



HAL
open science

Rôle du facteur de transcription Nrf2 dans la régulation des fonctions du neutrophile *in vitro* et dans l'allergie cutanée

Doumet Helou

► To cite this version:

Doumet Helou. Rôle du facteur de transcription Nrf2 dans la régulation des fonctions du neutrophile *in vitro* et dans l'allergie cutanée. Immunité innée. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS305 . tel-02117106

HAL Id: tel-02117106

<https://theses.hal.science/tel-02117106>

Submitted on 2 May 2019

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

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

Rôle du facteur de transcription Nrf2 dans la régulation des fonctions du neutrophile *in vitro* et dans l'allergie cutanée

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique, du fondamental à l'appliqué
Spécialité de doctorat: Immunologie-Toxicologie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 09 octobre 2018, par

Doumet Georges Helou

Composition du Jury :

Pr. Pierre Bobé Professeur des Universités, Université Paris-Sud, France (UMR 1174)	Président
Pr. Stefan Martin Professeur des Universités, Université de Freiburg, Allemagne	Rapporteur
Pr. François Huaux Professeur des Universités, Université catholique de Louvain, Belgique	Rapporteur
Dr. Angèle Soria Maitre de Conférences, Praticien hospitalier, Hôpital Tenon, Sorbonne Université, France	Examineur
Dr. My-chan Dang Chargée de recherche, Université Paris Diderot, France (UMR 1149)	Examineur
Pr. Sylvie Chollet-Martin Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université Paris-Sud, France (UMR 996)	Directrice de thèse
Pr. Saadia Kerdine-Römer Professeur des Universités, Université Paris-Sud, France (UMR 996)	Directrice de thèse

Dédicace

A mes très chers parents, **Georges** et **Eva**, qui ont tout sacrifié pour leurs enfants, n'épargnant ni santé ni efforts.

A mes sœurs, mes frères et mon adorable nièce **Rosarita** qui ont toujours été là pour moi, loin des yeux mais bien près du cœur.

A mon oncle **Charbel**, qui nous a quittés très tôt... Ton départ était un moment fort douloureux et bouleversant mais les bons souvenirs reviennent et apaisent la souffrance.

Je vous dédie ce doctorat en témoignage de mon profond respect et de toute ma reconnaissance !





Remerciements

La réalisation de cette thèse a été possible grâce au concours de plusieurs personnes qui m'ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de ces trois ans. Je remercie tout d'abord le **Pr. Pierre Bobé** pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse. Je remercie également les Professeurs **Stephan Martin** et **François Huaux** qui m'ont fait l'honneur de juger ce manuscrit et les Docteurs **Angèle Soria** et **My-Chan Dang** qui ont pris sur leur temps pour examiner ce travail. Je suis certain que notre discussion scientifique pendant la soutenance permettra de pousser les perspectives de cette thèse au plus haut niveau.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mes directrices de thèse **Sylvie Chollet-Martin** et **Saadia Kerdine-Römer**. L'enthousiasme de **Saadia** m'a grandement motivé et la sagesse de **Sylvie** a contribué à alimenter ma réflexion. Merci de m'avoir fait confiance dès notre première rencontre au café de la Porte de Versailles et merci aussi à la petite **Telma** qui est née au cours de la rencontre pour persuader sa mamie **Sylvie** que je suis le bon candidat pour la thèse. J'ai beaucoup apprécié les moments passés avec vous lors des deux derniers congrès au Québec et à Bruxelles, surtout la découverte de la poutine aussi bien que la cantine de PJ ! Je vous remercie sincèrement pour votre disponibilité et votre patience ; je reconnais qu'il faut beaucoup de patience pour gérer une personne tenace comme moi ! J'adresse aussi mes sincères remerciements au Doyen **Marc Pallardy** pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour ses questions intéressantes pendant les réunions de l'équipe, ses taquineries et son aide précieuse dans la finalisation des articles. Je remercie aussi la directrice de l'unité UMR996, le **Dr. Françoise Bachelier** pour m'avoir accueilli au sein de l'unité et m'avoir accordé autant de soutien.

