity in mast cell-deficient W/Wv and Sl/Sld mice." Journal of immunology **135**(2): 879-885.

Meng, X., D. Sawamura, K. Tamai, K. Hanada, H. Ishida and I. Hashimoto (1998). "Keratinocyte gene therapy for systemic diseases. Circulating interleukin 10 released from gene-transferred keratinocytes inhibits contact hypersensitivity at distant areas of the skin." The Journal of clinical investigation **101**(6): 1462-1467.

Merad, M., F. Ginhoux and M. Collin (2008). "Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells." Nature reviews. Immunology **8**(12): 935-947.

Merad, M., M. G. Manz, H. Karsunky, A. Wagers, W. Peters, I. Charo, I. L. Weissman, J. G. Cyster and E. G. Engleman (2002). "Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions." Nature immunology **3**(12): 1135-1141.

Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller and A. Mortha (2013). "The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting." Annu Rev Immunol **31**: 563-604.

Mercado, N., R. Thimmulappa, C. M. Thomas, P. S. Fenwick, K. K. Chana, L. E. Donnelly, S. Biswal, K. Ito and P. J. Barnes (2011). "Decreased histone deacetylase 2 impairs Nrf2 activation by oxidative stress." Biochemical and biophysical research communications **406**(2): 292-298.

Merchant, A. A., A. Singh, W. Matsui and S. Biswal (2011). "The redox-sensitive transcription factor Nrf2 regulates murine hematopoietic stem cell survival independently of ROS levels." Blood **118**(25): 6572-6579.

Migdal, C., J. Botton, Z. El Ali, M. E. Azoury, J. Guldemann, E. Gimenez-Arnau, J. P. Lepoittevin, S. Kerdine-Romer and M. Pallardy (2013). "Reactivity of chemical sensitizers toward amino acids in cellulo plays a role in the activation of the Nrf2-ARE pathway in human monocyte dendritic cells and the THP-1 cell line." Toxicol Sci.

Migdal, C., L. Foggia, M. Tailhardat, P. Courtellemont, M. Haftek and M. Serres (2010). "Sensitization effect of thimerosal is mediated in vitro via reactive oxygen species and calcium signaling." Toxicology **274**(1-3): 1-9.

Migdal, C. and M. Serres (2011). "[Reactive oxygen species and oxidative stress]." Medecine sciences : M/S **27**(4): 405-412.

Milpied-Homsi, B., E. Collet and M. Vigan (2009). "[Allergic dermatitis]." Ann Dermatol Venereol **136**(8-9): 573.

Miyamoto, N., H. Izumi, R. Miyamoto, H. Kondo, A. Tawara, Y. Sasaguri and K. Kohno (2011). "Quercetin induces the expression of peroxiredoxins 3 and 5 via the Nrf2/NRF1 transcription pathway." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(2): 1055-1063.

Mocsai, A. (2013). "Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond." The Journal of experimental medicine **210**(7): 1283-1299.

Moi, P., K. Chan, I. Asunis, A. Cao and Y. W. Kan (1994). "Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 9926-9930.

Molne, L., A. Corthay, R. Holmdahl and A. Tarkowski (2003). "Role of gamma/delta T cell receptor-expressing lymphocytes in cutaneous infection caused by Staphylococcus aureus." Clin Exp Immunol **132**(2): 209-215.

Monteiro, M., C. F. Almeida, M. Caridade, J. C. Ribot, J. Duarte, A. Agua-Doce, I. Wollenberg, B. Silva-Santos and L. Graca (2010). "Identification of regulatory Foxp3+ invariant NKT cells induced by TGF-beta." Journal of immunology **185**(4): 2157-2163.

Mori, T., K. Kabashima, R. Yoshiki, K. Sugita, N. Shiraishi, A. Onoue, E. Kuroda, M. Kobayashi, U. Yamashita and Y. Tokura (2008). "Cutaneous hypersensitivities to hapten are controlled by IFN-gamma-upregulated keratinocyte Th1 chemokines and IFN-gamma-downregulated langerhans cell Th2 chemokines." The Journal of investigative dermatology **128**(7): 1719-1727.

Morisseau, C. and B. D. Hammock (2005). "Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles." Annu Rev Pharmacol Toxicol **45**: 311-333.

Moser, M. and O. Leo (2010). "Key concepts in immunology." Vaccine **28 Suppl 3**: C2-13.

Motohashi, H. and M. Yamamoto (2004). "Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism." Trends Mol Med **10**(11): 549-557.

Movahed, A., L. Yu, S. J. Thandapilly, X. L. Louis and T. Netticadan (2012). "Resveratrol protects adult cardiomyocytes against oxidative stress mediated cell injury." Arch Biochem Biophys **527**(2): 74-80.

Mucida, D., Y. Park, G. Kim, O. Turovskaya, I. Scott, M. Kronenberg and H. Cheroutre (2007). "Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid." Science **317**(5835): 256-260.

Mueller, S. N., T. Gebhardt, F. R. Carbone and W. R. Heath (2013). "Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence." Annu Rev Immunol **31**: 137-161.

Mulcahy, R. T., M. A. Wartman, H. H. Bailey and J. J. Gipp (1997). "Constitutive and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence." The Journal of biological chemistry **272**(11): 7445-7454.

Muller, G., A. Muller, T. Tuting, K. Steinbrink, J. Saloga, C. Szalma, J. Knop and A. H. Enk (2002). "Interleukin-10-treated dendritic cells modulate immune responses of naive and sensitized T cells in vivo." The Journal of investigative dermatology **119**(4): 836-841.

Murphy, G. and J. Gavrilovic (1999). "Proteolysis and cell migration: creating a path?" Curr Opin Cell Biol **11**(5): 614-621.

N

Nakae, S., Y. Komiyama, A. Nambu, K. Sudo, M. Iwase, I. Homma, K. Sekikawa, M. Asano and Y. Iwakura (2002). "Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses." Immunity **17**(3): 375-387.

Nakae, S., Y. Komiyama, S. Narumi, K. Sudo, R. Horai, Y. Tagawa, K. Sekikawa, K. Matsushima, M. Asano and Y. Iwakura (2003). "IL-1-induced tumor necrosis factor-alpha elicits inflammatory cell infiltration in the skin by inducing IFN-gamma-inducible protein 10 in the elicitation phase of the contact hypersensitivity response." Int Immunol **15**(2): 251-260.

Napoli, C. and L. J. Ignarro (2009). "Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases." Arch Pharm Res **32**(8): 1103-1108.

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**(2): 284-292.

Natsch, A. and R. Emter (2008). "Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the in vitro testing of the sensitization potential of chemicals." Toxicol Sci **102**(1): 110-119.

Natsch, A., C. A. Ryan, L. Foertsch, R. Emter, J. Jaworska, F. Gerberick and P. Kern (2013). "A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation." J Appl Toxicol.

Neefjes, J., M. L. Jongsma, P. Paul and O. Bakke (2011). "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation." Nature reviews. Immunology **11**(12): 823-836.

Nestle, F. O., C. Conrad, A. Tun-Kyi, B. Homey, M. Gombert, O. Boyman, G. Burg, Y. J. Liu and M. Gilliet (2005). "Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production." The Journal of experimental medicine **202**(1): 135-143.

Nguyen, T., P. J. Sherratt, H. C. Huang, C. S. Yang and C. B. Pickett (2003). "Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome." The Journal of biological chemistry **278**(7): 4536-4541.

Nicolas, J. F., A. Rozieres and M. Castelain (2005). "[Pathogenesis of atopic dermatitis]." Ann Dermatol Vener **132 Spec No 1**: 1S44-52.

Nieuwenhuis, E. E., S. Gillessen, R. J. Scheper, M. A. Exley, M. Taniguchi, S. P. Balk, J. L. Strominger, G. Dranoff, R. S. Blumberg and S. B. Wilson (2005). "CD1d and CD1d-restricted iNKT-cells play a pivotal role in contact hypersensitivity." Exp Dermatol **14**(4): 250-258.

Nioi, P., M. McMahon, K. Itoh, M. Yamamoto and J. D. Hayes (2003). "Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence." The Biochemical journal **374**(Pt 2): 337-348.

Nishinaka, T. and C. Yabe-Nishimura (2005). "Transcription factor Nrf2 regulates promoter activity of mouse aldose reductase (AKR1B3) gene." J Pharmacol Sci **97**(1): 43-51.

Niture, S. K., A. K. Jain and A. K. Jaiswal (2009). "Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance." J Cell Sci **122**(Pt 24): 4452-4464.

Niture, S. K. and A. K. Jaiswal (2009). "Prothymosin-alpha mediates nuclear import of the INrf2/Cul3 Rbx1 complex to degrade nuclear Nrf2." The Journal of biological chemistry **284**(20): 13856-13868.

Niture, S. K. and A. K. Jaiswal (2010). "Hsp90 interaction with INrf2(Keap1) mediates stress-induced Nrf2 activation." The Journal of biological chemistry **285**(47): 36865-36875.

Niture, S. K. and A. K. Jaiswal (2011a). "Inhibitor of Nrf2 (INrf2 or Keap1) protein degrades Bcl-xL via phosphoglycerate mutase 5 and controls cellular apoptosis." The Journal of biological chemistry **286**(52): 44542-44556.

Niture, S. K. and A. K. Jaiswal (2011b). "INrf2 (Keap1) targets Bcl-2 degradation and controls cellular apoptosis." Cell Death Differ **18**(3): 439-451.

Niture, S. K. and A. K. Jaiswal (2012). "Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis." The Journal of biological chemistry **287**(13): 9873-9886.

Niture, S. K. and A. K. Jaiswal (2013). "Nrf2-induced antiapoptotic Bcl-xL protein enhances cell survival and drug resistance." Free Radic Biol Med **57**: 119-131.

Niture, S. K., J. W. Kaspar, J. Shen and A. K. Jaiswal (2010). "Nrf2 signaling and cell survival." Toxicol Appl Pharmacol **244**(1): 37-42.

Niture, S. K., R. Khatri and A. K. Jaiswal (2013). "Regulation of Nrf2-an update." Free Radic Biol Med.

Noble, A., A. Giorgini and J. A. Leggat (2006). "Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage." Blood **107**(11): 4475-4483.

Nosbaum, A., M. Vocanson, A. Rozieres, A. Hennino and J. F. Nicolas (2009). "Allergic and irritant contact dermatitis." European journal of dermatology : EJD **19**(4): 325-332.

O

Ogawa, A., A. Yoshizaki, K. Yanaba, F. Ogawa, T. Hara, E. Muroi, M. Takenaka, K. Shimizu, M. Hasegawa, M. Fujimoto, T. F. Tedder and S. Sato (2010). "The differential role of L-selectin and ICAM-1 in Th1-type and Th2-type contact hypersensitivity." The Journal of investigative dermatology **130**(6): 1558-1570.

Osada, A., H. Nakashima, M. Furue and K. Tamaki (1995). "Up-regulation of CD44 expression by tumor necrosis factor-alpha is neutralized by interleukin-10 in Langerhans cells." The Journal of investigative dermatology **105**(1): 124-127.

Otsuka, A., M. Kubo, T. Honda, G. Egawa, S. Nakajima, H. Tanizaki, B. Kim, S. Matsuoka, T. Watanabe, S. Nakae, Y. Miyachi and K. Kabashima (2011). "Requirement of interaction between mast cells and skin dendritic cells to establish contact hypersensitivity." PloS one **6**(9): e25538.

Ozawa, H., S. Nakagawa, H. Tagami and S. Aiba (1996). "Interleukin-1 beta and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mediate Langerhans cell maturation differently." The Journal of investigative dermatology **106**(3): 441-445.

P

Palmer, C. N., A. D. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski, Y. Zhao, H. Liao, S. P. Lee, D. R. Goudie, A. Sandilands, L. E. Campbell, F. J. Smith, G. M. O'Regan, R. M. Watson, J. E. Cecil, S. J. Bale, J. G. Compton, J. J. DiGiovanna, P. Fleckman, S. Lewis-Jones, G. Arseculeratne, A. Sergeant, C. S. Munro, B. El Houate, K. McElreavey, L. B. Halkjaer, H. Bisgaard, S. Mukhopadhyay and W. H. McLean (2006). "Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis." Nat Genet **38**(4): 441-446.

Papanikolaou, G. and K. Pantopoulos (2005). "Iron metabolism and toxicity." Toxicol Appl Pharmacol **202**(2): 199-211.

Pasch, M. C., N. H. Van Den Bosch, M. R. Daha, J. D. Bos and S. S. Asghar (2000). "Synthesis of complement components C3 and factor B in human keratinocytes is differentially regulated by cytokines." The Journal of investigative dermatology **114**(1): 78-82.

Paust, S., H. S. Gill, B. Z. Wang, M. P. Flynn, E. A. Moseman, B. Senman, M. Szczepanik, A. Telenti, P. W. Askenase, R. W. Compans and U. H. von Andrian (2010a). "Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses." Nature immunology **11**(12): 1127-1135.

Paust, S., B. Senman and U. H. von Andrian (2010b). "Adaptive immune responses mediated by natural killer cells." Immunol Rev **235**(1): 286-296.

Paust, S. and U. H. von Andrian (2011). "Natural killer cell memory." Nature immunology **12**(6): 500-508.

Peiser, M., T. Tralau, J. Heidler, A. M. Api, J. H. Arts, D. A. Basketter, J. English, T. L. Diepgen, R. C. Fuhlbrigge, A. A. Gaspari, J. D. Johansen, A. T. Karlberg, I. Kimber, J. P. Lepoittevin, M. Liebsch, H. I. Maibach, S. F. Martin, H. F. Merk, T. Platzek, T. Rustemeyer, A. Schnuch, R. J. Vandebriel, I. R. White and A. Luch (2012). "Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany." Cell Mol Life Sci **69**(5): 763-781.

Pennino, D., K. Eyerich, C. Scarponi, T. Carbone, S. Eyerich, F. Nasorri, S. Garcovich, C. Traidl-Hoffmann, C. Albanesi and A. Cavani (2010). "IL-17 amplifies human contact hypersensitivity by licensing hapten nonspecific Th1 cells to kill autologous keratinocytes." Journal of immunology **184**(9): 4880-4888.

Pi, J., Y. Bai, J. M. Reece, J. Williams, D. Liu, M. L. Freeman, W. E. Fahl, D. Shugar, J. Liu, W. Qu, S. Collins and M. P. Waalkes (2007). "Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2." Free Radic Biol Med **42**(12): 1797-1806.

Pichler, W. J. (2002). "Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept." Curr Opin Allergy Clin Immunol **2**(4): 301-305.

Pickering, A. M., R. A. Linder, H. Zhang, H. J. Forman and K. J. Davies (2012). "Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28alphabeta regulator are required for adaptation to oxidative stress." The Journal of biological chemistry **287**(13): 10021-10031.

Pietsch, E. C., J. Y. Chan, F. M. Torti and S. V. Torti (2003). "Nrf2 mediates the induction of ferritin H in response to xenobiotics and cancer chemopreventive dithiolethiones." The Journal of biological chemistry **278**(4): 2361-2369.

Posadas, S. J. and W. J. Pichler (2007). "Delayed drug hypersensitivity reactions - new concepts." Clin Exp Allergy **37**(7): 989-999.

Pothlichet, J. and L. Quintana-Murci (2013). "The genetics of innate immunity sensors and human disease." Int Rev Immunol **32**(2): 157-208.

Prestera, T., P. Talalay, J. Alam, Y. I. Ahn, P. J. Lee and A. M. Choi (1995). "Parallel induction of heme oxygenase-1 and chemoprotective phase 2 enzymes by electrophiles and antioxidants: regulation by upstream antioxidant-responsive elements (ARE)." Mol Med **1**(7): 827-837.

Price, A. A., M. Cumberbatch, I. Kimber and A. Ager (1997). "Alpha 6 integrins are required for Langerhans cell migration from the epidermis." The Journal of experimental medicine **186**(10): 1725-1735.

Proksch, E., J. M. Brandner and J. M. Jensen (2008). "The skin: an indispensable barrier." Exp Dermatol **17**(12): 1063-1072.

Purwar, R., W. Baumer, M. Niebuhr, T. Tschernig, M. Kietzmann and T. Werfel (2011). "A protective role of complement component 3 in T cell-mediated skin inflammation." Exp Dermatol **20**(9): 709-714.

Q

Qiao, H. L., Z. Li, J. Yang, X. Tian, N. Gao and L. J. Jia (2009). "Hypersensitivity reactions to penicillins: studies in a group of patients with negative benzylpenicillin G skin test." J Clin Pharm Ther **34**(3): 249-254.

R

Ramos-Gomez, M., M. K. Kwak, P. M. Dolan, K. Itoh, M. Yamamoto, P. Talalay and T. W. Kensler (2001). "Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3410-3415.

Ramsey, C. P., C. A. Glass, M. B. Montgomery, K. A. Lindl, G. P. Ritson, L. A. Chia, R. L. Hamilton, C. T. Chu and K. L. Jordan-Sciutto (2007). "Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases." Journal of neuropathology and experimental neurology **66**(1): 75-85.

Rangasamy, T., C. Y. Cho, R. K. Thimmulappa, L. Zhen, S. S. Srisuma, T. W. Kensler, M. Yamamoto, I. Petrache, R. M. Tuder and S. Biswal (2004). "Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice." J Clin Invest **114**(9): 1248-1259.

Rangasamy, T., M. A. Williams, S. Bauer, M. A. Trush, J. Emo, S. N. Georas and S. Biswal (2010). "Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2 inhibits the maturation of murine dendritic cells by ragweed extract." American journal of respiratory cell and molecular biology **43**(3): 276-285.

Rao, P. E., A. L. Petrone and P. D. Ponath (2005). "Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF-{beta}." Journal of immunology **174**(3): 1446-1455.

Ratzinger, G., P. Stoitzner, S. Ebner, M. B. Lutz, G. T. Layton, C. Rainer, R. M. Senior, J. M. Shipley, P. Fritsch, G. Schuler and N. Romani (2002). "Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin." J Immunol **168**(9): 4361-4371.

Reiser, H. and E. E. Schneeberger (1996). "Expression and function of B7-1 and B7-2 in hapten-induced contact sensitivity." Eur J Immunol **26**(4): 880-885.

Reisman, S. A., R. L. Yeager, M. Yamamoto and C. D. Klaassen (2009). "Increased Nrf2 activation in livers from Keap1-knockdown mice increases expression of cytoprotective genes that detoxify electrophiles more than those that detoxify reactive oxygen species." Toxicol Sci **108**(1): 35-47.

Ren, D., N. F. Villeneuve, T. Jiang, T. Wu, A. Lau, H. A. Toppin and D. D. Zhang (2011). "Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(4): 1433-1438.

Renoux, M. (1997). "Mast cells. Origin, cytology, localization, varieties and properties." Rev Fr Allergol **37**(4): 465-478.

Reuter, S., S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi and B. B. Aggarwal (2010). "Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?" Free radical biology & medicine **49**(11): 1603-1616.

Rietdijk, S. T., T. Burwell, J. Bertin and A. J. Coyle (2008). "Sensing intracellular pathogens-NOD-like receptors." Curr Opin Pharmacol **8**(3): 261-266.

Ring, S., A. H. Enk and K. Mahnke (2010a). "ATP activates regulatory T Cells in vivo during contact hypersensitivity reactions." Journal of immunology **184**(7): 3408-3416.

Ring, S., A. H. Enk and K. Mahnke (2011). "Regulatory T cells from IL-10-deficient mice fail to suppress contact hypersensitivity reactions due to lack of adenosine production." The Journal of investigative dermatology **131**(7): 1494-1502.

Ring, S., S. Karakhanova, T. Johnson, A. H. Enk and K. Mahnke (2010b). "Gap junctions between regulatory T cells and dendritic cells prevent sensitization of CD8(+) T cells." J Allergy Clin Immunol **125**(1): 237-246 e231-237.

Ring, S., S. J. Oliver, B. N. Cronstein, A. H. Enk and K. Mahnke (2009). "CD4+CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions through a CD39, adenosine-dependent mechanism." J Allergy Clin Immunol **123**(6): 1287-1296 e1282.

Ring, S., S. C. Schafer, K. Mahnke, H. A. Lehr and A. H. Enk (2006). "CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue." Eur J Immunol **36**(11): 2981-2992.

Robert, C. and T. S. Kupper (1999). "Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance." N Engl J Med **341**(24): 1817-1828.

Roelofs-Haarhuis, K., X. Wu, M. Nowak, M. Fang, S. Artik and E. Gleichmann (2003). "Infectious nickel tolerance: a reciprocal interplay of tolerogenic APCs and T suppressor cells that is driven by immunization." J Immunol **171**(6): 2863-2872.

Romagnoli, P., A. M. Labhardt and F. Sinigaglia (1991). "Selective interaction of Ni with an MHC-bound peptide." Embo J **10**(6): 1303-1306.

Roskos, K. V. and H. I. Maibach (1992). "Percutaneous absorption and age. Implications for therapy." Drugs Aging **2**(5): 432-449.

Rouzaire, P., C. Luci, E. Blasco, J. Bienvenu, T. Walzer, J. F. Nicolas and A. Hennino (2012). "Natural killer cells and T cells induce different types of skin reactions during recall responses to haptens." Eur J Immunol **42**(1): 80-88.

Rowland, A., J. O. Miners and P. I. Mackenzie (2013). "The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification." Int J Biochem Cell Biol **45**(6): 1121-1132.

Rozieres, A., M. Vocanson, K. Rodet, J. Benetiere, J. Bienvenu, F. Berard, A. Hennino and J. F. Nicolas (2010). "CD8+ T cells mediate skin allergy to amoxicillin in a mouse model." Allergy **65**(8): 996-1003.

Ruiz, S., P. E. Pergola, R. A. Zager and N. D. Vaziri (2013). "Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease." Kidney Int **83**(6): 1029-1041.

Rushmore, T. H., M. R. Morton and C. B. Pickett (1991). "The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity." The Journal of biological chemistry **266**(18): 11632-11639.

S

Saei, A. and J. Hadjati (2013). "Tolerogenic dendritic cells: key regulators of peripheral tolerance in health and disease." Int Arch Allergy Immunol **161**(4): 293-303.

Saeki, H., A. M. Moore, M. J. Brown and S. T. Hwang (1999). "Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes." Journal of immunology **162**(5): 2472-2475.

Saint-Mezard, P., A. Rosieres, M. Krasteva, F. Berard, B. Dubois, D. Kaiserlian and J. F. Nicolas (2004). "Allergic contact dermatitis." European journal of dermatology : EJD **14**(5): 284-295.

Salazar, M., A. I. Rojo, D. Velasco, R. M. de Sagarra and A. Cuadrado (2006). "Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2." The Journal of biological chemistry **281**(21): 14841-14851.

Salmi, M. and S. Jalkanen (2005). "Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking." Nature reviews. Immunology **5**(10): 760-771.

Sankaranarayanan, K. and A. K. Jaiswal (2004). "Nrf3 negatively regulates antioxidant-response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene." J Biol Chem **279**(49): 50810-50817.

Santamaria-Babi, L. F. (2004). "CLA(+) T cells in cutaneous diseases." European journal of dermatology : EJD **14**(1): 13-18.

Saraiva, M. and A. O'Garra (2010). "The regulation of IL-10 production by immune cells." Nat Rev Immunol **10**(3): 170-181.

Saren, P., H. G. Welgus and P. T. Kovanen (1996). "TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages." Journal of immunology **157**(9): 4159-4165.

Sasseville, D. (2008). "Occupational contact dermatitis." Allergy Asthma Clin Immunol **4**(2): 59-65.

Sato, K., Y. Imai and T. Irimura (1998). "Contribution of dermal macrophage trafficking in the sensitization phase of contact hypersensitivity." Journal of immunology **161**(12): 6835-6844.

Satoh, T., K. Kosaka, K. Itoh, A. Kobayashi, M. Yamamoto, Y. Shimojo, C. Kitajima, J. Cui, J. Kamins, S. Okamoto, M. Izumi, T. Shirasawa and S. A. Lipton (2008). "Carnosic acid, a catechol-type electrophilic compound, protects neurons both in vitro and in vivo through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via S-alkylation of targeted cysteines on Keap1." J Neurochem **104**(4): 1116-1131.

Saw, C. L., M. T. Huang, Y. Liu, T. O. Khor, A. H. Conney and A. N. Kong (2011). "Impact of Nrf2 on UVB-induced skin inflammation/photoprotection and photoprotective effect of sulforaphane." Molecular carcinogenesis **50**(6): 479-486.

Schaefer, H. and J. Lademann (2001). "The role of follicular penetration. A differential view." Skin Pharmacol Appl Skin Physiol **14 Suppl 1**: 23-27.

Schafer, M., S. Dutsch, U. auf dem Keller, F. Navid, A. Schwarz, D. A. Johnson, J. A. Johnson and S. Werner (2010). "Nrf2 establishes a glutathione-mediated gradient of UVB cytoprotection in the epidermis." Genes Dev **24**(10): 1045-1058.

Schafer, M., H. Farwanah, A. H. Willrodt, A. J. Huebner, K. Sandhoff, D. Roop, D. Hohl, W. Bloch and S. Werner (2012). "Nrf2 links epidermal barrier function with antioxidant defense." EMBO Mol Med **4**(5): 364-379.

Schakel, K., M. von Kietzell, A. Hansel, A. Ebling, L. Schulze, M. Haase, C. Semmler, M. Sarfati, A. N. Barclay, G. J. Randolph, M. Meurer and E. P. Rieber (2006). "Human 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells are

principal producers of early interleukin-12 and are controlled by erythrocytes." Immunity **24**(6): 767-777.

Schmidt, M., B. Raghavan, V. Muller, T. Vogl, G. Fejer, S. Tchaptchet, S. Keck, C. Kalis, P. J. Nielsen, C. Galanos, J. Roth, A. Skerra, S. F. Martin, M. A. Freudenberg and M. Goebeler (2010). "Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel." Nature immunology **11**(9): 814-819.

Schmitt, E. G. and C. B. Williams (2013). "Generation and function of induced regulatory T cells." Front Immunol **4**: 152.

Schnuch, A., G. Westphal, R. Mossner, W. Uter and K. Reich (2011). "Genetic factors in contact allergy--review and future goals." Contact Dermatitis **64**(1): 2-23.

Schwarz, A., M. Noordegraaf, A. Maeda, K. Torii, B. E. Clausen and T. Schwarz (2010). "Langerhans cells are required for UVR-induced immunosuppression." The Journal of investigative dermatology **130**(5): 1419-1427.

Sebastiani, S., C. Albanesi, P. O. De, P. Puddu, A. Cavani and G. Girolomoni (2002). "The role of chemokines in allergic contact dermatitis." Arch Dermatol Res **293**(11): 552-559.

Sharp, L. L., J. M. Jameson, G. Cauvi and W. L. Havran (2005). "Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1." Nature immunology **6**(1): 73-79.

Shin, H. and A. Iwasaki (2012). "Skin T(RM) mediates distributed border patrol." Cell Res **22**(9): 1325-1327.

Shin, J. W., K. Ohnishi, A. Murakami, J. S. Lee, J. K. Kundu, H. K. Na, H. Ohigashi and Y. J. Surh (2011). "Zerumbone induces heme oxygenase-1 expression in mouse skin and cultured murine epidermal cells through activation of Nrf2." Cancer Prev Res (Phila) **4**(6): 860-870.

Shivdasani, R. A. and S. H. Orkin (1995). "Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8690-8694.

Shortman, K. and S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." Nature reviews. Immunology **7**(1): 19-30.

Siegel, D., C. Yan and D. Ross (2012). "NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones." Biochem Pharmacol **83**(8): 1033-1040.

Singh, A., T. Rangasamy, R. K. Thimmulappa, H. Lee, W. O. Osburn, R. Brigelius-Flohe, T. W. Kensler, M. Yamamoto and S. Biswal (2006). "Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2." Am J Respir Cell Mol Biol **35**(6): 639-650.

Singh, S., S. Vrishni, B. K. Singh, I. Rahman and P. Kakkar (2010). "Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases." Free Radic Res **44**(11): 1267-1288.

Sligh, J. E., Jr., C. M. Ballantyne, S. S. Rich, H. K. Hawkins, C. W. Smith, A. Bradley and A. L. Beaudet (1993). "Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8529-8533.

Smith, C. K., C. A. Moore, E. N. Elahi, A. T. Smart and S. A. Hotchkiss (2000). "Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde, and cinnamic alcohol." Toxicol Appl Pharmacol **168**(3): 189-199.

Song, D. H. and J. O. Lee (2012). "Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors." Immunol Rev **250**(1): 216-229.

Sozzani, S., P. Allavena, G. D'Amico, W. Luini, G. Bianchi, M. Kataura, T. Imai, O. Yoshie, R. Bonecchi and A. Mantovani (1998). "Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties." Journal of immunology **161**(3): 1083-1086.

Stary, G., C. Bangert, M. Tauber, R. Strohal, T. Kopp and G. Stingl (2007). "Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells." The Journal of experimental medicine **204**(6): 1441-1451.

Steinbrink, K., E. Graulich, S. Kubsch, J. Knop and A. H. Enk (2002). "CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity." Blood **99**(7): 2468-2476.

Steinbrink, K., C. Sorg and E. Macher (1996). "Low zone tolerance to contact allergens in mice: a functional role for CD8+ T helper type 2 cells." The Journal of experimental medicine **183**(3): 759-768.

Steinman, R. M. (2006). "Linking innate to adaptive immunity through dendritic cells." Novartis Found Symp **279**: 101-109; discussion 109-113, 216-109.

Stepkowski, T. M. and M. K. Kruszewski (2011). "Molecular cross-talk between the NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy, and apoptosis." Free Radic Biol Med **50**(9): 1186-1195.

Stoll, S., G. Muller, M. Kurimoto, J. Saloga, T. Tanimoto, H. Yamauchi, H. Okamura, J. Knop and A. H. Enk (1997). "Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes." J Immunol **159**(1): 298-302.

Stroncek, D. F., R. A. Shankar and K. M. Skubitz (2005). "The subcellular distribution of myeloid-related protein 8 (MRP8) and MRP14 in human neutrophils." J Transl Med **3**: 36.

Sturtz, L. A., K. Diekert, L. T. Jensen, R. Lill and V. C. Culotta (2001). "A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage." The Journal of biological chemistry **276**(41): 38084-38089.

Summers deLuca, L. and J. L. Gommerman (2012). "Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily." Nature reviews. Immunology **12**(5): 339-351.

Sun, Z., Y. E. Chin and D. D. Zhang (2009a). "Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response." Mol Cell Biol **29**(10): 2658-2672.

Sun, Z., Z. Huang and D. D. Zhang (2009b). "Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response." PloS one **4**(8): e6588.

Sun, Z., T. Wu, F. Zhao, A. Lau, C. M. Birch and D. D. Zhang (2011). "KPNA6 (Importin {alpha}7)-mediated nuclear import of Keap1 represses the Nrf2-dependent antioxidant response." Mol Cell Biol **31**(9): 1800-1811.

Surprenant, A. and R. A. North (2009). "Signaling at purinergic P2X receptors." Annu Rev Physiol **71**: 333-359.

Sutterwala, F. S., Y. Ogura, M. Szczepanik, M. Lara-Tejero, G. S. Lichtenberger, E. P. Grant, J. Bertin, A. J. Coyle, J. E. Galan, P. W. Askenase and R. A. Flavell (2006). "Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1." Immunity **24**(3): 317-327.

Svajger, U. and P. Rozman (2013). "Tolerogenic dendritic cells: molecular and cellular mechanisms in transplantation." J Leukoc Biol.

Szczepanik, M., M. Akahira-Azuma, K. Bryniarski, R. F. Tsuji, I. Kawikova, W. Ptak, C. Kiener, R. A. Campos and P. W. Askenase (2003). "B-1 B cells mediate required early T cell recruitment to elicit protein-induced delayed-type hypersensitivity." Journal of immunology **171**(11): 6225-6235.

T

Taguchi, K., H. Motohashi and M. Yamamoto (2011). "Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution." Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms **16**(2): 123-140.

Tang, X., H. Wang, L. Fan, X. Wu, A. Xin, H. Ren and X. J. Wang (2011). "Luteolin inhibits Nrf2 leading to negative regulation of the Nrf2/ARE pathway and sensitization of human lung carcinoma A549 cells to therapeutic drugs." Free Radic Biol Med **50**(11): 1599-1609.

Tanigawa, S., M. Fujii and D. X. Hou (2007). "Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin." Free Radic Biol Med **42**(11): 1690-1703.

Tanito, M., M. P. Agbaga and R. E. Anderson (2007). "Upregulation of thioredoxin system via Nrf2-antioxidant responsive element pathway in adaptive-retinal neuroprotection in vivo and in vitro." Free Radic Biol Med **42**(12): 1838-1850.

Tarumoto, T., T. Nagai, K. Ohmine, T. Miyoshi, M. Nakamura, T. Kondo, K. Mitsugi, S. Nakano, K. Muroi, N. Komatsu and K. Ozawa (2004). "Ascorbic acid restores sensitivity to imatinib via suppression of Nrf2-dependent gene expression in the imatinib-resistant cell line." Exp Hematol **32**(4): 375-381.

Theoharides, T. C., K. D. Alysandratos, A. Angelidou, D. A. Delivanis, N. Sismanopoulos, B. Zhang, S. Asadi, M. Vasiadi, Z. Weng, A. Miniati and D. Kalogeromitros (2012). "Mast cells and inflammation." Biochim Biophys Acta **1822**(1): 21-33.

Theoharides, T. C. and D. Kalogeromitros (2006). "The critical role of mast cells in allergy and inflammation." Annals of the New York Academy of Sciences **1088**: 78-99.

Thierse, H. J., K. Gamerdinger, C. Junkes, N. Guerreiro and H. U. Weltzien (2005). "T cell receptor (TCR) interaction with haptens: metal ions as non-classical haptens." Toxicology **209**(2): 101-107.

Thierse, H. J., C. Moulon, Y. Allespach, B. Zimmermann, A. Doetze, S. Kuppig, D. Wild, F. Herberg and H. U. Weltzien (2004). "Metal-protein complex-mediated transport and delivery of Ni2+ to TCR/MHC contact sites in nickel-specific human T cell activation." Journal of immunology **172**(3): 1926-1934.

Thimmulappa, R. K., H. Lee, T. Rangasamy, S. P. Reddy, M. Yamamoto, T. W. Kensler and S. Biswal (2006a). "Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis." The Journal of clinical investigation **116**(4): 984-995.

Thimmulappa, R. K., K. H. Mai, S. Srisuma, T. W. Kensler, M. Yamamoto and S. Biswal (2002). "Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray." Cancer Res **62**(18): 5196-5203.

Thimmulappa, R. K., C. Scollick, K. Traore, M. Yates, M. A. Trush, K. T. Liby, M. B. Sporn, M. Yamamoto, T. W. Kensler and S. Biswal (2006b). "Nrf2-dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolide." Biochemical and biophysical research communications **351**(4): 883-889.

Tian, F. F., F. F. Zhang, X. D. Lai, L. J. Wang, L. Yang, X. Wang, G. Singh and J. L. Zhong (2011). "Nrf2-mediated protection against UVA radiation in human skin keratinocytes." Biosci Trends **5**(1): 23-29.

Tian, H., B. Zhang, J. Di, G. Jiang, F. Chen, H. Li, L. Li, D. Pei and J. Zheng (2012). "Keap1: one stone kills three birds Nrf2, IKKbeta and Bcl-2/Bcl-xL." Cancer Lett **325**(1): 26-34.

Tietz, W., Y. Allemand, E. Borges, D. von Laer, R. Hallmann, D. Vestweber and A. Hamann (1998). "CD4+ T cells migrate into inflamed skin only if they express ligands for E- and P-selectin." Journal of immunology **161**(2): 963-970.

Togo, T., O. Katsuse and E. Iseki (2004). "Nitric oxide pathways in Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias." Neurol Res **26**(5): 563-566.

Tomura, M., T. Honda, H. Tanizaki, A. Otsuka, G. Egawa, Y. Tokura, H. Waldmann, S. Hori, J. G. Cyster, T. Watanabe, Y. Miyachi, O. Kanagawa and K. Kabashima (2010). "Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice." The Journal of clinical investigation **120**(3): 883-893.

Tong, K. I., Y. Katoh, H. Kusunoki, K. Itoh, T. Tanaka and M. Yamamoto (2006a). "Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model." Mol Cell Biol **26**(8): 2887-2900.

Tong, K. I., A. Kobayashi, F. Katsuoka and M. Yamamoto (2006b). "Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism." Biol Chem **387**(10-11): 1311-1320.

Tong, K. I., B. Padmanabhan, A. Kobayashi, C. Shang, Y. Hirotsu, S. Yokoyama and M. Yamamoto (2007). "Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response." Mol Cell Biol **27**(21): 7511-7521.

Toulon, A., L. Breton, K. R. Taylor, M. Tenenhaus, D. Bhavsar, C. Lanigan, R. Rudolph, J. Jameson and W. L. Havran (2009). "A role for human skin-resident T cells in wound healing." The Journal of experimental medicine **206**(4): 743-750.

Trachootham, D., W. Lu, M. A. Ogasawara, R. D. Nilsa and P. Huang (2008). "Redox regulation of cell survival." Antioxidants & redox signaling **10**(8): 1343-1374.

Tsuji, R. F., I. Kawikova, R. Ramabhadran, M. Akahira-Azuma, D. Taub, T. E. Hugli, C. Gerard and P. W. Askenase (2000). "Early local generation of C5a initiates the elicitation of contact sensitivity by leading to early T cell recruitment." Journal of immunology **165**(3): 1588-1598.

Tsuji, R. F., M. Szczepanik, I. Kawikova, V. Paliwal, R. A. Campos, A. Itakura, M. Akahira-Azuma, N. Baumgarth, L. A. Herzenberg and P. W. Askenase (2002). "B cell-dependent T cell responses: IgM antibodies are required to elicit contact sensitivity." The Journal of experimental medicine **196**(10): 1277-1290.

U

Usatine, R. P. and M. Riojas (2010). "Diagnosis and management of contact dermatitis." Am Fam Physician **82**(3): 249-255.

V

Vabulas, R. M., P. Ahmad-Nejad, S. Ghose, C. J. Kirschning, R. D. Issels and H. Wagner (2002). "HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway." J Biol Chem **277**(17): 15107-15112.

Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur and J. Telser (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.

