

Toxicologie prédictive moléculaire et génétique

Application à la détection du pouvoir sensibilisant des molécules

J.L. GARRIGUE, Ph. CATROUX, J. LECLAIRE

RÉSUMÉ

La capacité de prévoir très précocement les phénomènes de toxicité idiosyncrasique liés aux xénobiotiques destinés à un usage pharmaceutique ou industriel en général demeure une préoccupation constante. Dans cette revue, nous confrontons les données immunologiques récentes concernant l'hypersensibilité retardée de contact (ou eczéma de contact), exemple d'effet secondaire des xénobiotiques dans certains cas, et nos connaissances actuelles des mécanismes de biotransformation des molécules appliquées sur la peau. Cet état des lieux offre l'occasion de présenter plusieurs orientations stratégiques possibles dans la mise au point de tests capables de prédire le potentiel sensibilisant des xénobiotiques, en particulier *in vitro*.

SUMMARY

Molecular and genetic predictive toxicology. Application to the detection of the sensitizing potential of molecules.

– The ability to very rapidly predict idiosyncratic toxicity phenomena related to xenobiotics intended for pharmaceutical or industrial use generally remains a constant preoccupation. In this review, we compare recent immunological data concerning contact delayed hypersensitivity (or contact eczema), an example of xenobiotic adverse effects in some cases, and our current knowledge of the mechanisms of biotransformation of molecules applied to the skin. This review provides an opportunity to present several possible strategic approaches to the development of tests capable of predicting the sensitizing potential of xenobiotics, particularly *in vitro*.

INTRODUCTION

Dans l'étude immunotoxicologique d'un xénobiotique, la possibilité d'évaluer avec précision son potentiel sensibilisant représente une phase essentielle. La prévision des phénomènes de toxicité idiosyncrasique, notamment du type hypersensibilité retardée de contact, constituent de fait l'une des préoccupations importantes des industriels de tous les secteurs professionnels, chimiques, pharmaceutiques ou cosmétologiques. Il s'agit en effet

d'éviter la survenue de réactions allergiques chez les utilisateurs après plusieurs années de commercialisation, alors même que l'ensemble des tests toxicologiques imposés par la réglementation se sont avérés négatifs.

Il est actuellement admis que la grande majorité des effets secondaires non souhaités des xénobiotiques ont pour événements précoces des phénomènes d'activation moléculaire *in situ*. Si les connaissances ont beaucoup progressé ces dernières années dans le domaine de la toxicologie

L'OREAL, Recherche Avancée – Sciences du Vivant, 1, avenue Eugène-Schueller, 93601 AULNAY-SOUS-BOIS.

Tirés à part : Dr J.L. Garrigue.

Communication présentée aux Journées Parisiennes d'Allergie 1995.

GARRIGUE J.L., CATROUX Ph., LECLAIRE J. – Toxicologie prédictive moléculaire et génétique. Application à la détection du pouvoir sensibilisant des molécules. *Rev. fr. Allergol.*, 1995, 35 (5), 455-461.

moléculaire, elles reposent pour l'essentiel sur l'observation de réactions de toxicité hépatique des xénobiotiques. Mais il n'existe pas de preuve formelle que ces concepts puissent être appliqués au niveau cutané.

Notre propos est donc de mettre en parallèle les données immunologiques récentes concernant la réaction d'hypersensibilité retardée de contact et la connaissance que nous avons des mécanismes probables de bioactivation des xénobiotiques au niveau cutané. Nous voudrions suggérer, en prenant l'exemple des réactions allergiques de contact, que l'analyse d'événements moléculaires et/ou génétiques très précoces dans ces deux types d'approche peut contribuer à faire progresser la toxicologie prédictive des réactions idiosyncrasiques des xénobiotiques.

L'HYPERSENSIBILITÉ RETARDÉE DE CONTACT (HSRC) AUX XÉNOBIOTIQUES

La physiopathologie de la réaction d'hypersensibilité retardée de contact (HSRC), ou eczéma allergique de contact chez l'homme, repose sur des interactions cellulaires et moléculaires complexes que nous ne détaillerons pas ici. Quelques éléments sont rappelés dans l'optique d'une réflexion sur la mise au point de tests prédictifs *in vitro*.