Je remercie tous mes collègues de l'**UMR996** qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions. Je désire remercier très spécialement, mes très chers amis (ex-) doctorants **Chloé**, **Rami** et **Myriam** qui ont toujours été là pour moi et avec qui je partage les



plus forts souvenirs de la thèse. **Cloco** ou titine, je suis content d'avoir gagné une amie pétillante comme toi... Toutes nos discussions et les moments partagés avec toi seront bien protégés de l'oubli... Notamment le fameux mail que je dois recevoir dans 10 ans ! **Rami**, je te remercie d'être un collègue excellent ; j'ai beaucoup apprécié ton implication, ton souci du détail et toutes nos discussions scientifiques. Merci d'avoir écouté quand j'avais besoin de parler, aller dans ton bureau était un vrai soulagement ! **Myriam**... j'avoue que c'était dur pour moi de te comprendre au début, mais du moment où t'as commencé à parler Allemand, tout s'est très bien passé ! Je te remercie pour tout ce que tu as apporté au labo, surtout ta bonne humeur quotidienne défiant toutes les hormones !

Une petite pensée à la riche collègue **Elodie** ; ravi d'avoir fait ta connaissance même si tu ne m'as pas offert un cytomètre comme promis ! Je remercie ma voisine de bureau **Vanessa** pour son sens de l'humour et pour m'avoir appris tant d'expressions françaises « originales ». Un grand MERCI à **Benoit** et **Marie-Hélène** pour leur participation aux expériences animales, même si la souris n'était pas leur animal préféré ! **Benoit**, tu sais quoi ?? Bon j'arrête là. Les petites et les grandes discussions avec **Muriel**, **Isabelle B.** et **Marie-Hélène** vont particulièrement me manquer. **Marie-Hélène**, merci pour ta tendresse et ton implication... Deux mots : Tu gères ! **Muriel**, merci pour ton sens de l'humour, ta spontanéité et ton travail rigoureux. **Isabelle**, n'oublie pas que tu dois m'emmener un jour à la Réunion pour y trouver ma moitié !

Je tiens à remercier **Natacha** pour toute l'hygiène d'amitié et la sécurité d'échange puis remercier **Kim**, **Isabelle T.**, **Viviana**, **Luc** et **Armelle** pour leur amitié, leur soutien inconditionnel et leur encouragement. Je voudrais adresser toute ma gratitude à **Aude Gleizes**, qui fut la première à me faire découvrir l'enseignement universitaire. Je tiens en outre à souligner le profond intérêt que m'a inspiré l'encadrement des deux étudiantes de M2 « **Sarah B.** et **Sara S.** ». Mes **Sara**² ; le travail avec vous fut une expérience inoubliable, je vous souhaite le meilleur surtout dans votre vie



professionnelle. De même je souhaite le meilleur à tous les étudiants de Master avec qui j'ai pu échanger, surtout ma très chère amie portugaise **Marta** ainsi que **Stéphane, Marie, Mathilde, Ahmad** et **Alexia**... Bon courage aux nouveaux arrivants : **Kevin, Khadi, Qianqian, Romain** et **Marine**... C'est dommage de ne pas pouvoir travailler avec vous !

Un grand merci à **Myriam, Mathilde** et **Romain** qui m'ont apporté une aide précieuse pour la finalisation de ce manuscrit pendant la chaude canicule d'été. Je remercie aussi le personnel des plateformes, notamment **Marie-Laure, Françoise G., Hélène, Claudine, Valérie** et **Ayma**. Je remercie mes chers amis doctorants : **Naghm, Julie** et **Carmen** ainsi que **Joyce, Mathias** et **Vincent**. Nos soirées folles entre doctorants resteront un beau souvenir non studieux de la thèse ! Je ne suis pas prêt d'oublier les membres de l'association des doctorants en innovation thérapeutique « **ADIT** ». Notre dévouement pour l'organisation des journées de l'école doctorale et pour le soutien des doctorants nous a conduits à se serrer les coudes en formant une véritable famille.

Enfin, je tiens à remercier très sincèrement la **France** qui m'a accueilli pour mes études de Master et qui a eu l'immense générosité de financer ce projet de thèse ; je suis très reconnaissant et redevable d'une formation dont je suis fier.