Valladeau, J., O. Ravel, C. Dezutter-Dambuyant, K. Moore, M. Kleijmeer, Y. Liu, V. Duvert-Frances, C. Vincent, D. Schmitt, J. Davoust, C. Caux, S. Lebecque and S. Saeland (2000). "Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules." Immunity **12**(1): 71-81.

Valladeau, J. and S. Saeland (2005). "Cutaneous dendritic cells." Semin Immunol **17**(4): 273-283.

Van den Steen, P. E., B. Dubois, I. Nelissen, P. M. Rudd, R. A. Dwek and G. Opdenakker (2002). "Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)." Crit Rev Biochem Mol Biol **37**(6): 375-536.

van Loveren, H., R. Meade and P. W. Askenase (1983). "An early component of delayed-type hypersensitivity mediated by T cells and mast cells." The Journal of experimental medicine **157**(5): 1604-1617.

Van Och, F. M., H. Van Loveren, J. C. Van Wolfswinkel, A. J. Machielsen and R. J. Vandebriel (2005). "Assessment of potency of allergenic activity of low molecular weight compounds based on IL-1alpha and IL-18 production by a murine and human keratinocyte cell line." Toxicology **210**(2-3): 95-109.

Verma, R. P. and C. Hansch (2007). "Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs." Bioorg Med Chem **15**(6): 2223-2268.

Vigan, M. (2009). "Clinical patterns of allergic contact dermatitis to fragrances." Revue Francaise D Allergologie **49**(4): 356-359.

Villadangos, J. A. and P. Schnorrer (2007). "Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo." Nature reviews. Immunology **7**(7): 543-555.

Vladimer, G. I., R. Marty-Roix, S. Ghosh, D. Weng and E. Lien (2013). "Inflammasomes and host defenses against bacterial infections." Curr Opin Microbiol **16**(1): 23-31.

Vocanson, M., A. Hennino, C. Chavagnac, A. Rozieres, P. Saint-Mezard, H. Akiba, M. Satoh, D. Kaiserlian and J. F. Nicolas (2006). "[Allergic contact dermatitis: how to re-induce tolerance?]." Med Sci (Paris) **22**(2): 158-163.

Vocanson, M., A. Hennino, A. Rozieres, G. Poyet and J. F. Nicolas (2009). "Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis." Allergy **64**(12): 1699-1714.

Vocanson, M., A. Rozieres, A. Hennino, G. Poyet, V. Gaillard, S. Renaudineau, A. Achachi, J. Benetiere, D. Kaiserlian, B. Dubois and J. F. Nicolas (2010). "Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells." J Allergy Clin Immunol **126**(2): 280-289, 289 e281-287.

Volonte, D., Z. Liu, P. M. Musille, E. Stoppani, N. Wakabayashi, Y. P. Di, M. P. Lisanti, T. W. Kensler and F. Galbiati (2013). "Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by caveolin-1 promotes stress-induced premature senescence." Mol Biol Cell **24**(12): 1852-1862.

W

Wagner, A. E., I. Ernst, R. Iori, C. Desel and G. Rimbach (2010). "Sulforaphane but not ascorbigen, indole-3-carbinole and ascorbic acid activates the transcription factor Nrf2 and induces phase-2 and antioxidant enzymes in human keratinocytes in culture." Exp Dermatol **19**(2): 137-144.

Wang, B., C. Esche, A. Mamelak, I. Freed, H. Watanabe and D. N. Sauder (2003). "Cytokine knockouts in contact hypersensitivity research." Cytokine Growth Factor Rev **14**(5): 381-389.

Wang, L., Y. Chen, P. Sternberg and J. Cai (2008). "Essential roles of the PI3 kinase/Akt pathway in regulating Nrf2-dependent antioxidant functions in the RPE." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(4): 1671-1678.

Wang, M., X. Qin, J. S. Mudgett, T. A. Ferguson, R. M. Senior and H. G. Welgus (1999). "Matrix metalloproteinase deficiencies affect contact hypersensitivity: stromelysin-1 deficiency prevents the response and gelatinase B deficiency prolongs the response." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6885-6889.

Wang, W., M. A. Knovich, L. G. Coffman, F. M. Torti and S. V. Torti (2010). "Serum ferritin: Past, present and future." Biochim Biophys Acta **1800**(8): 760-769.

Wang, X. J., J. D. Hayes, C. J. Henderson and C. R. Wolf (2007). "Identification of retinoic acid as an inhibitor of transcription factor Nrf2 through activation of retinoic acid receptor alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19589-19594.

Watai, Y., A. Kobayashi, H. Nagase, M. Mizukami, J. McEvoy, J. D. Singer, K. Itoh and M. Yamamoto (2007). "Subcellular localization and cytoplasmic complex status of endogenous Keap1." Genes Cells **12**(10): 1163-1178.

Watanabe, H., O. Gaide, V. Petrilli, F. Martinon, E. Contassot, S. Roques, J. A. Kummer, J. Tschopp and L. E. French (2007a). "Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity." The Journal of investigative dermatology **127**(8): 1956-1963.

Watanabe, H., S. Gehrke, E. Contassot, S. Roques, J. Tschopp, P. S. Friedmann, L. E. French and O. Gaide (2008). "Danger signaling through the inflammasome acts as a master switch between tolerance and sensitization." Journal of immunology **180**(9): 5826-5832.

Watanabe, R., M. Fujimoto, N. Ishiura, Y. Kuwano, H. Nakashima, N. Yazawa, H. Okochi, S. Sato, T. F. Tedder and K. Tamaki (2007b). "CD19 expression in B cells is important for suppression of contact hypersensitivity." Am J Pathol **171**(2): 560-570.

Weber, F. C., P. R. Esser, T. Muller, J. Ganesan, P. Pellegatti, M. M. Simon, R. Zeiser, M. Idzko, T. Jakob and S. F. Martin (2010). "Lack of the purinergic receptor P2X(7) results in resistance to contact hypersensitivity." The Journal of experimental medicine **207**(12): 2609-2619.

West, A. P., I. E. Brodsky, C. Rahner, D. K. Woo, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. C. Walsh, Y. Choi, G. S. Shadel and S. Ghosh (2011). "TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS." Nature **472**(7344): 476-480.

Wild, A. C. and R. T. Mulcahy (2000). "Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression: insights into transcriptional control of antioxidant defenses." Free radical research **32**(4): 281-301.

Wilsmann-Theis, D., S. Koch, C. Mindnich, S. Bonness, S. Schnautz, D. von Bubnoff and T. Bieber (2013). "Generation and functional analysis of human TNF-alpha/iNOS-producing dendritic cells (Tip-DC)." Allergy **68**(7): 890-898.

Wisniewski, J., R. Agrawal and J. A. Woodfolk (2013). "Mechanisms of tolerance induction in allergic disease: integrating current and emerging concepts." Clin Exp Allergy **43**(2): 164-176.

Wollenberg, A., S. Kraft, D. Hanau and T. Bieber (1996). "Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema." The Journal of investigative dermatology **106**(3): 446-453.

Wollenberg, A., M. Wagner, S. Gunther, A. Towarowski, E. Tuma, M. Moderer, S. Rothenfusser, S. Wetzel, S. Endres and G. Hartmann (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases." The Journal of investigative dermatology **119**(5): 1096-1102.

Wong, S. H., L. Santambrogio and J. L. Strominger (2004). "Caspases and nitric oxide broadly regulate dendritic cell maturation and surface expression of class II MHC proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(51): 17783-17788.

X

Xu, H., H. Guan, G. Zu, D. Bullard, J. Hanson, M. Slater and C. A. Elmets (2001). "The role of ICAM-1 molecule in the migration of Langerhans cells in the skin and regional lymph node." Eur J Immunol **31**(10): 3085-3093.

Xu, H., P. S. Heeger and R. L. Fairchild (1997). "Distinct roles for B7-1 and B7-2 determinants during priming of effector CD8+ Tc1 and regulatory CD4+ Th2 cells for contact hypersensitivity." Journal of immunology **159**(9): 4217-4226.

Xystrakis, E., A. S. Dejean, I. Bernard, P. Druet, R. Liblau, D. Gonzalez-Dunia and A. Saoudi (2004). "Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation." Blood **104**(10): 3294-3301.

Y

Yamamoto, T., T. Suzuki, A. Kobayashi, J. Wakabayashi, J. Maher, H. Motohashi and M. Yamamoto (2008). "Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity." Mol Cell Biol **28**(8): 2758-2770.

Yanaba, K., J. D. Bouaziz, K. M. Haas, J. C. Poe, M. Fujimoto and T. F. Tedder (2008). "A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses." Immunity **28**(5): 639-650.

Yanagihara, S., E. Komura, J. Nagafune, H. Watarai and Y. Yamaguchi (1998). "EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation." Journal of immunology **161**(6): 3096-3102.

Yang, C., X. Zhang, H. Fan and Y. Liu (2009). "Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia." Brain Res **1282**: 133-141.

Yeh, C. T. and G. C. Yen (2006). "Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression." J Nutr **136**(1): 11-15.

Yin, Y., J. L. Pastrana, X. Li, X. Huang, K. Mallilankaraman, E. T. Choi, M. Madesh, H. Wang and X. F. Yang (2013). "Inflammasomes: sensors of metabolic stresses for vascular inflammation." Front Biosci (Landmark Ed) **18**: 638-649.

Yoshiki, R., K. Kabashima, J. Sakabe, K. Sugita, T. Bito, M. Nakamura, B. Malissen and Y. Tokura (2010). "The mandatory role of IL-10-producing and OX40 ligand-expressing mature Langerhans cells in local UVB-induced immunosuppression." Journal of immunology **184**(10): 5670-5677.

Yu, M., H. Li, Q. Liu, F. Liu, L. Tang, C. Li, Y. Yuan, Y. Zhan, W. Xu, W. Li, H. Chen, C. Ge, J. Wang and X. Yang (2011). "Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway." Cell Signal **23**(5): 883-892.

Yu, R., W. Lei, S. Mandlekar, M. J. Weber, C. J. Der, J. Wu and A. N. Kong (1999). "Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals." The Journal of biological chemistry **274**(39): 27545-27552.

Yuan, X., C. Xu, Z. Pan, Y. S. Keum, J. H. Kim, G. Shen, S. Yu, K. T. Oo, J. Ma and A. N. Kong (2006). "Butylated hydroxyanisole regulates ARE-mediated gene expression via Nrf2 coupled with ERK and JNK signaling pathway in HepG2 cells." Molecular carcinogenesis **45**(11): 841-850.

Z

Zaba, L. C., J. G. Krueger and M. A. Lowes (2009). "Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin." The Journal of investigative dermatology **129**(2): 302-308.

Zemelka-Wiacek, M., M. Majewska-Szczepanik, W. Pyrczak and M. Szczepanik (2013). "Complementary methods for contact hypersensitivity (CHS) evaluation in mice." J Immunol Methods **387**(1-2): 270-275.

Zhang, D. D. and M. Hannink (2003). "Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress." Mol Cell Biol **23**(22): 8137-8151.

Zhang, D. D., S. C. Lo, Z. Sun, G. M. Habib, M. W. Lieberman and M. Hannink (2005). "Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway." The Journal of biological chemistry **280**(34): 30091-30099.

Zhang, X., Y. Kluger, Y. Nakayama, R. Poddar, C. Whitney, A. DeTora, S. M. Weissman and P. E. Newburger (2004). "Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli." J Leukoc Biol **75**(2): 358-372.

Zheng, S. G., J. D. Gray, K. Ohtsuka, S. Yamagiwa and D. A. Horwitz (2002). "Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors." Journal of immunology **169**(8): 4183-4189.

Zhu, H., K. Itoh, M. Yamamoto, J. L. Zweier and Y. Li (2005). "Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury." FEBS Lett **579**(14): 3029-3036.

Zhu, H., L. Zhang, K. Itoh, M. Yamamoto, D. Ross, M. A. Trush, J. L. Zweier and Y. Li (2006). "Nrf2 controls bone marrow stromal cell susceptibility to oxidative and electrophilic stress." Free Radic Biol Med **41**(1): 132-143.

Zhu, L., E. C. Barret, Y. Xu, Z. Liu, A. Manoharan and Y. Chen (2013). "Regulation of Cigarette Smoke (CS)-Induced Autophagy by Nrf2." PloS one **8**(4): e55695.

Zhu, M. and W. E. Fahl (2001). "Functional characterization of transcription regulators that interact with the electrophile response element." Biochemical and biophysical research communications **289**(1): 212-219.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

Rôle du facteur de transcription Nrf2 dans le phénotype des cellules THP1 en réponse aux haptènes

Zeina El Ali, Marie-Hélène Damiens, Marc Pallardy et Saadia Kerdine-Römer

Journée de la recherche – Faculté de Pharmacie, Châtenay Malabry- France- 12 Novembre 2009

Colloque du Domaine d'Intérêt Majeur (DIM)- SEnT- Versailles – France – 26 Novembre 2009

Xème Journées de l'Ecole Doctorale (JED)- Orsay, France – 25-26 Mai 2010

The survival and the phenotype of THP1 cells are controlled by the transcriptional factor Nrf2 in response to chemical sensitizers.

Zeina El Ali, Philippe Rousseau, Marie-Hélène Damiens, Marc Pallardy and Saadia Kerdine-Römer

49th Annual Meeting of Society of Society of Toxicology (SOT) – Utah – USA – 7-11 Mars 2010

The survival of human dendritic cells is controlled by the transcriptional factor Nrf2 in response to chemical sensitizers.

Zeina El Ali, Marie-Hélène Damiens, Marc Pallardy and Saadia Kerdine-Römer

DC2010 – 11th International Symposium on Dendritic cells in Fundamental and clinical immunology- Lugano – Swisse – 26-30 Septembre 2010

50th Annual Meeting of Society of Toxicology (SOT) – Washington, D.C – USA – 6-10 Mars 2011

10th world congress on inflammation- Paris, France- 26-29 Juin 2011

ULLA Summer School 2011- Parme, Italie - 2-8 Juillet 2011

La survie des cellules dendritiques humaines est contrôlée par le facteur de transcription Nrf2 en réponse aux molécules sensibilisantes.

Zeina El Ali, Marc Pallardy et Saadia Kerdine-Römer

Congrès de la Société de Pharmacologie et de Toxicologie Cellulaire (SPTC)- Toulouse- 19-20 Mai 2011

XIème Journées de l'Ecole Doctorale (JED)- Châtenay-Malabry, France- 23-24 Mai 2011

Evaluation of the sensitizing potential of chemicals based on their chemical reactivity

Migdal Camille, El Ali Zeina, Giménez-Arnau Elena, Lepoittevin Jean-Pierre, Kerdine-Römer Saadia, Pallardy Marc

10th world congress on inflammation- Paris, France- 26-29 Juin 2011

A proteomics approach to elucidate the role of the Keap1/Nrf2 pathway in dendritic cells upon activation by chemical contact

Haase A., Mussotter F., El Ali Z., Kerdine-Römer S., Wruck C., Pallardy M., Luch A., Goetz M.E.

47th Congress of European Societies of Toxicology (EUROTOX) - Paris, France- 28-31 Août 2011

Chemical sensitizer's reactivity and Nrf2 activation in human dendritic cells and the THP-1 cell line

C. Migdal, Z. El Ali, S. Kerdine-Römer, M-E. Azoury, J.Guldemann, E. Giménez-Arnau, J-P. Lepoittevin and M Pallardy

51th Annual Meeting of Society of Toxicology (SOT) – San Francisco, California - USA - 11–15 Mars 2012

The role of the transcriptional factor Nrf2 in hypersensitivity

Zeina El Ali, Cédric Gerbeix, Philippe Esser, Pauline Robert, Jean-Jacques Legrand, Stefan Martin, Marc Pallardy and Saadia Kerdine-Römer

47th Congress of European Societies of Toxicology (EUROTOX) - Paris, France- 28-31 Août 2011

51th Annual Meeting of Society of Toxicology (SOT) – San Francisco, California - USA - 11–15 Mars 2012

Drug Hypersensitivity Meeting 5 (DHM5 2012) – Munich, Allemagne – 11-14 Avril 2012

The survival of murine dendritic cells is controlled by the transcriptional factor Nrf2 in response to contact sensitizers.

Zeina El Ali, Marc Pallardy and Saadia Kerdine-Römer

Club Francophone des Cellules Dendritiques (CFCD)-Paris-France- 13-14 décembre 2012

Rôle du facteur de transcription Nrf2 dans l'hypersensibilité retardée

Zeina El Ali, Cédric Gerbeix, Philippe Esser, Pauline Robert, Jean-Jacques Legrand, Stefan Martin, Marc Pallardy et Saadia Kerdine-Römer

Congrès de la Société de Pharmacologie et de Toxicologie Cellulaire (SPTC) – Université Paris Diderot- France- 10-11 Mai 2012

XIIème Journées de l'Ecole Doctorale (JED)- Châtenay-Malabry, France- Mai 2012

L'activation du facteur de transcription Nrf2, régulateur rédox, est contrôlée par la kinase c-Jun-N-terminal et la caséine kinase II.

Marie de Bourayne, Zeina El Ali, Marc Pallardy, Saadia Kerdine-Römer

Congrès de la Société de Pharmacologie et de Toxicologie Cellulaire (SPTC) – Université Paris Diderot- France- 10-11 Mai 2012

A proteomics approach to elucidate the role of Nrf2 in primary bonemarrow-derived dendritic cells of mice upon activation by contact allergens

Franz Mussotter, Andrea Haase, Zeina El Ali, Saadia Kerdine- Römer, Janina Tomm, Marc Pallardy, Martin von Bergen, and Andreas Luch

52th Annual Meeting of Society of Toxicology (SOT) – San Francisco, California - USA - Mars 2013
49th Congress of European Societies of Toxicology (EUROTOX). Interlaken, Switzerland. September 2013

Allergic skin inflammation induced by chemical sensitizers is controlled by the transcription factor Nrf2
Zeina El Ali, Cédric Gerbeix, Patrice Hemon, Philipp R. Esser, Stefan F. Martin, Marc Pallardy and Saadia Kerdine-Römer, 49th Congress of European Societies of Toxicology (EUROTOX). Interlaken, Switzerland. September 2013

Protein kinase CK2 and JNK control Nrf2 activation in response to skin contact sensitizers in THP1 cells
Marie de Bourayne, Zeina El Ali, Odile Filhol, Claude Cochet, Marc Pallardy et Saadia Kerdine-Römer, 49th Congress Of European Societies of Toxicology (EUROTOX). Interlaken, Switzerland. September 2013

Rôle du facteur de transcription Nrf2 dans l'immunotoxicité des adjuvants vaccinaux,
Romain Génard, Zeina El Ali, Marc Pallardy et Saadia Kerdine-Römer, Société de Pharmacologie et de Toxicologie Cellulaire (SPTC). Paris, France- Juin 2013

La protéine kinase CK2 et c-Jun N-terminal participent à l'cativation du facteur de transcritpion Nrf2 en réponse aux molécules sensibilisantes.
Marie de Bourayne, Zeina El Ali, Odile Filhol, Claude Cochet, Marc Pallardy and Saadia Kerdine-Römer, Société de Pharmacologie et de Toxicologie Cellulaire (SPTC). Paris, France- Juin 2013

La survie des cellules dendritiques murines est contrôlée par le facteur de transcription Nrf2 en réponse aux molécules allergisantes.
Zeina El Ali, Marc Pallardy and Saadia Kerdine-Römer, Société de Pharmacologie et de Toxicologie Cellulaire (SPTC). Paris, France- Juin 2013

COMMUNICATIONS ORALES

Rôle du facteur de transcription Nrf2 dans le phénotype des cellules THP1 en réponse aux haptènes
Zeina El Ali, Marie-Hélène Damiens, Marc Pallardy et Saadia Kerdine-Römer
Congrès de la Société de Pharmacologie et de Toxicologie Cellulaire (SPTC) – Université Paris Diderot- France- Mai 2010

The survival and the phenotype of THP1 cells are controlled by the transcriptional factor Nrf2 in response to chemical sensitizers.

Zeina El Ali, Philippe Rousseau, Marie-Hélène Damiens, Marc Pallardy and Saadia Kerdine-Römer
ITCASS – Den Bosch – The Netherlands – 21-22 Juin 2010

The Role of the transcriptional factor Nrf2 in the survival of human dendritic cells in response to chemical sensitizers
Zeina El Ali, Marc Pallardy and Saadia Kerdine-Römer
23rd European Research Group on Experimental Contact Dermatitis (ERGECD) - Gothenburg- Suède- 8-11 Juin 2011

Rôle du facteur de transcription Nrf2 dans l'hypersensibilité retardée
Zeina El Ali, Cédric Gerbeix, Philippe Esser, Pauline Robert, Jean-Jacques Legrand, Stefan Martin, Marc Pallardy et Saadia Kerdine-Römer
Congrès de la Société de Pharmacologie et de Toxicologie Cellulaire (SPTC) – Université Paris Diderot- France- 10-11 Mai 2012

ANNEXES



ARTICLE 3

TOXICOLOGICAL SCIENCES **133(2)**, 259–274 2013
doi:10.1093/toxsci/kft075
Advance Access publication March 27, 2013

Reactivity of Chemical Sensitizers Toward Amino Acids *In Cellulo* Plays a Role in the Activation of the Nrf2-ARE Pathway in Human Monocyte Dendritic Cells and the THP-1 Cell Line

Camille Migdal,* Jérémie Botton,† Zeina El Ali,* Marie-Eliane Azoury,* Joan Guldemann,‡ Elena Giménez-Arnau,‡ Jean-Pierre Lepoittevin,‡ Saadia Kerdine-Römer,* and Marc Pallardy*,[1]

*UniverSud, INSERM UMR-S 996, Faculté de Pharmacie, 92290 Châtenay-Malabry, France; †UniverSud, INSERM UMR-S 1018, Centre de Recherche en Epidémiologie et Santé des Populations, 94800 Villejuif, France; and ‡Université de Strasbourg, CNRS UMR 7177, Laboratoire de Dermatochimie, 67081 Strasbourg, France

[1]To whom correspondence should be addressed at INSERM UMR 996, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France. Fax: +33-1-46-83-53-96. E-mail: marc.pallardy@u-psud.fr.

Received October 30, 2012; accepted March 8, 2013

Allergic contact dermatitis resulting from skin sensitization is an inflammatory skin disease linked to the use of chemicals termed haptens. Chemical reactivity is necessary for a chemical to be a sensitizer, allowing both covalent binding to proteins and maturation of dendritic cells (DCs) by mimicking "danger signals." The aim of this study was to evaluate how the reactivity of chemical sensitizers toward amino acids translates into a biological response using the activation of the nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) pathway, which was assessed by the induction of three Nrf2 target genes (*ho-1*, *nqo1*, and *il-8*) and Nrf2 protein accumulation. Nrf2 activation is known to play a role in numerous detoxification mechanisms that could regulate danger signal outcomes in myeloid cells. Monocyte-derived DCs and THP-1 cells were exposed to (a) haptens with cysteine, lysine, or cysteine/lysine reactivity, (b) pro-/prehaptens, and (c) nonsensitizing molecules with reducing or oxidative properties (17 molecules in total). Chemicals were classified as "Nrf2 pathway activators" when at least two Nrf2 target genes associated with Nrf2 protein expression were induced. Results showed that most chemical sensitizers having cysteine and cysteine/lysine affinities were inducers of the Nrf2 pathway in both cell models, whereas lysine-reactive chemicals were less efficient. In THP-1 cells, the Nrf2 pathway was also activated by pro-/prehaptens. Regression analysis revealed that *ho-1* and *nqo1* expressions were found to be associated with chemical sensitizer reactivity to cysteine, providing evidence of the importance of chemical reactivity, as a part of danger signals, in DC biology.

Key Words: **chemical sensitizer reactivity; Nrf2; dendritic cells.**

Allergic contact dermatitis (ACD) is a predominantly $CD8^+$ T cell–mediated immune disease induced by small reactive chemicals. Dendritic cells (DCs) play a key role in ACD (for review, Vocanson *et al.* (2009)) as they are able to (a) detect, capture, and process chemical-protein complexes, (b) migrate from the skin to the draining lymph nodes, and (c) present the hapten-protein complex to naive T cells (Banchereau and Steinman, 1998). Several *in vitro* studies reported that human DCs were able to acquire a mature phenotype in response to chemical sensitizer exposure, characterized by the upregulation of (1) MHC-II molecules, costimulatory molecules, chemokine receptors and (2) the synthesis of cytokines (Aiba *et al.*, 1997; Hulette *et al.*, 2002; Reuter *et al.*, 2011). The hypothesis that chemical sensitizers can be perceived as a danger signal by DCs has been also proposed based on signaling pathways identified upon chemical sensitizer treatment and known to be triggered by danger signals such as toll-like receptor agonists (Ade *et al.*, 2007; Boislève *et al.*, 2004, 2005). Signaling pathways such as MAPKs and NF-κB are known to be redox sensitive, and oxidative stress induced by chemical sensitizers has been shown to participate in the DC-maturation process (for review, see Neves *et al.* (2011)).

It is now well recognized that skin sensitization and chemical protein reactivity are linked. The formation of a stable and immunogenic hapten-protein complex, able to be fully recognized by naive T cells, is one of the mandatory conditions for ACD to occur. This capacity of chemical sensitizers to react with amino acids is also used in *in silico* models, evaluating the sensitization potential of chemicals by either using (quantitative) structure-activity relationships (Aptula *et al.*, 2005) or measuring peptide depletion (Gerberick *et al.*, 2004). Indeed, a correlation between peptide reactivity (using cysteine- and lysine-based peptide depletion assays) and the sensitization potential of chemicals (evaluated by the local lymph node assay) has been demonstrated (Gerberick *et al.*, 2007, 2009; Troutman *et al.*, 2011).

Although chemical sensitizers are extremely diverse in weight and structure, most of them share electrophilic properties and

© The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Society of Toxicology.
All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

Downloaded from http://toxsci.oxfordjournals.org/ at INSERM on October 27, 2013

possess intrinsic reactivity toward various amino acids containing nucleophilic heteroatoms (i.e., cysteine, lysine, histidine, arginine, or methionine). Electrophilic and oxidative stresses can be detected by the Keap1-Nrf2 cellular sensor pathway, implicated in the antioxidant response of the cell (Baird and Dinkova-Kostova, 2011). Under normal conditions, the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) sequesters the transcriptional regulator nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in the cytoplasm, provoking its proteasomal degradation (Kobayashi *et al*., 2004). In the presence of electrophiles or oxidants, the highly reactive cysteine residues of Keap1 are modified, leading to the dissociation of Keap1 from Nrf2. Nrf2 translocates to the nucleus and forms heterodimers with small Maf proteins. These dimers induce the transcription of genes with an antioxidant response element (ARE) in their promoters (Holland and Fishbein, 2010) and coding for proteins mostly involved in detoxification, such as heme oxygenase-1 (HO-1) or NADPH-quinone oxidoreductase 1 (Nqo1). Thus, Keap1-Nrf2 seems to be one of the cellular sensor mechanisms that recognize intrinsic chemical reactivity of molecules rather than diverse structures, and a number of reports suggest that chemical sensitizers may activate the Nrf2 pathway (Natsch, 2010). Indeed, mostly all chemical sensitizers, with the exception of lysine-reactive haptens, have been found positive in a cell-based ARE assay (Emter *et al*., 2010; Natsch and Emter, 2008), and recently, Ade *et al.* (2009) have demonstrated that chemical sensitizers induce *ho-1* and *nqo1* mRNA expression and Nrf2 accumulation in $CD34^+$-DCs and in the THP-1 cell line.

In this context, we hypothesized that the electrophilic properties of chemical sensitizers toward endogenous proteins may be part of the danger signals perceived by DCs exposed to these chemicals, leading to the activation of the Nrf2-ARE regulatory pathway. The main objective of this work was to evaluate how chemical sensitizer's reactivity to amino acids translates into a biological response using the activation of the Nrf2-ARE pathway. This question was addressed in both monocyte-derived DCs (Mo-DCs) and in the THP-1 cell line whose phenotypic modifications induced by chemicals are currently under evaluation by ECVAM as a model (European Center for the Validation of Alternative Methods). The expressions of Nrf2-dependent ARE-responsive genes, such as *ho-1*, *nqo1*, and *il-8* (Zhang *et al*., 2005), and Nrf2 protein accumulation were assessed in response to chemicals. Sensitizers ranged from weak to strong and covered essentially cysteine, lysine, or cysteine/lysine mixed reactivity. The effects of pro-/prehaptens and nonsensitizing molecules with oxidative and reducing properties were also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. 2-Mercaptoethanol, 7-aminoactinomycin D (7-AAD), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB), cinnamaldehyde (CIN), diethyl maleate (DEM), 4,4′-methylene bis-phenyl isocyanate (4,4′ MDI), diphenylcyclopropenone (DPC), N-methyl-3-isothiazolinone (MI), phthalic anhydride (AP), trimellitic anhydride (AT), cinnamyl alcohol (CINA), eugenol (EU), isoeugenol (ISO), *p*-phenylenediamine (ppD), *tert*-butylhydroperoxide (tBHP), *meta*-chloroperoxybenzoic acid (mCPBA), dithiothreitol (DTT), sodium borohydride ($NaBH_4$), and *tert*-butylhydroquinone (tBHQ) were all purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France).

Purification and culture of DCs derived from monocytes. DCs were generated *in vitro* from human monocytes ($CD14^+$). $CD14^+$ cells were purified from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from buffy coat of different healthy donors (EFS, Rungis, France). Buffy coat was diluted 1:3 in PBS, and PBMCs were then isolated by separation on Ficoll-hypaque gradient (lymphocyte separation medium LSM 1077; PAA, Les Mureaux, France). Monocytes were further isolated by magnetic positive selection using CD14 microbeads separated with a magnetic cell separator (Miltenyi Biotec, Paris, France). Immature Mo-DCs were generated from $CD14^+$ monocytes cultured for 5 days (10^6 cells/ml) in RPMI 1640 medium with Glutamax, 25mM HEPES (Gibco Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Biowest, Paris, France), 1% sodium pyruvate (Gibco Invitrogen), 1% penicillin/streptomycin (Gibco Invitrogen), and recombinant human cytokines such as GM-CSF (550 U/ml) and interleukin-4 (550 U/ml) obtained from Miltenyi Biotec. Resulting Mo-DCs were DC-$SIGN^+$, $CD1a^+$, $CD86^{low}$, and $CD83^-$, as evaluated by flow cytometry.

Culture of the THP-1 cell line. The human monocytic cell line THP-1 was grown in RPMI 1640 medium with Glutamax, 25mM HEPES (Gibco Invitrogen), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Biowest), 1% sodium pyruvate (Gibco Invitrogen), 1% penicillin/streptomycin (complete medium), and 0.05mM 2-mercaptoethanol. Cells were maintained at a density between 2×10^5 and 1×10^6 cells/ml, and frozen stocks were regularly thawed and subcultured to avoid cultures with higher than 30 passages. Before each cell treatment, THP-1 cells were cultured for at least 12 h at 4×10^5 cells/ml in complete medium without 2-mercaptoethanol.

Chemical treatment. Cells (Mo-DCs and THP-1) were seeded in complete medium at 1×10^6 cells/ml and treated with chemicals (Table 1). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and acetonitrile (CH_3CN) were used to solubilize the water-insoluble chemicals, and their final concentrations in culture media did not exceed 0.1% because cells were treated with chemicals at 1000× the final concentration in 100% DMSO or CH_3CN for 1 ml of cell suspension.

Measurement of cell viability. THP-1 cells or Mo-DCs were seeded in 96-well plates (1×10^6 cells/ml, 200 µl/well) with various concentrations of each chemical for 24 h. Cells were washed twice in PBS and stained with 7-AAD for 15 min at room temperature. Cell viability was measured using the FL-3 wavelength on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). At least three independent experiments were performed for each chemical, and the mean value of cell viability was calculated for each dose and each chemical.

Immunofluorescent staining and flow cytometry analysis. After 24 h of incubation with chemicals, Mo-DCs and THP-1 cells were harvested, washed once in 1× PBS and 3×10^5 cells (per antibody) were incubated in PBS containing 0.05% bovine serum albumin (BSA) for 30 min at 4°C with the following monoclonal antibodies: PE-conjugated anti-CD86 (555658, BD) allophycocyanin (APC)- or PE-conjugated anti-CD54 (respectively, 559771, BD and IM1239U, Beckman Coulter, France), APC-conjugated anti-CD83 (551073, BD), APC-conjugated anti-CD40 (555591, BD), FITC-conjugated anti-CD80 (557226, BD), and FITC-conjugated anti-HLA-DR (555811, BD). Appropriate antibody isotypes (IgG1, IgG2b, and IgG2a, all from BD) were used at the same concentrations as the controls. After incubation, cells were washed twice in PBS + 0.05% BSA and once in 1× PBS and then fixed in PBS + 1% formaldehyde. Mo-DC and THP-1 cell phenotype modifications were detected using a FACSCalibur flow cytometer. For each sample, 20,000 cells were acquired from a gated homogenous cell population selected from a side- versus forward-scatter dot plot and analyzed using the CellQuest software. Results were expressed using relative fluorescence intensity (RFI) calculated with the following formula, where MFI is the mean fluorescence intensity:

TABLE 1
Molecules Used for the Experiments

Category	Known amino acid reactivity*	Name	Abbreviation	Class	CAS number	Solvent
Hapten	Cysteine and lysine	1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	DNCB	Extreme	[97-00-7]	DMSO
		Cinnamaldehyde	CIN	Moderate	[104-55-2]	DMSO
		Diethyl maleate	DEM	Moderate	[141-05-9]	DMSO
		4,4′-Methylenebis (phenyl isocyanate)	4,4′ MDI	Moderate	[101-68-8]	CH_3CN
	Cysteine	Diphenylcyclopropenone	DPC	Moderate	[886-38-4]	CH_3CN
		2-Methyl-3(2H)-isothiazolone	MI	Moderate	[2682-20-4]	Water
	Lysine	Phtalic anhydride	AP	Strong	[85-44-9]	DMSO
		Trimellitic anhydride	AT	Strong	[552-30-7]	DMSO
Prohapten	Cysteine	Cinnamyl alcohol	CINA	Weak	[104-54-1]	DMSO
		Eugenol	EU	Weak	[97-53-0]	DMSO
Pre		Isoeugenol	ISO	Moderate	[97-54-1]	DMSO
hapten		*p*-Phenylenediamine	ppD	Strong	[106-50-3]	DMSO
Oxidant	*tert*-butylhydroperoxide		tBHP		[75-91-2]	DMSO
	Meta-chloroperoxybenzoic acid		mCPBA		[937-14-4]	CH_3CN
Reducer	Dithiothreitol		DTT		[3483-12-3]	Water
	Sodium borohydride		$NaBH_4$		[16940-66-2]	DMSO
	Tert-butylhydroquinone		tBHQ		[1948-33-0]	DMSO

	Mo-DCs			
			Tested concentration	
	Concentration range tested (μM)	Cytotoxicity > 30% (μM)	μM	% ± SEM
DNCB	5–30	15	10	82.1 ± 4.3
CIN	100–200	200	150	84.6 ± 4.7
DEM	200–600	400	300	84.2 ± 1.9
4,4′ MDI	10–100	30	10	78.1 ± 5.0
DPC	10–200	50	30	76.1 ± 0.8
MI	100–1000	> 500	500	83.8 ± 1.3
AP	500–1000	> 1000	1000	78.9 ± 2.9
AT	500–1000	> 1000	1000	88.5 ± 3.1
CINA	500–1000	> 1000	1000	87.5 ± 1.9
EU	500–1000	> 1000	1000	77.7 ± 14.7
ISO	200–1000	> 500	500	73.4 ± 5.5
ppD	200–1000	> 500	500	85.5 ± 3.5
tBHP	200–400	> 400	400	76.9 ± 0.8
mCPBA	200–1000	800	500	83.3 ± 0.4
DTT	500–1000	> 1000	1000	78.8 ± 1.6
NaBH4	500–1000	> 1000	1000	86.6 ± 1.1
tBHQ	40	ND	40	87.54 ± 4.0

	THP-1			
			Tested concentration	
	Concentration range tested (μM)	Cytotoxicity > 30% (μM)	μM	% ± SEM
DNCB	5–30	15	10	81.6 ± 3.8
CIN	25–150	150	100	75.4 ± 3.5
DEM	200–400	350	300	74.1 ± 3.0
4,4′ MDI	10–1000	100	50	78.9 ± 5.6
DPC	10–200	30	10	90.1 ± 0.6
MI	25–500	> 500	100	90.0 ± 2.7
AP	500–1000	> 1000	1000	85.5 ± 0.9
AT	500–1000	> 1000	1000	92.9 ± 1.8
CINA	300–1000	1000	1000	79.8 ± 4.6

TABLE 1—*Continued*

	THP-1			
			Tested concentration	
	Concentration range tested (µM)	Cytotoxicity > 30% (µM)	µM	% ± SEM
EU	500–1000	800	700	82.3 ± 2.5
ISO	400–700	500	400	84.1 ± 0.6
ppD	150–300	250	200	77.6 ± 3.7
tBHP	100–500	400	350	90.1 ± 1.8
mCPBA	50–400	300	200	90.3 ± 1.5
DTT	100–1000	> 1000	1000	83.5 ± 6.8
NaBH4	100–1000	> 1000	1000	87.7 ± 3.3
tBHQ	40	ND	40	92.44 ± 0.8

Notes. The tested molecules represent different classes of sensitizers (strong, moderate, or weak haptens, prehaptens, and prohaptens) with different reactivities* to different amino acids (cysteine, lysine, or mixed reactivity). tBHP, mCPBA, DTT, and $NaBH_4$ are nonsensitizing molecules but with redox properties (oxidants and reducers). Cell viability was assessed on both Mo-DCs and THP-1 cells using 7-AAD staining after a 24-h treatment using flow cytometry and was never less than 70%. Data were expressed as the percentage (%) of viable cells ± SEM. tBHQ concentration was chosen in agreement with previous data (Ade *et al*., 2009). ND, not done.

*Data from the direct peptide reactivity assay (Gerberick *et al*., 2004, 2007).

(MFI of chemical-treated cells labeled with antigen-specific antibody − MFI of chemical-treated isotype control cells)/(MFI of vehicle control cells labeled with antigen-specific antibody − MFI of vehicle isotype control cells).