L'eczéma allergique de contact est une dermatose inflammatoire se développant chez certains sujets après des contacts cutanés le plus souvent répétés avec une molécule se comportant comme un haptène capable de pénétrer dans la peau, de se fixer sur des cellules de l'épiderme ou du derme et de provoquer une réaction d'hypersensibilité retardée médiée par des lymphocytes T de type Th1. Cette affection survient typiquement après contacts répétés sur la peau d'agents sensibilisants environnementaux ou liés à l'exposition professionnelle. Les étapes physiopathologiques comportent lors d'un premier contact une phase de sensibilisation, muette cliniquement, suivie d'une phase de révélation lors de la réintroduction de l'haptène qui permet l'expression clinique de l'eczéma.

Pour provoquer une allergie de contact, une substance doit être d'abord capable de pénétrer dans la peau. Interviennent ici l'éventuelle altération de la couche cornée par des phénomènes d'irritation, la dose appliquée, la répétition des contacts cutanés, la lipophilie de ces molécules, et le véhicule utilisé.

Les allergènes de contact partagent des caractéristiques communes. Ce sont le plus souvent des

antigènes potentiels incomplets, ou haptènes, substances le plus souvent non protidiques et de petit poids moléculaire et par définition non immunogéniques par eux-mêmes. On peut distinguer : a) les haptènes électrophiles, se fixant aux groupes nucléophiles des protéines ; b) les molécules provoquant un stress oxydant générateur de radicaux libres qui modifient la structure de certaines protéines ; dans ces deux premiers cas se forment des liaisons covalentes qui transforment la protéine autologue ou « soi » en protéine hétérologue ou « non soi » ; c) les haptènes lipophiles se fixant directement dans les lipides de la membrane cellulaire ; et d) les prohaptènes, où des processus de biotransformation cutanés ou extra-cutanés jouent un rôle probablement important.

La phase d'induction se produit lors de l'application épicutanée d'un haptène chez un individu non sensibilisé. L'haptène est pris en charge par les cellules de Langerhans, qui migrent vers le ganglion lymphatique de drainage, où elles présentent l'antigène aux lymphocytes T naïfs. L'antigène reconnu par le lymphocyte T peut être un épitope de l'antigène du CMH modifié par l'haptène, ou un peptide présent dans la niche à peptide de la molécule du CMH, modifié par l'haptène (Romagnoli [24], von Bonin [32]). Il s'ensuit une expansion clonale de cellules T spécifiques d'haptène, qui recirculent ensuite dans l'organisme et infiltrent les tissus périphériques, en particulier la peau. La phase de révélation se produit lors d'un contact cutané ultérieur avec l'haptène. Les cellules Th1 mémoires présentes localement sont réactivées et libèrent des cytokines (IL2, IFN γ), amplifiant la réaction par activation directe des cellules voisines et recrutement de cellules mononucléées non spécifiques, conduisant aux manifestations cliniques de l'eczéma.

Des études réalisées chez des jumeaux homozygotes suggèrent que des facteurs génétiques existent probablement, mais que les facteurs environnementaux (contacts répétés avec l'allergène en particulier) sont déterminants dans la variabilité inter-individuelle observée dans l'eczéma de contact.

LES CONCEPTS RÉGISSANT LA MÉTABOLISATION CUTANÉE DES XÉNOBIOTIQUES

La grande majorité des effets secondaires non souhaités des xénobiotiques ont pour événements précoces des phénomènes d'activation moléculaire *in situ*. Ceux-ci proviennent de la formation de métabolites instables ou réactifs qui sont formés au niveau des cellules constituant les cibles