Table des matières

I. AVANT-PROPOS	17
II. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	21
1. La vie du neutrophile : développement et fonctions	21
1.1. Développement du neutrophile dans la moelle osseuse	21
1.1.1. Origine du polynucléaire neutrophile.....	21
1.1.2. La granulopoïèse.....	23
1.1.3. La granulopoïèse d'urgence	24
1.2. Migration du neutrophile	25
1.2.1. Mobilisation du neutrophile: de la moelle osseuse à la circulation sanguine	25
1.2.2. Transmigration du neutrophile: du vaisseau sanguin aux tissus périphériques ...	27
1.3. Les fonctions majeures du neutrophile	29
1.3.1. Activation initiale et reconnaissance des pathogènes	29
1.3.2. La production des cytokines.....	30
1.3.3. La phagocytose	33
1.3.3.1. Le neutrophile : une cellule phagocytaire puissante.....	33
1.3.3.2. Les défauts de la phagocytose.....	34
1.3.3.3. Spécificités de la phagocytose du neutrophile.....	35
1.3.4. L'explosion oxydative du neutrophile.....	36
1.3.4.1. Mécanismes de production des FRO.....	36
1.3.4.2. Les FRO : au-delà des effets antimicrobiens.....	38
1.3.5. La dégranulation	39
1.3.6. La nétose	40
1.3.6.1. Les mécanismes de nétose.....	41
1.3.6.2. Nétose ou phagocytose ?.....	42
1.3.6.3. Pouvoir antimicrobien des NETs.....	43
1.3.6.4. Rôle des NETs dans la physiopathologie de maladies inflammatoires.....	44
1.4. L'hétérogénéité des neutrophiles : polarisation ou sous-populations prédéfinies ?..	45
1.4.1. Les sous-populations dans les conditions non-inflammatoires.....	45
1.4.2. Les sous-populations dans les conditions inflammatoires.....	47
1.5. Clairance du neutrophile	48
1.5.1. L'apoptose et l'efferocytose.....	48
1.5.2. La migration inverse.....	51



2. Rôle émergent du neutrophile dans l'hypersensibilité de contact	53
2.1. La dermatite allergique de contact	53
2.2. Diagnostic	54
2.3. Traitement	55
2.4. Le modèle expérimental de la DAC	56
2.5. La place du neutrophile dans l'HSC : aperçu historique	59
3. Nrf2 involvement in the chemically-induced skin innate immunity	64
3.1. Cutaneous innate immunity	65
3.1.1. Principal resident and recruited innate immune cells	66
3.2. Skin exposure to chemical sensitizers	69
3.2.1. Allergic contact dermatitis	69
3.2.2. Haptens recognition by skin cells	70
3.3. Skin gets by with a little help from Nrf2	71
3.3.1. Nrf2 in oxidative/xenobiotic stress	71
3.3.2. Nrf2 in inflammation: crosstalk with NF-κB and inflammasomes	72
3.3.3. Regulation of skin innate immunity by Nrf2	74
3.4. Future directions	79
 III. ÉTUDE EXPERIMENTALE	 83
1. Objectifs du travail	83
2. Résultats expérimentaux	85
2.1. Manuscrit 1 : Nrf2 diminue l'activation des neutrophiles en réponse au zymosan et module la migration	86
2.2. Manuscrit 2 : Nrf2 régule le recrutement et l'accumulation des neutrophiles au cours de l'hypersensibilité de contact	131
 IV. DISCUSSION	 177
 V. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	 193
 VI. REFERENCES	 199