Total RNA isolation. Cells (10^6 cells/ml, 2 ml/well) were exposed to test compounds either for 4 and 6 h for Mo-DCs or 6 and 8 h for THP-1 cells. These time points were determined in preliminary experiments and were found to be optimal to study expression of Nrf2 target genes (data not shown). Treated cells were lysed in TRIzol Reagent (Invitrogen), and total RNA was isolated as described (Ade *et al*., 2009). Total RNA yield was quantified by spectrophotometry using two dilutions (total RNA diluted at 1:100 and 1:200, two independent measurements). In addition, for each RNA isolation experiment, the quality and purity of random samples were determined by automated gel electrophoresis (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, Massy, France). Only samples with RNA integrity number ≥8 were processed.

Reverse transcription. RNA concentrations were adjusted (40 ng/µl for Mo-DCs, 80 ng/µl for THP-1 cells in 11 µl final volume) and combined with 2 µl of deoxynucleotide triphosphate mixture and 2 µl of 50µM oligo(dT) primers. Mixes were denatured at 70°C for 10 min and then quickly cooled at 4°C in a Biometra thermocycler (Goettingen, Germany). Reverse transcription was carried out in AMV Reverse Transcriptase Reaction Buffer (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) with final concentrations of 2 U/µl of RNase inhibitor (RNasine, Promega) and 0.2 U/µl of AMV Reverse Transcriptase (Promega), and RNase-free water to make up a final volume of 10 µl. The reaction was then performed for 1 h 30 min at 42°C in the thermocycler. A control without reverse transcriptase was performed to confirm that no DNA contamination had occurred. The final product was stored at −20°C and used in the PCR step.

Analysis of gene expression using real-time PCR. Real-time PCR analysis was performed using the SYBR Green technology on a Biorad CFX96 system. Each reaction consisted of cDNA (1:10 diluted for Mo-DCs and 1:50 diluted for THP-1 cells in 4 µl final volume of nuclease-free water), 0.5µM each of the forward and reverse primers (*ho-1* [5′-GGCCTGGCCTTCTTCACCTT-3′ and 5′-GAGGGGCTCTGGTCCTTG GT-3′], *nqo1* [5′-GGGCAAGTCCATCCCAACTG-3′ and 5′-GCAAGTCAG-GGAAGCCTG GA-3′], *il*-8 [5′-TCTCTTGGCAGCCTTCCTGA-3′ and 5′-TGGGGTGGAAAGGTTTGG AG-3′], *tbp* [tata box binding protein 5′-GAGAGCCACGAACCACGG-3′ and 5′-ACATCACAGCTCCCCACC-AT-3′], or *β-actin* [5′-GGCATCCTCACCCTGAAGTA-3′ and 5′-GCACA-CGCAGCTCATTGTAG-3′]), and Sso Fast EvaGreen Supermix (Bio-rad, Marnes la Coquette, France) in a total reaction volume of 10 µl. After 30 s at 95°C for Sso7d-fusion polymerase activation, amplification was allowed to proceed up to 44 cycles, each consisting of denaturation at 95°C for 5 s and annealing/extension at 62°C for 5 s. Sevenfold serial dilutions of mixed cDNA (from different samples) were analyzed for each target gene and allowed us to construct linear standard curves, from which the efficiency (E) of each PCR reaction was evaluated and taken into account. The SYBR green fluorescence was detected at the end of each elongation cycle, after which a melting curve was assessed to confirm the specificity of the PCR products. The quantification was performed with the Biorad CFX Manager software, and data were analyzed using the delta-delta Ct method (ΔΔCt). Ratio was calculated as the geometrical mean of $(1 + E)^{-\Delta\Delta Ct}$ values, where E is the efficiency and ΔΔCt is the target gene expression of treated cells compared with normal levels in untreated cells and corrected using the expression of the reference genes *tbp* and *β-actin*. Results were expressed as fold induction (i.e., ratio of $(1 + E)^{-\Delta\Delta Ct}$ of treated cells/$(1 + E)^{-\Delta\Delta Ct}$ of vehicle-treated cells).

Immunoblotting. Cells (10^6 cells/ml, 2 ml/well) exposed to test compounds (based on pilot studies, 4 h for Mo-DCs and 6 h for THP-1 cells) were harversted and washed in cold PBS; they were then lysed in 40 µl lysis buffer (20mM Tris pH 7.4, 137mM NaCl, 2mM EDTA pH 7.4, 2mM sodium pyrophosphate, 1% Triton, 10% glycerol, 1mM PMSF, 1mM Na_3VO_4, 25mM β-glycerophosphate, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin and 10 µg/ml pepstatine) and centrifuged at 17,600 × g for 20 min at 4°C, before the supernatants were collected. Total protein concentration was evaluated using bicinchoninic acid assay, and equal amounts of denatured proteins (50 µg) were loaded onto 10% SDS-PAGE gel and then transferred onto a PVDF membrane. Membranes were then incubated with antibodies raised against Nrf2 (H-300; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) or HO-1 (ab13248; Abcam, Cambridge), stripped, and reprobed with an antibody against p38 MAPK (9212; Cell Signaling, Danvers) as a loading control. Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence using a ChemiDoc XRS+ System (Bio-rad). Bands were quantified using Image Lab software. Results were expressed as the fold induction that represented the ratio of Nrf2 or HO-1 to the total p38 MAPK for treated cells compared with untreated control cells at $t = 0$.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using nonparametric one-way ANOVAs on ranks approach (Kruskall-Wallis) combined with Mann-Whitney U tests for multiple comparisons (Statistica 7.0; Statsoft, Chicago, IL).

A mixed-effect model approach was also employed (using SAS software, Version 9.2 of the SAS system for Unix) to take into account the correlation between repeated time measurements. This ANOVA was used to estimate the effects of group, chemicals, and time and to compare the between-group differences. The significance level of all tests was specified at 0.05, and for the mixed-effect model approach, multiple comparisons were computed with the Tukey-Kramer method as appropriate. Log transformation of fold induction (i.e., LogInduction) was applied for the mixed-effect model and for linear regression analysis (quadratic model with the R software) in order to achieve the required normality assumption (R Development Core Team, 2011). For the analysis of the relationship between LogInduction and depletion, associations were summed up by the R^2 of the model and the p value that test globally the effect of depletion (F-test nested models comparison). To compare the differences of associations between the use of Mo-DCs and the use of THP-1 cell line, we performed a global interaction test on both the linear and the quadratic terms using a comparison of nested models as well.

RESULTS

Cytotoxicity Measurement

For each chemical, several concentrations were first tested on both Mo-DCs (Supplementary fig. 1A) and THP-1 cells (Supplementary fig. 1B) to assess cell viability after 24 h of treatment using 7-AAD staining. Cytotoxicity evaluation revealed that cell viability depended on the chemical. For example, DNCB and DPC showed a rapid decline in cell viability beyond a threshold concentration and DEM showed a linear dose-dependent decrease of cell viability, whereas CINA, AP, AT, DTT, and $NaBH_4$ showed no cytotoxicity whatever the concentration tested (Supplementary fig. 1). According to these results, one concentration for each chemical was selected for further experiments. This concentration was close to the maximal concentration inducing no more than 30% cytotoxicity. This criterion allows comparison of the chemicals because it is a common readout for chemical reactivity and toxicity. However, differences existed between Mo-DCs and the THP-1 cell line concerning chemical-induced cytotoxicity (Supplementary figs. 1A and B). Consequently, different chemical concentrations were tested in the two cell models (Table 1). For those chemicals that did not exhibit cell toxicity, the tested dose was set at 1mM.

Phenotypic Characterization of Mo-DCs and THP-1 Cells Exposed to Chemicals

The phenotype of Mo-DCs and THP-1 cells was characterized after 24 h of treatment with chemicals. These modifications were expressed as RFI values (Table 2). Untreated Mo-DCs or vehicle-treated DCs shared an immature phenotype as they expressed low levels of CD86, CD40, and HLA-DR and were negative for CD83. However, they were $CD80^+$ and $CD54^+$ (ICAM-1) (data not shown). Chemical sensitizers significantly modified the expressions of CD86 and CD83 (Table 2), whereas expression of other markers (CD80, CD54, HLA-DR, and CD40) was less affected (data not shown). Results showed that DNCB, CIN, DEM, 4,4′ MDI, DPC, MI, EU, and ppD induced Mo-DC phenotype modifications, whereas AP, AT, CINA, and ISO had no effect. For the nonsensitizing molecules, the oxidants tBHP and mCPBA were able to induce CD83 and CD86/CD83 upregulation, respectively.

TABLE 2
Phenotypic Modifications of Mo-DCs and THP-1 Cells After Chemical Sensitizer Treatment

	Mo-DCs			THP-1		
	RFI CD86 ± SEM	RFI CD83 ± SEM	*N*	RFI CD86 ± SEM	RFI CD54 ± SEM	*N*
DNCB	1.85 ± 0.41*	0.80 ± 0.19	4	5.13 ± 0.52*	5.87 ± 0.92*	6
CIN	1.41 ± 0.02*	0.96 ± 0.21	4	1.69 ± 0.32*	2.60 ± 0.79*	7
DEM	1.44 ± 0.04*	0.77 ± 0.07	3	1.21 ± 0.24	1.34 ± 0.37	6
4,4′ MDI	1.12 ± 0.05*	1.55 ± 0.30*	3	1.25 ± 0.19	1.16 ± 0.42	4
DPC	1.67 ± 0.31*	0.87 ± 0.14	3	1.38 ± 0.18*	1.62 ± 0.57	5
MI	0.90 ± 0.13	2.95 ± 1.15*	3	1.97 ± 0.32*	7.99 ± 1.95*	6
AP	1.26 ± 0.11	0.93 ± 0.12	4	1.50 ± 0.24*	1.38 ± 0.41	5
AT	1.06 ± 0.10	1.04 ± 0.13	4	0.98 ± 0.10	0.94 ± 0.27	3
CINA	0.89 ± 0.05	0.86 ± 0.52	4	1.76 ± 0.23*	1.80 ± 0.47	5
EU	1.63 ± 0.38*	0.84 ± 0.15	4	3.37 ± 0.44*	2.44 ± 0.10*	5
ISO	1.14 ± 0.28	0.99 ± 0.22	4	1.65 ± 0.19*	1.55 ± 0.36	4
ppD	0.98 ± 0.05	1.43 ± 0.20*	4	2.14 ± 0.28*	2.99 ± 0.84*	4
tBHP	1.05 ± 0.23	1.38 ± 0.36*	2	1.59 ± 0.13*	1.71 ± 0.43*	4
mCPBA	1.12 ± 0.06*	1.34 ± 0.30*	2	1.13 ± 0.20*	0.83 ± 0.10*	3
DTT	0.90 ± 0.02	1.55 ± 0.88	2	1.54 ± 0.37*	1.06 ± 0.31*	4
NaBH4	1.01 ± 0.10	1.22 ± 0.17	2	1.19 ± 0.06*	0.84 ± 0.01*	5
tBHQ	0.79 ± 0.11	1.44 ± 0.75	2	1.50 ± 0.09*	1.18 ± 0.16*	4

Notes. CD86 and CD83 expression were assessed on Mo-DCs, whereas CD86 and CD54 were measured on THP-1 cells, both after 24 h of treatment. Data were expressed using RFI ± SEM as described in Materials and Methods section. *N*, total number of independent experiments performed.
*$p < 0.05$ versus control cells (i.e., corresponding vehicle-treated cells = 1, Mann-Whitney U tests).

For THP-1 cells, activation was assessed according to CD86 and CD54 expression (Sakaguchi *et al*., 2007). Our results (Table 2) showed that DNCB, CIN, MI, DPC, and AP and all the pre- and prohaptens CINA, EU, ISO, and ppD were able to induce the expression of CD86 and/or CD54. Conversely, DEM and AT had no effects on THP-1 cell activation. In addition, and as previously described (Ade *et al*., 2009), the known activator of Nrf2, tBHQ, was able to modify CD86 expression, similar to the reducer DTT, and the oxidant tBHP modified both CD86 and CD54 expressions. The nonsensitizing molecules mCPBA and $NaBH_4$ had no effect.

Nrf2 Target Gene Expression After Chemicals Exposure in Mo-DC

To investigate the activation of the Nrf2-ARE pathway after chemical sensitizer exposure, the expression of three genes known to be regulated by Nrf2 was measured: *ho-1*, *nqo1*, and *il-8*. Mo-DCs were treated for 4 and 6 h (optimal treatment time according to preliminary experiments, data not shown) with the different chemical sensitizers, oxidants, reducers, and tBHQ, a well-known activator of Nrf2. Results obtained in Mo-DCs showed that the mixed (cysteine/lysine)-reactive chemicals DNCB, CIN, DEM, and 4,4′ MDI significantly induced the expression of at least two of the three Nrf2-dependent genes (Figs. 1A–C). The cysteine-reactive chemical DPC was also able to induce the expression of the three Nrf2-dependent genes, with a 19-fold induction of *ho-1* at 6 h (Fig. 1A), whereas the other cysteine-reactive sensitizer MI induced only a slight expression of *il-8* after 4 h of treatment (Figs. 1A–C). On the contrary, lysine-reactive chemicals AP and AT induced neither *ho-1* nor *nqo1* expression, but AP was able to induce *il-8* gene expression significantly (a threefold induction after 6 h, see Fig. 1C). The pro- and prehaptens CINA, EU, ISO, and ppD also induced *ho-1* and *il-8* expressions, whereas only CINA and ppD induced *nqo1*. Interestingly, CINA was able to increase *ho-1* and *nqo1* expressions in a similar manner as CIN and with similar kinetics: 8-fold induction of *ho-1* at 4 h for CINA compared with 8.7-fold induction for CIN at the same time, and 5.2-fold induction of *nqo1* at 4 h compared with 5.5-fold induction for CIN. As expected, tBHQ and the oxidants tBHP and mCPBA were able to induce Nrf2-dependent gene expression, whereas DTT had no effect on *ho-1* and *nqo1* but augmented *il-8* expression. Surprisingly, treatment with the reducer $NaBH_4$ upregulated the expression of the three Nrf2-dependent genes. Nrf2 target gene expression was also evaluated using other primers from Qiagen. Results were validated for the majority of the tested chemicals for *nqo1* and *il-8* expression, whereas, for DNCB, CIN, and MI, a higher *ho-1* expression was found with the Qiagen primers compared with our home-designed primers (Supplementary fig. 2), although these differences did not change the interpretation of the results.

Chemical-induced Nrf2-dependent gene expressions were then clustered into four arbitrary categories according to their fold induction and represented by different colors: mild expression of Nrf2 was represented by a fold induction between 2 and 5 (in grey), high expression by a fold induction ranging from 5 to 10 (in yellow), and strong expression by a fold induction >10 (in purple, see Table 3). An arbitrary fold change cutoff of 2 was selected as a positive criterion for gene induction according to the fact that vehicle-treated cells (DMSO or CH_3CN) did not show more than a twofold upregulation for the three genes studied (data not shown). In this context, data analysis revealed that *ho-1* was strongly upregulated in response to chemical sensitizers and that cysteine/lysine- and cysteine-reactive chemical sensitizers were the most potent inducers of Nrf2-dependent gene expression in Mo-DCs, whereas lysine-reactive chemicals did not significantly modify most of the genes tested.

Nrf2 Target Gene Expression After Chemical Exposure in THP-1 Cells

To test whether the observations obtained in Mo-DCs were similar to those of the THP-1 cell line, Nrf2-dependent gene expression was also assessed in THP-1 cells (Fig. 2). According to preliminary data (data not shown) and due to differences between Mo-DCs and THP-1 cells observed in the kinetics of *ho-1*, *nqo1*, and *il-8* expression, mRNA level was assessed after 6 and 8 h of treatment compared with 4 and 6 h in Mo-DCs. As shown in Figures 2A–C, all the cysteine/lysine- and cysteine-reactive chemicals (DNCB, CIN, DEM, 4,4′ MDI, DPC, and MI) and also all the pro- and prehaptens significantly upregulated the expression of the three Nrf2-dependent genes, except for EU, which did not significantly induce *nqo1* (Fig. 2B). On the other hand, the lysine-reactive chemical AT had no effect on *nqo1* expression, whereas AP significantly induced it after 8 h, and both significantly induced *il-8* expression after 8 h. Interestingly, in our experiments, AP strongly induced *ho-1* expression (18-fold increase at 8 h), whereas AT did not have any significant statistical effect (Fig. 2A). The nonsensitizing chemicals, tBHQ and the oxidant tBHP, significantly upregulated the three Nrf2-dependent genes, whereas the oxidant mCPBA was less efficient and induced significantly only *ho-1* and *il-8*. The reducer $NaBH_4$ had no effect, whereas DTT induced *ho-1* and, to a lesser extent, *nqo1* expression. These results were also validated using other primers (from Qiagen; see Supplementary fig. 3). As for Mo-DCs, these data are summarized in Table 3, where chemicals are classified according to the fold induction. As the fold inductions were greater in THP-1 cells compared with those in Mo-DCs, we arbitrarily defined the categories using different fold inductions: mild expression of Nrf2 was then represented by a fold induction between 2 and 15 (in grey), high expression by a fold induction ranging from 15 to 100 (in yellow), and strong expression by a fold induction >100 (in purple). Results showed that all cysteine/lysine- and cysteine-reactive chemical sensitizers and the prohapten CINA strongly induced Nrf2-dependent gene expression.

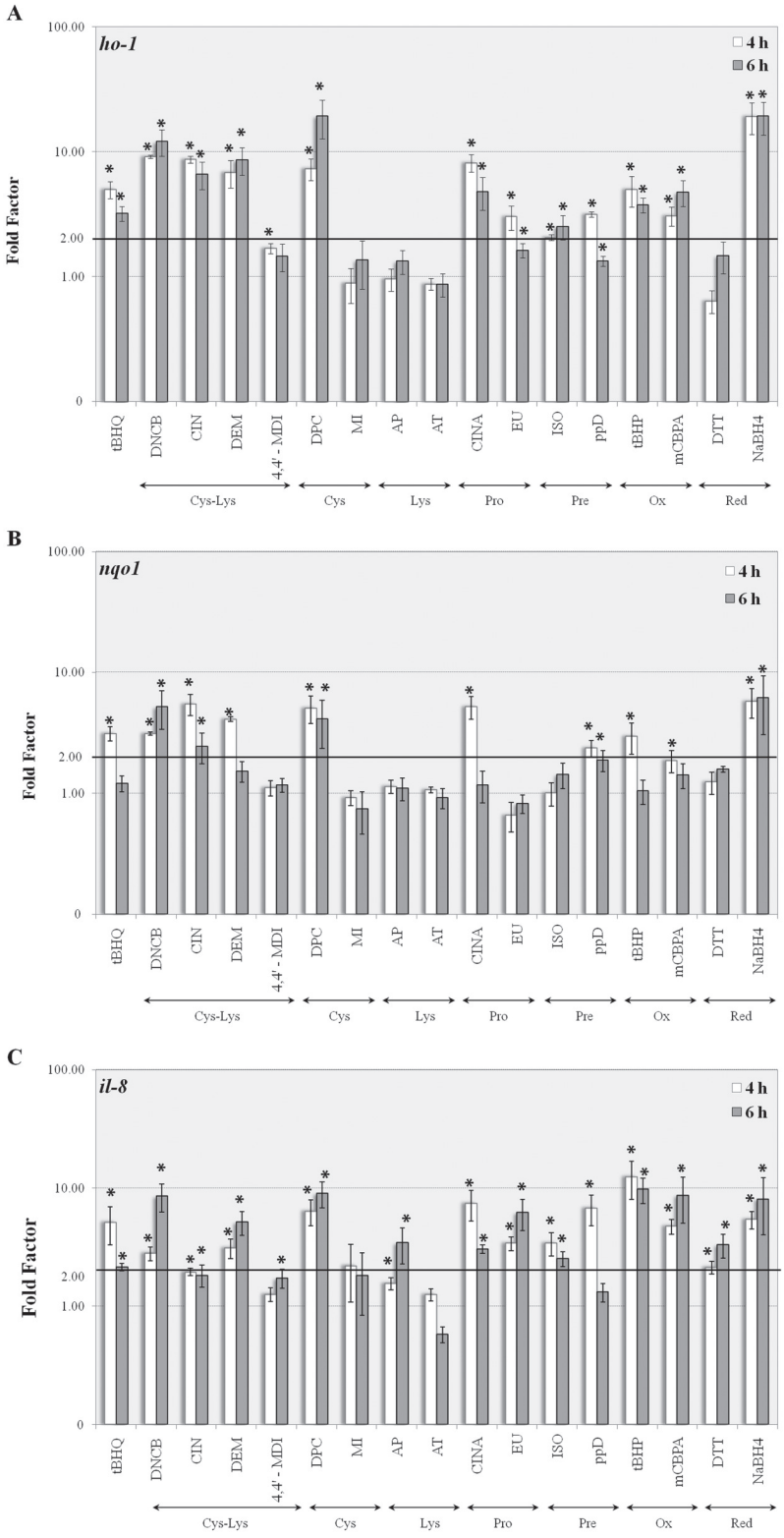


FIG. 1. mRNA expression of *ho-1* (A), *nqo1* (B), and *il-8* (C) in Mo-DCs exposed to the selected chemicals and analyzed by real-time PCR. Results were expressed as fold induction compared with control samples (corresponding vehicle-treated cells) and corrected by the expression of the reference genes *β-actin* and *tbp*. For all graphs, results were expressed as the mean ± SEM of at least three independent experiments. Dotted line indicates the twofold gene upregulation criteria. *$p < 0.05$ versus control cells for both time treatment (Mann-Whitney *U* tests).

TABLE 3
mRNA Expressions of *ho-1*, *il-8*, and *nqo1* in Mo-DCs and THP-1 Cells

Mo-DCs	THP-1
fold ≤ 2	fold ≤ 2
2 < fold ≤ 5	2 < fold ≤ 15
5 < fold ≤ 10	15 < fold ≤ 100
fold > 10	fold > 100

		Mo-DCs											
		ho-1				*nqo1*				*il-8*			
		4 h	*N*	6 h	*N*	4 h	*N*	6 h	*N*	4 h	*N*	6 h	*N*
Cysteine and Lysine	DNCB	9.15 ± 0.27*	3/3	12.12 ± 2.88*	3/3	3.12 ± 0.09*	3/3	5.21 ± 1.83*	3/3	2.81 ± 0.37*	3/3	8.57 ± 2.28*	3/3
	CIN	8.70 ± 0.56*	3/3	6.64 ± 1.67*	4/4	5.46 ± 1.08*	3/3	2.45 ± 0.70*	1/3	1.95 ± 0.14*	1/3	1.84 ± 0.39*	1/3
	DEM	6.84 ± 1.71*	3/3	8.64 ± 2.17*	3/3	4.11 ± 0.19*	3/3	1.53 ± 0.29	0/3	3.12 ± 0.58*	3/3	5.16 ± 1.19*	3/3
	4,4′ MDI	1.69 ± 0.16*	1/4	1.46 ± 0.36	1/4	1.11 ± 0.16	0/5	1.17 ± 0.15	0/3	1.27 ± 0.17	0/4	1.73 ± 0.32*	1/3
Cysteine	DPC	7.35 ± 1.43*	3/3	19.44 ± 6.66*	3/3	5.07 ± 1.29*	3/3	4.11 ± 1.75*	2/4	6.37 ± 1.58*	3/3	9.05 ± 2.24*	4/4
	MI	0.89 ± 0.28	0/5	1.36 ± 0.57	1/4	0.92 ± 0.13	0/4	0.74 ± 0.28	0/4	2.21 ± 1.12	3/5	1.83 ± 0.99	2/4
Lysine	AP	0.96 ± 0.20	0/4	1.33 ± 0.29	0/3	1.14 ± 0.15	0/4	1.10 ± 0.24	0/3	1.56 ± 0.18*	0/3	3.45 ± 1.17*	3/5
	AT	0.87 ± 0.09	0/4	0.87 ± 0.18	0/4	1.07 ± 0.06	0/3	0.92 ± 0.17	0/3	1.26 ± 0.15	0/4	0.58 ± 0.09	0/3
Prohapten	CINA	8.16 ± 1.30*	3/3	4.83 ± 1.42*	3/3	5.19 ± 1.10*	3/3	1.18 ± 0.34	0/3	7.40 ± 2.14*	3/3	3.05 ± 0.25*	3/3
	EU	3.03 ± 0.67*	2/3	1.63 ± 0.22*	1/3	0.66 ± 0.18	0/3	0.82 ± 0.14	0/3	3.41 ± 0.46*	3/3	6.21 ± 1.84*	3/3
Prehapten	ISO	2.07 ± 0.10*	2/3	2.53 ± 0.56*	2/3	1.00 ± 0.22	0/4	1.43 ± 0.34	1/3	3.43 ± 0.77*	4/4	2.53 ± 0.37*	3/3
	ppD	3.16 ± 0.16*	3/3	1.34 ± 0.13*	0/3	2.37 ± 0.36*	2/3	1.88 ± 0.37*	2/3	6.77 ± 1.99*	3/3	1.32 ± 0.23	0/3
Oxidant	tBHP	5.01 ± 1.38*	3/3	3.76 ± 0.50*	3/3	2.96 ± 0.85*	3/4	1.04 ± 0.24	0/3	12.45 ± 4.42*	3/3	9.77 ± 2.40*	4/4
	mCPBA	3.08 ± 0.54*	3/3	4.75 ± 1.11*	3/3	1.87 ± 0.39*	1/4	1.42 ± 0.34	1/4	4.76 ± 0.68*	3/3	8.70 ± 3.67*	4/4
Reducer	DTT	0.64 ± 0.13	0/3	1.48 ± 0.42	0/3	1.24 ± 0.26	0/3	1.59 ± 0.09	0/3	2.14 ± 0.26*	2/3	3.32 ± 0.76*	3/4
	NaBH4	19.19 ± 5.45*	4/4	19.33 ± 5.70*	3/3	5.76 ± 1.58*	3/3	6.20 ± 3.15*	3/3	5.43 ± 0.93*	3/3	8.10 ± 4.09*	3/3
Nrf2 inducer	tBHQ	5.01 ± 0.79*	4/4	3.22 ± 0.43*	3/3	3.12 ± 0.42*	3/3	1.21 ± 0.18	0/3	5.15 ± 1.83*	3/3	2.15 ± 0.15*	2/3

		THP-1											
		ho-1				*nqo1*				*il-8*			
		6 h	*N*	8 h	*N*	6 h	*N*	8 h	*N*	6 h	*N*	8 h	*N*
Cysteine and Lysine	DNCB	533.26 ± 176.99*	4/4	226.76 ± 66.61*	4/4	2.62 ± 0.20*	4/4	4.12 ± 0.76*	4/4	81.40 ± 12.64*	5/5	301.44 ± 123.98*	4/4
	CIN	1562.79 ± 419.57*	4/4	1208.68 ± 245.42*	4/4	6.11 ± 0.17*	3/3	8.22 ± 2.70*	3/3	45.81 ± 9.16*	5/5	169.91 ± 50.46*	4/4
	DEM	229.37 ± 34.85*	4/4	298.46 ± 36.94*	4/4	3.46 ± 0.16*	4/4	4.41 ± 0.94*	4/4	3.83 ± 0.63*	5/5	12.81 ± 3.44*	4/4
	4,4′ MDI	105.11 ± 12.58*	3/3	109.72 ± 19.28*	3/3	1.96 ± 0.29*	2/3	3.24 ± 0.60*	3/3	8.42 ± 5.40*	2/3	11.45 ± 1.30*	3/3
Cysteine	DPC	121.15 ± 44.13*	3/3	162.79 ± 46.45*	3/3	1.98 ± 0.48*	2/3	2.87 ± 0.10*	3/3	5.14 ± 1.54*	3/3	2.89 ± 0.99*	2/3
	MI	85.65 ± 8.01*	4/4	63.00 ± 4.25*	4/4	4.47 ± 0.75*	4/4	5.21 ± 0.38*	3/3	36.78 ± 7.62*	5/5	20.52 ± 7.79*	3/3
Lysine	AP	9.91 ± 3.08*	3/3	17.92 ± 3.69*	3/3	1.09 ± 0.16	0/3	2.29 ± 0.46*	2/3	5.91 ± 0.98*	4/4	6.5 ± 2.83*	4/4
	AT	1.12 ± 0.04	0/3	1.41 ± 0.52	0/3	0.73 ± 0.21	0/3	1.18 ± 0.12	0/3	1.04 ± 0.13	0/4	2.13 ± 0.68*	1/3
Prohapten	CINA	701.93 ± 189.65*	3/3	699.26 ± 249.85*	4/4	3.28 ± 0.04*	3/3	4.43 ± 1.47*	3/3	1.87 ± 0.29*	1/4	2.27 ± 0.32*	3/4
	EU	22.64 ± 7.01*	4/4	24.13 ± 2.94*	3/4	1.41 ± 0.29	0/3	1.76 ± 0.61	1/3	1.46 ± 0.12*	0/5	4.79 ± 0.66*	3/3
Prehapten	ISO	21.30 ± 5.49*	4/4	27.73 ± 7.99*	4/4	2.17 ± 0.51*	2/3	3.19 ± 0.46*	3/3	1.35 ± 0.38	0/3	4.83 ± 0.97*	3/3
	ppD	29.04 ± 8.49*	3/3	20.16 ± 7.78*	3/3	1.63 ± 0.35	1/4	2.45 ± 0.50*	3/4	14.74 ± 3.72*	4/4	22.63 ± 3.80*	4/4
Oxidant	tBHP	31.82 ± 3.87*	3/3	18.49 ± 3.19*	3/3	2.85 ± 0.37*	3/3	2.31 ± 0.68	2/3	7.86 ± 3.05*	3/3	5.04 ± 1.27*	3/3
	mCPBA	1.10 ± 0.42	0/3	2.37 ± 0.16*	3/3	1.29 ± 0.24	0/3	1.00 ± 0.19	0/3	1.35 ± 0.11*	0/4	1.67 ± 0.44	2/3
Reducer	DTT	0.79 ± 0.27	0/3	7.72 ± 2.90*	3/3	1.00 ± 0.21	0/4	2.03 ± 0.51*	2/4	1.23 ± 0.30	0/5	1.48 ± 0.40	0/3
	NaBH4	0.84 ± 0.15	0/3	0.95 ± 0.30	0/3	1.09 ± 0.18	0/5	1.22 ± 0.14	0/5	0.69 ± 0.07	0/5	1.60 ± 0.50	1/5
Nrf2 iiducer	tBHQ	25.86 ± 6.73*	4/4	10.91 ± 5.05*	4/4	4.91 ± 1.01*	3/3	2.51 ± 0.48*	3/4	1.61 ± 0.12*	0/3	2.72 ± 0.66*	3/4

Notes. Results were expressed as fold induction ± SEM (see Fig. 1). A twofold gene upregulation was selected as the criteria for significant gene expression. *N*, number of positive experiments (fold > 2) compared with the total number of experiments.
*$p < 0.05$ versus control cells (i.e., corresponding vehicle-treated cells = 1, Mann-Whitney *U* tests).

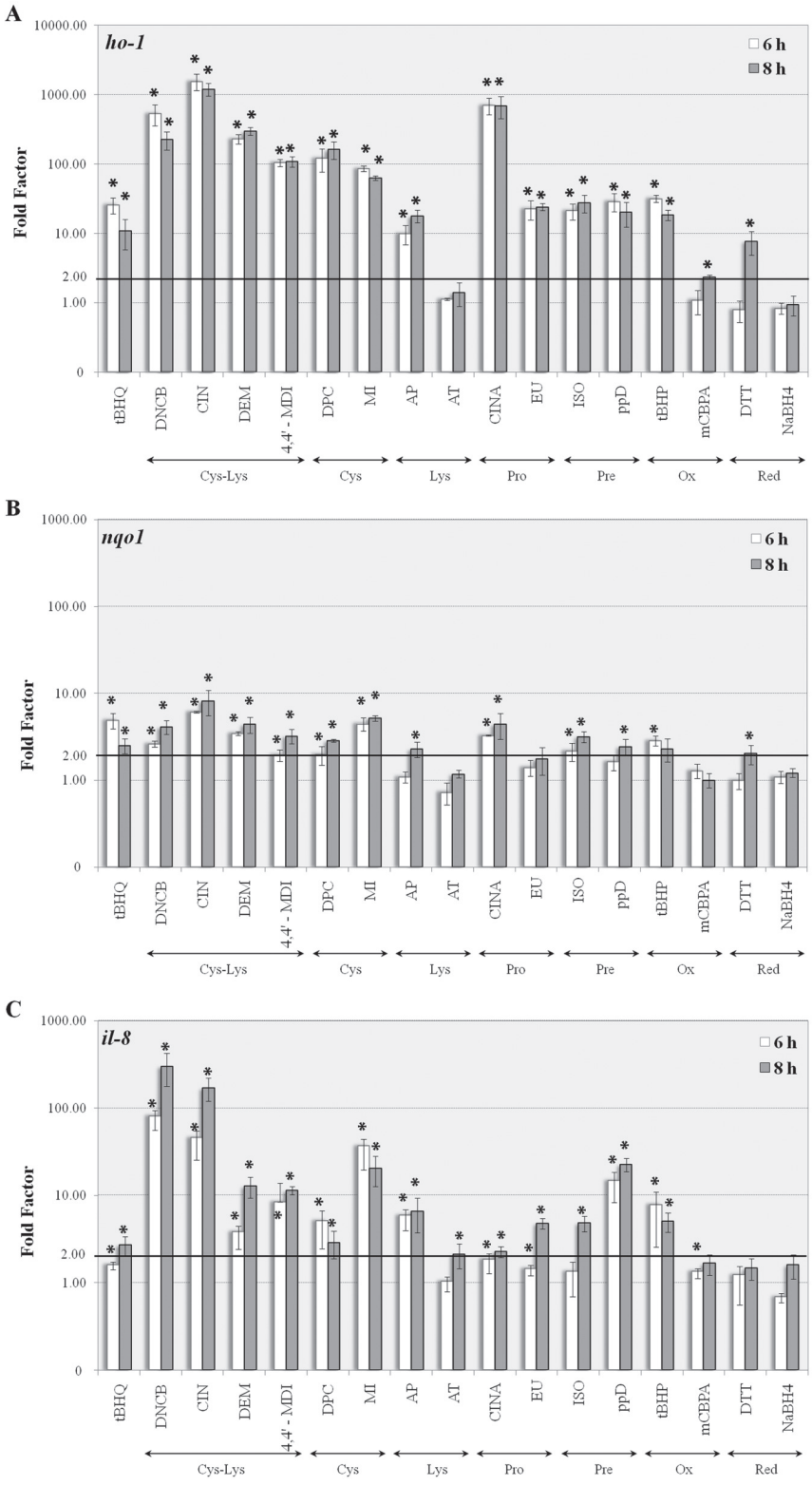


FIG. 2. mRNA expression of *ho-1* (A), *nqo1* (B), and *il-8* (C) in THP-1 cells exposed to the selected chemicals and measured by real-time PCR. Results were expressed as fold induction compared with control samples (corresponding vehicle-treated cells) and corrected by the expression of the reference genes *β-actin* and *tbp*. For all graphs, results were expressed as the mean ± SEM of at least three independent experiments. Dotted line indicates the twofold gene upregulation criteria. *$p < 0.05$ versus control cells for both time treatment (Mann-Whitney *U* tests).

Interaction Analysis of Chemical-Induced Nrf2-Dependent Gene Expression

To determine whether the expression of one of the Nrf2-dependent gene may permit to distinguish reactive chemicals (sensitizers) from nonsensitizing molecules, two different statistical analyses were performed for both cell models.

In the first analysis, all chemicals were preclassified into three groups, and interaction analysis within groups was carried out. The first group was composed of reactive chemicals, i.e., haptens (DNCB, CIN, 4,4′ MDI, DEM, MI, DPC, AP, and AT)—whatever their specific amino acid reactivity was, the second group was composed of pre- and prohaptens (CINA, EU, ISO, and ppD) needing to be metabolized or oxidized to be fully reactive, and the third group was composed of nonreactive molecules, i.e., nonsensitizing chemicals (tBHP, mCPBA, DTT, and $NaBH_4$). The results are presented in Table 4. In Mo-DCs, *ho-1* expression distinguished nonsensitizing molecules from haptens or pro-/prehaptens, whereas *il-8* expression distinguished haptens versus pro-/prehaptens and nonsensitizing molecules. However, if lysine-reactive sensitizers AP and AT were excluded from the hapten group, interaction analyses for Mo-DCs revealed that differences between haptens and pro-/prehaptens became statistically significant for *ho-1* and *nqo-1* expression ($p = 0.004$ and $p = 0.01$, respectively) (data not shown). In THP-1 cells, almost all the differences between means of fold induction for each gene were significant, except for *nqo1,* whose expression was not significantly different between haptens and pro-/prehaptens ($p = 0.11$).

In the second analysis, all chemicals were tested by pairs and groups were designed *a posteriori*, i.e., chemicals for which mean Log(Induction) was statistically different were classified in different groups. Results presented in Supplementary figures 4A and B showed extensive overlapping between chemicals, and these latter could not be clearly grouped into different categories *a posteriori*. However, some tendencies appeared: *ho-1* expression in THP-1 cells partially classed chemicals according to their amino acid reactivity: cysteine- and mixed-reactive chemical sensitizers were not statistically different, as well as pro- and prehaptens, whereas both the reducers, mCBPA and AT, were classified in a different group (Supplementary fig. 4B).

Correlation Analysis of Nrf2-Dependent Gene Expression with Chemical Reactivity to Cysteine

To test whether the expression of Nrf2-dependent genes was correlated with chemical reactivity, the percentage of cysteine depletion induced by each chemical sensitizer was used for regression analysis. The relationship between Log(Induction) of each Nrf2 target gene and the percentage of peptide cysteine (PepCys) depletion (Gerberick *et al*., 2007, 2009; Troutman *et al*., 2011) were compared using a quadratic model for linear regression analysis. Scatter plots of PepCys depletion versus Log(Induction) of a specific Nrf2-dependent gene, along with correlation analysis, are shown in Figure 3 for both cell models and for both time treatments. The results indicate that, in Mo-DCs, little association exists between fold induction of *ho-1* ($r^2 = 0.19$, $p = 0.02$ at 4 h and $r^2 = 0.13$, $p = 0.08$ at 6 h), *nqo1* ($r^2 = 0.02$, $p = 0.70$ at 4 h and $r^2 = 0.06$, $p = 0.35$ at 6 h), or *il-8* ($r^2 = 0.02$, $p = 0.69$ at 4 h and $r^2 = 0.04$, $p = 0.44$ at 6 h) and cysteine depletion (Figs. 3A and 3B). These results suggested that, in Mo-DCs, expression of Nrf2-dependent genes requires additional signals and was not correlated with the capacity of chemicals to alter cysteine as measured in peptide depletion assays. However, in THP-1 cells, Log(Induction) of gene expression and cysteine depletion were highly associated, especially for *ho-1* ($r^2 = 0.38$, $p = 0.0001$ at 6 h and $r^2 = 0.44$, $p < 0.0001$ at 8 h) and *nqo1* ($r^2 = 0.37$, $p = 0.0003$ at 6 h and $r^2 = 0.31$, $p = 0.002$ at 8 h) expressions (Figs. 3C and 3D). The differences in associations between Mo-DCs and THP-1 cells were significant for *ho-1* (p of interaction = 0.02 at 4 h and 0.007 at 6 h) but not for *il-8* and *nqo1* genes.