biologiques importantes. Ces composés intermédiaires sont formés lors de l'activation des xénobiotiques (biotransformation) par de nombreux systèmes enzymatiques (mono-oxygénases, réductases, peroxydases, cyclo-oxygénases) dont le plus important au niveau hépatique est représenté par la famille des mono-oxygénase cytochromes P450. Qualitativement, la peau possède un équipement enzymatique semblable à celui du foie. La majorité des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse (réactions de fonctionnalisation ou de phase I) ainsi que de conjugaisons (réactions de phase II) ont été mises en évidence au niveau cutané (Martin [19], Kao et Carver [16]). Les différences sont avant tout quantitatives, le pouvoir métabolique de la peau ne représentant selon l'espèce considérée que de 1 à 6 % des capacités métaboliques du foie. Le métabolisme des xénobiotiques est néanmoins facilité par la lenteur du flux sanguin cutané qui favorise l'exposition prolongée des xénobiotiques aux systèmes enzymatiques. Ces activités enzymatiques sont principalement localisées au niveau de l'épiderme, des follicules pileux et des glandes sébacées. Le rôle des cytochromes P450 dans le métabolisme cutané a été plus particulièrement étudié à cause du caractère ubiquitaire de ces enzymes et de leur rôle primordial dans le métabolisme des xénobiotiques. Dans les tissus de mammifères, douze familles ont été identifiées qui se différencient par leur poids moléculaire, leur réactivité immunologique et leur spécificité de substrat. Des isoenzymes impliquées dans le métabolisme de composés exogènes, appartenant notamment aux familles IA (IA1/IA2), IIB (IIB1/IIB2), IIE et IIIA ont été identifiées dans la peau de rongeur et la peau humaine par des approches biochimiques, immunohistochimiques et par biologie moléculaire (Khan W.A. [15] ; Jugert *et al* [14] ; Pendlington R.U. *et al* [22] ; Pham M.A. *et al* [23]). Certaines de ces activités peuvent être induites ou inhibées par traitement topique à l'aide des mêmes substances actives au niveau hépatique. Le rôle de certaines enzymes et plus particulièrement de l'isoenzyme IA1 dans les phénomènes d'activation métabolique de procarcinogènes au niveau cutané est bien établi. Il reste mal défini dans le cas de l'activation métabolique de prohaptènes. Pour illustrer ceci, nous rapportons ci-dessous les résultats contradictoires de deux études récentes. Il est possible d'exacerber dans certains cas le potentiel sensibilisant de prohaptènes dont la métabolisation est cytochrome P450-dépendante. Chez la souris, la monocrotaline n'est sensibilisante que si l'on stimule le cytochrome P450 adéquat par le 3-méthylcholanthrène (Schmidt *et al* [29]). L'inhibition de ce P450 par le pipéronyl-butoxide supprime complètement la réaction d'HSRC à la monocrotaline (induction et révélation). Par contre, aucune sensibilisation de contact n'est générée si l'on teste d'autres alca-

loïdes comme l'atropine, l'éphédrine, ou la nicotine, probablement parce que la stimulation par le 3-méthylcholanthrène n'induit pas dans ces cas l'isoenzyme adéquat de cytochrome P450. D'autres équipes ont tenté d'inhiber les systèmes enzymatiques supposés en cause. L'eugénol et l'isoeugénol sont des allergènes de contact nécessitant d'être métabolisés dans la peau et transformés en haptène réactif. Malgré une structure chimique proche, ils ne donnent pas de réactions croisées, d'où l'hypothèse qu'ils pourraient être activés par des mécanismes différents (Barratt et Basketter [1]). L'eugénol s'oxyderait, en présence de cytochrome P450-IA, en formant des espèces radicalaires à partir du groupement OH de sa formation phénol. L'isoeugénol subirait quant à lui une déméthylation suivie d'une oxydation, aboutissant à la formation d'une orthoquinone. Scholes et collaborateurs (Scholes [30]) ont étudié l'effet de la modulation de la réaction d'HSRC à ces deux haptènes par le clotrimazole, inhibiteur connu du cytochrome P450-IA, en s'attendant donc à observer une inhibition de la réponse à l'eugénol et une absence de modification de la réponse du LLNA à l'isoeugénol. Or, un prétraitement par le clotrimazole des souris double l'intensité de la réponse inflammatoire à l'eugénol et quintuple celle observée avec l'isoeugénol. Ces résultats sont particulièrement intéressants, car ils montrent que la situation est plus complexe qu'il n'y paraît. Ils suggèrent que le cytochrome P450-IA de la peau agit non pas en métabolisant l'eugénol en un produit plus sensibilisant mais en quelque sorte en le « détoxifiant ». Ces résultats, s'ils confirment que le clotrimazole inhibe bien le P450-IA, suggèrent par ailleurs qu'il pourrait stimuler d'autres enzymes intervenant dans le métabolisme de l'eugénol et de l'isoeugénol, en augmentant ainsi leur allergénicité.