Nrf2 Protein Accumulation After Chemical Exposure

To confirm that the Nrf2 pathway was activated upon chemical exposure, accumulation of the Nrf2 protein was measured in both Mo-DCs (Fig. 4) and THP-1 cells (Fig. 5). In addition, the protein level of HO-1 was also assessed.

Mo-DC Western blot analysis showed that the Nrf2 protein was absent in control cells at time $t = 0$ but appeared as one major band as soon as they were cultured for 4 h either in culture medium (UT) or with DMSO, whereas the Nrf2 protein was absent in CH_3CN-treated Mo-DCs (Fig. 4A). Conversely, in THP-1 cells, the Nrf2 protein was absent in both the untreated and vehicle-treated cells even after 6 h of treatment (Fig. 5A). It is important to note that protein expression was assessed at one time point in each cell model based on previous experiments (data not shown).

In Mo-DCs, the Nrf2 protein was present in response to (a) the well-described Nrf2 activator tBHQ, (b) chemicals that were reactive with both cysteine and lysine residues (CIN, DNCB, DEM, and 4,4′ MDI), (c) the cysteine-selective chemical DPC, and (d) the prohapten CINA. MI, the lysine-reactive chemicals AP and AT, other pre- and prohaptens (EU, ISO, and ppD), and the nonsensitizing molecules tBHP, mCPBA, DTT, and $NaBH_4$ had no effects (Figs. 4A and B). The HO-1 protein level was found to be increased with all mixed-reactive chemicals and the cysteine-reactive DPC, whereas MI had no effect. The HO-1 protein was also found in response to the prohapten CINA, whereas lysine-reactive chemicals (AP and AT) and EU, ISO, and ppD (pre- and prohaptens) had no effect. The tBHP molecule upregulated HO-1 protein expression significantly, whereas the other nonsensitizing molecules mCPBA, DTT, and $NaBH_4$ did not affect its expression.

In THP-1 cells, Nrf2 protein accumulated after 6 h in response to all mixed- and cysteine-reactive sensitizers (i.e., CIN, DNCB, DEM, 4,4′ MDI, MI, and DPC) and in response to all the pro- and prehaptens (CINA, EU, ISO, and ppD),

TABLE 4
Statistical Analyses of Chemical-Induced Nrf2 Target Gene Expression

	Mo-DCs			THP-1		
	ho-1	*nqo1*	*il-8*	*ho-1*	*nqo1*	*il-8*
Haptens versus pro-/prehaptens	n.s.	n.s.	$p = 0.03$	$p = 0.01$	n.s.	$p < 0.0001$
Haptens versus nonsensitizing molecules	$p = 0.03$	n.s.	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$
Pro-/prehaptens versus nonsensitizing molecules	$p = 0.03$	$p = 0.02$	n.s.	$p < 0.0001$	$p = 0.02$	$p < 0.0001$

Notes. Interaction between chemical reactivity groups was assessed using a mixed-effect model that integrated both time treatments. Haptens: DNCB, CIN, 4,4′ MDI, DEM, MI, DPC, AP, and AT; pre-/prohaptens: CINA, EU, ISO, and ppD; nonsensitizing molecules: tBHP, mCPBA, DTT, and $NaBH_4$.

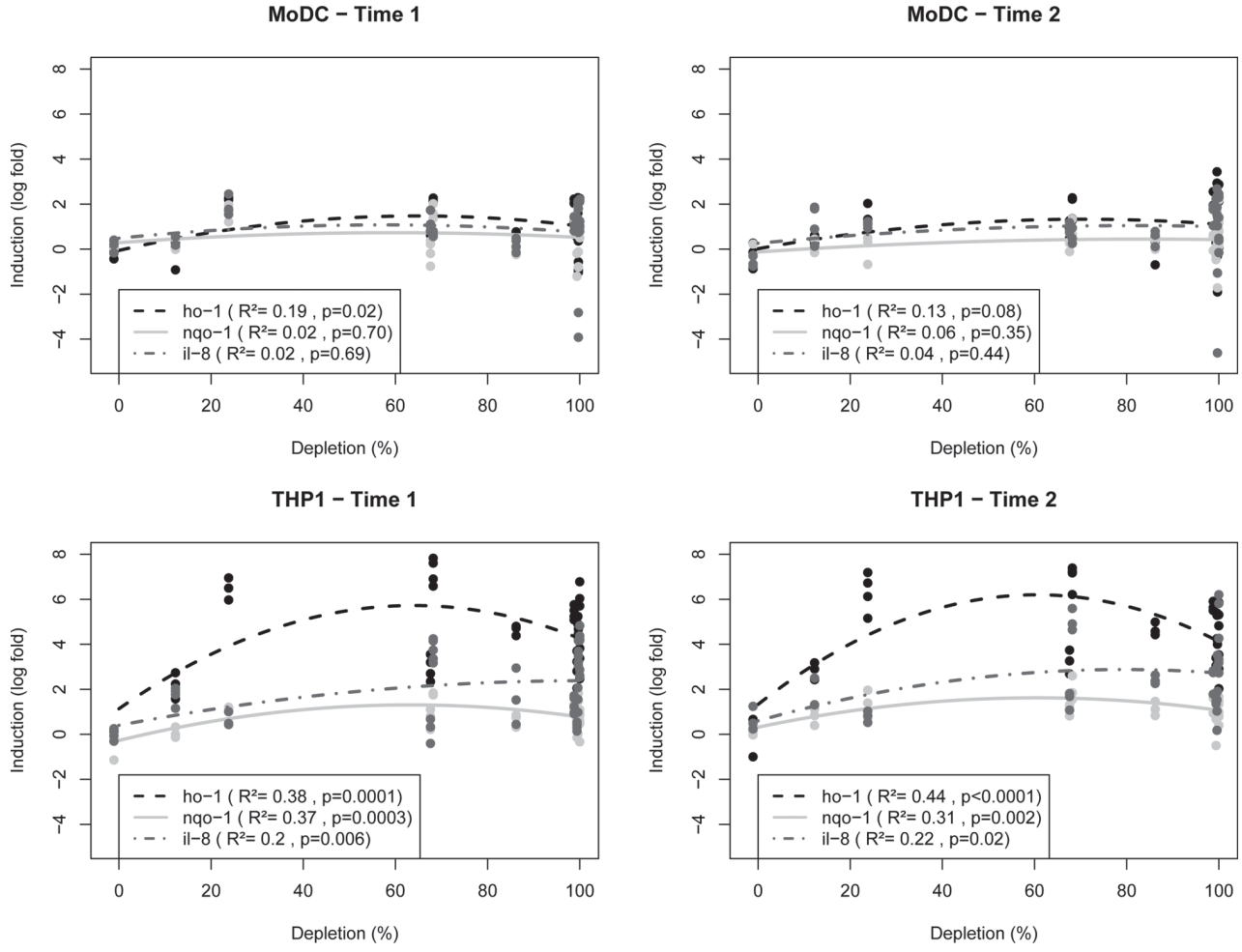


FIG. 3. Relationship between Nrf2-dependent gene expression (LogInduction) and chemical reactivity to the peptide cysteine. Gene expression was measured in Mo-DCs at 4 h (A) and 6 h (B) and in THP-1 cells at 6 h (C) and 8 h (D). Data from the literature was used to fix the % of PepCys depletion. Results represent a quadratic regression analysis.

whereas AP and AT, the lysine-reactive chemicals, had no effects (Fig. 5B). The oxidant tBHP and the reducer DTT were able to significantly increase Nrf2 protein level, whereas mCPBA and $NaBH_4$ had no effect. In correlation with the induction of Nrf2 accumulation, expression of the HO-1 protein was detected in THP-1 cells exposed to all cysteine/lysine- and cysteine-reactive sensitizers (except MI) and to all pre- and prohaptens, except ISO (Fig. 5B, lower panel). Lysine-reactive chemicals AP and AT had no effect. Further, tBHP also induced HO-1 accumulation, whereas the other nonsensitizing molecules mCPBA, DTT, and $NaBH_4$ did not significantly modify the HO-1 protein level.

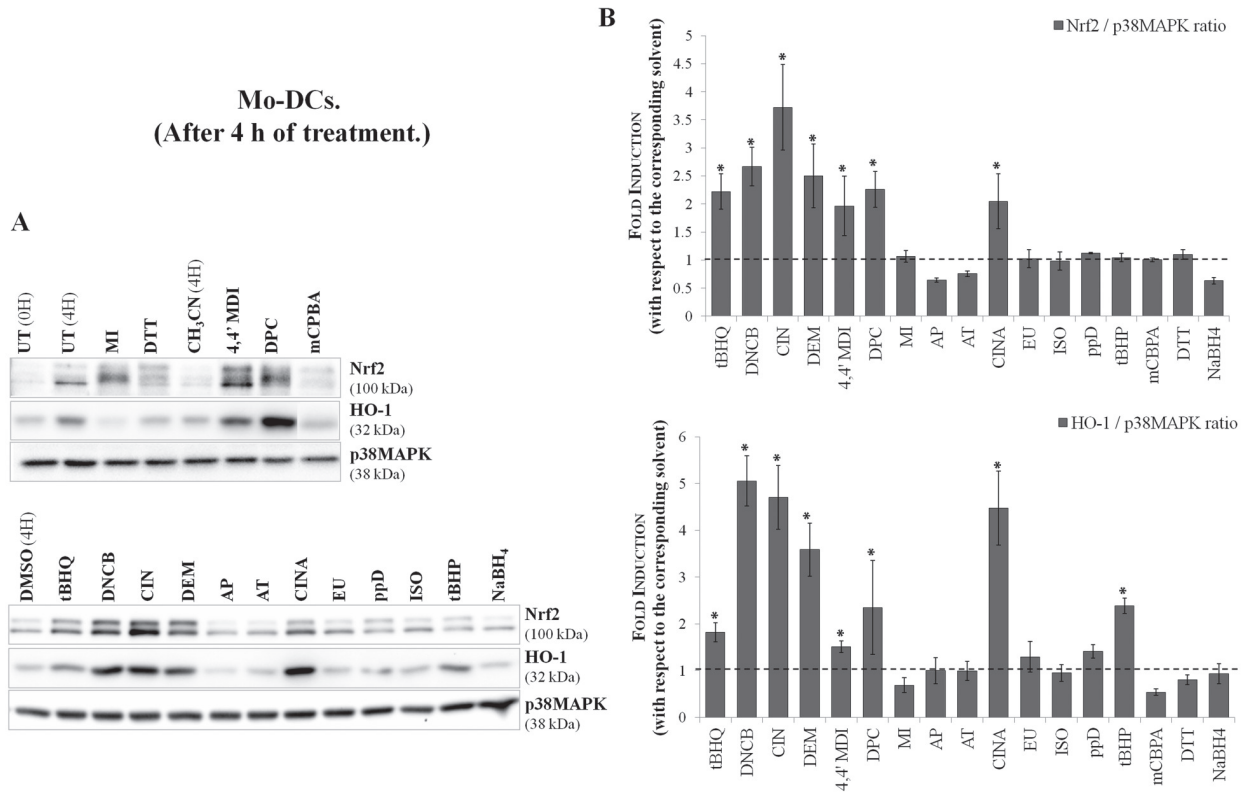


FIG. 4. Expression of Nrf2 and HO-1 proteins in cells exposed to the selected chemicals. (A) Representative Western blot of Nrf2 and Ho-1 proteins. (B) Semiquantification of Nrf2 (upper panel) and HO-1 (lower panel) protein expression. Results were expressed as the ratio of Nrf2 or HO-1 to the p38MAPK protein used as a loading control and were compared with the corresponding vehicle control cells at $t = 4$ h for Mo-DCs (fold induction). ($n = 5$, $^*p < 0.05$ versus vehicle-treated cells, Mann-Whitney U tests).

DISCUSSION

A key step in the skin sensitization process is the formation of a covalent adduct between the chemical sensitizer and endogenous proteins in the skin. The intrinsic protein reactivity of chemical sensitizers (or after their oxidation/metabolism) is generally assumed to be a shared property and could be the common characteristic detected by DCs rather than their structure or size. Moreover, it is now well accepted that, according to the danger model of Matzinger (1998) and in the context of contact sensitization (Kimber *et al*., 2002), DCs need to receive danger signals from their environment to be fully activated and to migrate to lymph nodes. Experimental evidences suggested that chemical sensitizers themselves could provide a danger signal, allowing the maturation of DCs (Ade *et al*., 2007; Boislève *et al*., 2004, 2005; Casati *et al*., 2005). Our hypothesis is that Nrf2 is one of the key players in contact allergy, integrating chemical sensitizer's protein reactivity and translating this signal into a biological response in DCs. Indeed, recent reports have shown that Nrf2 plays a role in inflammatory immune responses (Kim *et al*., 2009) and that it is also activated by chemical sensitizers in DCs (Ade *et al*., 2009), suggesting that Nrf2 could be implicated in the chemical sensitization process. Moreover, initial work conducted by Natsch and colleagues in the Hepa1C1C7 cell line and in a keratinocytic cell line has shown that Nrf2 was activated by chemical sensitizers (Natsch and Emter, 2008; Emter *et al*., 2010). These results were at the basis of the development of the Keratinosens assay but also emphasized that the Nrf2 pathway is also activated by chemical sensitizers in keratinocytes. To test our hypothesis, we measured the expression of Nrf2 target genes and Nrf2 protein expression after exposure to chemical sensitizers known to react with different sets of amino acids (cysteine and lysine, cysteine or lysine only). To our knowledge, this is the first work addressing the link between sensitizer chemical reactivity, as defined by reactivity toward amino acids with Nrf2 activation *in cellulo* using cells of myeloid origin, and gene expression. The main objective is then to address experimentally how chemical reactivity can translate into a biological response in cells of the myeloid lineage involved in skin sensitization.

Chemical sensitizers and nonsensitizing molecules were tested for their capacity to induce maturation of both Mo-DCs and THP-1 cells. All mixed- and cysteine-reactive sensitizers were able to induce Mo-DC maturation, although phenotypic modifications were less pronounced in response to pro-/prehaptens, as previously reported (Aiba *et al*., 1997; Hulette *et al*.,

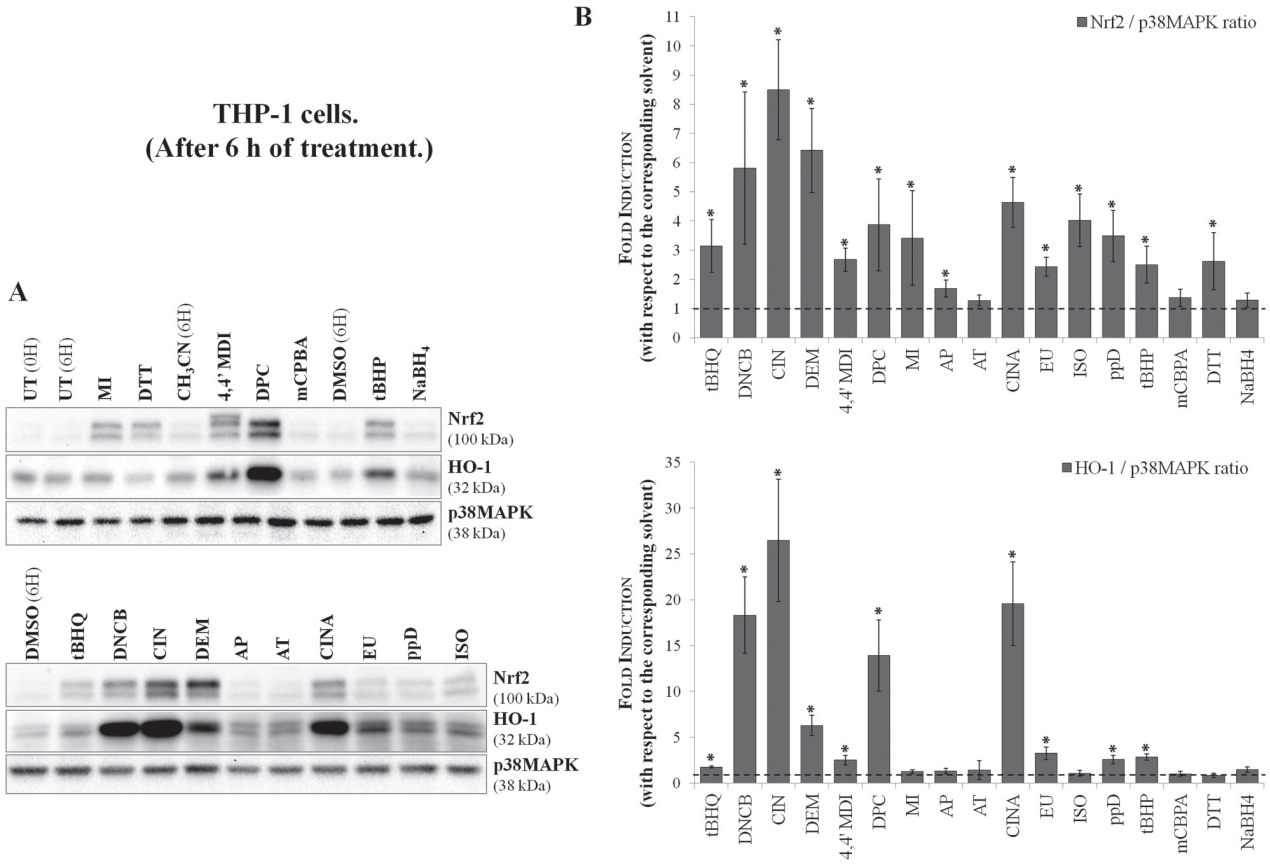


FIG. 5. Expression of Nrf2 and HO-1 proteins in cells exposed to the selected chemicals. (A) Representative Western blot of Nrf2 and Ho-1 proteins. (B) Semiquantification of Nrf2 (upper panel) and HO-1 (lower panel) protein expression. Results were expressed as the ratio of Nrf2 or HO-1 to the p38MAPK protein used as a loading control and were compared with the corresponding vehicle control cells at $t = 6$ h for THP-1 cells (fold induction). ($n = 5$, $^*p < 0.05$ versus vehicle-treated cells, Mann-Whitney U tests).

2002; Reuter *et al*., 2011). Lysine-reactive chemicals did not show any effect. Conversely, THP-1 cells were activated by a larger panel of chemical sensitizers and even by all pre-/pro-haptens, confirming that this cell line is a useful tool for *in vitro* sensitization screening (Nukada *et al*., 2011). However, in our experiments, DEM, 4,4′ MDI, and AT had no significant effect although previous reports showed that they induced phenotypic alterations in THP-1 (Mitjans *et al*., 2008; Nukada *et al*., 2011). In addition, tBHP and mCPBA induced DC maturation, as previously shown with other oxidants (Kantengwa *et al*., 2003; Rutault *et al*., 1999). These results confirmed that both Mo-DCs and THP-1 cells were suitable models to test our hypothesis.

With respect to the results presented in this work, we decided that Nrf2 pathway activation really occurs when chemicals were able to induce at least two Nrf2 target genes associated with Nrf2 protein expression. Chemicals with cysteine/lysine (DNCB, CIN, DEM, and 4,4′ MDI) and high cysteine (mainly DPC) reactivity were true activators of the Nrf2 pathway in our models, whereas other chemicals such as the lysine-reactive AP and AT showed an Nrf2-independent activation of the studied genes (Table 5). In addition, Nrf2 pathway senses the overall reactivity of chemical sensitizers rather than discriminating between specific mechanistic applicability domain as DEM, CIN, and DPC are Michael acceptors and DNCB is a S_NAr-reactive chemical. The effect of mixed- and cysteine-reactive sensitizers can be explained by the fact that Keap1 contains a number of cysteine residues important for the repression of Nrf2 under basal conditions (Holland and Fishbein, 2010). Modifications of these cysteine-reactive residues by cysteine-reactive chemicals lead to Nrf2 stabilization and transcription of ARE-dependent genes (Kobayashi *et al*., 2004).

No activation of the Nrf2 pathway was found with the lysine-reactive chemicals AP and AT. Although AP was evaluated as false negative in the ARE-cell line assay of Natsch and Emter (2008), in our study, it was able to strongly induce *ho-1* mRNA in THP-1 cells and *il-8* mRNA in both cell models. Although Nrf2 plays a critical role in *ho-1* gene induction, several transcription factors can also participate in *ho-1* gene transcription (Ryter *et al*., 2006). This is also true for *il-8* gene expression (Roebuck, 1999). Thus, *ho-1* and *il-8* mRNA expressions could be mediated independently of Nrf2 in response to AP, and this remains to be elucidated.

TABLE 5
Summary of Chemical-Induced Nrf2 Pathway Activation in Mo-DCs and THP-1 Cells

	Mo-DCs					THP-1				
	Nrf2 target gene induction			Nrf2 protein	Nrf2 pathway activation	Nrf2 target gene induction			Nrf2 protein	Nrf2 pathway activation
	ho-1	*nqo1*	*il-8*			*ho-1*	*nqo1*	*il-8*		
tBHQ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DNCB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIN	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+
DEM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,4′ MDI	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
DPC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MI	–	–	+	–	–	+	+	+	+	+
AP	–	–	+	–	–	+	+	+	–	–
AT	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
CINA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EU	+	–	+	–	–	+	–	+	+	+
ISO	+	–	+	–	–	+	+	+	+	+
ppD	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+
tBHP	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+
mCBPA	+	–	+	–	–	+	–	+	–	–
DTT	–	–	+	–	–	+	+	–	+	+
$NaBH_4$	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–

Notes. For Nrf2 target gene induction, a "+" indicates that the chemical significantly induced gene expression in at least one out of the two treatment times. Statistically significant Nrf2 accumulation was used for Nrf2 positive protein expression and was also represented by "+." "**+**" indicates a chemical activating the Nrf2 pathway according to our criteria: induction of at least two Nrf2 target genes associated with Nrf2 protein expression.

CINA also induced the activation of the Nrf2 pathway. CINA is a prohapten that needs to be metabolized either by alcohol dehydrogenase or by cytochrome P450 2E1 to become a reactive sensitizer (Smith *et al*., 2000). Monocytes, as well as DCs, express CYP2E1 (Baron *et al*., 1998; Saeki *et al*., 2002). The other prohapten, EU, and the prehaptens, ISO and ppD, activated the Nrf2 pathway especially in THP-1 cells, suggesting that this cell line is metabolically active. However, it should be emphasized that the THP-1 cell line poorly metabolizes compounds that are substrates of CYP450s, as recently described by Chipinda *et al.* (2011).

For the nonsensitizing molecules, DTT was found to be an Nrf2 inducer in THP-1 cells, as previously described in HepG2 cells by Haridas *et al.* (2004), although to a lesser extent than chemical sensitizers. However, $NaBH_4$ displayed dissimilar effects in both cell models. In Mo-DCs, $NaBH_4$ had a strong effect on gene expression, but no Nrf2 accumulation was found, suggesting an Nrf2-independent activation of these genes. In THP-1 cells, $NaBH_4$ did not show any effect. In contrast, both tested oxidants were able to induce the expression of at least one Nrf2-dependent gene, although tBHP, an analogue of lipid hydroperoxides, was more specific than the peracid mCPBA. Taken together, these results obtained with nonsensitizing molecules possessing redox properties confirmed that the Nrf2 pathway is redox/electrophilic sensitive in DCs.

Our data revealed some differences between Mo-DCs and THP-1 cells for some chemicals, i.e., MI, 4,4′ MDI, and, as mentioned, $NaBH_4$. In agreement with our results in THP-1 cells, MI has been shown to induce the activation of the ARE-luciferase assay, suggesting a lack of sensitivity of Mo-DCs. Although 4,4′ MDI induced both Nrf2 and HO-1 protein accumulation in both cell models, the level of detected mRNA was strongly different between the cell models. At this time, we have no explanation for this observation. Nevertheless, monocytes and DCs display different metabolic enzymes (Le Naour *et al*., 2001), and Mo-DCs have a higher antioxidant capacity compared with monocytes (Rivollier *et al*., 2006). This can explain, at least in part, the lack of effect of some chemicals on Mo-DCs and the large difference between the maximal fold inductions of genes between THP-1 cells and Mo-DCs.

We then analyzed our results to evaluate the validity of our hypothesis. The following questions were asked: (1) Based on gene fold induction, is it possible to group the chemicals into categories? (2) Does a correlation exist between gene fold induction and the percentage of cysteine depletion? (3) Can Nrf2 pathway activation distinguish between sensitizers, nonsensitizers, and pro-/prehaptens? Mixed model analysis was first used in a "blinded experiment" where sensitizers were classified, for each studied gene, into different groups according to the statistically significant difference observed between their mean gene fold inductions. This method allowed the grouping of sensitizers according to their potency for inducing gene expression; however, results showed that initial grouping

of haptens, pro-/prehaptens, and nonsensitizing categories was not possible. This method highlights that fold induction alone (without cutoff) cannot differentiate sensitizers from nonsensitizers. However, using the same analysis with chemicals assigned to groups of (1) haptens, (2) pro-/prehaptens, and (3) nonsensitizing molecules, our results revealed that in THP-1 cells, gene expression analysis was able to distinguish reactive from nonreactive chemicals. In Mo-DCs, results were less clear cut, but when the statistical analysis was performed in the absence of lysine-reactive chemicals, statistical differences were observed, suggesting that these chemicals shared distinct properties compared with other reactive sensitizers (data not shown).

We then performed regression analysis with the aim to identify the relationships between gene fold induction and the percentage of cysteine depletion, as assessed using the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Our results showed that gene expression in THP-1 cells was significantly associated with cysteine depletion, but this was not the case with Mo-DCs. These observations exemplified that the ability of a chemical sensitizer to react with cysteine translates into Nrf2 activation, as measured with gene expression. However, they also suggested that other mechanisms such as ROS production provoked by chemicals may play additional roles.

In summary, we have described the ability of several chemical sensitizers to activate the Nrf2 pathway *in cellulo* using cells of myeloid lineage known to be involved in the skin sensitization process. Our data were in accordance with the observations made by Natsch (2010) and Natsch and Emter (2008) using ARE-cell line assays as a new tool for the detection of chemical sensitizers. Here, we demonstrated that DCs and THP-1 cells were able to integrate and translate chemical sensitizer reactivity into activation of the Nrf2 pathway, which regulates the cellular stress provoked by the chemical sensitizer's reactivity. These data also suggested that a link exists between the capacity of a chemical to bind to a protein (i.e., its amino acid reactivity) and the amount of stress it induces in cells, measured as the activation of inducible Nrf2 target genes. This cellular stress participates in the cellular signaling needed for phenotypic modifications of DCs and needs to be tightly regulated. This is the first time that an extensive analysis of Nrf2 activation has been performed in myeloid cells, and the results emphasize the importance of Nrf2 in myeloid cell activation by chemical sensitizers.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at http://toxsci.oxfordjournals.org/.

FUNDING

Cosmerics Europe; ANR 11-CESA-015-01—Allergochem.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Silvia Tessier for critically reading the article and Claudine Délomenie for technical assistance for real-time PCR.

REFERENCES

Ade, N., Antonios, D., Kerdine-Romer, S., Boisleve, F., Rousset, F., and Pallardy, M. (2007). NF-kappaB plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO(4) but not by DNCB. *Toxicol. Sci*. **99,** 488–501.

Ade, N., Leon, F., Pallardy, M., Peiffer, J. L., Kerdine-Romer, S., Tissier, M. H., Bonnet, P. A., Fabre, I., and Ourlin, J. C. (2009). HMOX1 and NQO1 genes are upregulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: Role of the Keap1/Nrf2 pathway. *Toxicol. Sci*. **107,** 451–460.

Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., and Tagami, H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur. J. Immunol*. **27,** 3031–3038.

Aptula, A. O., Patlewicz, G., and Roberts, D. W. (2005). Skin sensitization: Reaction mechanistic applicability domains for structure-activity relationships. *Chem. Res. Toxicol*. **18,** 1420–1426.

Baird, L., and Dinkova-Kostova, A. T. (2011). The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol*. **85,** 241–272.

Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392,** 245–252.

Baron, J. M., Zwadlo-Klarwasser, G., Jugert, F., Hamann, W., Rübben, A., Mukhtar, H., and Merk, H. F. (1998). Cytochrome P450 1B1: A major P450 isoenzyme in human blood monocytes and macrophage subsets. *Biochem. Pharmacol*. **56,** 1105–1110.

Boislève, F., Kerdine-Römer, S., and Pallardy, M. (2005). Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha. *Toxicology* **206,** 233–244.

Boislève, F., Kerdine-Römer, S., Rougier-Larzat, N., and Pallardy, M. (2004). Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: Role of TNF-alpha and MAPK. *J. Invest. Dermatol*. **123,** 494–502.

Casati, S., Aeby, P., Basketter, D. A., Cavani, A., Gennari, A., Gerberick, G. F., Griem, P., Hartung, T., Kimber, I., Lepoittevin, J. P., *et al.* (2005). Dendritic cells as a tool for the predictive identification of skin sensitisation hazard. *Altern. Lab. Anim*. **33,** 47–62.

Chipinda, I., Ruwona, T. B., Templeton, S. P., and Siegel, P. D. (2011). Use of the monocytic cell line and co-incubation with microsomes to identify and differentiate hapten and prohapten sensitizers. *Toxicology* **280,** 135–143.

Emter, R., Ellis, G., and Natsch, A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **245,** 281–290.

Gerberick, G. F., Troutman, J. A., Foertsch, L. M., Vassallo, J. D., Quijano, M., Dobson, R. L., Goebel, C., and Lepoittevin, J. P. (2009). Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system. *Toxicol. Sci*. **112,** 164–174.

Gerberick, G. F., Vassallo, J. D., Bailey, R. E., Chaney, J. G., Morrall, S. W., and Lepoittevin, J. P. (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol. Sci*. **81,** 332–343.

Gerberick, G. F., Vassallo, J. D., Foertsch, L. M., Price, B. B., Chaney, J. G., and Lepoittevin, J. P. (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicol. Sci*. **97,** 417–427.

Haridas, V., Hanausek, M., Nishimura, G., Soehnge, H., Gaikwad, A., Narog, M., Spears, E., Zoltaszek, R., Walaszek, Z., and Gutterman, J. U. (2004). Triterpenoid electrophiles (avicins) activate the innate stress response by redox regulation of a gene battery. *J. Clin. Invest*. **113,** 65–73.

Holland, R., and Fishbein, J. C. (2010). Chemistry of the cysteine sensors in Kelch-like ECH-associated protein 1. *Antioxid. Redox Signal*. **13,** 1749–1761.

Hulette, B. A., Ryan, C. A., and Gerberick, G. F. (2002). Elucidating changes in surface marker expression of dendritic cells following chemical allergen treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **182,** 226–233.

Kantengwa, S., Jornot, L., Devenoges, C., and Nicod, L. P. (2003). Superoxide anions induce the maturation of human dendritic cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. **167,** 431–437.

Kim, J., Cha, Y. N., and Surh, Y. J. (2009). A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat. Res*. **690,** 12–23.

Kimber, I., Cumberbatch, M., Dearman, R. J., and Griffiths, C. E. (2002). Danger signals and skin sensitization. *Br. J. Dermatol*. **147,** 613–614.

Kobayashi, A., Kang, M. I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol*. **24,** 7130–7139.

Le Naour, F., Hohenkirk, L., Grolleau, A., Misek, D. E., Lescure, P., Geiger, J. D., Hanash, S., and Beretta, L. (2001). Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *J. Biol. Chem*. **276,** 17920–17931.

Matzinger, P. (1998). An innate sense of danger. *Semin. Immunol*. **10,** 399–415.

Mitjans, M., Viviani, B., Lucchi, L., Galli, C. L., Marinovich, M., and 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.

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.

Natsch, A., and Emter, R. (2008). Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: Application to the in vitro testing of the sensitization potential of chemicals. *Toxicol. Sci*. **102,** 110–119.

Neves, B. M., Gonçalo, M., Figueiredo, A., Duarte, C. B., Lopes, M. C., and Cruz, M. T. (2011). Signal transduction profile of chemical sensitisers in dendritic cells: An endpoint to be included in a cell-based in vitro alternative approach to hazard identification? *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **250,** 87–95.

Nukada, Y., Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Mugita, N., Hirota, M., Miyazawa, M., Ito, Y., Sasa, H., and Nishiyama, N. (2011). Predictive performance for human skin sensitizing potential of the human cell line activation test (h-CLAT). *Contact Derm*. **65,** 343–353.

R Development Core Team. (2011). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Reuter, H., Spieker, J., Gerlach, S., Engels, U., Pape, W., Kolbe, L., Schmucker, R., Wenck, H., Diembeck, W., Wittern, K. P., *et al.* (2011). In vitro detection of contact allergens: Development of an optimized protocol using human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *Toxicol. In Vitro* **25,** 315–323.

Rivollier, A., Perrin-Cocon, L., Luche, S., Diemer, H., Strub, J. M., Hanau, D., van Dorsselaer, A., Lotteau, V., Rabourdin-Combe, C., Rabilloud, T., *et al.* (2006). High expression of antioxidant proteins in dendritic cells: Possible implications in atherosclerosis. *Mol. Cell Proteomics* **5,** 726–736.

Roebuck, K. A. (1999). Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: Differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB (Review). *Int. J. Mol. Med*. **4,** 223–230.

Rutault, K., Alderman, C., Chain, B. M., and Katz, D. R. (1999). Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radic. Biol. Med*. **26,** 232–238.

Ryter, S. W., Alam, J., and Choi, A. M. (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: From basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev*. **86,** 583–650.

Saeki, M., Saito, Y., Nagano, M., Teshima, R., Ozawa, S., and Sawada, J. (2002). mRNA expression of multiple cytochrome p450 isozymes in four types of cultured skin cells. *Int. Arch. Allergy Immunol*. **127,** 333–336.

Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., and 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.

Smith, C. K., Moore, C. A., Elahi, E. N., Smart, A. T., and Hotchkiss, S. A. (2000). Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde, and cinnamic alcohol. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **168,** 189–199.

Troutman, J. A., Foertsch, L. M., Kern, P. S., Dai, H. J., Quijano, M., Dobson, R. L., Lalko, J. F., Lepoittevin, J. P., and Gerberick, G. F. (2011). The incorporation of lysine into the peroxidase peptide reactivity assay for skin sensitization assessments. *Toxicol. Sci*. **122,** 422–436.

Vocanson, M., Hennino, A., Rozières, A., Poyet, G., and Nicolas, J. F. (2009). Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy* **64,** 1699–1714.

Zhang, X., Chen, X., Song, H., Chen, H. Z., and Rovin, B. H. (2005). Activation of the Nrf2/antioxidant response pathway increases IL-8 expression. *Eur. J. Immunol*. **35,** 3258–3267.



ARTICLE 4

ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING
Volume 18, Number 1, 2013
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/ars.2011.4240

Discoveries

ORIGINAL RESEARCH COMMUNICATION

Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Nuclear Translocation Induces Myofibroblastic Dedifferentiation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis

Elise Artaud-Macari,[1] Delphine Goven,[1] Stéphanie Brayer,[1] Akila Hamimi,[1] Valérie Besnard,[1] Joëlle Marchal-Somme,[1] Zeina El Ali,[2] Bruno Crestani,[1,3] Saadia Kerdine-Römer,[2] Anne Boutten,[1,4] and Marcel Bonay[1,3,5]

Abstract

Aims: Oxidants have been implicated in the pathophysiology of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), especially in myofibroblastic differentiation. We aimed at testing the hypothesis that nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), the main regulator of endogenous antioxidant enzymes, is involved in fibrogenesis *via* myofibroblastic differentiation. Fibroblasts were cultured from the lungs of eight controls and eight IPF patients. Oxidants–antioxidants balance, nuclear Nrf2 expression, and fibroblast phenotype (α-smooth muscle actin and collagen I expression, proliferation, migration, and contraction) were studied under basal conditions and after Nrf2 knockdown or activation by Nrf2 or Keap1 siRNA transfection. The effects of sulforaphane (SFN), an Nrf2 activator, on the fibroblast phenotype were tested under basal and pro-fibrosis conditions (transforming growth factor β [TGF-β]). ***Results:*** Decreased Nrf2 expression was associated with a myofibroblast phenotype in IPF compared with control fibroblasts. Nrf2 knockdown induced oxidative stress and myofibroblastic differentiation in control fibroblasts. Conversely, Nrf2 activation increased antioxidant defences and myofibroblastic dedifferentation in IPF fibroblasts. SFN treatment decreased oxidants, and induced Nrf2 expression, antioxidants, and myofibroblastic dedifferentiation in IPF fibroblasts. SFN inhibited TGF-β profibrotic deleterious effects in IPF and control fibroblasts and restored antioxidant defences. Nrf2 knockdown abolished SFN antifibrosis effects, suggesting that they were Nrf2 mediated. ***Innovation and Conclusion:*** Our findings confirm that decreased nuclear Nrf2 plays a role in myofibroblastic differentiation and that SFN induces human pulmonary fibroblast dedifferentiation *in vitro via* Nrf2 activation. Thus, Nrf2 could be a novel therapeutic target in IPF. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 66–79.

Introduction

IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS (IPF) is the most frequent idiopathic interstitial pneumonia, with an estimated prevalence of 13 to 20 cases per 100 000 (24).

According to the American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias, usual interstitial pneumonia (UIP), including myofibroblasts and fibroblastic foci, is the histopathologial finding of IPF (3). This disease is characterized by fibroproliferation, associated with an excessive extracellular matrix deposition leading to pulmonary architecture distorsion and respiratory failure. Unfortunately, no treatment has shown any benefit in terms of survival (38).