Ainsi, bien qu'il existe des arguments en faveur de l'intervention des cytochromes P450 dans l'activation métabolique des prohaptènes, l'état actuel des connaissances du système enzymatique cutané et des conditions d'analyse ne suggèrent pour l'instant pas que les P450 jouent un rôle important dans l'allergie de contact. Il est nécessaire de préciser d'autre part que d'autres systèmes enzymatiques (mono-oxygénases à flavine, peroxydases...) présents au niveau de la peau sont susceptibles de jouer un rôle important dans le métabolisme des xénobiotiques (Venkatesh *et al* [31]). Leur rôle dans l'activation métabolique de prohaptènes, à notre connaissance, n'a pas été abordé. Des mécanismes fins de régulation existent entre la génération de métabolites toxiques et les processus de détoxification à partir de chaque substrat. Ces métabolites réactifs peuvent être formés dans tous les tissus puisque ces systèmes enzymatiques sont ubiquitaires.

De façon schématique, on peut considérer qu'il existe deux mécanismes principaux de formation de ces composés intermédiaires :

- Une voie oxydative, avec formation de composés électrophiles capables de former des liaisons covalentes avec des macromolécules biologiques. Ces liaisons irréversibles représentent ainsi une première étape dans l'apparition des effets toxiques.

- Une voie réductrice, conduisant à des composés intermédiaires possédant un excès d'électrons (radicaux libres, radicaux anioniques) qui réagissent avec l'O₂ pour produire des entités réactives dérivées de la réduction de l'O₂ (ex. : l'anion super-oxyde).

La persistance de ce stress oxydatif peut dépasser les systèmes de défense anti-oxydante (super-oxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase...), aboutir à l'oxydation de macromolécules biologiques (lipides, protéines), et entraîner des effets toxiques.

En outre, ces deux processus peuvent également aboutir à une déplétion en glutathion à l'origine d'un affaiblissement des défenses cellulaires. Ceci est à rapprocher du fait que l'on observe dans certaines familles de molécules (lactones, isothiocyanates) une corrélation entre la capacité à générer un stress oxydant au niveau cutané et la capacité à induire une réponse d'hypersensibilité retardée de contact (Schmidt et Chung [28]).

Cependant, la formation de ces métabolites réactifs n'est pas suffisante en elle-même pour déclencher des effets secondaires nocifs. Très souvent c'est la conjonction de plusieurs facteurs dépendant des espèces et des différences interindividuelles qui fait réagir un organisme plutôt qu'un autre. Ceci est défini par l'expression « toxicité idiosyncrasique ». Par exemple, des facteurs internes tels que la variabilité génétique des systèmes de défense (polymorphismes) et /ou des facteurs externes incluant principalement l'induction et l'inhibition des systèmes de biotransformation et de défense peuvent aboutir à des susceptibilités individuelles vis-à-vis des intermédiaires toxiques formés.

CONSÉQUENCES EN TOXICOLOGIE PRÉDICTIONNE MOLECULAIRE ET GÉNÉTIQUE

Depuis une vingtaine d'années, l'étude du potentiel sensibilisant des molécules repose sur un ou plusieurs tests *in vivo* chez le cobaye. Plus récemment développé chez la souris, le Local Lymph

Node Assay (Kimber [18]) repose sur l'étude de la prolifération lymphocytaire induite au niveau du ganglion drainant le site de sensibilisation par les premières applications cutanées d'une molécule (phase d'induction), et non plus sur les réponses inflammatoires observées après révélation. Autre avantage, le LLNA permet la discrimination entre allergènes de contact et allergènes respiratoires, selon qu'ils induisent une réponse de type Th1 ou Th2, respectivement.

Des connaissances mentionnées précédemment découlent plusieurs types de stratégies envisageables dans la prédiction du potentiel sensibilisant retardé de contact des xénobiotiques : approche des relations structure-activité, en fonction de leur structure chimique, et différentes approches *in vitro*, utilisant des systèmes cellulaires simples ou plus complexes.

Approche QSAR

Parallèlement à la mise au point de techniques *in vitro* de détection des substances allergisantes s'est développée une autre approche qui est l'étude quantitative des relations structure-activité des molécules (QSAR). Dans la mesure où la réactivité entre un haptène et les protéines paraît importante dans la détermination du potentiel sensibilisant de celui-ci, la relation entre le pouvoir alkylant et le potentiel sensibilisant de différentes molécules a été très étudiée depuis quelques années (Betso [4] ; Fragnals [9]). Ces auteurs ont défini la notion d'index relatif d'alkylation (RAI) en prenant en compte trois paramètres : la dose de produit appliqué sur la peau, sa lipophilicité et sa réactivité chimique. Cette approche, bien que tout à fait intéressante reste partielle pour deux raisons. D'une part, la réactivité chimique est déterminée vis-à-vis d'une amine, la butylamine, ce qui est sans doute très éloigné des caractéristiques des protéines pouvant servir de cibles pour des espèces électrophiles. D'autre part, ce système ne fait pas intervenir la notion de métabolisme.

Par ailleurs, des bases de données existent où sont compilés de façon systématique les cas cliniques publiés d'allergie de contact ainsi que les études expérimentales réalisées (Benezra [3]). Enfin, des systèmes experts d'aide à la décision sont en cours de développement dans le domaine de la prédiction du potentiel sensibilisant des molécules et représentent une voie particulièrement intéressante (Barratt [2]).

Approches *in vitro*

Aucun test *in vitro* prédictif du potentiel sensibilisant des molécules n'est actuellement validé.

Les travaux réalisés dans ce domaine ont porté sur l'étude *in vitro* de cellules ganglionnaires provenant d'animaux sensibilisés *in vivo*, sur la capacité de fixation des allergènes sur les protéines, sur la culture et l'exposition de cellules de Langerhans aux allergènes *in vitro*, voire sur l'étude combinée de la capacité de liaison de l'haptène et de l'induction d'une prolifération cellulaire. Ces cellules de Langerhans (et d'autres cellules dendritiques) peuvent être utilisées pour générer une réponse proliférative de type primaire par des lymphocytes T naïfs *in vitro* (Hauser et Katz [11, 12]). D'autres approches *in vitro* sont étudiées actuellement.

Fractions subcellulaires

Différentes fractions subcellulaires (microsomes, mitochondries, membranes plasmiques) peuvent être utilisées pour l'évaluation précoce de la réactivité potentielle d'une molécule. Les fractions microsomales, en particulier, contiennent les principales enzymes impliquées dans le métabolisme des produits. La capacité d'un produit à former des espèces électrophiles ou à générer un stress oxydant dans ces modèles peut être évaluée biochimiquement. La fixation covalente des électrophiles formés sur des nucléophiles (protéines microsomales) peut être mesurée par technique radiométrique ce qui nécessite de disposer du produit radiomarqué. Différentes méthodes directes ou indirectes permettent aussi d'évaluer le stress oxydatif généré par voie réductrice. Les études sur microsomes (études d'interactions, identification des métabolites) permettent aussi de phénotyper les enzymes impliquées.