Myofibroblastic differentiation plays a key role in the pathophysiologic process of IPF. Fibroblasts, differentiated to myofibroblasts, acquire a pro-fibrosing phenotype, defined by the expression of alpha-smooth muscle actin (α-SMA), the production of extracellular matrix (collagen I and III), and increased cell proliferation, contraction, and migration abilities (35).

[1]Inserm, UMR-700, Université Paris 7, Faculté de Médecine Denis Diderot-site Bichat, Paris, France.
[2]Inserm UMR-996, Université Paris Sud, Faculté de Pharmacie, Châtenay, Malabry, France.
[3]Service de Pneumologie A, Hôpital Bichat, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Université Paris 7 Denis Diderot, Paris, France.
[4]Service de Biochimie; Hôpital Bichat, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Université Paris 7, Denis Diderot, Paris, France.
[5]Service de Physiologie-Explorations Fonctionnelles; Hôpital Ambroise Paré, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Boulogne, France, EA 4497 Université de Versailles Saint Quentin (UVSQ), Boulogne, France.

Innovation

We showed a decreased expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and antioxidant "Phase II Enzymes" in human pulmonary fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and the key role of Nrf2 modulation in the fibroblast phenotype. Nrf2 inhibition induced myofibroblastic differentiation and increased oxidative stress *in vitro*. Conversely, nuclear Nrf2 induction restored the oxidant/antioxidant equilibrium and reversed myofibroblastic differentiation. The profibrosis effect of transforming growth factor β was related to decreased nuclear Nrf2 expression and counteracted by the antifibrosis effect of Sulforaphane, an Nrf2 activator. Nrf2 could play a central role in fibroblast differentiation in IPF, leading to new therapeutic strategies.

Oxidative stress, resulting from an imbalance of oxidants and antioxidants, has also been implicated in IPF pathophysiologic features (1, 17). To counteract oxidative stress, lung cells enlist a battery of classical antioxidant systems, such as Superoxide dismutase, Catalase, Glutathion Peroxidase, Glutathion S Transferase, Thioredoxin, Sulfiredoxin, Glutamate Cysteine Ligase (25, 26), and especially Phase II Enzymes (EPII) such as NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO-1), epoxyde hydrolase (EPHX), and Heme oxygenase-1 (HO-1), whose central protective roles against oxidant and inflammatory injuries have been previously identified in lung disease (12, 26).

The transcription factor nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a key orchestrator of the induction of several antioxidants, especially EPII. Nrf2 belongs to the "cap 'n' collar" basic leucin zipper family. Under basal conditions, Nrf2 is sequestered in the cytoplasm by its inhibitor Kelch-like erythroid cell-derived protein CNC homology-associated protein 1 (Keap1), then ubiquitinylated, and, finally, degraded by the proteasome. In the presence of oxidative stress, Keap1 releases Nrf2, which can migrate in the nucleus, bind to the antioxidant responsive element sequence, and induce phase II gene transcription (20). Previous studies reported an increase in the expression of oxidant enzymes (NADPH oxidases) in IPF fibroblasts and showed the role of oxidants in myofibroblastic differentiation (1, 17). The important role of Nrf2 in lung fibrosis has previously been published in animal models (8, 22, 33, 41, 43). Cho *et al.* showed that bleomycin induced earlier and more severe pulmonary fibrosis in Nrf2 $-/-$ mice than in wild-type mice, which suggests the involvement of Nrf2 (8). In humans, a potential protective role for Nrf2 against chronic fibrosing lung disease has been reported (30, 31). However, the role of EPII and Nrf2 in lung fibrogenesis in patients with IPF and the potential therapeutic effect of Nrf2 inducers have not been studied.

Sulforaphane (SFN), an isothiocyanate found in cruciferous vegetables from the Brassicaceae family, is a known Nrf2 activator. SFN interacts in a concentration-dependent manner (7) with thiol groups of Keap1, thus leading to its conformational modification, dissociation of the Nrf2–Keap1 cytoplasmic complex, and, finally, Nrf2 translocation into the nucleus (11). McWalter *et al.* reported that Nrf2 is essential for the induction of EPII expression by SFN (32).

We hypothesized that (i) the imbalance in oxidants and antioxidants, as well as altered EPII and Nrf2 expression, are involved in myofibroblast differentiation observed in IPF and (ii) Nrf2 activation may modulate the fibroblast phenotype in IPF. Thus, we compared Nrf2 expression in human pulmonary fibroblasts from control and IPF patients and investigated the role of activation of Nrf2 in myofibroblast differentiation and fibrosis.

Results

Basal pulmonary fibroblast phenotype, expression of oxidative stress markers, and Nrf2

We characterized the basal pulmonary fibroblast phenotype after a 24-h culture of cells without stimulation. Phase-contrast microscopy revealed control fibroblasts as thin and spindle shaped with prolonged cytoplasmic projections; in contrast, IPF fibroblasts appeared star shaped, with abundant cytoplasm and short projections (Fig. 1A). These morphological features matched the higher expression of α-SMA and collagen I protein in IPF fibroblasts than in controls (both $p < 0.05$; Fig. 1B). Thus, IPF fibroblasts were characterized by a myofibroblastic phenotype.

The staining of 4-hydroxynonenal (4-HNE), an oxidative stress lipid peroxidation marker, was higher in IPF fibroblasts than in controls (Table 1), and the quantitative glutathione (GSH)/oxidized glutathione (GSSG) ratio was decreased ($p = 0.03$; Fig. 1C). mRNA expression of NQO-1, EPHX, and HO-1 (all $p < 0.05$; Fig. 1D) and Nrf2 protein were lower in IPF fibroblasts than in controls ($p = 0.014$; Fig. 1E). Moreover, immunostaining for the nuclear fraction of Nrf2 was lower in IPF fibroblasts than in controls ($p < 0.0001$; Fig. 1F). Thus, *ex vivo*, decreased nuclear Nrf2 expression was associated with decreased EPII expression, GSH/GSSG ratio, and increased 4-HNE staining in IPF fibroblasts as compared with controls.

Effect of siRNA knockdown of Nrf2 expression on oxidative stress and fibroblast phenotype

In control fibroblasts, Nrf2 inhibition by Nrf2 siRNA increased 4-HNE staining (Fig. 2A and Table 2); decreased NQO-1, EPHX, and HO-1 mRNA expression (all $p = 0.03$; Fig. 2B); induced a myofibroblastic dedifferentiation phenotype (Fig. 2E); and increased α-SMA mRNA expression (Fig. 2F; $p = 0.03$). Conversely, in IPF fibroblasts, Nrf2 activation by Keap1 siRNA knockdown decreased 4-HNE staining (Fig. 2C and Table 3); increased NQO-1, EPHX, and HO-1 mRNA expression (all $p = 0.03$; Fig. 2D); and induced a control-like myofibroblastic dedifferentiation phenotype (Fig. 2G). This phenotype was confirmed by decreased α-SMA and Collagen I α1 mRNA expression ($p = 0.04$; Fig. 2H).

Effect of SFN on oxidative stress, Nrf2 expression, and fibroblast phenotype

To assess the effect of pharmacological activation of Nrf2, fibroblasts were exposed for 24 h to SFN, a known Nrf2 inducer. SFN decreased 4-HNE staining (Fig. 3A and Table 4) and increased the mRNA expression of EPII (Fig. 3B) and nuclear Nrf2 expression in both control and IPF fibroblasts (all $p < 0.001$; Fig. 3C).

Stimulation for 24 h with SFN reversed myofibroblastic differentiation as confirmed by decreased protein level of

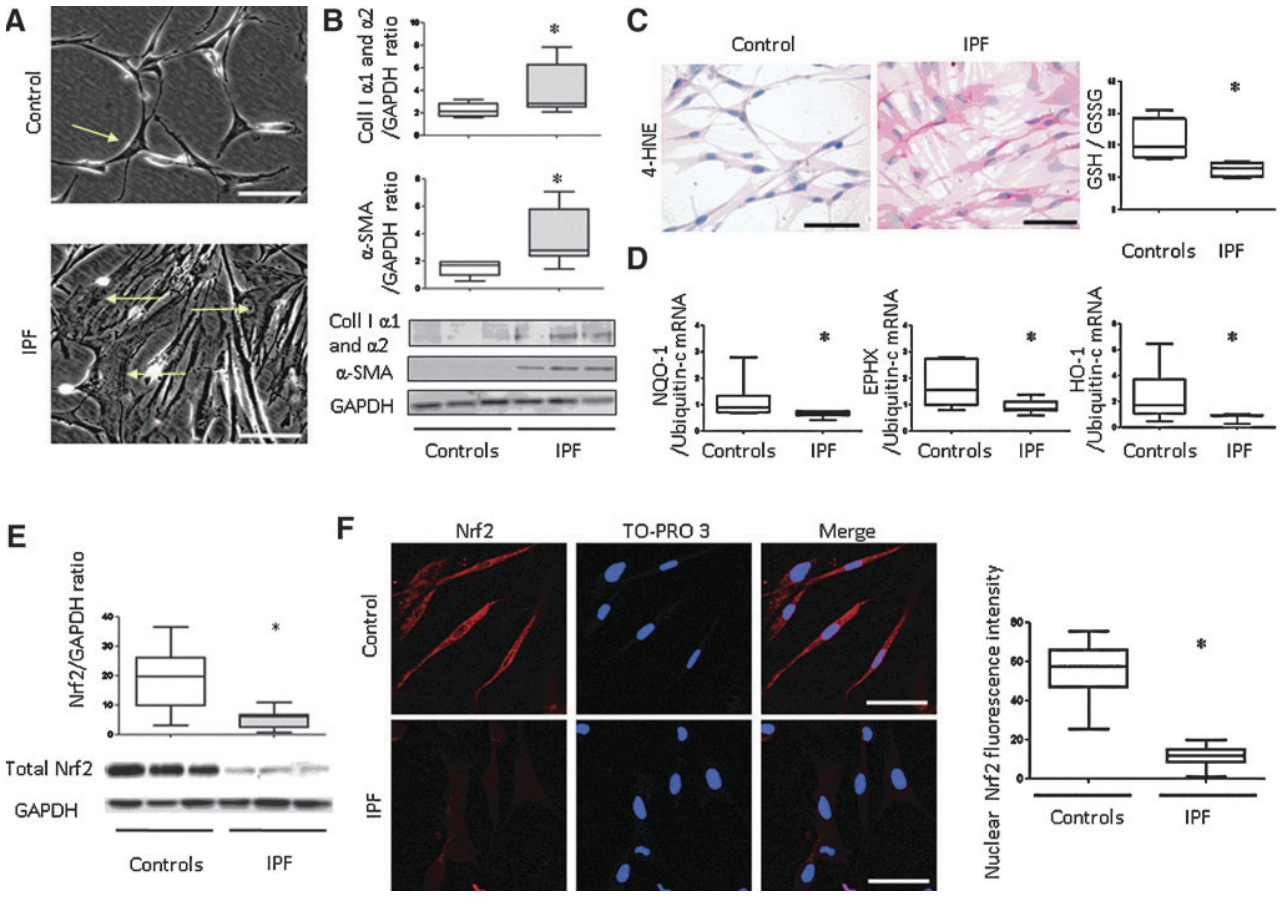


FIG. 1. Basal phenotype of pulmonary fibroblasts from control (Controls) and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients. Pulmonary fibroblast phenotype was characterized after a 24-h culture without stimulation. **(A)** Morphological study of pulmonary fibroblasts by phase-contrast microscopy (×400 magnification, bar = 100 μm). IPF fibroblasts were characterized by a myofibroblastic phenotype that was star shaped, with an abundant cytoplasm as compared with thin and spindle-shaped control fibroblasts (arrows). **(B)** Western blot analysis of protein expression of α-smooth muscle actin (SMA) and collagen I (Coll I). α-SMA and Coll I expression was higher in fibroblasts from IPF than control patients. Results are relative to Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression (*$p < 0.05$ compared with controls, Controls: $n = 8$, IPF: $n = 8$). **(C)** Immunocytochemistry of 4-hydroxynonenal (4-HNE) staining (magnification × 400, bar = 100 μm, representative of 8 experiments) and glutathione (GSH)/oxidized glutathione (GSSG) ratio. As compared with controls, IPF fibroblasts evidenced increased expression of 4-HNE and decreased GSH/GSSG ratio. (*$p = 0.03$, Controls: $n = 5$, IPF: $n = 5$). **(D)** mRNA expression of phase II enzymes: NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO-1), epoxyde hydrolase (EPHX), and Heme-oxygenase-1 (HO-1). As compared with controls, IPF fibroblasts evidenced decreased expression of phase II enzymes (*$p < 0.05$ compared with controls, controls: $n = 8$, IPF: $n = 8$). **(E)** Western blot analysis of nuclear factor erythroid-2 related factor 2 (Nrf2) protein expression. As compared with controls, IPF fibroblasts evidenced decreased expression of Nrf2 (*$p < 0.05$ compared with controls, controls: $n = 8$, IPF: $n = 8$). **(F)** Confocal microscopy of nuclear expression of Nrf2 in red (left column) and TO-PRO3, a nucleic acid marker, in blue. Co-expression is seen by double staining and overlays (Merge column). Images are representative of all samples (×630 magnification, bar = 50 μm). Quantification evidenced decreased nuclear Nrf2 expression in IPF fibroblasts (*$p < 0.05$ compared with controls, controls: $n = 3$, IPF: $n = 3$). Box-and-whisker plot with median, interquartile range, and minimum and maximum values. (To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at www.liebertpub.com/ars.)

α-SMA in control and IPF fibroblasts (both $p < 0.05$) and collagen I (both $p < 0.01$; Fig. 4A). For IPF fibroblasts, SFN decreased contractility from day 7 ($p = 0.03$) to 14 ($p = 0.03$); the same effect was observed but delayed at day 14 in control fibroblasts ($p = 0.03$; Fig. 4B). SFN decreased fibroblast proliferation at 48 h in both control and IPF fibroblasts (both $p < 0.05$; Fig. 4C) and inhibited control and IPF fibroblast migration as compared with basal conditions (both $p < 0.05$; Fig. 4D). Therefore, SFN had antifibrosis effects.

Effect of SFN on EPII and nuclear Nrf2 expression in fibroblasts stimulated with transforming growth factor β

In fibroblasts pretreated with transforming growth factor β (TGF-β) for 24 h, a pro-fibrosing condition, SFN treatment increased the mRNA expression of NQO-1, EPHX, and HO-1 (Fig. 5A) and concomitantly increased the nuclear Nrf2 fraction in both control and IPF fibroblasts (all $p < 0.0001$; Fig. 5B).

Table 1. Quantification of 4-Hydroxynonenal Staining in Control and Idiopathic Pulmonary Fibrosis Fibroblasts Under Basal Conditions

	4-HNE			
	0	+	+ +	+ + +
Control	0 [0–0]	99 [93.5–100]	1 [0–6.5]	0 [0–0]
IPF	0 [0–0]	0 [0–0]	3.3 [0–8.5]	96.7 [91.5–100][a]

[a]$p < 0.05$ IPF *versus* controls.

0, absent staining; +, moderate staining; + +, intense staining; + + +, very intense staining; results are presented as median [min-max] percentage, 4-HNE, 4-hydroxynonenal; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis.

Effect of SFN on fibroblast phenotype in fibroblasts stimulated with TGF-β or platelet-derived growth factor BB

We assessed the potential therapeutic effect of SFN in fibroblasts stimulated with TGF-β or platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) for 24 h to differentiate into myofibroblasts. SFN treatment strongly modified fibroblast morphology reversing myofibroblastic differentiation as confirmed by a decreased of α-SMA (controls: $p = 0.03$; IPF: $p = 0.005$) and collagen I (controls: $p = 0.03$, IPF: $p = 0.02$) (Fig. 6A). SFN also decreased the contractility of IPF myofibroblasts at days 7 to 14 (all $p = 0.03$). The same effect was observed in control fibroblasts but was delayed at day 14 ($p = 0.03$; Fig. 6B). Moreover, SFN decreased control and IPF fibroblast proliferation at 48 h (both $p < 0.05$; Fig. 6C), and 24-h SFN stimulation inhibited control and IPF fibroblast migration induced by PDGF-BB (both $p < 0.05$; Fig. 6D).

Antifibrosis effects of SFN were via *Nrf2*

To confirm that SFN effects were *via* Nrf2, we transfected control fibroblasts with Nrf2 siRNA. With Nrf2 knockdown, SFN stimulation neither induced mRNA expression of NQO-1, EPHX, and HO-1 (all $p < 0.05$; Fig. 7A) nor decreased the protein levels of α-SMA and collagen I (both $p < 0.05$; Fig. 7B). Therefore, the antifibrosis and antioxidant effects of SFN acted *via* the Nrf2 pathway.

These results were further confirmed in Nrf2 knockout mice. Indeed, as expected, 10 μg/ml SFN inhibited collagen I protein expression in wild-type mice lung fibroblasts and induced concomitant HO-1 expression. These effects of SFN were not observed in Nrf2 − / − mice (Fig. 8).

SFN did not prevent lung fibrosis in the murine bleomycin model

To determine whether SFN treatment could protect mice from bleomycin-induced fibrosis, 8-week-old mice received an intratracheal instillation of either vehicule (NaCl) or bleomycin on Day (D) 0 and were treated by either phosphate-buffered saline (PBS) or SFN for 2 weeks. Lung histology from SFN mice was similar to control mice (Fig. 9A, B), indicating the lack of SFN toxicity in noninjured mouse lungs. Thickened alveoli and fibroblastic foci were observed in bleomycin-treated mice (Fig. 9C, D). SFN treatment did not prevent lung fibrosis after pulmonary bleomycin injury (Fig. 9D). Nrf2 immunostaining was detected in the bronchiolar epithelium (Fig. 9E) and was slightly increased in SFN-treated mice compared with control mice (Fig. 9F). Cytoplasmic Nrf2 staining was increased in the bronchiolar epithelium, alveolar type II cells, and alveolar macrophages in bleomycin-treated mice compared with control mice (Fig. 9G). Nrf2 immunostaining was slightly increased in bleomycin/SFN mice compared with bleomycin-treated mice (Fig. 9H).

Discussion

We showed a decreased expression of nuclear Nrf2 and EPII in human pulmonary fibroblasts from patients with IPF and the key role of altered Nrf2 level in the fibroblast phenotype. Nrf2 inhibition with siRNA-induced myofibroblastic differentiation was associated with increased oxidative stress. Conversely, Nrf2 activation with Keap1 knockdown restored the oxidant/antioxidant balance and reversed the myofibroblastic differentiation. SFN, a known activator of Nrf2, reversed the myofibroblastic differentiation of IPF fibroblasts *in vitro*: decreased α-SMA and collagen I expression and decreased cell proliferation, migration and contraction abilities, both under basal and profibrosis conditions. These alterations were associated with restored Nrf2 expression and oxidant/antioxidant balance in fibroblasts. Nrf2 may play a central role in fibroblast differentiation in IPF, with the activation by SFN providing antifibrosis effects.

We highlighted increased oxidative stress in human IPF fibroblasts, which confirms previous results showing increased expression of NADPH oxidase in human pulmonary fibroblasts from IPF patients (1, 17). Our study explored the endogenous antioxidant side of this balance. Indeed, we observed decreased EPII expression in IPF fibroblasts, concomitant with increased 4-HNE staining, a lipid peroxidation product. Our results agree with the loss of HO-1 in the fibroblastic foci of the human IPF/UIP lung reported by Lakari *et al.* (27). This oxidant/antioxidant imbalance in IPF pulmonary fibroblasts was associated with decreased nuclear Nrf2 expression. Our results agree with the recent evidence of decreased total Nrf2 expression in fibroblastic foci in IPF lung biopsies (31).

As recently described (1, 17), a profibrosis condition such as with TGF-β stimulation induces myofibroblastic differentiation of fibroblasts and increases oxidative stress. In our study, TGF-β stimulation decreased the antioxidant defences of fibroblasts. Our results strongly suggest an association of myofibroblastic differentiation and oxidant/antioxidant imbalance, both involving TGF-β. The role of Nrf2 pathway in the differentiation of human pulmonary fibroblasts into myofibroblasts has never been studied. In control fibroblasts, the specific inhibition of Nrf2 by siRNA induced myofibroblastic differentiation associated with increased oxidative stress (increase of oxidant damage with increased 4-HNE staining and defective antioxidant defences). Moreover, in IPF fibroblasts, Nrf2 specific activation by Keap1 siRNA transfection reversed the myofibroblastic differentiation associated with restored antioxidant defences and decreased oxidant damage. These results suggest a potential antifibrosis role of Nrf2 in IPF in humans. In a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis, Cho *et al.* showed increased sensitivity to bleomycin and more severe inflammatory lesions in Nrf2-knockout mice (8). In agreement with our results, Nrf2 was previously found to down-regulate collagen I

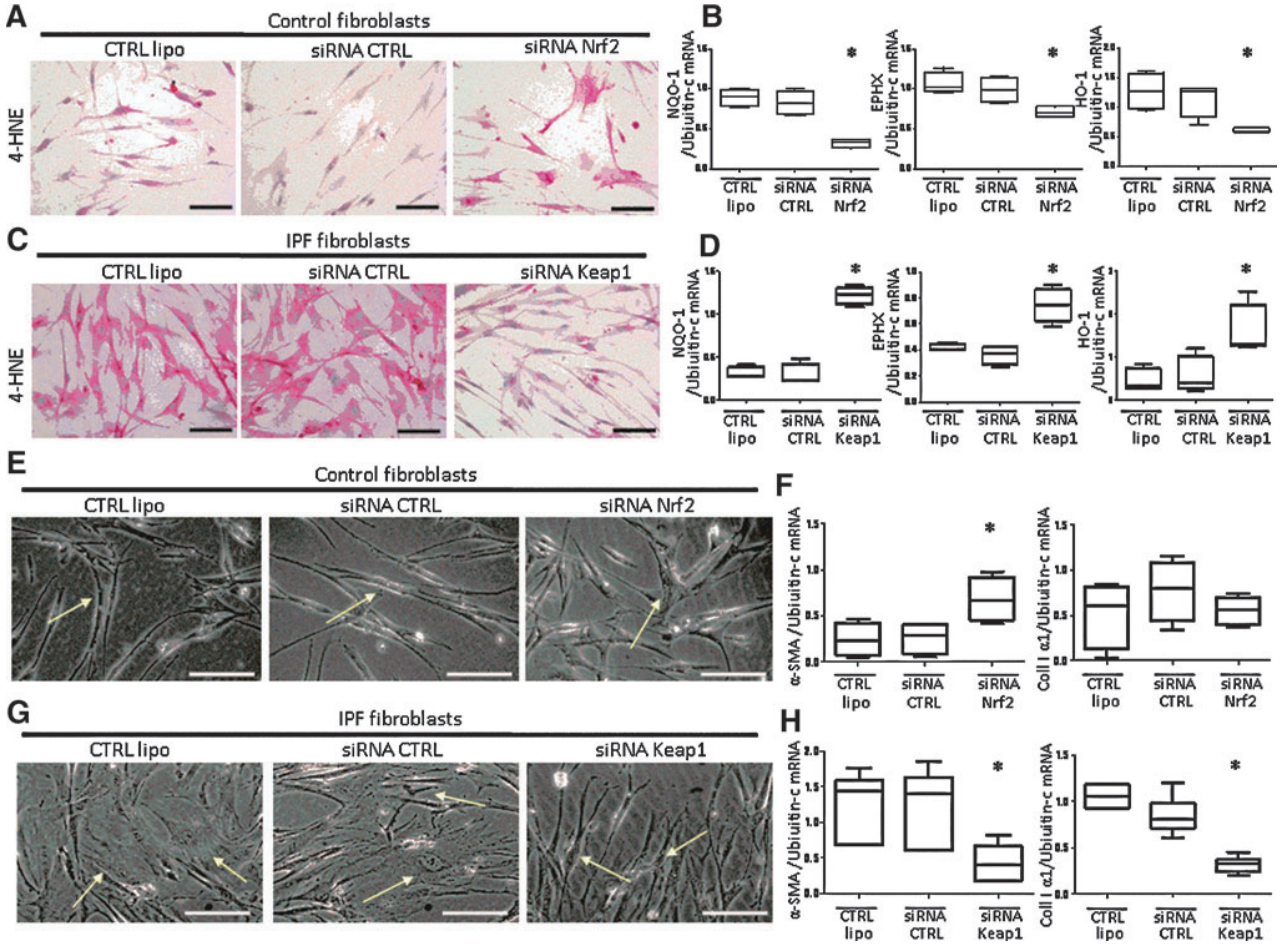


FIG. 2. Effect of Nrf2 modulation by siRNA transfection on oxidative stress and fibroblast phenotype: *Nrf2 knockdown in control fibroblasts:* **(A)** Immunocytochemistry of 4-HNE staining (×400 magnification, bar = 100 μm). As compared with lipofectamine control (CTRL lipo) and scramble siRNA (siRNA CTRL), Nrf2 inhibition increased 4-HNE staining in control fibroblasts **(B)**. mRNA expression of NQO-1, EPHX, and HO-1. As compared with CTRL lipo and siRNA CTRL, Nrf2 inhibition decreased NQO-1, EPHX, and HO-1 mRNA expression. *Nrf2 activation by Keap1 knockdown in IPF fibroblasts:* **(C)**. Immunocytochemistry of 4-HNE staining (bar = 100 μm). As compared with CTRL lipo and siRNA CTRL, Keap1 inhibition decreased 4-HNE staining in IPF fibroblasts **(D)**. mRNA expression of NQO-1, EPHX, and HO-1. As compared with CTRL lipo and siRNA CTRL, NQO-1, EPHX, and HO-1 mRNA expression increased with Keap1 siRNA knockdown. *Nrf2 knockdown in control fibroblasts:* **(E)**. Phase-contrast microscopy (bar = 100 μm). Control fibroblasts transfected with siRNA Nrf2 were characterized by a myofibroblastic phenotype that was star shaped, with an abundant cytoplasm as compared with thin and spindle-shaped fibroblasts in non-transfected CTRL (arrows). **(F)** mRNA expression of α-SMA and collagen I. As compared with CTRL lipo and siRNA CTRL, Nrf2 inhibition increased α-SMA and collagen I mRNA expression. *Nrf2 activation by Keap1 knockdown in IPF fibroblasts:* **(G)**. Phase-contrast microscopy (bar = 100 μm). IPF fibroblasts transfected with siRNA Keap1 were characterized by a thin and spindle-shaped phenotype as compared with a myofibroblastic phenotype that was star shaped and an abundant cytoplasm in non-transfected CTRL (arrows). **(H)**. mRNA expression of α-SMA and collagen I. As compared with CTRL lipo and siRNA CTRL, Keap1 inhibition decreased α-SMA and collagen I mRNA expression. Box-and-whisker plot with median, interquartile range, and minimum and maximum values (*$p < 0.05$; controls: $n = 3$; IPF: $n = 3$). (To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at www.liebertpub.com/ars.)

Table 2. Quantification of 4-Hydroxynonenal Staining in Control Fibroblasts Transfected with Control and Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 siRNA

		4-HNE			
		0	+	+ +	+ + +
Control	Lipofectamine	0 [0–0]	0 [0–0]	60.7 [26.3–100]	39.3 [0–73.7]
	siCTRL	0 [0–0]	0 [0–0]	65.3 [36.4–94.6]	34.7 [5.4–63.6]
	siNrf2	0 [0–0]	0 [0–0]	0 [0–16.7]	100 [83.3–100][a]

[a]$p < 0.05$ Nrf2 siRNA *versus* lipofectamine control or control siRNA (siCTRL).

Table 3. Quantification of 4-Hydroxynonenal Staining in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Fibroblasts Transfected with Control and Keap1 siRNA

		4-HNE			
		0	+	+ +	+ + +
IPF	Lipofectamine	0 [0–0]	0 [0–0]	0 [0–10.5]	100 [89.5–100]
	siCTRL	0 [0–0]	0 [0–0]	5.8 [0–27.8]	94,2 [72.2–100]
	siKeap1	0 [0–0]	0 [0–0]	51.3 [4.5–71.1]	48,7 [28.9–95.5][a]

[a]$p < 0.05$ Keap1 siRNA *versus* lipofectamine control or control siRNA (siCTRL).

mRNA level in mice (28). Beyond its clear role in inflammatory respiratory diseases such as chronic obstructive pulmonary disease in humans (6), Nrf2 has been found involved in cellular differentiation, in cancer cell lines *in vitro* (37). Our study highlights a new role of Nrf2 in myofibroblastic differentiation of fibroblasts during IPF.

The activation of Nrf2 by SFN could decrease oxidative stress damage in IPF and control fibroblasts as previously reported (9, 14, 45). SFN induced EPII expression in cutaneous human fibroblasts (10), Beas2B cells (29), and tubular epithelial rat cells (40). In our study, SFN decreased oxidative stress, increased EPII expression and nuclear Nrf2 not only in control

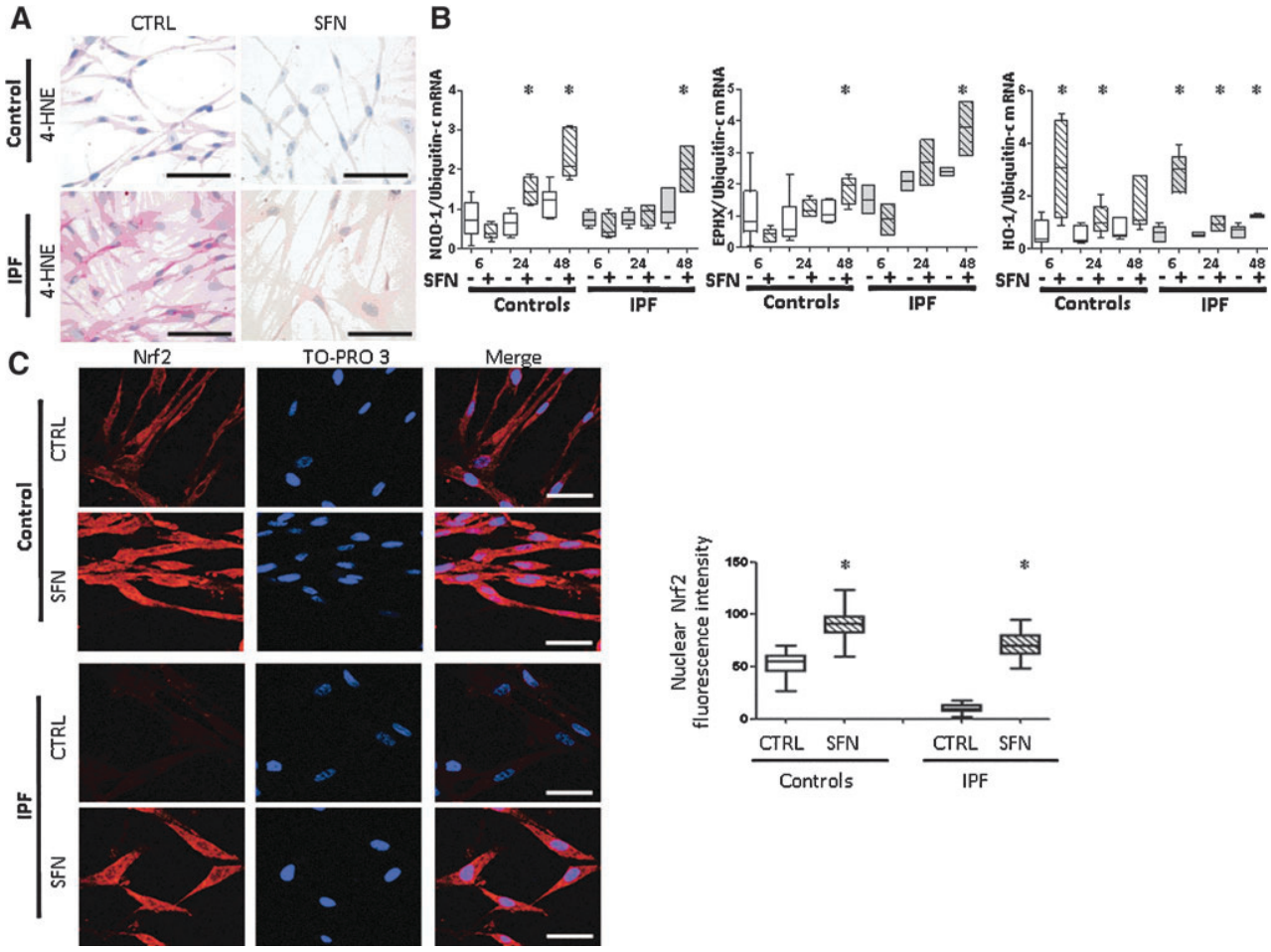


FIG. 3. Effect of sulforaphane (SFN) on oxidative stress and Nrf2 expression in controls and IPF fibroblasts. (A). Immunocytochemistry of 4-HNE staining with 24-h SFN (10 μM) stimulation (×400 magnification, bar = 100 μm). SFN decreased 4-HNE expression. **(B)**. Increased mRNA expression of NQO-1, EPHX, and HO-1 with SFN stimulation (10 μM) for 6, 24, or 48 h, respectively. (*$p < 0.05$, compared with the control condition (without SFN) at each time, in control and in IPF fibroblasts, controls: $n = 8$, IPF: $n = 8$). **(C)**. Confocal microscopy of nuclear Nrf2 expression with SFN stimulation for 6 h (×630 magnification, bar = 50 μm) Nrf2 in red (left column) and TO-PRO3, a nucleic acid marker, in blue. Co-expression is seen by double staining and overlays (Merge column). Images are representative of all samples. Quantification evidenced increased nuclear Nrf2 expression in controls and IPF fibroblasts treated with SFN (*$p < 0.05$ compared with controls; controls: $n = 3$, IPF: $n = 3$). Box-and-whisker plot with median, interquartile range, and minimum and maximum values. (To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at www.liebertpub.com/ars.)

Table 4. Quantification of 4-Hydroxynonenal Staining in Control and Idiopathic Pulmonary Fibrosis Fibroblasts Under Basal Conditions (CTRL) and After Stimulation with Sulforaphane

		4-HNE			
		0	+	+ +	+ + +
Control	CTRL	3.3 [0–12.3]	96.7 [87.7–100]	0 [0–0]	0 [0–0]
	SFN	1.7 [0–6.4]	98.3 [93.6–100]	0 [0–0]	0 [0–0]
IPF	CTRL	0 [0–0]	0 [0–0]	3.3 [0–8.5]	96.7 [91.5–100]
	SFN	0 [0–0]	0 [0–0]	48.6 [29.2–71.4]	51.4 [28.6–70.8][a]

[a] $p < 0.05$ *versus* CTRL.

but also in IPF fibroblasts. SFN could also restore EPII expression and nuclear Nrf2 in IPF and control human pulmonary fibroblasts even after a prestimulation with TGF-β. Interestingly, the inhibition of P38 subunits by SFN (21) could block the TGF-mediated Nrf2 degradation reported in alveolar epithelial cells (34). This suggests that SFN can induce nuclear Nrf2 and decrease oxidative stress even in IPF patients and, thus, could lead to new therapeutic strategies.

The pharmacological activation of Nrf2 by SFN was assessed in the murine bleomycin fibrosis model. Unfortunately, SFN did

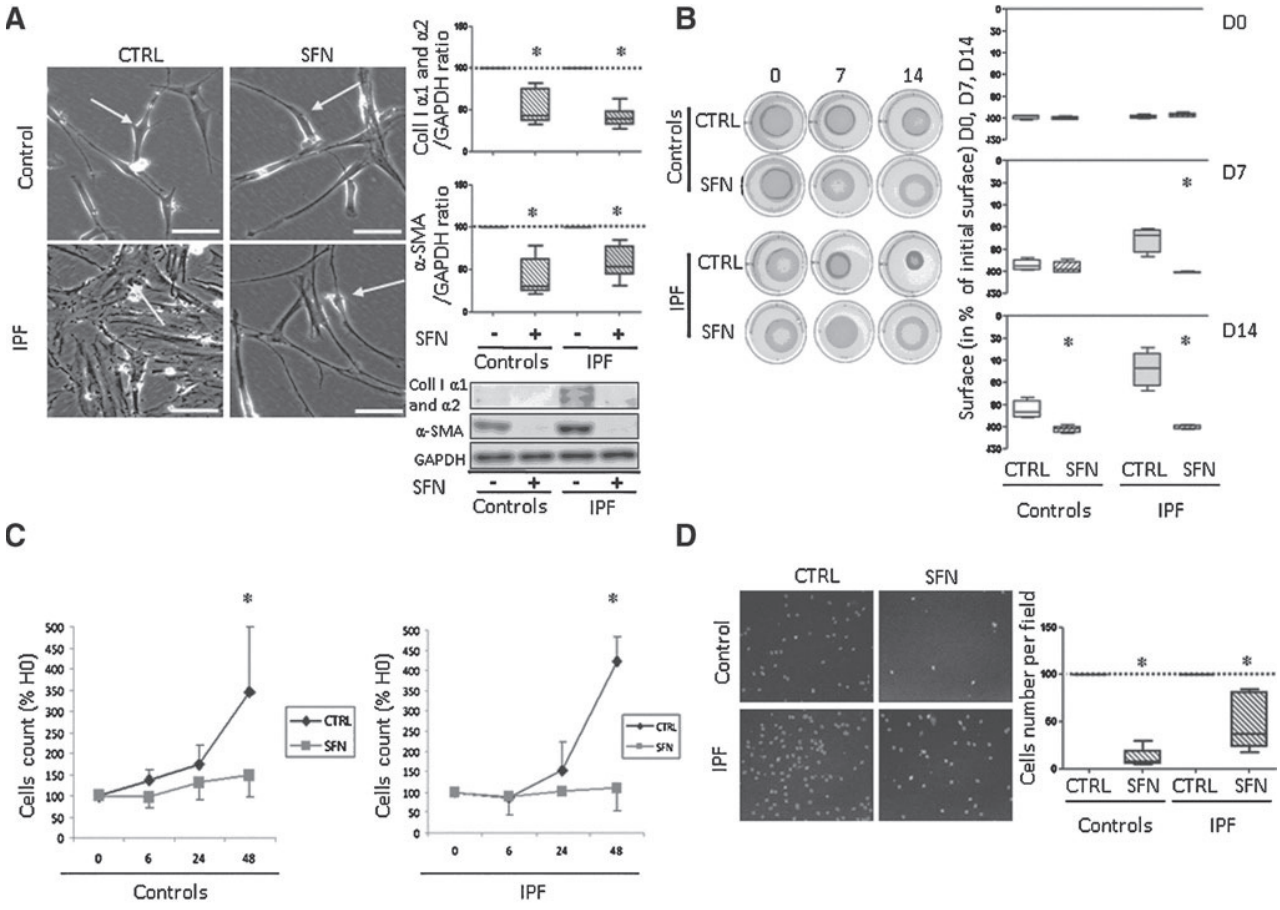


FIG. 4. Effect of SFN to activate Nrf2 on fibroblast phenotype. (A). Phase-contrast microscopy of the effect of 24-h SFN stimulation on fibroblast morphology (×400 magnification, bar = 100 μm), and α-SMA and collagen I protein expression. Controls and IPF fibroblasts treated with SFN were characterized by a thin and spindle shape as compared with a myofibroblastic phenotype with a star shape and an abundant cytoplasm in CTRL (arrows). Decreased α-SMA and collagen I protein was observed in SFN-treated controls and IPF fibroblasts (*$p < 0.05$ compared with CTRL, controls: $n = 8$, IPF: $n = 8$). **(B)**. SFN decreased IPF fibroblasts contractility at days 7 and 14 and at day 14 in control fibroblasts (results are a percentage of the initial collagen gel surface; *$p < 0.05$ compared with CTRL, controls: $n = 5$, IPF: $n = 5$). **(C)**. SFN decreased fibroblast proliferation at 48h (*$p < 0.05$, controls: $n = 5$, IPF: $n = 5$) and **(D)**. SFN inhibited fibroblasts migration at 24 h (×40 magnification, microscopy with fluorescence, and automated count of cells which migrated through the Transwell membrane) (*$p < 0.05$; Controls: $n = 5$, IPF: $n = 5$). Box-and-whisker plot with median, interquartile range, and minimum and maximum values.