Systèmes monocellulaires

Pendant la phase d'induction de la réaction d'HSRC, différents types cellulaires (kératinocytes, cellules de Langerhans et cellules endothéliales des veinules post-capillaires dermiques) expriment un certain nombre de molécules d'adhésion et synthétisent de nombreuses cytokines (Enk et Katz [8] ; Heufler [12]). Des travaux ont suggéré que certains de ces signaux moléculaires précoces seraient spécifiques d'une réaction d'allergie de contact (Enk et Katz [8]). Ces observations demandent confirmation, mais suggèrent néanmoins de travailler sur une approche prédictive alternative basée sur la mesure d'événements induits à un niveau moléculaire par des substances sensibilisantes ou irritantes sur un matériel aisément manipulable tel que des lignées de cellules kératinocytaires ou endothéliales humaines (Bosse [5]).

Un autre outil particulièrement prometteur est constitué par les « formes purifiées ». Il s'agit de levures, de bactéries ou de cellules de mammifères transfectées par un ADN complémentaire d'origine humaine codant pour un enzyme particulier impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques. (Crespi *et al* [7] ; Renaud J.P. *et al* [25]). Ceci devrait permettre de mieux disséquer les mécanismes en cause dans la bioactivation des molécules étudiées.

Systèmes pluricellulaires

Des systèmes de co-culture associant lymphocytes T, cellules présentatrices et haptène (trinitrophényl) sont capables de reproduire la réaction d'HSRC entièrement *in vitro* (Hauser et Katz [11] ; Moulon [21]). Si le développement d'un test entièrement *in vitro* paraît difficile dans l'immédiat pour tout type d'haptène, l'utilisation de lignées de cellules présentant l'antigène pourrait permettre de progresser dans la mise au point de tests prédictifs de type réponse primaire *in vitro* de lymphocytes T naïfs, en présence de cofacteurs moléculaires ou cellulaires encore à déterminer.

Une autre phase importante consiste à préciser la contribution relative dans un tel système des différentes sous-populations T. De nombreux arguments expérimentaux chez l'animal (Gocinski et Tigelaar [10] ; Hauser et Katz [11]) et chez l'homme (Kalish [16] ; Bour [6]) soulignent le rôle effecteur original des lymphocytes T CD8+. Par ailleurs, la population de cellules T dendritiques épidermiques interviendrait également dans la phase précoce de la réaction d'HSRC (Ptak, 1991). Il apparaît enfin que selon l'environnement moléculaire et cellulaire, et les conditions de culture choisies, il est possible d'orienter l'expansion de clones T spécifiques d'allergènes vers un phénotype ou un autre, qu'il s'agisse des marqueurs membranaires CD4 ou CD8 (Bour [6]) ou du profil cytokinique Th1 ou Th2 (Wirth [33]).

L'haptène doit quant à lui être testé sous une forme chimique permettant l'activation lymphocytaire T. Même si l'on sait que le nickel se fixe sur les résidus histidine et peut se fixer à un peptide à l'intérieur de la niche de la molécule du CMH (Romagnoli [27]), les mécanismes de prise en charge et de présentation de l'haptène par les cellules présentatrices restent en général très mal connus.

Modèles de peaux humaines reconstituées *in vitro*

Sur le modèle Episkin, un épiderme humain reconstitué *in vitro*, la présence d'activités cytochrome P450 dépendantes a été démontrée

(Roguet [26]). Après administration topique de différents substrats des monooxygénases, les activités ethoxycoumarine et ethoxyrésorufine ont été mesurées, illustrant la présence de la famille des cytochromes P450-IA. Ces deux activités sont fortement inductibles par application topique de 3-méthylcholanthrène). Un inducteur des P450 hépatiques (comme le phénobarbital) n'a pas montré d'effet stimulateur, ce qui reproduit la situation observée au niveau de la peau elle-même. D'autres résultats montrent que ce modèle semble reproduire in vitro certains aspects des processus métaboliques cutanés mis en jeu in vivo. Il offre de plus la possibilité de tester des molécules non hydrosolubles et des produits formulés, permettant alors d'étudier leur effet sur le métabolisme cutané.

D'autres modèles de peau humaine reconstituée in vitro, comme Skin² existent, où la présence de cytochromes P450 IA1/A2, IIB1/B2 et IIIA, et de

glutathion S-transférase a été mise en évidence (Pendlington [22]).

Ces modèles sont en plein développement et représenteront probablement une aide au diagnostic prédictif du potentiel sensibilisant des xénobiotiques.

CONCLUSION

La recherche d'une interrelation entre les événements cellulaires et moléculaires en cause dans la réaction d'hypersensibilité retardée de contact et les mécanismes précoces d'activation moléculaire des xénobiotiques est une démarche nouvelle. Elle devrait participer à une réflexion sur les moyens les plus adaptés à mettre en œuvre pour progresser dans le domaine de la toxicologie prédictive en général.

RÉFÉRENCES

- Barratt M.D., Basketter D.A. – Possible origin of the skin sensitization potential of isoeugenol and related compounds. *Contact Dermatitis*, 1992, 27, 98-104.
- Barratt M.D., Basketter D.A. – Structure-activity relationships for skin sensitization: an expert system. In : *In Vitro Toxicology*. Rougier A., Goldberg A.M., Maibach H.I. Eds. New York, Mary Ann Liebert, 1994, pp. 293-302.
- Benezra C., Sigman C.C., Perry L.R., Helmes T.C., Maibach H.I. – A systematic search for structure-activity relationships of skin contact sensitizers: methodology. *J. Invest. Dermatol.*, 1985, 85, 351-356.
- Betso J.E., Carreon R.E., Miner V.M. – The use of proton nuclear magnetic resonance spectrometry (H NMR) for monitoring the reaction of epoxides with butylamine and predictive capabilities for the relative alkylation index (RAI) for skin sensitization by epoxides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1991, 108, 483-488.
- Bosse D. et al. – Antigen presentation by a continuous human microvascular endothelial cell line, HMEC-1, to human T cells. *Pathology*, 1993, 63, 236-238.
- Bour H., Nicolas J.F., Garrigue J.L., Demidem J.L., Schmitt D. – Establishment of nickel-specific T cell lines from patients with allergic contact dermatitis: comparison of different protocols. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1994, 73, 142-145.
- Crespi C.L., Langenbach R., Penman B.W. – Human cell lines, derived from AHH-1 TK⁺/– human lymphoblasts, genetically engineered for expression of cytochrome P450. *Toxicology*, 1993, 82, 89-104.
- Enk A.H., Katz S.I. – Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1992, 89, 1398-1402.
- Fraginals R., Roberts D., Lepoittevin J.P., Benezra C. – Refinement of the relative alkylation index (RAI) model for skin sensitization and application to mouse and guinea-pig test data for alkyl alkanesulphonates. *Arch. Dermatol. Res.*, 1991, 283, 387-394.
- Gocinski B.L., Tigelaar R.E. – Roles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J. Immunol.*, 1990, 144, 4121-4128.
- Hauser C., Katz S.I. – Activation and expansion of hapten- and protein-specific T helper cells from non-sensitized mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1988, 85, 5625-5628.
- Hauser C., Katz S.I. – Generation and characterization of T-helper cells by primary in vitro sensitization using Langerhans cells. *Immunol. Rev.*, 1990, 117, 67-84.
- Heufler C., Topar G., Grasseger A., Stanzl U., Koch F., Romani N., Schuler G. – Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *J. Exp. Med.*, 1993, 178, 1109-1114.
- Jugert F.K., Agarwal R., Kuhn A., Bickers D.R., Merk H.F., Mukhtar H. – Multiple cytochrome P450 isozymes in murine skin: induction of P450 1A, 2B, 2E and 3A by dexamethasone. *J. Invest. Dermatol.*, 1994, 102, 970-975.
- Kahn W.A., Park S.S., Gelboin H.V., Bickers D.R., Mukhtar H. – Monoclonal antibodies directed characterization of epidermal and hepatic cytochrome P450 isozymes induced by skin application of therapeutic crude coal tar. *J. Invest. Dermatol.*, 1989, 93, 40-45.
- Kalish R.S. – The use of human T-lymphocyte clones to study T-Cell function in allergic contact dermatitis to urushiol. *J. Invest. Dermatol.*, 1990, 90, 108S-111S.
- Kao J., Carver M.P. – Cutaneous metabolism of xenobiotics. *Drug Metabol. Rev.*, 1990, 22, 363-410.
- Kimber I., Mitchell J.A., Griffin A.C. – Development of a murine local lymph node assay for determination of sensitizing potential. *Fd Chem. Toxic.*, 1986, 24, 585.
- Liang S.M., Liang C.M., Hargrove M.E., Ting C.C. – Regulation by GSH of the effect of lymphokines on differentiation of primary activated lymphocytes. Influence of GSH on cytotoxic activity of CD3-AK. *J. Immunol.*, 1991, 146, 1909-1913.
- Martin R.J., Denyer S.P., Hadgraft J. – Skin metabolism of topically applied compounds. *Int. J. Pharmac.*, 1987, 39, 23-32.
- Moulon C., Péguet-Navarro J., Courtellemont P., Redziniak G., Schmitt D. – In vitro primary sensitization and restimulation of hapten-specific T cells by fresh and cultured human epidermal Langerhans Cells. *Immunology*, 1993, 80, 373-379.
- Pendlington R.U., Williams D.L., Naik J.T., Sharma R.K. – Distribution of xenobiotic metabolizing enzymes in skin. *Toxic. in Vitro*, 1994, 8, 525-527.
- Pham M.A., Magdalou J., Totis M., Fournel-Gigleux S., Siest G., Hammock B.D. – Characterization of distinct forms of cytochrome P450, epoxide metabolizing enzymes and UDP-glucuronosyltransferases in rat skin. *Biochem. Pharmacol.*, 1989, 38, 2187-2194.