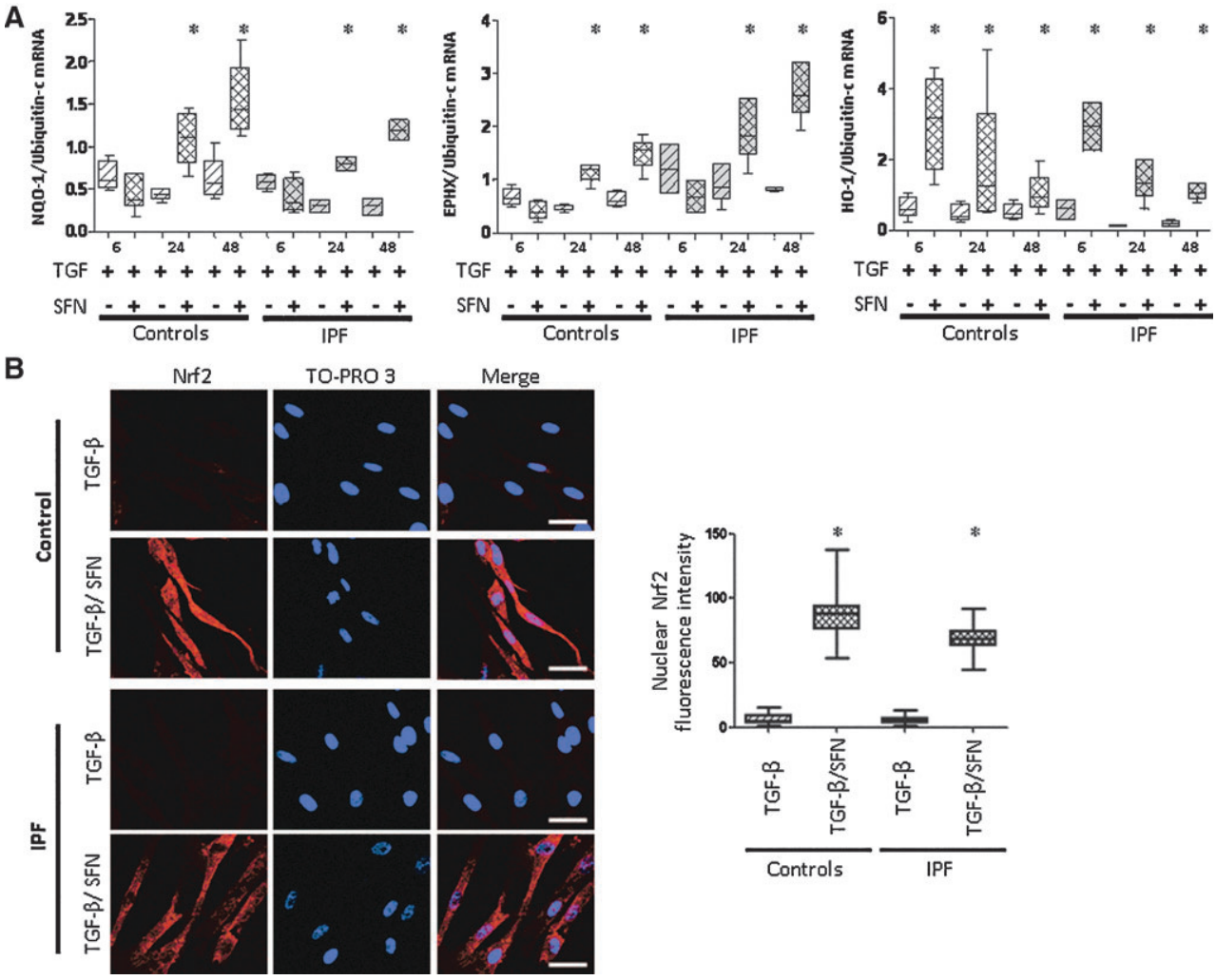


FIG. 5. Effect of SFN on EPII and nuclear Nrf2 expression in fibroblasts stimulated with transforming growth factor β (TGF-β). (A). SFN increased mRNA expression of NQO-1, EPHX, and HO-1 in fibroblasts pretreated 24-h with TGF-β (*$p < 0.05$, compared with the control condition (without SFN) at each time, in controls and in IPF fibroblasts, controls: $n = 8$, IPF: $n = 8$). **(B)**. Confocal microscopy of nuclear Nrf2 expression of fibroblasts pretreated 24-h with TGF-β, then with SFN for 6 h ($\times 630$ magnification, bar = 50 μm) Nrf2 in red (left column) and TO-PRO3, a nucleic acid marker, in blue. Co-expression is seen by double staining and overlays (Merge column). Images are representative of all samples. Quantification evidenced increased nuclear Nrf2 expression in controls and IPF fibroblasts treated with TGF-β/SFN (*$p < 0.05$ compared with TGF-β; controls: $n = 3$, IPF: $n = 3$). Box-and-whisker plot with median, interquartile range, and minimum and maximum values. (To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at www.liebertpub.com/ars.)

not exhibit antifibrotic effect *in vivo.* Nrf2 was not expressed in lung fibroblasts in this model in the basal condition. Moreover, both SFN and bleomycin failed to modulate Nrf2 in lung fibroblasts. In the bleomycin model, the major inflammatory response and the oxidant nature of bleomycin contrast with the histological features of human IPF (4, 23). The bleomycin model of lung fibrosis is rather an acute lung injury with major oxidative and inflammatory responses. This probably explains the increased susceptibility of the Nrf2 −/− mice to bleomycin (8). In our study, bleomycin increased Nrf2 expression in lung epithelial cells and macrophages. The Nrf2 activator SFN probably represents a small additive effect, compared with bleomycin alone. Finally, this model associated with major oxidative stress did not fit well to address the role of an Nrf2 inducer in lung fibrosis, especially in myofibroblastic dedifferentiation in the absence of Nrf2 expression in mice compared with human lung fibroblasts.

The antifibrosis effect of SFN as an Nrf2 activator on human pulmonary fibroblasts of IPF patients has never been studied. In our study, myofibroblast stimulation by SFN led to their dedifferentiation into fibroblasts concomitant with antioxidant defence restoration, even in pro-fibrosis conditions. The effect of SFN on cell differentiation was reported in a rat model of renal fibrosis (40). SFN inhibited the epithelial–mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells, with decreased α-SMA expression (40). Antifibrosis properties have been reported with *in vitro* stimulation with N-acetylcystein, another Nrf2 activator (42). However, unlike SFN, N-acetylcystein has not been shown to inhibit fibroblast migration. SFN acted specifically *via* Nrf2 in fibroblasts. Indeed, SFN stimulation in fibroblasts after Nrf2 knockdown did not induce myofibroblastic dedifferentiation. In addition, we demonstrated that the effects of SFN on HO-1 and collagen

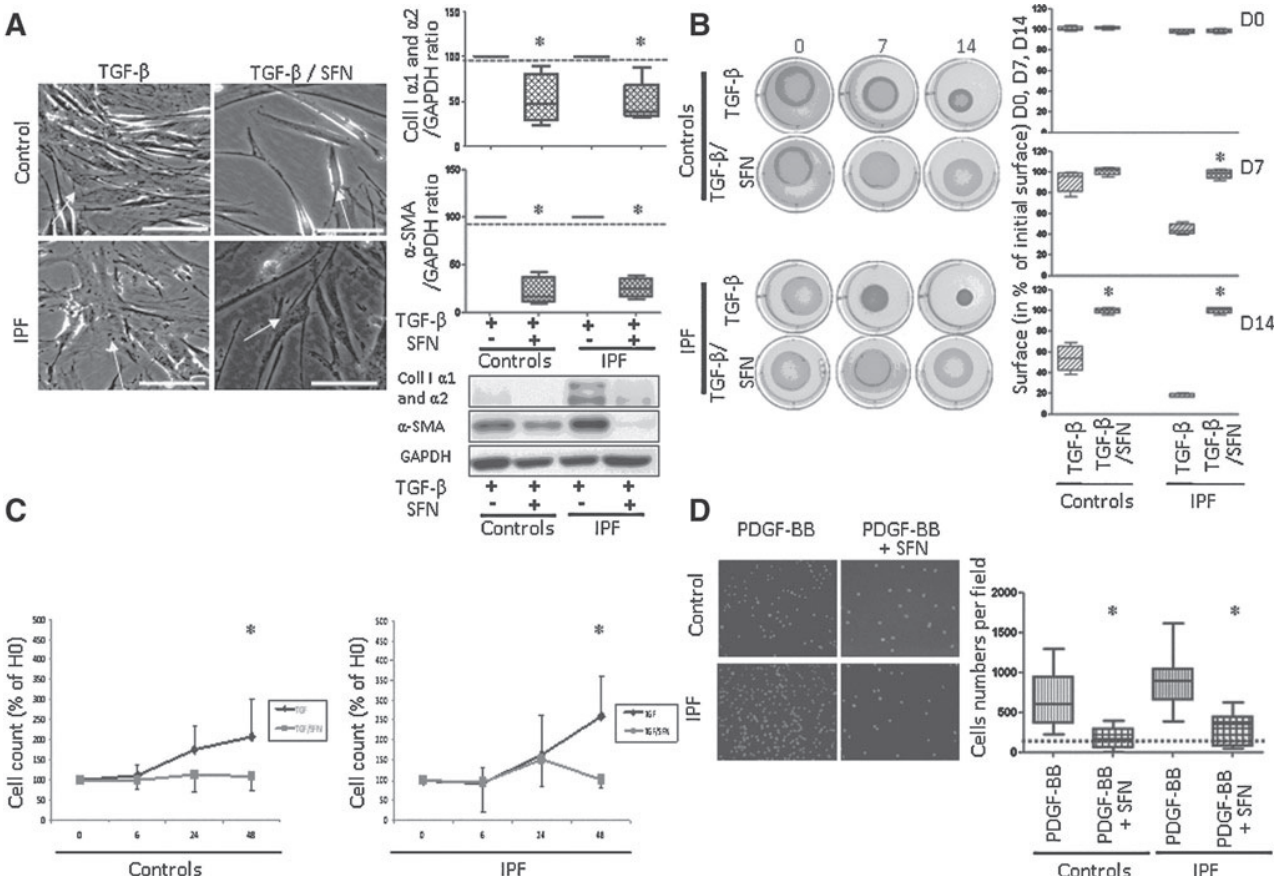


FIG. 6. Antifibrosis effects of SFN on fibroblast phenotype in fibroblasts stimulated with TGF-β or platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB). (A). Phase-contrast microscopy of effect of SFN on fibroblast morphology pretreated for 24 h with TGF-β ($\times$400 magnification, bar = 100 μm), and α-SMA and collagen I protein expression. Control and IPF fibroblasts treated with TGF-β/SFN were characterized by a thin and spindle shape as compared with myofibroblastic phenotypes with a star shape and an abundant cytoplasm in TGF-β (arrows). Decreased α-SMA and collagen I protein was observed in TGF-β/SFN-treated controls and IPF fibroblasts (*$p < 0.05$ compared with TGF-β, controls: $n = 8$, IPF: $n = 8$). **(B)**. SFN decreased IPF fibroblasts contractility at days 7 and 14 and at day 14 in control fibroblasts (results are a percentage of the initial collagen gel surface; *$p < 0.05$ compared with TGF-β, controls: $n = 5$, IPF: $n = 5$). **(C)**. SFN decreased fibroblast proliferation at 48 h compared with TGF-β (*$p < 0.05$, controls: $n = 5$, IPF: $n = 5$) and **(D)**. SFN inhibited PDGF-BB–induced migration of fibroblasts at 24 h ($\times$40 magnification, microscopy with fluorescence, and automated count of cells that migrated through the Transwell membrane) (*$p < 0.05$; controls: $n = 5$, IPF: $n = 5$). Box-and-whisker plot with median, interquartile range, and minimum and maximum values.

I expression were mediated by Nrf2 in lung fibroblasts from wild-type and Nrf2 knockout mice.

We report an antiproliferating effect of SFN in human pulmonary fibroblasts, which could be associated with Nrf2 signals. Previous studies showed that SFN reduced the proportion of Barett esophageal adenocarcinoma cells in the S phase (36). SFN blocked the cell cycle in the G0 phase. Moreover, N-acetylcystein inhibited mouse fibroblast proliferation *in vitro*, not by inducing cell death but by cell cycle arrest in the mid-G1 phase. N-acetylcystein prevented activation of the mitogen-activated protein kinase extracellular-signal-regulated kinase1/2 and inhibited the expression of cyclin D1 (39).

In conclusion, we demonstrated decreased Nrf2 expression concomitant with oxidant/antioxidant imbalance and myofibroblastic differentiation in human pulmonary fibroblasts from IPF patients *in vitro*. Conversely, the induction of nuclear Nrf2 restored the oxidant/antioxidant equilibrium and reversed the myofibroblastic differentiation. The pro-fibrosis effect of TGF-β was related to decreased nuclear Nrf2 expression and counteracted by the antifibrosis effect of an Nrf2 activator, SFN. Our study identified Nrf2 as a novel potential therapeutic target in IPF and confirmed the *in vitro* antifibrosis effects of SFN.

Materials and Methods

Patients

This study was approved by the local ethics committee, and stored biopsies were reported to our institutional board (Delegation a la Recherche Clinique, Assistance Publique - Hopitaux de Paris, Carre Historique - Hopital Saint-Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, 75475 Paris Cedex 10, France/ Comite de Protection des Personnes, Ile de France 1, 1 Place

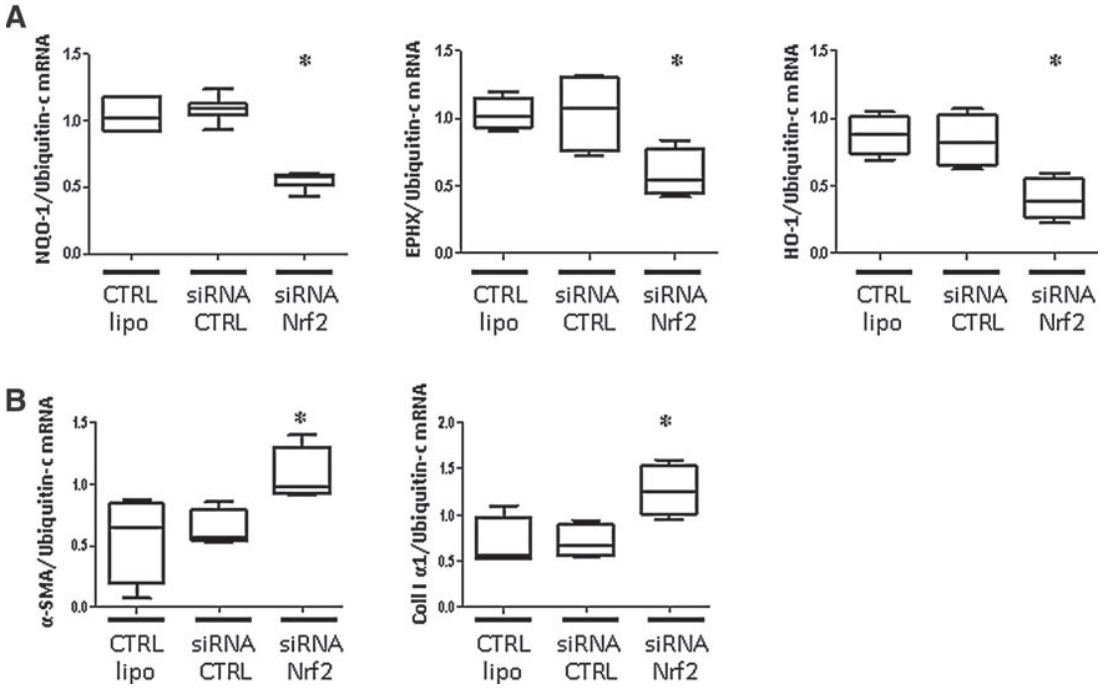


FIG. 7. Nrf2 mediated the antifibrosis effects of SFN. Control fibroblasts were transfected with Nrf2 siRNA and treated by SFN. **(A)**. NQO-1, EPHX, and HO-1 mRNA expression of control fibroblasts stimulated by SFN was inhibited in siRNA Nrf2 as compared with CTRL lipo and siRNA CTRL **(B)**. α-SMA and collagen I mRNA expression of control fibroblasts stimulated by SFN was not inhibited in siRNA Nrf2 as compared with CTRL lipo and siRNA CTRL. Box-and-whisker plot with median, interquartile range, and minimum and maximum values (*all $p < 0.05$, $n = 5$).

du Parvis Notre-Dame, 75181 Paris cedex 04, France, reference 0811760).

We obtained biopsies from eight patients with IPF according to the American Thoracic Society definition (2), and eight control patients without radiographic, spirometric or histological features of fibrosis.

Control and IPF patients groups did not differ in age.

Cell culture

Processing of human lung samples and fibroblast isolation. Human lung tissue fragments were either immediately frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C or used for extraction of fibroblasts. Human lung fibroblasts were cultured from lung explants until passage 4–6 as previously described (1). In some experiments, cells were incubated with recombinant human (rh) TGF-β1, PDGF-BB (R&D Systems) (1), or SFN (10 μM; Sigma Aldrich) (13).

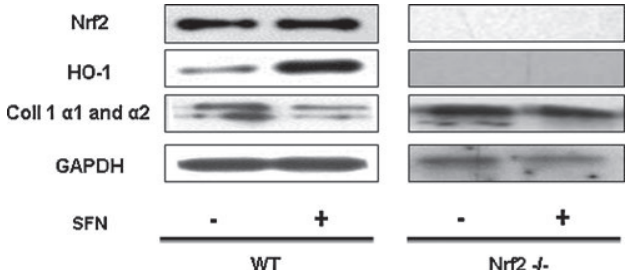


FIG. 8. Effects of SFN on HO-1 and collagen I expression in lung fibroblast of wild-type (WT) and Nrf2−/− mice. SFN increased HO-1 and decreased collagen type I α1 and α2 (Coll I α1 and α2) expression in WT mouse lung fibroblast. These effects were not observed in Nrf2−/− mouse lung fibroblast (representative experiment out of 3 in WT and 3 in Nrf2−/− mouse lung fibroblast).

Mouse lung fibroblasts. Mouse lung fibroblasts were obtained as previously described (44). Male C57BL/6 mice (8–12 week old) and Nrf2−/− mice were provided by the RIKEN BRC according a MTA to Dr S. Kerdine-Römer (19).

Cell stimulation. Cells were stimulated with TGF-β or SFN for 24 h. For therapeutic experiments, fibroblasts were prestimulated with TGF- β for 24 h, and then SFN for 6, 24, or 48 h.

Cell migration assay. Cell motility was examined as previously described (1) with use of a modified Boyden chamber (Transwell Costar) in response to 24-h stimulation with PDGF-BB (10 ng/ml), with or without SFN (10 μM) or media alone (with 1% fetal calf serum (FCS)). The chemotactic index was determined as the ratio of cells moving in response to PDGF-BB with or without SFN relative to cells moving in response to medium alone (control). Nuclear cells were stained by 4′,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, 5 mg/ml; Invitrogen Corp.), and cells migrating through the Transwell membrane were automatically counted.

3-D collagen gel culture. Fibroblast-seeded collagen lattices were prepared by mixing collagen I extracted from rat tail (BD Biosciences), with 10×Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen) and 10 N NaOH before adding

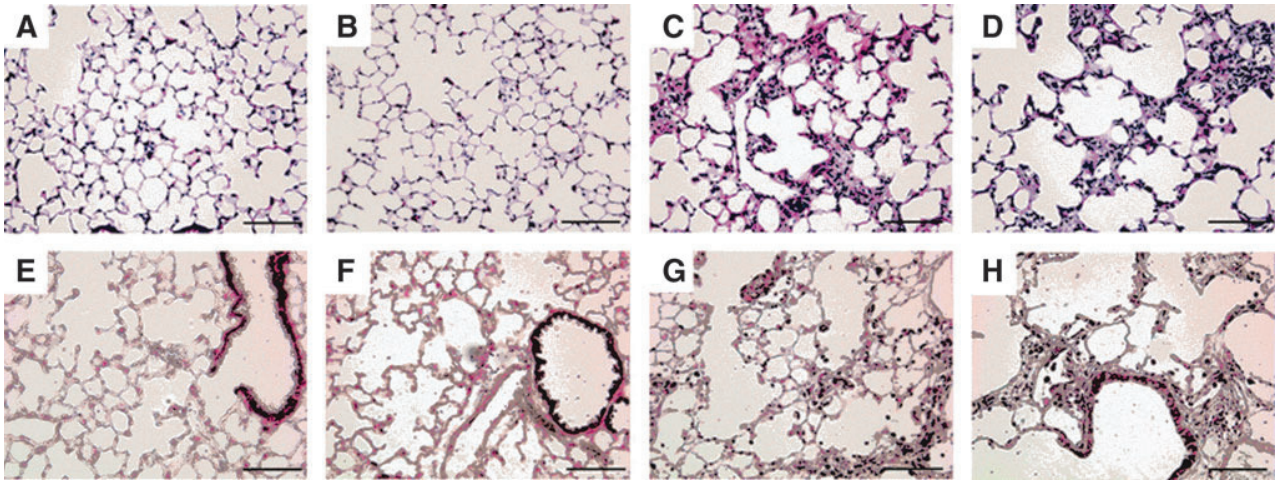


FIG. 9. SFN did not prevent lung fibrosis in the murine bleomycin model. Eight-week-old mice received one intratracheal instillation of either NaCl or bleomycin on Day (D) 0 and were then treated from D0 to D14 by a subcutaneous injection of either phosphate-buffered saline (PBS) or SFN 25 mg/kg/day ($n = 12$ per group). Lung sections were stained with hematoxylin and eosin to assess lung morphology **(A–D)**. Lung histology from SFN mice (NaCl/SFN) **(B)** was similar to that in control mice (NaCl/PBS) **(A)**. Bleomycin administration resulted in the development of extensive fibrosis areas in the lung on D14 after bleomycin treatment **(C)**. SFN did not prevent lung fibrosis after pulmonary bleomycin injury **(D)**. Nrf2 immunohistochemical staining was performed in control, SFN-treated, bleomycin-treated, and bleomycin/SFN-treated mice on D14 after bleomycin treatment **(E–H)**. Cytoplasmic staining for Nrf2 was detected in the bronchiolar epithelium of control mice **(E)**. Nrf2 staining was slightly increased in SFN-treated mice **(F)**. After bleomycin exposure, cytoplasmic Nrf2 staining was increased in bronchiolar epithelium, alveolar type II cells, and alveolar macrophages **(G)**. Cytoplasmic Nrf2 staining was slightly increased in bleomycin/SFN-treated mice compared with bleomycin-treated mice **(H)**. Photomicrographs are representative of at least four individual mice. Scale bar: 100 μm. (To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at www.liebertpub.com/ars.)

1.5 ml cell suspension to give a final concentration of 150 000 fibroblasts/ml lattice mixture. Fibroblasts in collagen gels were stimulated with TGF-β or SFN for 0, 7, and 14 days (18). At each time, the lattices were photographed, and rates of gel contraction were calculated by determining the remaining surface area by computer-based analysis and expressed as a percentage of initial or control area.

Cell proliferation. Fibroblasts were seeded in six-well plates (100, 000 cells/well) and stimulated in a complete medium with 10% FCS with TGF-β or SFN for 24 h or TGF-β for 24 h and then SFN for 48 h. Fibroblasts were trypsined, centrifuged, and counted by an automatic cell counter (VI-cell XR; Beckman).

siRNA transfection. Fibroblasts were transfected for 48 h with 50 n*M* Nrf2 siRNA (NM_006164) or 100 n*M* Keap1 siRNA (L-012453-00, both Dharmacon SMARTpool siRNA reagents), or negative control (scramble) siRNA (D-0018010-10-20, Dharmacon plus nontargeting pool) by the use of Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (5, 16).

Cellular toxicity. Cellular toxicity and viability were assessed by trypan blue exclusion and lactate dehydrogenase release (1).

Phase-contrast microscopy

Phase-contrast microscopy was used to evaluate the morphological features of fibroblasts. Myofibroblastic phenotype was characterized by star-shaped cells, with abundant cytoplasm and short projections. Fibroblastic phenotype was characterized by thin and spindle-shaped cells with prolonged cytoplasmic projections.

GSH measurement

GSH/GSSG ratio was measured according to the manufacturer's instructions (glutathione assay Euromedex; Arbor Assay).

Western blot analysis

Proteins were extracted, and western blot analysis was performed as previously described (16) with antibodies for Nrf2 (Abcam), α-SMA (Sigma), and collagen I (SouthernBiothec), with expression normalized to that of Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Abcam).

Quantitative analysis of mRNA expression

The mRNA expression of HO-1, NQO-1, EPHX, α-SMA, and collagen I α1 was quantified by a reverse transcriptase–real-time polymerase chain reaction (7500 Software v2.0.1, Applied Biosystem) as previously described with expression normalized to that of ubiquitin-c (15).

Confocal laser scanning microscopy

Simple immunofluorescence labelling was performed to assess the subcellular localisation of Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology) in fibroblasts as previously described (16). Nuclear Nrf2 immunofluorescence was quantified by co-localisation with TO-PRO3, a nucleic acid marker (Molecular Probes).

4-HNE immunocytochemistry

Fibroblasts were grown in 8-well Lab-teks (25, 000 cells/well in DMEM with 10% fetal calf serum; Lab-tek Chamber Slide System, 177445 Permanox Slide, NUNC) and stimulated or not with SFN for 24 h. 4-HNE fibroblast staining (Calbiochem) was used as an oxidative stress marker (16). Positive cells were revealed by use of the Vectastain ABC-alkaline phosphatase kit (Vector Laboratories) and the Liquid Permanent Red substrate-chromogen system (Dako). Positive cells were evaluated by two independent observers examining 10 different high-power fields at × 400 magnification. Results were expressed as the number of positive cells per field (16). The intensity of protein staining was graded from 0 (absent) to + + + (very intense staining). Complete agreement in scoring was obtained between the two independent observers.

Bleomycin lung fibrosis

All experiments were performed with 8-week-old male C57BL/6J mice (Janvier) according to Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale guidelines that complied with national and international regulations. On Day (D) 0, mice received an intratracheal instillation of 0.06 unit of bleomycin hydrochloride (Bleomycine Bellon; Aventis) or vehicle (0.9% sterile saline), in a volume of 50 μl. The animals were killed on Day 14 after instillation, and their lungs were removed for further analysis. Saline-treated mice were used as controls. PBS (20 m*M* Tris·HCl, pH 7.6, 137 m*M* NaCl) or SFN (25 mg/kg/day body weight) were administered by a subcutaneous injection to saline-treated or bleomycin-treated mice from D0 to D14 with a 2-day break (D5-D6 and D12-13) twice. This resulted in 4 groups of 12 animals each: Control, Bleomycin, SFN, Bleomycin/SFN.

Tissue preparation and immunostaining

Tissue harvesting was preceded by the administration of anesthetic and then exsanguination by severing the inferior vena cava. Mouse lungs were inflation fixed by gravity with 4% paraformaldehyde (PFA in PBS) at 25 cm hydrostatic pressure for 1 min. The lungs were immersed overnight in 4% PFA at 4°C, washed in PBS followed by dehydration in a series of ethanol solutions before paraffin embedding. Paraffin sections were deparaffinized in xylene, followed by rehydration in ethanol washes. Peroxidase treatment in methanol with 0.5% hydrogen peroxide was followed by heat-assisted antigen retrieval in 0.01 *M* sodium citrate buffer (pH 6.0). Blocking was performed for 2 h at room temperature using 2% horse serum followed by overnight incubation with primary antibody anti-Nrf2 (1:100; Abcam) at 4°C. Rinsed sections were incubated with biotinylated secondary antibodies directed to primary antibody host IgGs (7.5 μg/ml; Vector Laboratories), visualized with the Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories) using nickel-diaminobenzidine as a substrate, enhanced with Tris-cobalt, and counterstained with 0.1% nuclear-fast red.

Statistical analysis

Data were analysed by use of Statview software (Abacus Concepts), and displayed as box-and-whiskers plot with median, interquartile range, and minimum and maximum values. Between-group differences were first assessed by a nonparametric analysis of variance (Kruskal–Wallis test) and then the Mann–Whitney U-test or the Wilcoxon paired test. $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Acknowledgments

Marcel Bonay was supported by the Chancellerie des Universités de Paris (Legs Poix) and the Fonds de Dotation "Recherche en Santé Respiratoire."

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Amara N, Goven D, Prost F, Muloway R, Crestani B, and Boczkowski J. NOX4/NADPH oxidase expression is increased in pulmonary fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates TGFbeta1-induced fibroblast differentiation into myofibroblasts. *Thorax* 65: 733–738, 2010.
2. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med* 161: 646–664, 2000.
3. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 277–304, 2002.
4. Aono Y, Ledford JG, Mukherjee S, Ogawa H, Nishioka Y, Sone S, Beers MF, Noble PW, and Wright JR. Surfactant protein-D regulates effector cell function and fibrotic lung remodeling in response to bleomycin injury. *Am J Respir Crit Care Med* 185: 525–536, 2012.
5. Blake DJ, Singh A, Kombairaju P, Malhotra D, Mariani TJ, Tuder RM, Gabrielson E, and Biswal S. Deletion of Keap1 in the lung attenuates acute cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42: 524–536, 2010.
6. Boutten A, Goven D, Artaud-Macari E, Boczkowski J, and Bonay M. NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Mol Med* 17: 363–371, 2011.
7. Cheung KL and Kong AN. Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention. *Aaps J* 12: 87–97, 2010.
8. Cho HY, Reddy SP, Yamamoto M, and Kleeberger SR. The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis. *Faseb J* 18: 1258–1260, 2004.
9. Dash PK, Zhao J, Orsi SA, Zhang M, and Moore AN. Sulforaphane improves cognitive function administered following traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 460: 103–107, 2009.
10. Dinkova-Kostova AT, Fahey JW, Wade KL, Jenkins SN, Shapiro TA, Fuchs EJ, Kerns ML, and Talalay P. Induction of the phase 2 response in mouse and human skin by sulforaphane-containing broccoli sprout extracts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 847–851, 2007.

11. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, and Talalay P. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11908–11913, 2002.
12. Fredenburgh LE, Perrella MA, and Mitsialis SA. The role of heme oxygenase-1 in pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36: 158–165, 2007.
13. Gan N, Wu YC, Brunet M, Garrido C, Chung FL, Dai C, and Mi L. Sulforaphane activates heat shock response and enhances proteasome activity through upregulation of HSP27. *J Biol Chem* 285: 35528–35536, 2010.
14. Gao X, Dinkova-Kostova AT, and Talalay P. Powerful and prolonged protection of human retinal pigment epithelial cells, keratinocytes, and mouse leukemia cells against oxidative damage: the indirect antioxidant effects of sulforaphane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15221–15226, 2001.
15. Goven D, Boutten A, Lecon-Malas V, Boczkowski J, and Bonay M. Prolonged cigarette smoke exposure decreases heme oxygenase-1 and alters Nrf2 and Bach1 expression in human macrophages: roles of the MAP kinases ERK(1/2) and JNK. *FEBS Lett* 583: 3508–3518, 2009.
16. Goven D, Boutten A, Lecon-Malas V, Marchal-Somme J, Soler P, Boczkowski J, and Bonay M. Induction of heme oxygenase-1, biliverdin reductase and H-ferritin in lung macrophage in smokers with primary spontaneous pneumothorax: role of HIF-1alpha. *PLoS One* 5: e10886, 2010.
17. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, Pennathur S, Martinez FJ, and Thannickal VJ. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med* 15: 1077–1081, 2009.
18. Huet E, Vallee B, Szul D, Verrecchia F, Mourah S, Jester JV, Hoang-Xuan T, Menashi S, and Gabison EE. Extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 promotes myofibroblast differentiation by inducing alpha-smooth muscle actin expression and collagen gel contraction: implications in tissue remodeling. *FASEB J* 22: 1144–1154, 2008.
19. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, and Nabeshima Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 313–322, 1997.
20. Kensler TW, Wakabayashi N, and Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 89–116, 2007.
21. Keum YS, Yu S, Chang PP, Yuan X, Kim JH, Xu C, Han J, Agarwal A, and Kong AN. Mechanism of action of sulforaphane: inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Res* 66: 8804–8813, 2006.
22. Kikuchi N, Ishii Y, Morishima Y, Yageta Y, Haraguchi N, Itoh K, Yamamoto M, and Hizawa N. Nrf2 protects against pulmonary fibrosis by regulating the lung oxidant level and Th1/Th2 balance. *Respir Res* 11: 31, 2010.
23. Kikuchi N, Ishii Y, Morishima Y, Yageta Y, Haraguchi N, Yamadori T, Masuko H, Sakamoto T, Yanagawa T, Warabi E, Ishii T, and Hizawa N. Aggravation of bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice lacking peroxiredoxin I. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 600–609, 2011.
24. King TE, Jr. and Pardo A, and Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 378: 1949–1961, 2011.
25. Kinnula VL and Myllarniemi M. Oxidant-antioxidant imbalance as a potential contributor to the progression of human pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal* 10: 727–738, 2008.
26. Kirkham P and Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* 111: 476–494, 2006.
27. Lakari E, Pylkas P, Pietarinen-Runtti P, Paakko P, Soini Y, and Kinnula VL. Expression and regulation of hemeoxygenase 1 in healthy human lung and interstitial lung disorders. *Hum Pathol* 32: 1257–1263, 2001.
28. Malhotra D, Portales-Casamar E, Singh A, Srivastava S, Arenillas D, Happel C, Shyr C, Wakabayashi N, Kensler TW, Wasserman WW, and Biswal S. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res* 38: 5718–5734, 2010.
29. Malhotra D, Thimmulappa R, Navas-Acien A, Sandford A, Elliott M, Singh A, Chen L, Zhuang X, Hogg J, Pare P, Tuder RM, and Biswal S. Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1. *Am J Respir Crit Care Med* 178: 592–604, 2008.
30. Markart P, Luboeinski T, Korfei M, Schmidt R, Wygrecka M, Mahavadi P, Mayer K, Wilhelm J, Seeger W, Guenther A, and Ruppert C. Alveolar oxidative stress is associated with elevated levels of nonenzymatic low-molecular-weight antioxidants in patients with different forms of chronic fibrosing interstitial lung diseases. *Antioxid Redox Signal* 11: 227–240, 2009.
31. Mazur W, Lindholm P, Vuorinen K, Myllarniemi M, Salmenkivi K, and Kinnula VL. Cell-specific elevation of NRF2 and sulfiredoxin-1 as markers of oxidative stress in the lungs of idiopathic pulmonary fibrosis and non-specific interstitial pneumonia. *Apmis* 118: 703–712, 2010.
32. McWalter GK, Higgins LG, McLellan LI, Henderson CJ, Song L, Thornalley PJ, Itoh K, Yamamoto M, and Hayes JD. Transcription factor Nrf2 is essential for induction of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferases, and glutamate cysteine ligase by broccoli seeds and isothiocyanates. *J Nutr* 134: 3499S–3506S, 2004.
33. Nichols DP, Ziady AG, Shank SL, Eastman JF, and Davis PB. The triterpenoid CDDO limits inflammation in preclinical models of cystic fibrosis lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L828–L836, 2009.
34. Ning W, Song R, Li C, Park E, Mohsenin A, Choi AM, and Choi ME. TGF-beta1 stimulates HO-1 via the p38 mitogen-activated protein kinase in A549 pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L1094–L1102, 2002.
35. Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest* 122: 286S–289S, 2002.
36. Qazi A, Pal J, Maitah M, Fulciniti M, Pelluru D, Nanjappa P, Lee S, Batchu RB, Prasad M, Bryant CS, Rajput S, Gryaznov S, Beer DG, Weaver DW, Munshi NC, Goyal RK, and Shammas MA. Anticancer activity of a broccoli derivative, sulforaphane, in barrett adenocarcinoma: potential use in chemoprevention and as adjuvant in chemotherapy. *Transl Oncol* 3: 389–399, 2010.
37. Rachakonda G, Sekhar KR, Jowhar D, Samson PC, Wikswo JP, Beauchamp RD, Datta PK, and Freeman ML. Increased cell migration and plasticity in Nrf2-deficient cancer cell lines. *Oncogene* 29: 3703–3714, 2010.

38. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE, Jr., Kondoh Y, Myers J, Muller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, and Schunemann HJ. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 183: 788–824, 2011.
39. Sekharam M, Trotti A, Cunnick JM, and Wu J. Suppression of fibroblast cell cycle progression in G1 phase by N-acetylcysteine. *Toxicol Appl Pharmacol* 149: 210–216, 1998.
40. Shin DH, Park HM, Jung KA, Choi HG, Kim JA, Kim DD, Kim SG, Kang KW, Ku SK, Kensler TW, and Kwak MK. The NRF2-heme oxygenase-1 system modulates cyclosporin A-induced epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *Free Radic Biol Med* 48: 1051–1063, 2010.
41. Sriram N, Kalayarasan S, and Sudhandiran G. Epigallocatechin-3-gallate augments antioxidant activities and inhibits inflammation during bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis through Nrf2-Keap1 signaling. *Pulm Pharmacol Ther* 22: 221–236, 2009.
42. Sugiura H, Ichikawa T, Liu X, Kobayashi T, Wang XQ, Kawasaki S, Togo S, Kamio K, Mao L, Ann Y, Ichinose M, and Rennard SI. N-acetyl-L-cysteine inhibits TGF-beta1-induced profibrotic responses in fibroblasts. *Pulm Pharmacol Ther* 22: 487–491, 2009.
43. Travis EL, Rachakonda G, Zhou X, Korhonen K, Sekhar KR, Biswas S, and Freeman ML. NRF2 deficiency reduces life span of mice administered thoracic irradiation. *Free Radic Biol Med* 51: 1175–1183, 2011.
44. Yamaji-Kegan K, Su Q, Angelini DJ, Champion HC, and Johns RA. Hypoxia-induced mitogenic factor has proangiogenic and proinflammatory effects in the lung via VEGF and VEGF receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L1159–L1168, 2006.
45. Zhu H, Jia Z, Strobl JS, Ehrich M, Misra HP, and Li Y. Potent induction of total cellular and mitochondrial antioxidants and phase 2 enzymes by cruciferous sulforaphane in rat aortic smooth muscle cells: cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Cardiovasc Toxicol* 8: 115–125, 2008.

Address correspondence to:
Prof. Marcel Bonay
Service de Physiologie-Explorations Fonctionnelles
Hôpital Ambroise Paré
Boulogne cedex 92104
France

E-mail: marcel.bonay@apr.aphp.fr

Date of first submission to ARS Central, August 19, 2011; date of final revised submission, June 08, 2012; date of acceptance, June 15, 2012.

Abbreviations Used

4-HNE = 4-hydroxynonenal
α-SMA = alpha-smooth muscle actin
DAPI = 4′,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DMEM = Dulbecco's modified Eagle's medium
EPII = phase II enzymes
EPHX = epoxyde hydrolase
FCS = foetal calf serum
GAPDH = glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GSH = glutathione
GSSG = oxidized glutathione
HO-1 = heme oxygenase-1
IPF = idiopathic pulmonary fibrosis
Keap1 = Kelch-like erythroid cell-derived protein CNC homology-associated protein 1
NQO-1 = NADPH quinone oxidoreductase 1
Nrf2 = nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PBS = phosphate-buffered saline
PDGF-BB = platelet-derived growth factor BB
PFA = paraformaldehyde
SFN = sulforaphane
TGF-β = transforming growth factor β
UIP = usual interstitial pneumonia

ARTICLE 5

frontiers in
PHARMACOLOGY

METHODS ARTICLE
published: 26 September 2013
doi: 10.3389/fphar.2013.00124

A method for biomarker measurements in peripheral blood mononuclear cells isolated from anxious and depressed mice: β-arrestin 1 protein levels in depression and treatment

Indira Mendez-David[1], Zeina El-Ali[2], René Hen[3,4], Bruno Falissard[5], Emmanuelle Corruble[5], Alain M. Gardier[1], Saadia Kerdine-Römer[2†] and Denis J. David[1*†]

[1] *EA3544, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France*
[2] *INSERM UMR 996, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France*
[3] *Department of Neuroscience, Columbia University, New York, NY, USA*
[4] *Department of Psychiatry, Columbia University, New York, NY, USA*
[5] *INSERM U669, Département de Psychiatrie, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Université Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France*

Edited by:
Thibault Renoir, Florey Institute of Neuroscience and Mental Health, Australia

Reviewed by:
Ciaran J. Faherty, Cadence Pharmaceuticals, USA
El Chérif Ibrahim, Aix-Marseille UNiversité - Centre National de la Recherche Scientifique, France

****Correspondence:***
Denis J. David, EA3544, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 5, rue J-B Clement, Tour D1, 2e etage, F-92296 Châtenay-Malabry Cedex, France
e-mail: denis.david@u-psud.fr

† Saadia Kerdine-Römer and Denis J. David are joint last authors.

A limited number of biomarkers in the central and peripheral systems which are known may be useful for diagnosing major depressive disorders and predicting the effectiveness of antidepressant (AD) treatments. Since 60% of depressed patients do not respond adequately to medication or are resistant to ADs, it is imperative to delineate more accurate biomarkers. Recent clinical studies suggest that β-arrestin 1 levels in human mononuclear leukocytes may be an efficient biomarker. If potential biomarkers such as β-arrestin 1 could be assessed from a source such as peripheral blood cells, then they could be easily monitored and used to predict therapeutic responses. However, no previous studies have measured β-arrestin 1 levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in anxious/depressive rodents. This study aimed to develop a method to detect β-arrestin protein levels through immunoblot analyses of mouse PBMCs isolated from whole blood. In order to validate the approach, β-arrestin levels were then compared in naïve, anxious/depressed mice, and anxious/depressed mice treated with a selective serotonin reuptake inhibitor (fluoxetine, 18 mg/kg/day in the drinking water). The results demonstrated that mouse whole blood collected by submandibular bleeding permitted isolation of enough PBMCs to assess circulating proteins such as β-arrestin 1. β-Arrestin 1 levels were successfully measured in healthy human subject and naïve mouse PBMCs. Interestingly, PBMCs from anxious/depressed mice showed significantly reduced β-arrestin 1 levels. These decreased β-arrestin 1 expression levels were restored to normal levels with chronic fluoxetine treatment. The results suggest that isolation of PBMCs from mice by submandibular bleeding is a useful technique to screen putative biomarkers of the pathophysiology of mood disorders and the response to ADs. In addition, these results confirm that β-arrestin 1 is a potential biomarker for depression.

Keywords: peripheral blood mononuclear cells, β-arrestin 1, anxiety, depression, mouse models, fluoxetine, biomarkers

INTRODUCTION

Elucidation of the neurobiological bases of depression and anxiety are significant challenges for today's society. Mood disorders impact 7% of the world's population and rank among the top 10 causes of disability (Kessler et al., 2005). Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs) are the most commonly prescribed antidepressant (AD) drugs for major depressive disorders (MDD; Samuels et al., 2011). However, key questions about the molecular and cellular mechanisms underlying the effects of ADs remain unanswered. Approximately 60% of depression patients do not respond adequately or are resistant to these drugs (Samuels et al., 2011). Therefore, there are clear benefits of having valid, reliable, selective, and feasible biomarkers for MDD. Several studies have reported genome-wide expression changes associated with AD responses in MDD (Iga et al., 2007a,b; Belzeaux et al., 2010; Lakhan et al., 2010; Mamdani et al., 2011). However, candidate biomarkers that can accurately predict AD responses must be identified. While there are currently no specific markers that are considered "gold standards," a few candidates have emerged. Peripheral/serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), and cytokines may serve as biomarkers of MDD and treatment response (for review, see Schmidt et al., 2011).

Recently, a substantial body of evidence indicates that β-arrestins (β-arrestin 1 and 2), proteins that regulate G protein receptor coupling, play major roles in the pathophysiology of mood disorders and in the mechanisms underlying AD actions (Avissar et al., 2004; Schreiber and Avissar, 2004; Matuzany-Ruban et al., 2005; Beaulieu et al., 2008; David et al., 2009; Schreiber

et al., 2009; Golan et al., 2010). The β-arrestin-signaling cascade has recently gained attention as a potential pre-clinical/clinical bridging biomarker for depressive states and treatment effects. In naïve rats, SSRI, SNRI, and non-selective reuptake inhibitor ADs significantly elevate β-arrestin 1 levels in the cortex and the hippocampus (Avissar et al., 2004; Beaulieu and Caron, 2008; Beaulieu et al., 2008; David et al., 2009). Similarly, β-arrestin 1 expression is decreased in the hypothalamus and hippocampus in anxious/depressed mice exposed to glucocorticoid elevation, and is restored by chronic fluoxetine treatment (David et al., 2009). Moreover, β-arrestin 1 and 2 signaling is involved in mediating the response to fluoxetine and lithium (Beaulieu et al., 2008; David et al., 2009).

Clinical data from Avissar et al. (2004) suggest that β-arrestin 1 mRNA and protein levels are highest in peripheral blood leukocytes of MDD patients. Therefore, β-arrestin 1 may be a putative candidate biochemical marker in clinical practice for depressive pathophysiology and the response to ADs (for review, see Schreiber et al., 2009). β-Arrestin mRNA levels and β-arrestin 1 protein levels in mononuclear leukocytes of untreated patients with MDD are lower than the levels found in healthy subjects. Furthermore, reduced levels of β-arrestin 1 protein and mRNA are significantly correlated with the severity of depressive symptoms (Avissar et al., 2004; Schreiber et al., 2009). However, the low β-arrestin 1 protein and mRNA levels are alleviated by AD treatment. Therefore, these low levels can predict clinical improvement (Avissar et al., 2004; Golan et al., 2010).

These clinical data suggest that assessment of β-arrestin 1 levels may prove useful for diagnosing depression with high sensitivity and specificity (Golan et al., 2013). This hypothesis must first be validated in animal models of anxiety–depression. Most of the current understandings of mood disorders and AD activities are based on studies performed on animal models of anxiety–depression (Belzung and Lemoine, 2011). No animal studies have investigated whether β-arrestin 1 protein levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) area marker of the pathophysiology of depression and the AD response. However, if PBMCs can be successfully used to define biomarkers, they provide a system of circulating cells that can be easily collected from patients and monitored to predict therapeutic responses.

In this study, we developed a method to measure and assess circulating proteins (such as β-arrestin 1 in PBMCs) that are collected through submandibular bleeding from unanesthetized animals. Furthermore, we examined whether changes in β-arrestin 1 levels in mouse PBMCs were observed in a model of anxiety/depression (David et al., 2009; Guilloux et al., 2011; Rainer et al., 2012b), and whether these levels could be corrected by chronic treatment with the SSRI fluoxetine.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

SUBJECTS

Adult male C57BL/6Ntac mice were purchased from Taconic Farms (Lille Skensved, Denmark). All mice were 7–8 weeks old, weighed 23–25 g at the beginning of the treatment and were maintained on a 12L:12D schedule (lights on at 0600 hours). The mice were group-housed with each cage containing five animals. Food and water were provided *ad libitum*. All testing were conducted in compliance with the laboratory animal care guidelines and with protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (Council directive # 87-848, October 19, 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale, permissions # 92-256B to Denis J. David).

DRUGS

Corticosterone (4-pregnen-11b-DIOL-3 20-DIONE 21-hemisuccinate from Sigma (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) was dissolved in 0.45% hydroxypropyl-β-cyclodextrin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Fluoxetine hydrochloride (18 mg/kg/day in the drinking water) was purchased from Anawa Trading (Zurich, Switzerland).

ISOLATION OF HUMAN AND MOUSE PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

Collection of human blood and isolation of peripheral blood mononuclear cells

Peripheral blood mononuclear cells were purified from 7.5 ml of human whole circulating blood obtained from Etablissement Français du Sang (Ivry-Sur-Seine, France) through density centrifugation (850 *g* at 20°C for 20 min) using a Ficoll gradient (PAA Laboratories GmbH, Pashing, Austria; **Figure 1A**). This centrifugation separated lymphocytes, monocytes, and plasma. The PBMC layers were carefully removed from the tube and transferred to a new 50 ml conical tube. The PBMCs were then washed twice (1 min each) with 1× phosphate-buffered saline (PBS)/fetal calf serum (FCS, 2%). After centrifugations (150 *g* at 20°C for 7 min), the cells were resuspended in the appropriate volume of 1× PBS. The human PBMCs were then recovered with a final centrifugation (1,000 *g* at 4°C for 5 min) and were stored at −80°C.

Collection of mouse blood and isolation of peripheral blood mononuclear cells

Blood was collected from unanesthetized mice as previously described (Golde et al., 2005; Joslin, 2009). In compliance with the laboratory animal care guidelines, approximately 0.4 ml of blood per mouse was collected in K_3EDTA tubes with a submandibular bleeding procedure. Five millimeters point size sterile lancets (MediPoint, Mineola, NY, USA; **Figure 1B**) were used to puncture the location where the orbital vein and the submandibular vein join to form the jugular vein (Joslin, 2009). A light pressure with dry gauze was applied to the punctured area for hemostasis. Separation and extraction of PBMCs were performed using an iodixanol mixer technique (Ford and Rickwood, 1990). Mouse PBMCs were purified from whole blood by density centrifugation (300 *g* at 20°C for 30 min) using solution B (see **Table 1** for preparation) of the OptiPrep™ gradient solution (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Specifically, the OptiPrep™ gradient solution was used to separate blood into PBMC and plasma layers with centrifugation. The PBMC layers were then carefully removed from the tube and transferred to a new 50 ml conical tube. The PBMCs were then washed twice with solution B (1 min each). After another centrifugation (150 *g* at 20°C for 7 min) and two washing steps (1 min each), mouse

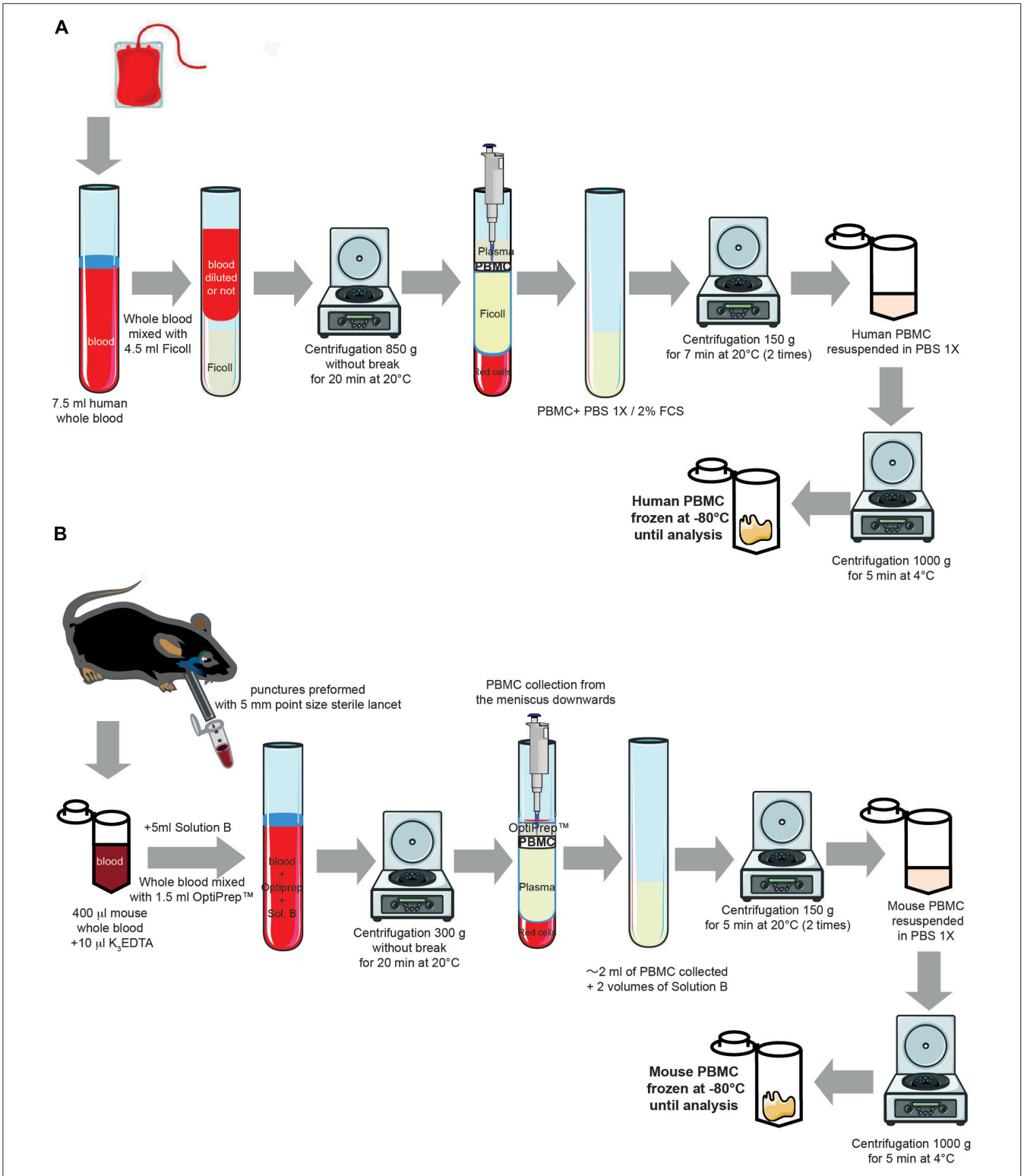


FIGURE 1 | Experimental protocol for isolating human and mouse peripheral blood mononuclear cells from whole blood. **(A)** Cartoon representing the different steps for isolating human PBMC from whole circulating blood (for full details of the method, see *Blood collection and Peripheral blood mononuclear cells Isolation in human* from the Section "Experimental Procedures"). Some elements of this figure were produced using Servier Medical Art image bank (www.servier.com). **(B)** Cartoon representing the different steps for isolating mouse PBMC from whole circulating blood (for full details of the method, see *Blood collection and Peripheral blood mononuclear cells Isolation in mouse* from the Section "Experimental Procedures"). Some elements of this figure were produced using Servier Medical Art image bank (www.servier.com).

Table 1 | Solution used to prepare peripheral blood mononuclear cells from mouse whole blood.

	OptiPrep™ density gradient medium	Tricine-buffered saline (TBS)	Solution B
Solutions	D1556-250ML (Sigma-Aldrich, France)	0.85% NaCl, 10 mM; Tricine-NaOH, pH 7.4 (*Tricine as 100 mM stock solution at 4° C; 1.79 g/100 ml water*)	Dissolve 0.85 g NaCl in 50 ml water; add 10 ml of Tricine stock; adjust to pH 7.4 with 1 M NaOH and make up to 100 ml

PBMCs were recovered with a final centrifugation (1,000 *g* at 4°C for 5 min) and were stored at −80°C.

β-ARRESTIN 1 LEVELS IN HUMAN AND MOUSE PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

Protein extraction from peripheral blood mononuclear cells and immunoblots

Peripheral blood mononuclear cells were thawed and homogenized with cell lysis buffer containing [20 mM Tris pH 7.4, 137 mM NaCl, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) pH 7.4, 1% Triton X-100, 25 mM β-glycerophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml leupeptin, and 10 μg/ml pepstatin and 100 mM orthovanadate], were incubated on ice for 20 min, were then subjected to centrifugation at 21,130 *g* at 4°C for 20 min. Protein concentrations were quantified using a BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology).

β-Arrestin 1 level measurements with immunoblot analyses

Equal amounts of proteins were separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Amersham Biosciences, Les Ulis, France). The membranes were then incubated overnight with a primary mouse monoclonal anti-β-arrestin 1 antibody (#610551, BD Biosciences Pharmingen, France; 1:100). In order to ensure that equal amounts of total protein (30 μg) were loaded in each lane, β-actin protein levels were also assessed [β-actin (C4) horseradish peroxidase (HRP), Santa Cruz Biotechnology, Germany, 1:10,000]. Immune complexes were detected using appropriate peroxide-conjugated secondary antibodies and a chemiluminescent reagent kit (Pierce Biotechnology). Immunoblot quantifications were performed by densitometric scanning with Image Lab Software (Bio-Rad). Signals were in the linear range. The densitometry values were normalized against the β-actin values (**Figures 2** and **3**).

CORTICOSTERONE MODEL AND TREATMENT

The dose and duration of corticosterone treatment (CORT model) were selected based on previous studies (David et al., 2009; Guilloux et al., 2011; Hache et al., 2012; Rainer et al., 2012a,b). Exposure to chronic corticosterone results in a phenotype that is similar to a chronic stress phenotype, including a deterioration of the coat state and anxiety/depression-related behaviors. At the end, a higher emotionality score is observed (Guilloux et al., 2011). Corticosterone (35 μg/ml/day, equivalent to about 5 mg/kg/day) or vehicle (0.45% β-cyclodextrin, β-CD) were available to mice *ad libitum* in the drinking water in opaque bottles. Corticosterone-treated water was changed every 3 days to prevent degradation. Group-housed mice were also treated with the SSRI fluoxetine (18 mg/kg/day) for the last 4 weeks of the experiment (see the experimental protocol on **Figure 3A**).

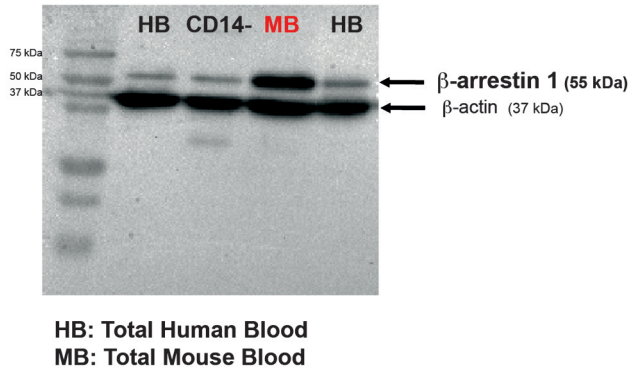


FIGURE 2 | β-Arrestin 1 is measurable in both human and mouse peripheral blood mononuclear cells obtained from a low collection volume of fresh blood. Representative western blot of β-arrestin 1 levels in PBMCs isolated either from CD14− human cells, human or naïve mouse whole blood. In each blot, 30 μg of total protein were run. β-Actin was used as a control.

STATISTICAL ANALYSIS

β-Arrestin 1 levels were quantified and then expressed with a scatterplot or as mean ± SEM normalized to vehicle levels. Data were analyzed using Prism 6.0 software (GraphPad, La Jolla, USA). One-way ANOVAs were used to evaluate data when appropriate. Significant main effects were further analyzed by Fisher's *post hoc* test. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

β-ARRESTIN 1 IS DETECTED IN HUMAN AND MOUSE PBMC

We first collected blood in order to assess whether β-arrestin 1 could be detected. Single-use lancets were used for submandibular bleeding and permitted drawing of ∼0.4 ml of blood without the use of anesthesia (Golde et al., 2005). The mouse PBMCs were lysed and subjected to immunoblotting. A ∼55 kDa band that corresponded to the molecular weight of β-arrestin 1 protein was detected with a monoclonal antibody against mouse anti-β-arrestin 1 that is known to detect human β-arrestin 1 (Avissar et al., 2004; Matuzany-Ruban et al., 2005; Golan et al., 2013; **Figure 2**). Therefore, this method of PBMC isolation from fresh mouse

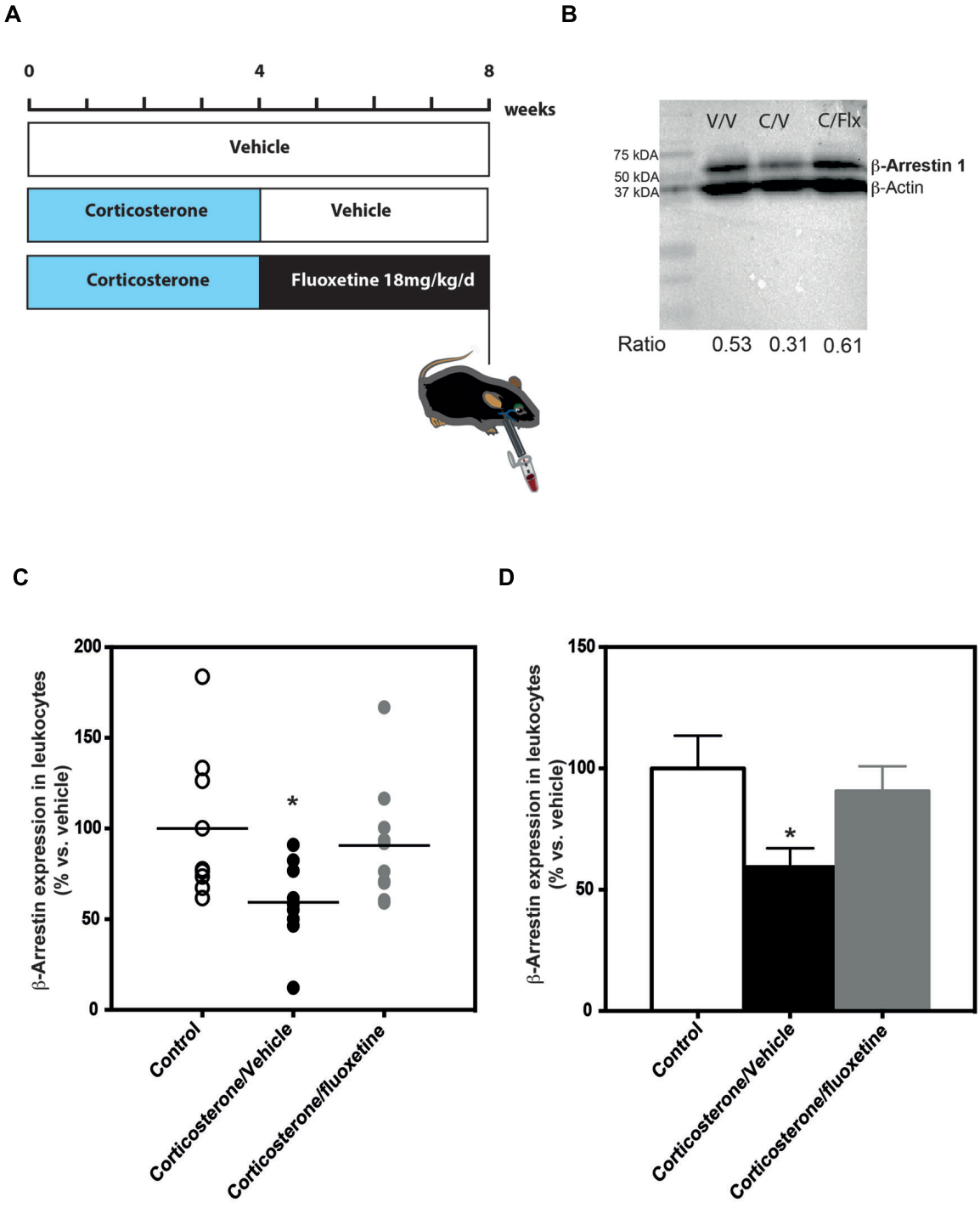


FIGURE 3 | Chronic fluoxetine treatment (18 mg/kg/day for 28 days) restored β-arrestin 1 levels in the peripheral blood mononuclear cells from anxio/depressive mice treated with chronic corticosterone treatment. **(A)** Experimental timeline used to measure β-arrestin 1 levels in peripheral blood mononuclear cells from naïve or anxio-depressive mouse submandibular bleeding chronically treated or not with fluoxetine during 28 days (18 mg/kg/day in the drinking water). **(B)** Representative western blot of β-arrestin 1 levels in peripheral blood mononuclear cells isolated from naïve (vehicle/vehicle, V/V), corticosterone (35 μg/ml/day; corticosterone/vehicle, C/V) or corticosterone/fluoxetine (18 mg/kg/day; corticosterone/fluoxetine, C/F) mouse whole blood. In each blot, 30 μg of protein from mouse PBMC were run. The densitometry values for each band allowed the calculation of a ratio: optical density for β-arrestin 1/optical density β-actin value. **(C,D)** Scatterplot of the individual effects **(C)** or bar charts of mean ± SEM of the effects **(D)** of a chronic administration (28 days) treatment with fluoxetine on β-arrestin 1 levels in the peripheral blood mononuclear cells from mice treated with chronic corticosterone in comparison to untreated animals. Data are expressed in percentage normalized to vehicle/vehicle expression; $n = 9$–10). $^*p < 0.05$, *versus* control vehicle/vehicle group.

blood successfully permitted measurements of β-arrestin 1 levels. This method can potentially be used to investigate levels of other proteins as well. Lysates of human total PBMCs and CD14 negative PBMC fraction cells ($CD14^-$) were used as positive controls. In addition, we were also able to detect β-arrestin 1 in human PBMCs isolated from low fresh circulating blood volume (7.5 ml) of healthy adult donors obtained from Etablissement Français du Sang (**Figure 2**). To our knowledge, this is the first study to detect β-arrestin 1 in this fashion.

Next, we decided to quantify β-arrestin 1 levels in PBMCs isolated from C57BL/6Ntac mice exposed to chronic corticosterone (David et al., 2009; Rainer et al., 2012b) that was given either alone or in combination with the SSRI fluoxetine (18 mg/kg/day; **Figure 3A**).

CHRONIC FLUOXETINE TREATMENT NORMALIZES β-ARRESTIN 1 EXPRESSION IN PBMC ISOLATED FROM ANXIOUS/DEPRESSIVE-LIKE MICE

In mouse PBMCs isolated from blood of mice treated chronically with corticosterone (35 μg/ml/day), we found that β-arrestin 1 levels were significantly lower (−41%; 59% of expression compared to 100% in the control group) than the levels in naïve animals [one-way ANOVA, $F(2,25) = 3.81$; $^*p < 0.05$; **Figures 3C,D**]. Interestingly, a 4-week treatment with the SSRI fluoxetine normalized these β-arrestin 1 expression levels so that they were not significantly different than the levels observed in naïve animals (**Figures 3C,D**).

DISCUSSION

We developed a new method to assess circulating proteins such as β-arrestin 1 through immunoblot analyses of mouse PBMCs isolated from whole blood. We showed significantly reduced β-arrestin 1 levels in PBMCs from anxious/depressed mice. These decreased β-arrestin 1 expression levels were restored to normal levels with chronic fluoxetine treatment.

PBMCs WERE ISOLATED FROM UNANESTHETIZED MICE

A recent review from Duman's group highlighted the need to develop a biomarker panel for depression. This biomarker panel should profile diverse peripheral factors that together will provide a biological signature of MDD subtypes and predict treatment response (Schmidt et al., 2011). Assessing peripheral protein levels in PBMCs is an attractive method because PBMCs are circulating cells that can be easily collected and monitored. Previous studies demonstrated that PBMCs can be isolated from mouse blood to assess immunological responses (Fuss et al., 2009). However, to our knowledge this is the first study to collect PBMCs from circulating blood of unanesthetized animals. Single-use lancets were used for submandibular bleeding. This method permitted PBMCs to be collected from peripheral blood circulation in living and unanesthetized mice. Thus, submandibular bleeding is a useful method to screen putative biomarkers of the pathophysiology of mood disorders and the response to ADs. This technique can be easily performed multiple times in the same animals and can be used with other rodent species such as rats.

β-ARRESTIN 1 PROTEIN LEVELS CAN BE MEASURED IN MOUSE AND HUMAN PBMCs

We measured β-arrestin 1 protein levels to determine whether mouse PBMCs are useful biological materials to screen biomarkers for MDD pathophysiology and the AD response. Over the last decade, several G protein receptor-related genes such as β-arrestins were found to be involved in the pathophysiology of mood disorders (Schreiber and Avissar, 2004; Beaulieu et al., 2008; David et al., 2009). Numerous data from clinical studies support the importance of measuring β-arrestin 1 levels as a peripheral biomarker of the pathophysiology of mood disorders and predicting the AD response (Avissar et al., 2004; Schreiber et al., 2009; Golan et al., 2013). However, no previous study demonstrated *ex vivo* measurements of β-arrestin 1 levels in leukocytes isolated from whole blood to compare levels between naïve and anxious/depressed rodents. In addition, this is the first study to assess β-arrestin 1 by immunoblot in human and in mouse leukocytes simultaneously by using the same monoclonal antibody.

In the human experiments, we were able to recover PBMCs from 7.5 ml of whole circulating blood from healthy volunteers. Previous studies showed that larger amounts of blood were needed for the detection of β-arrestin 1 in human leucocytes (Avissar et al., 2004; Matuzany-Ruban et al., 2005; Golan et al., 2013). Here, 7.5 ml was sufficient to acquire 30 μg of PBMC lysate for immunoblotting (**Figure 2**).

Avissar et al. (2004) demonstrated that β-arrestin 1 levels were elevated by chronic ADs in rat cortex and hippocampus. However, by contrast with their human study, they did not provide data showing that β-arrestin 1 levels in rat PBMCs are affected by chronic AD treatment (Avissar et al., 2004). Therefore, we also compared β-arrestin 1 levels in PBMCs of anxious/depressed mice before and after chronic AD treatment (**Figure 3**).

β-ARRESTIN 1 IS A PREDICTIVE MARKER OF THE PATHOPHYSIOLOGY OF DEPRESSION AND THE ANTIDEPRESSANT RESPONSE

To induce an anxious/depression-related phenotype, we utilized a chronic corticosterone treatment that results in hallmark characteristics of anxiety and depression (for review, see David et al., 2009; Mendez-David et al., 2013). In order to delineate a panel of biomarkers of the pathophysiology and the treatment of depression, it is first essential to screen putative candidates in a model of anxiety/depression. β-Arrestin 1 protein levels in leukocytes were reduced when mice were exposed to chronic corticosterone. As found in previous human studies (Matuzany-Ruban et al., 2005; Golan et al., 2013), these reduced β-arrestin 1 levels were alleviated by AD treatment.

LIMITATIONS OF THE STUDY

Measuring protein levels in mouse PBMCs at several time points is a powerful technique that can be used to reveal potential biomarkers for the pathophysiology of depression and the AD response. However, this study has some limitations that must be considered when interpreting the current findings. For example, it is important to distinguish diagnostic biomarkers from treatment biomarkers (Schmidt et al., 2011). This study does not address this difference. Further studies are required to assess whether β-arrestin 1 is a reasonable biomarker for diagnostic and/or drug

treatments. A study that compares peripheral levels of β-arrestin 1 in stressed animals before and after AD treatment could definitively address this question. It also may be interesting to study whether there is a correlation between β-arrestin 1 levels and the severity of the anxio/depressive state (Guilloux et al., 2011). Moreover, disease conditions are most often signified by the dysregulation of complex biological pathways involving multiple key factors (Dudley and Butte, 2009). Thus, it is unlikely that β-arrestin 1 alone will be a sufficient diagnostic and treatment biomarker. However, mouse PBMCs might provide useful material to screen a panel of biomarkers and to provide biological signatures of MDD and AD treatments. Finally, in our study, β-arrestin 1 levels were measured using western blots, which is a semi-quantitative method of evaluating protein levels. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to assess β-arrestin 1 levels would provide a more quantitative method.

CONCLUSION

In this study, we demonstrated that PBMCs isolated from a small volume of whole blood in unanesthetized mice using a submandibular bleeding method may provide a useful biological tool to assess circulating proteins. This method will permit future studies to screen potential biomarkers for the pathophysiology of depression and AD responses. We also confirmed that measurements of β-arrestin 1 levels in PBMCs may serve as a biochemical marker of depression in humans (Avissar et al., 2004). Overall, we developed a powerful tool for translational studies that can easily be used to assess proteins measurements and to provide a biological signature of treatment response. Identification of a biological signature could predict the effectiveness of ADs (Fuss et al., 2009).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Valérie Domergue-Dupont and her staff in the animal care facility of the Institut Paris-Sud d'Innovation Therapeutique. We also thank Sylvain David (sylvain.david09@gmail.com) for designing the mouse submandibular bleeding method (**Figures 1B** and **3A**). This work was supported by grants from Agence Nationale pour la Recherche SAMENTA (ANR-12-SAMA-0007, to Alain M. Gardier) and by a NARSAD young investigator award (to Denis J. David). Finally, we are grateful to Dr. Benjamin A. Samuels (Columbia University, USA) for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Indira Mendez-David, Alain M. Gardier, René Hen, Saadia Kerdine-Römer, and Denis J. David designed research; Indira Mendez-David and Zeina El-Ali performed research and draw **Figure 2**; Indira Mendez-David analyzed data; Indira Mendez-David, Saadia Kerdine-Römer, and Denis J. David wrote the manuscript. Indira Mendez-David, Zeina El-Ali, René Hen, Emmanuelle Corruble, Bruno Falissard, Alain M. Gardier, Saadia Kerdine-Römer, and Denis J. David contributed to the preparation of the manuscript.

REFERENCES

Avissar, S., Matuzany-Ruban, A., Tzukert, K., and Schreiber, G. (2004). Beta-arrestin-1 levels: reduced in leukocytes of patients with depression and elevated by antidepressants in rat brain. *Am. J. Psychiatry* 161, 2066–2072. doi: 10.1176/appi.ajp.161.11.2066

Beaulieu, J. M., and Caron, M. G. (2008). Looking at lithium: molecular moods and complex behaviour. *Mol. Interv.* 8, 230–241. doi: 10.1124/mi.8.5.8

Beaulieu, J. M., Marion, S., Rodriguiz, R. M., Medvedev, I. O., Sotnikova, T. D., Ghisi, V., et al. (2008). A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior. *Cell* 132, 125–136. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.041

Belzeaux, R., Formisano-Treziny, C., Loundou, A., Boyer, L., Gabert, J., Samuelian, J. C., et al. (2010). Clinical variations modulate patterns of gene expression and define blood biomarkers in major depression. *J. Psychiatr. Res.* 44, 1205–1213. doi: 10.1016/j.jpsychires.2010.04.011

Belzung, C., and Lemoine, M. (2011). Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol. Mood Anxiety Disord.* 1, 9. doi: 10.1186/2045-5380-1-9

David, D. J., Samuels, B. A., Rainer, Q., Wang, J. W., Marsteller, D., Mendez, I., et al. (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62, 479–493. doi: 10.1016/j.neuron.2009.04.017

Dudley, J. T., and Butte, A. J. (2009). Identification of discriminating biomarkers for human disease using integrative network biology. *Pac. Symp. Biocomput.* 2009, 27–38.