24. Ptak W., Herzog W.R., Askenase P.W. – Delayed-type hypersensitivity initiation by early-acting cells that are antigen mismatched or MHC incompatible with late-acting delayed-type hypersensitivity effector T cells. *J. Immunol.*, 1991, 146, 469-475.
25. Renaud J.P., Peyronneau M.A., Urban P., Truan G., Cullin C., Pompon D., Beaune P., Mansuy D. – Recombinant yeast in drug metabolism. *Toxicology*, 1993, 82, 39-52.
26. Roguet R., Cotovio J., Kremers P., Rougier A., Pouradier-Duteil X., Leclaire J. – Cytochrome P450-dependant enzyme activities and testosterone metabolism in a reconstituted human epidermis. *In Vitro Toxicol.*, 1994, in press.
27. Romagnoli P., Labhardt A.M., Sinigaglia F. – Selective interaction of Ni with an MHC-bound peptide. *EMBO J.*, 1991, 10, 1303-1306.
28. Schmidt R.J., Chung L.Y. – Perturbation of glutathione status and generation of oxidative stress in mouse skin following application of contact allergenic sesquiterpene lactones and isothiocyanates. *Xenobiotica*, 1993, 23, 889-897.
29. Schmidt R.J. et al. – New perspectives on prohaptens activation in the pre-immunologic phase of allergic contact dermatitis. *Prediction of Percutaneous Penetration*, 1993, 3B, 670-678.
30. Scholes E.W., Pendlington R.U., Sharma R.K., Basketter D.A. – Skin metabolism of contact allergens. *Toxic. in Vitro*, 1994, 8, 551-553.
31. Venkatesh K., Levi P.E., Inman A.O., Monteiro-Riviere N.A., Mistra R., Hodgson E.P. – Enzymatic and immunological studies on the role of cytochrome P450 and the flavin-containing monooxygenase of mouse skin in the metabolism of pesticides and other xenobiotics. *Pesticide biochemistry and physiology*, 1992, 43, 53-66.
32. Von Bonin A., Ortmann B., Martin S., Weltzien H.U. – Peptide-conjugated haptens are the major antigenic determinants for trinitrophenyl-specific cytotoxic T cells. *Int. Immunol.*, 1992, 4, 869-874.
33. Wirth S., Saurat J.H., Hauser C. – Generation of murine CD8+ T cells with different lymphokine secretion patterns. *J. Invest. Dermatol.*, 1994, 103, 420 (abstract).