Ford, T. C., and Rickwood, D. (1990). A new one-step method for the isolation of human mononuclear cells. *J. Immunol. Methods* 134, 237–241. doi: 10.1016/0022-1759(90)90385-9

Fuss, I. J., Kanof, M. E., Smith, P. D., and Zola, H. (2009). Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 7, Unit 7.1. doi: 10.1002/0471142735.im0701s19

Golan, M., Schreiber, G., and Avissar, S. (2010). Antidepressants increase beta-arrestin 2 ubiquitinylation and degradation by the proteasomal pathway in C6 rat glioma cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332, 970–976. doi: 10.1124/jpet.109.160218

Golan, M., Schreiber, G., and Avissar, S. (2013). Antidepressant-induced differential ubiquitination of beta-arrestins 1 and 2 in mononuclear leucocytes of patients with depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 1745–1754. doi: 10.1017/S1461145713000291

Golde, W. T., Gollobin, P., and Rodriguez, L. L. (2005). A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim. (NY)* 34, 39–43. doi: 10.1038/laban1005-39

Guilloux, J. P., Seney, M., Edgar, N., and Sibille, E. (2011). Integrated behavioral *z*-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex. *J. Neurosci. Methods* 197, 21–31. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.01.019

Hache, G., Guiard, B. P., Le Dantec, Y., Orvoen, S., David, D. J., Gardier, A. M., et al. (2012). Antinociceptive effects of fluoxetine in a mouse model of anxiety/depression. *Neuroreport* 23, 525–529. doi: 10.1097/WNR.0b013e328353d70a

Iga, J., Ueno, S., Yamauchi, K., Numata, S., Kinouchi, S., Tayoshi-Shibuya, S., et al. (2007a). Altered HDAC5 and CREB mRNA expressions in the peripheral leukocytes of major depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31, 628–632. doi: 10.1016/j.pnpbp.2006.12.014

Iga, J., Ueno, S., Yamauchi, K., Numata, S., Tayoshi-Shibuya, S., Kinouchi, S., et al. (2007b). Gene expression and association analysis of vascular endothelial growth factor in major depressive disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31, 658–663. doi: 10.1016/j.pnpbp.2006.12.011

Joslin, J. O. (2009). Blood collection techniques in exotic small mammals. *J. Exotic Pet Med.* 18, 117–139. doi: 10.1053/j.jepm.2009.04.002

Kessler, R. C., Chiu, W. T., Demler, O., Merikangas, K. R., and Walters, E. E. (2005). Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch. Gen. Psychiatry* 62, 617–627. doi: 10.1001/archpsyc.62.6.617

Lakhan, S. E., Vieira, K., and Hamlat, E. (2010). Biomarkers in psychiatry: drawbacks and potential for misuse. *Int. Arch Med.* 3, 1. doi: 10.1186/1755-7682-3-1

Mamdani, F., Berlim, M. T., Beaulieu, M. M., Labbe, A., Merette, C., and Turecki, G. (2011). Gene expression biomarkers of response to citalopram treatment in major depressive disorder. *Transl. Psychiatry* 1, e13. doi: 10.1038/tp.2011.12

Matuzany-Ruban, A., Avissar, S., and Schreiber, G. (2005). Dynamics of beta-arrestin1 protein and mRNA levels elevation by antidepressants in mononuclear leukocytes of patients with depression. *J. Affect. Disord.* 88, 307–312. doi: 10.1016/j.jad.2005.08.007

Mendez-David, I., Hen, R., Gardier, A. M., and David, D. J. (2013). Adult hippocampal neurogenesis: an actor in the antidepressant-like action. *Ann. Pharm. Fr.* 71, 143–149. doi: 10.1016/j.pharma.2013.02.006

Rainer, Q., Nguyen, H. T., Quesseveur, G., Gardier, A. M., David, D. J., and Guiard, B. P. (2012a). Functional status of somatodendritic serotonin 1A autoreceptor after long-term treatment with fluoxetine in a mouse model of anxiety/depression based on repeated corticosterone administration. *Mol. Pharmacol.* 81, 106–112. doi: 10.1124/mol.111.075796

Rainer, Q., Xia, L., Guilloux, J. P., Gabriel, C., Mocaer, E., Hen, R., et al. (2012b). Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 15, 321–335.

Samuels, B. A., Leonardo, E. D., Gadient, R., Williams, A., Zhou, J., David, D. J., et al. (2011). Modeling treatment-resistant depression. *Neuropharmacology* 61, 408–413. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.02.017

Schmidt, H. D., Shelton, R. C., and Duman, R. S. (2011). Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and pathophysiology. *Neuropsychopharmacology* 36, 2375–2394. doi: 10.1038/npp.2011.151

Schreiber, G., and Avissar, S. (2004). Editorial: complexity and future of biochemical differential diagnosis in psychiatry. *Isr. J. Psychiatry Relat. Sci.* 41, 79–81.

Schreiber, G., Golan, M., and Avissar, S. (2009). Beta-arrestin signaling complex as a target for antidepressants and as a depression marker. *Drug News Perspect.* 22, 467–480.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 26 July 2013; accepted: 09 September 2013; published online: 26 September 2013.

Citation: Mendez-David I, El-Ali Z, Hen R, Falissard B, Corruble E, Gardier AM, Kerdine-Römer S and David DJ (2013) A method for biomarker measurements in peripheral blood mononuclear cells isolated from anxious and depressed mice: β-arrestin 1 protein levels in depression and treatment. Front. Pharmacol. ***4****:124. doi: 10.3389/fphar.2013.00124*

This article was submitted to Neuropharmacology, a section of the journal Frontiers in Pharmacology.

Copyright © 2013 Mendez-David, El-Ali, Hen, Falissard, Corruble, Gardier, Kerdine-Römer and David. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ARTICLE 6

Papier en préparation

Proteomic analyses of Dendritic Cell activation by Contact Allergens reveal possible biomarkers regulated by Nrf2

Franz Mussotter[1], Andrea Haase[1], Janina Tomm[2], Zeina El Ali[3], Saadia Kerdine-Römer[3], Marc Pallardy[3], Martin von Bergen[2], Andreas Luch[1]

[1]Federal Institute for Risk Assessment, Department Product Safety, Max- Dohrn-Strasse 8-10, Berlin, Germany

[2]University of Paris-Sud, Inserm UMR-996, Châtenay-Malabry, France

[3]Helmholtz Centre for Environmental Research (UFZ), Department of Proteomics, Leipzig, Germany

Corresponding Author: andrea.haase@bfr.bund.de

Abstract

Contact sensitizers are low molecular weight compounds, which can prompt dendritic cells in the skin to subsequently activate naïve T-cells in draining lymph nodes. Often these compounds are electrophilic and activate the Keap1/Nrf2 pathway. In this study we applied a proteomic approach using bone marrow derived dendritic cells (BMDC) of wildtype and Nrf2 knockout mice to further elucidate the underlying molecular mechanisms of skin sensitization and get insights into the role of Nrf2. We identified putative biomarkers for skin sensitizers and dendritic cell activation by allergens that can possibly be used for developing alternative testing methods *in vitro*.

We included the contact sensitizers cinnamaldehyde (CA), 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) and nickel(II) sulphate and the irritant Sodium dodecyl sulphate (SDS) was used as a control treatment. Dimethyl sulfoxide (DMSO) served as vehicle control. Analysis was performed with 2D polyacrylamid gel electrophoresis (2D-PAGE) in combination with ESI-MS/MS.

While treatment with nickel(II) sulfate and SDS had only low effects, CA and DNCB led to significant changes in protein expression. We found 18 and 30 spots upregulated with 50 and 100 µM CA, respectively. For 5 and 10 µM DNCB, 32 and 37 spots were upregulated, respectively. A subset of these proteins was not differentially expressed in Nrf2 -/- BMDCs, indicating an Nrf2-dependent regulation. Among them we identified proteins involved in oxidative stress response, signal transduction pathways, basic cellular pathways and heat shock response. Some of them were not yet described in an Nrf2 context. These potential biomarkers, will have to be studied in more detail.

Introduction

Allergic contact dermatitis (ACD) is a widespread skin disease not only under occupational settings. In case of chronification it can cause severe and long-lasting health problems. Therefore, ACD represents a major reason for occupational disability. Although it is possible to treat the eczema during ACD – mostly with topical glucocorticosteroids – the best strategy is to avoid the contact with skin sensitizers. Therefore, reliable test strategies are needed. From 2013 on the European Union prohibits any animal testing of cosmetic ingredients for contact allergy potential (7th amendment to the EU Cosmetics Directive). Until now, there is no validated alternative method to replace the actual gold standard in animal testing, the Local Lymph Node Assay (LLNA).

Contact allergens may occur in a wide range of products. Today more than 3000 allergens are known. Especially preservatives, hair dyes or fragrances are important and frequent contact allergens. ACD is caused by type IV delayed-type hypersensitivity reactions and develops in two phases: sensitization and elicitation phase. The essential prerequisite for sensitization is activation of the innate immune system. Chemical sensitizers are low molecular weight xenobiotics (< 500 Dalton). Most of them are hydrophobic and may thus penetrate the water impermeable stratum corneum barrier. Furthermore they are electrophilic and can modify proteins in the skin. Contact allergens bind cellular proteins in a process called haptenization, mostly covalently or sometimes (e.g. in the case of metals like nickel) also in a coordinative way. This process mimics the occurance of pathogen/damage associated molecular patterns (PAMPs/DAMPs) and finally leads to the activation of innate immune mechanisms involving activation of Toll-like receptors and the inflammasome in several cell types in the skin. Keratinocytes encountering sensitizers secrete pro-inflammatory cytokines like Il-1β, IL18 or TNFα. Subsequently dendritic cells (DC) in the skin become attracted by the inflammatory milieu. DC represent the key player in the sensitization process. They internalize haptenated molecules, process them and present the modified peptides as possible antigens on the cell surface via major histocompatibility complex II (MHC II). After migration to the local lymph nodes they help to select naïve T lymphocytes. Primed T cells proliferate and migrate into the skin. In case of further exposure to the contact allergen the excretion of inflammatory cytokines leads to appearance of contact eczema (elicitation). Once the immune system has set up memory T cells, any following

exposure to the corresponding allergen will to lead to immediate inflammatory response in the skin, the so called efferent phase.

The Keap1/Nrf2 signalling pathway is one of the most important cytoprotective pathways answering cellular stress and is induced by many different types of chemicals (e.g. oxidative or electrophilic stress, heavy metals) and stressors (e.g. radiation). Typically the transcription factor Nrf2 is bound to Keap1 in the cytoplasm mediating ubiquitinylation and rapid degradation of Nrf2. Upon oxidative stress thiol moieties of Keap1 may become oxidized. The subsequent conformational change of Keap1 releases Nrf2 to the nucleus, allowing for transcription of target genes, which contain antioxidant response elements (ARE) in their promotor region. Typical Nrf2 target genes are for instance antioxidants or phase II metabolizing enzymes (Nguyen et al., 2009), which enable the cells to cope with oxidative, electrophilic or other types of chemical stress.

Sensitizers often induce oxidative stress and due to their electrophilic properties mostly they induce the Keap1/Nrf2 pathway For example, Ni(II) activates cytokine secretion from monocytic cells in an Nrf2-dependent manner (Lewis et al., 2006). Application of a sensitizer subset to DCs and the monocytic cell line THP-1 induced typical Nrf2 target genes like NQO1 or HMOX1, the latter may also be induced via other transcription factors than Nrf2 (Ade et al., 2008). The Keap1/Nrf2 pathway was proposed as a marker toxicity pathway indicating cysteine-reactive sensitizers (Natsch, 2009). In two *in vitro* assays, KeratinoSens™ or LuSens™, activation of Nrf2 via an ARE-luciferase reporter gene construct is used for prediction of contact allergens (Emter et al., 2010, xxx).

Natsch and Emter have tested in total more than 200 allergens. Therefore it is well known that most sensitizers are able to induce the Keap1/ Nrf2 pathway. Still it remains unclear how the activation of Nrf2 is connected to the development of ACD. Nrf2 activation may be a cellular defence mechanism of the cells to cope with those electrophilic chemicals. As well Nrf2 activation may also play a functional role in DC activation, which is supported by recent data obtained in Nrf2 (-/-) mice.

Application of the LLNA and the Mouse Ear Swelling Test (MEST) to Nrf2 knockout mice showed an enhanced reactivity to cysteine reactive sensitizers indicating a major role of Nrf2 in sensitization (El Ali et al., 2013). In Nrf2 (-/-) ultrafine particles have an augmented adjuvant effects (Li et al. 2013) such that Nrf2 deficiency in DC promotes a constitutive immune-polarizing cytokine milieu.

Our goal was first to further analyze changes that occur during maturation of DC by contact allergens in order to identify possible biomarkers for contact allergens. Secondly by including Nrf2 knockout animals in our study we aimed to further elucidate the role of Nrf2 during ACD. Thus, we have chosen an proteomic approach using BMDC of wildtype and Nrf2 knock out mice and treated them in vitro with several contact allergens. We included 2 concentration of the contact sensitizers cinnamaldehyde (CA), 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) and nickel(II) sulphate and one concentration of the irritant Sodium dodecyl sulphate (SDS), which served as a control. The vehicle Dimethyl sulfoxide (DMSO) served as another control. Analysis was performed with 2D polyacrylamid gel electrophoresis (2D-PAGE) in combination with ESI-MS/MS.

Due to the complexity of sensitization it is reasonable to assume that not a single assay will be able to replace the LLNA but a comprehensive and integrated testing strategy is needed to reflect the complex processes leading to sensitization. In that sense our approach is suitable as it allows for a quite comprehensive search for biomarkers for activation of the immune system by contact allergens.

Materials and methods

Cell culture, treatment and sample preparation:

CD34 monocyte progenitor cells were attained from either wild type mice (stem: C57BL/6, Nrf2 +/+) or Nrf2 knockout mice (stem: C57BL/6, Nrf2 -/-) as described in **REF.** The cells were differentiated in vitro in xxx medium containing xxx GM-CSF over 10 days into bone marrow derived dendritic cells (BMDC). Purity and pre-activition was checked by FACS analysis of CD11 and CD86 expression, respectively. Differentiation into BMDC was analyzed by ? BMDCs were treated with cinnamaldehyde (CIN, 50µM, 100µM), 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB, 5µM, 10µM), nickel sulphate (Ni 250µM, 400µM) and sodium dodecyl sulphate (SDS 100µM). Controls were incubated pure culture medium and approbiate amounts DMSO (corresponding to the amounts used for the sensitizer application), respectively. Cells were incubated for 8h at 37°C, 5% CO_2.

Cells were harvested (300xg, 5min, RT) and washed with PBS twice. Cell pellets were resuspended in 2D-PAGE lysis buffer (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, pharmalytes pH3-10 2%, Destreak Reagent 1,2%, Spermin 0,7%, protease inhibitor 1%). Cell lysates were centrifuged (40.000rpm, 1h) and supernatants applied to isoelectric focusing.

2D-PAGE:

Isoelectric focusing was performed on 3-10NL IPG strips (24cm) with Ettan IPGPhor3 Isoelectric Focusing System (GE Healthcare Lifesciences, Little Chalfont).

Second dimension polyacrylamide gels were casted manually (12,5% T, 2,6% C). Electrophoresis was performed with Ettan DALTtwelve System second-dimension gel electrophoresis system (GE Healthcare Lifesciences, Little Chalfont).

Staining and image acquisition:

Gels were stained with Ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) and scanned with Typhoon FLA 9500 imager (GE Healthcare Lifesciences, Little Chalfont) using an LPG Channel 1 filter (excitation: 473nm, detection: 610nm). Gel images were analyzed with imaging software Delta2D (Decodon GmbH, Greifswald). For each treatment 3 replicate gels were run (biological replicates). Differentially expressed proteins (>1.5x regulated for up regulated and <0.5 for down regulation, $p < 0.05$) were selected for mass spectrometry identification.

Mass spectrometry and data analysis:

Proteins were in gel digested with trypsin (Promega, Fitchburg WI). Mass spectra were obtained by ESI-MS/MS using an Orbitrap system (Thermo Scientific, Waltham MA). Database analysis was performed using Mascot Daemon and Swissprot database (significant Mascot score and a minimum of 2 unique peptides). *Describe parameters used for searching*

Results

Treatment with a moderate Sensitizer: Cinnamaldehyde (CA)

To understand molecular proteomic changes occurring after treatment with a moderate sensitizer, BMBC's were treated with a either 50 or 100 μM CA for 8h. Proteomic changes were evaluated via 2D gel analysis in triplicates. Protein spots were considered to be differentially regulated if they changed statistically significant ($p < 0.05$) at least 1.5 fold (up regulation) or 0.5 fold (down regulation) compared to vehicle, i.e. DMSO, treated cells.

We found 18 spots up regulated for treatment with 50 μM, 30 spots for treatment with 100 μM CA (Figure 1, Supplemental Figure 1). From those 12 spots changed for both concentrations (Figure 2). Some spots were unique for each treatment with 50 μM (3 spots) and with 100 μM (12 spots).

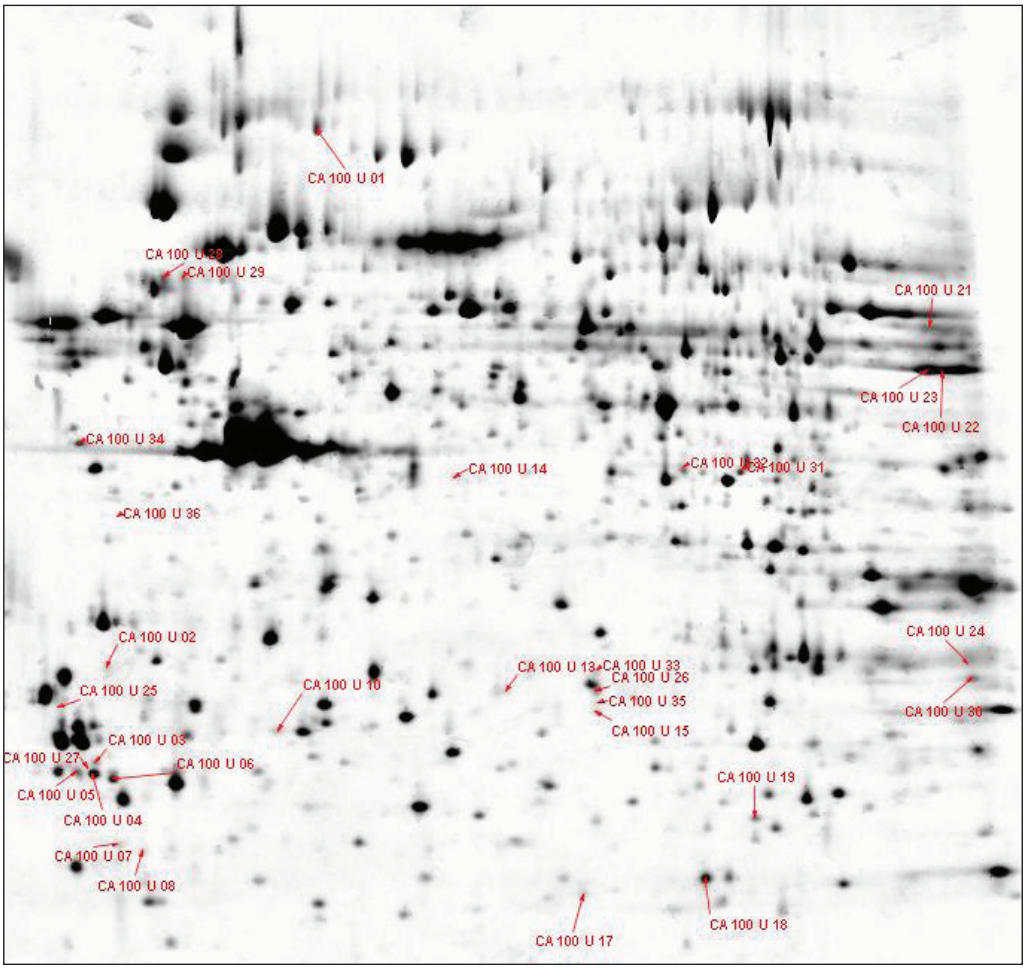


Figure 1: 2D Gel displaying up regulated protein spots, which increased at least 1.5 fold in BMDC cells after treatment with 100 μM CA (n=3, $p < 0.05$)- refer to SI Figure 1 for data on 50 μM CA. In total 30 protein spots were statistically significant increased.

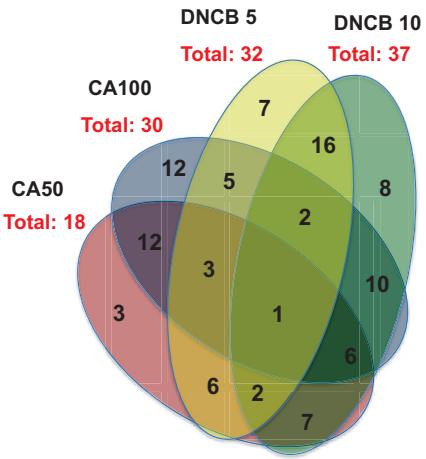


Figure 2: Venn Diagramm showing overlaps for the number of up regulated protein spots for 50,100 μM CA and 5, 10 μM DNCB. Each analysis was performed in triplicates and spots were considered significant if they changed at least 1.5 fold with $p < 0.05$.

Up regulated spots were identified with mass spectrometry (see Table 1 in Supplementary Information). Among the up regulated proteins we found proteins related to oxidative stress, cytoprotection and phase II enzymes (e.g. Glutamate-Cysteine-Ligase reg SU, hemoxygenase). In addition we identified chaperones and proteins related to protein folding (e.g. HSP90, HSP84, HSP70, HSP70 homologue or protein disulfid isomerase). Furthermore we found different enzymes up regulated, in particular many glycolytic enzymes such as pyruvate kinase, GAPDH, Fructose-bisphosphate aldolase or enolase. A set of 14-3-3 proteins was also induced, in particular 14-3-3 epsilon, gamma, zeta/ delta and eta. Proteasomal compoments and proteins involved in regulation of protein degradation (i.e. ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase) were upregulated among others, which will not be further discussed in detail here (e.g. hN RNP's, histones).

We also specifically looked for down regulated proteins. However much less down regulated spots could be identified. We found 5 spots statistically significant down regulated for 50 μM CA and 4 spots for 100 μM CA.

As the aim of this study also was to analyse the role of Nrf2 in the elicitation phase of ACD we repeated this analysis in Nrf2 -/- BMDC. From the 18 spots upregulated in WT after 50 μM CA 12 seemed to be Nrf2 dependent regulated as they were not induced in the knockout. From the 30 spots that were induced in WT BMDC 19 seemed to be Nrf2 regulated and were not induced in the knockout. Interestingly the vast majority (8 of 12) of the protein spots being induced after both concentration seemed to be Nrf2 dependent.

In the group of spots that seemed to be Nrf2 dependent regulated we identified many known Nrf2 target genes such as or glutamate cysteine ligase or hemoxygenase. For some others there is at least transcriptomics data available fro Nrf2 -/- mice that indicate a possible Nrf2 regulation as for instance for HSP84. However we detected many protein species that were clearly not induced anymore in Nrf2 -/- BMBDC and which previously have not been described to be Nrf2 dependent.

Treatment with a strong Sensitizer: 2,4- Dinitrochlorobenzene (DNCB)

To understand molecular proteomic changes occurring after treatment with a strong sensitizer, BMBC's were treated with a either 5 or 10 μM DNCB for 8h. Proteomic changes were again evaluated via 2D gel analysis in triplicates. Protein spots were considered to be differentially regulated if they changed statistically significant ($p < 0.05$) at least 1.5 fold (up regulation) or 0.5 fold (down regulation) compared to vehicle, i.e. DMSO, treated cells.

Interestingly for the strong sensitizer we found much more spots regulated compared to the moderate sensitizer CA, which somehow might be expected. We found 32 spots up regulated for treatment with 5 μM, 37 spots for treatment with 10 μM DNCB (Figure 3, Supplemental Figure 2). Again many of them, i.e. 16 (17?- check!) spots changed for both concentrations (refer to Figure 2). Some were unique for each treatment- 7 spots for 5 μM and 8 spots for 10 μM. Interestingly a significant number of them was induced as well with CA as with DNCB- those are of particular interest as those might represent possible biomarkers for contact allergens and they will be discussed in detail later one (refer to Figure 2).

We identified up regulated spots with mass spectrometry (see Table 1 in Supplementary Information). Again proteins related to oxidative stress, cytoprotection and phase II enzymes were up regulated, but we found more of those type of proteins compared to CA (e.g. Glutamate-Cysteine-Ligase reg SU, Glutathione-S-transferase omega-1, ferritin, peroxidredoxin-1, hemoxygenase). Compared to CA we found less chaperones and proteins related to protein folding (HSP90, protein disulfid isomerase). However, compared to CA much more enzymes are specifically up regulated. Like for CA we found many glycolytic enzymes up regulated such as pyruvate kinase, GAPDH, Fructose-bisphosphate aldolase or enolase. But in addition we also found Transaldolase, Transketolase upregulated as well as flavin reductase or aldehyde dehydrogenase. In contrast to CA we found less 14-3-3 proteins

induced, only 14-3-3 epsilon. Like after CA treatment we found several proteasomal compoments and proteins involved in regulation of protein degradation (i.e. ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase) were upregulated. Other proteins were induced as well, which will not be further discussed in detail here (e.g. hN RNP's, histones).

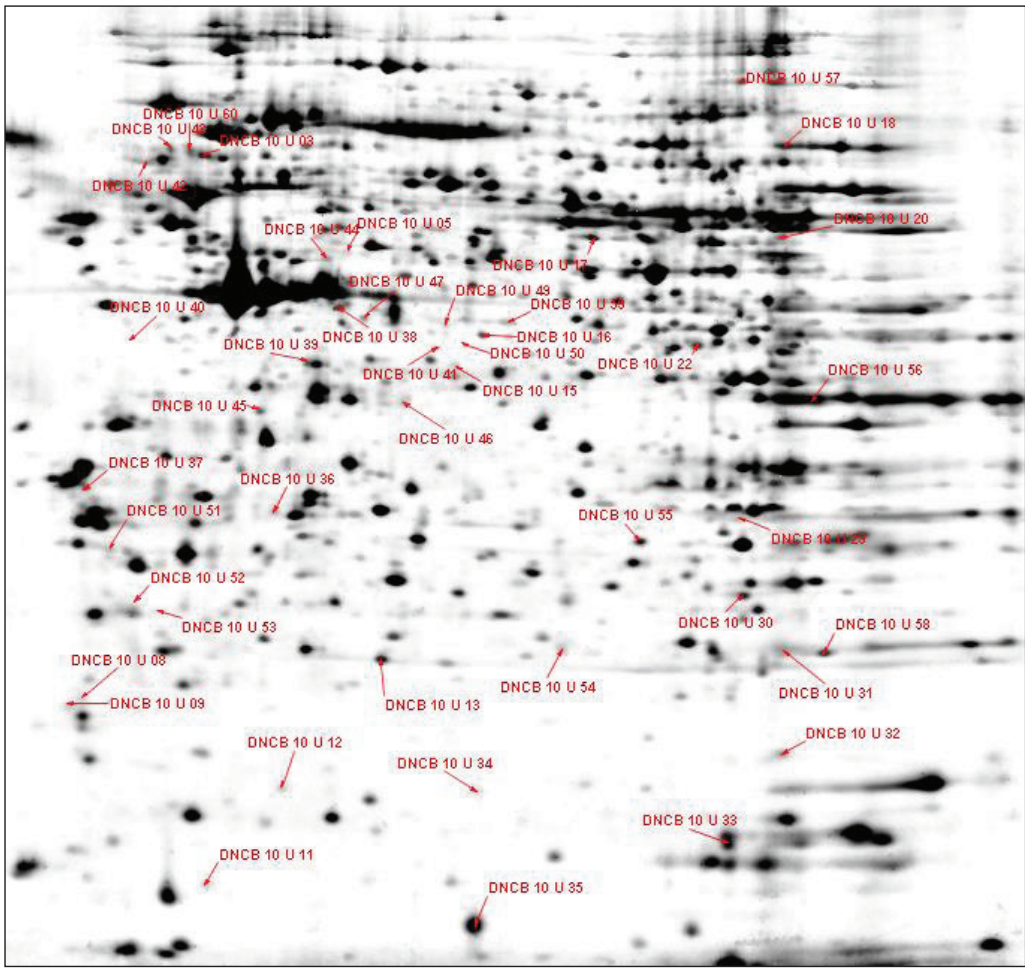


Figure 3: 2D Gel displaying up regulated protein spots, which increased at least 1.5 fold in BMDC cells after treatment with 10 μM DNCB (n=3, p< 0.05)- refer to SI Figure 2 for data on 5 μM DNCB. In total 37 protein spots were statistically significant increased.

We also specifically looked for down regulated proteins. Like we CA treatment much less spots could be identified that were specifically down regulated. We found only 5 spots statistically significant down regulated for both treatment 5 and 10 μM DNCB. Also for DNCB treatment we repeated the analysis in BMDC from Nrf2 -/- mice. From the 32 spots upregulated in WT after 5 μM DNCB 11 seemed to be Nrf2 dependent regulated as they were not induced in the knockout. From the 37 spots that were induced in WT BMDC 15 seemed to be Nrf2 regulated and were not induced in the knockout. Interestingly, again the majority of the protein spots (approx. 10 of 16-

number needs to be checked again!) being induced after both concentration seemed to be Nrf2 dependent.

In the group of spots that seemed to be Nrf2 dependent regulated we identified many known Nrf2 target genes such as or glutamate cysteine ligase, glutathione-S-transeferase omega-1, peroxiredoxin or hemoxygenase. For some others there is at least transcriptomics data available fro Nrf2 -/- mice that indicate a possible Nrf2 regulation as for instance for HSP84, Transaldolase, Transketolase, Aldehyde DH, ferritin. However we detected many protein species that were clearly not induced anymore in Nrf2 -/- BMBDC and which previously have not been described to be Nrf2 dependent.

Treatment with a moderate Sensitizer: nickel sulphate (NiSO4)

When our study was planned there was no indication that mouse would not be able to respond to nickel, although it was long known that NiSO4 was not recognized in LLNA as a sensitizer. Thus we included NiSO4 in our study and BMBC's were treated with a either 250 or 400 μM NiSO4 for 8h. Proteomic changes were evaluated via 2D gel analysis in triplicates. Protein spots were considered to be differentially regulated if they changed statistically significant ($p < 0.05$) at least 1.5 fold (up regulation) or 0.5 fold (down regulation) compared to vehicle, i.e. DMSO, treated cells.

We found 17 spots up regulated for treatment with 250 μM and 17 spots for treatment with 400 μM NiSO4 (Figure 4, Supplemental Figure 3). From those the vast majority (12 spots) changed for both concentrations (Figure 5). Some spots were unique for each treatment – 2 spots for 250 μM and 3 spots with 400 μM. No spot was significantly down regulated.

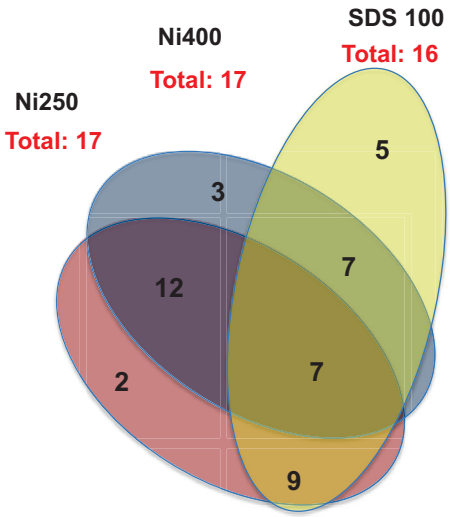


Figure 5: Venn Diagramm showing overlaps for the number of up regulated protein spots for 250, 400 μM NiSO4 and 100 μM SDS. Each analysis was performed in triplicates and spots were considered significant if they changed at least 1.5 fold with $p < 0.05$.

Mass spectrometric identification revealed some proteins related to oxidative stress (peroxiredoxin-1), to protein folding (several protein disulfid isomerases) or to proteasomal degradation (proteasomal subunits). As with all other treatment we also found cytoskeletal protein spots up regulated (several actin isoforms).

…

Treatment with an irritant: sodium dodecylsulphate (SDS)

As a control BMDC cells were treated with an irritant. BMBC's were treated with 100 μM SDS for 8h. Proteomic changes were evaluated via 2D gel analysis in triplicates. Protein spots were considered to be differentially regulated if they changed statistically significant ($p < 0.05$) at least 1.5 fold (up regulation) or 0.5 fold (down regulation) compared to vehicle, i.e. DMSO, treated cells.

We found 16 spots up regulated for SDS treatment (Figure 5) and 5 were unique for SDS treatment. One spot was significantly down regulated.

…will be completed…

Discussion

Include the following points

- so far no proteomic study is published to analyse contact allergens, however transcriptomic studies have shown several candidates being upregulated on RNA level after sensitizer treatment (e.g. Ade et al. 2008 with a few selected allergens, Johansson et al. 2011 with 20 sensitizers and 20 non-sensitizers, Ryan et al 2004, Arkusz et al. 2010)
    - among those Nrf2 targets such as HMOX1, NQO1 (Ade et al. 2008, Arkusz et al. 2010)
    - HSP40 homologues (Johansson et al. 2011)
    - different histones (Johansson et al. 2011)
    - transaldolase (Ryan et al. 2004)

- compare to our study: we also find HMOX1 but also other Nrf2 targets (Glutamate Cysteine Ligase, Glutathione- S- Transferase omega-1, we also find several chaperones (however not HSP40 but several other) and we find several histones and also transaldolase

- proteomic studies do exist that analyse changes in proteome occurring during maturation of dendritic cells (Buschow et al. performed a combined proteome and transcriptome study). In this study many proteins have been identified and some of them are upregulated. Upregulated during DC maturation are for instance:
    - HSP40 homologues (only RNA, not on protein level)
    - ferritin (RNA, protein)
    - transaldolase (RNA, protein) but not transketolase (detected but no change)
    - Glutamate-Cysteine Ligase regulatory SU (RNA; protein)
    - a few 14-3-3 proteins are induced on RNA but not on protein level (epsilon and eta are induced)

- compare to our study & to allergen transcriptome studies
    - obviously: ferritin, transaldolase and glutatate-Cys Ligase seem to be important (we have chosen those for further analysis)

discuss Nrf2 dependence:

Many known Nrf2 dependent genes were induced after treatment of BMDC with different contact allergens and as expected those were not induced anymore in the Nrf2 -/- cells. These are for instance glutamate-cysteine ligase, hemoxygenase, ferritin, glutathione-s-transferase omega-1, transaldolase, transketolase or Aldehyd-DH.

Possible new Nrf2 dependent genes are:

References:

Ade, N., Leon, F., Pallardy, M., Peiffer, J.-L., Kerdine-Romer, S., Tissier, M.-H., Bonnet, P.-A., et al. (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. Tox Sci 107(2), 451–60

Adler, S., Basketter, D., Creton, S., Pelkonen, O., Van Benthem, J., Zuang, V., Andersen, K. E., et al. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Arch. Tox. 85(5), 367–485.

Basketter, D. (2008). Skin sensitization: strategies for the assessment and management of risk. The British journal of dermatology, 159(2), 267–73.

Buschow et al. (Proteomic/ Transcriptomic Study maturation DC)

Kaplan, D. H., Igyártó, B. Z., & Gaspari, A. a. (2012). Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. Nature reviews. Immunology, 12(2), 114–24.

El Ali, Z., Gerbeix, C., Hemon, P., Esser, P. R., Martin, S. F., Pallardy, M., & Kerdine-Römer, S. (2013). Allergic Skin Inflammation Induced By Chemical Sensitizers Is Controlled By the Transcription Factor Nrf2. Tox Sci Epub

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. Tox Sci 81(2), 332–43

Johansson, H., Lindstedt, M., Albrekt, A.-S., & Borrebaeck, C. a K. (2011). A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests. BMC genomics, 12(1), 399

Lewis, J. B., Messer, R. L., McCloud, V. V, Lockwood, P. E., Hsu, S. D., & Wataha, J. C. (2006). Ni(II) activates the Nrf2 signaling pathway in human monocytic cells. *Biomaterials*, *27*(31), 5348–56

Martin, S. F., Esser, P. R., Weber, F. C., Jakob, T., Freudenberg, M. a, Schmidt, M., & Goebeler, M. (2011). Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. Allergy, 66(9), 1152–63

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. Tox Sci, 1–34.

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. Toxicological sciences, 1–41.

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. Tox Sci 113(2), 284–92

Résumé

Les réactions allergiques telles que les réactions d'hypersensibilité de contact (HSC) sont un problème de santé publique. Il s'agit d'une réaction inflammatoire aiguë qui survient suite à des expositions répétées d'une molécule allergisante avec la peau et dans laquelle les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle essentiel. Les composés chimiques tels que le dinitrochlorobenzène (DNCB) ou le cinnamaldéhyde (CinA), responsables d'HSC, sont capables d'induire un stress chimique et de produire des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Parmi les voies de détoxication en réponse aux xénobiotiques, la voie Nrf2/Keap1 est une voie centrale connue pour la détection de composés électrophiles. A l'état basal et en absence de stress, Nrf2 est couplé à son répresseur cytosolique Keap1 qui assure sa dégradation *via* le protéasome. En présence d'un stress chimique, Nrf2 transloque dans le noyau et induit l'expression des gènes antioxydants [*hème-oxygénase 1 (ho-1), NADPH quinone oxydoréductase (nqo1), glutathione-s-transférase (gst)*].

En absence de Nrf2, nous avons montré que le DNCB et le CinA induisent la mort cellulaire des DC *via* l'activation des caspases impliquées dans la voie mitochondriale ou intrinsèque de l'apoptose. Cette mort cellulaire induite par le DNCB est ERO dépendante tandis que celle induite par le CinA ne l'est pas. En présence de Nrf2, la survie des DC est régulée par l'expression de *bcl-2*, un gène antiapoptotique, et des gènes antioxydants. Nrf2 semblerait activer ou réprimer la transcription des gènes et ce en fonction de la molécule testée, du temps de traitement.

Par ailleurs, nous avons également montré que Nrf2 joue un rôle clef dans les phases de sensibilisation et d'élicitation de la réaction d'HSC mais également au cours de l'irritation. Des transferts adoptifs de DC ont permis de montrer le rôle clef de Nrf2 dans la DC au cours de l'HSC.

Enfin, notre étude montre que Nrf2 régule les Treg au niveau du tissu cutané et participe à la tolérance cutanée.

Mots clés : apoptose, bcl-2, cellules dendritiques, espèces réactives de l'oxygène, eczéma de contact, molécules allergisantes, Nrf2, peau, tolérance cutanée

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

Laboratoire de rattachement :
INSERM UMR-S 996 "Cytokines, chimiokines et immunopathologie"
Equipe 2 "Signalisation en immunotoxicologie et immunopathologie"

Université Paris-Sud
UFR "Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry"
5, rue Jean Baptiste Clément,
92290 Châtenay-Malabry, France