Liste des figures

Figure 1 : La voie classique et les voies alternatives de l'hématopoïèse. D'après Nandakumar <i>et al.</i> 2016.	22
Figure 2 : Les principales étapes de la granulopoïèse et le contenu des granulations formées à chaque stade. Adapté de Lawrence <i>et al.</i> 2018.	23
Figure 3 : Rôle du facteur de transcription C/EBP (α et β) dans la régulation et l'orientation de la granulopoïèse. D'après Hirai <i>et al.</i> 2015.	24
Figure 4 : Régulation chimiokine-dépendante de la mobilisation des neutrophiles de la moelle osseuse vers le sang à l'état normal et au cours de l'inflammation.	26
Figure 5 : Étapes de la transmigration leucocytaire à travers l'endothélium vasculaire et les molécules clés impliquées. Adapté de Hyun <i>et al.</i> 2017.	28
Figure 6 : Les principales cytokines secrétées par les neutrophiles humains. D'après Tamassia <i>et al.</i> 2018.	32
Figure 7 : Un neutrophile phagocytant des <i>Staphylococcus aureus</i> opsonisés en utilisant les différents mécanismes bactéricides. Adapté de McGuinness <i>et al.</i> 2016.	34
Figure 8 : L'implication de la phagocytose frustrée dans un modèle inflammatoire de polyarthrite rhumatoïde. D'après Paoliello-Paschoalato <i>et al.</i> 2015.	35
Figure 9 : L'assemblage des sous-unités de la NADPH oxydase au cours de l'activation du neutrophile. D'après El-Benna <i>et al.</i> 2016.	37
Figure 10 : La fusion membranaire médiée par la formation du complexe SNARE composé de 3 t-SNAREs (Qa, Qb et Qc) et 1 v-SNARE (R). Adapté de Sehgal <i>et al.</i> 2011.	40
Figure 11 : Visualisation par microscopie électronique des NETs piégeant les bactéries <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Salmonella typhimurium</i>. D'après Brinkmann <i>et al.</i> 2004.	41
Figure 12 : Les mécanismes de la nétose classique lytique et la netose rapide vitale. D'après Papayannopoulos. 2018.	42
Figure 13 : Choix entre phagocytose et nétose en fonction de la taille du pathogène. D'après Wheeler & Underhill. 2014.	43
Figure 14 : Analyse phénotypique des neutrophiles d'un donneur sain en fonction de l'expression du CD177 et/ou de l'OLFM4. D'après Welin <i>et al.</i> 2013.	46
Figure 15 : La polarisation et les fonctions des neutrophiles associés aux tumeurs N1/N2. Adapté de Piccard <i>et al.</i> 2011.	47
Figure 16 : Les récepteurs et ligands fortement impliqués dans l'efferocytose. Adapté de Greenlee-Wacker <i>et al.</i> 2016.	50
Figure 17 : L'altération de l'efferocytose en conditions pathologiques induisant une nécrose secondaire. Adapté de Roth <i>et al.</i> 2015.	50
Figure 18 : Schéma récapitulatif des fonctions antimicrobiennes du neutrophile après	



sa transmigration endothéliale. D'après Mócsai. 2013.....	52
Figure 19 : Aspects cliniques des éruptions eczémateuses induites par le nickel et des éruptions morbilliformes dans une dermatite médicamenteuse à l'ampicilline. D'après <i>Color Atlas of Pediatric Dermatology 2008</i>.....	54
Figure 20 : L'implication du neutrophile dans les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'HSC.	62
Figure 21 : Historique des études portant sur le rôle du neutrophile dans l'HSC.	63
Figure 22 : Crosstalk between Nrf2 and NF-κB transcription factors.	74
Figure 23 : Role of Nrf2 in the principal skin innate immune cells including keratinocytes, dendritic cells and macrophages.....	78
Figure 24 : Nrf2 stabilization and anti-inflammatory effects following immune cells exposure to chemical sensitizers.....	78
Figure 25 : Schéma récapitulatif montrant le rôle protecteur de Nrf2 dans le neutrophile activé par le zymosan A.	184
Figure 26 : Schéma récapitulatif montrant le rôle protecteur de Nrf2 dans la réponse allergique cutanée au DNCB.....	188



Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des plus importants récepteurs du neutrophile.....	30
Tableau 2 : Structure chimique et catégorisation de quelques molécules chimiques sensibilisantes.	57
Tableau 3 : Principal functions of five antioxidant enzymes encoded by Nrf2 target genes....	72



Liste des abréviations

CCL	C-C motif chemokine ligand	LB	Lymphocyte B
CGD	Chronic granulomatous disease	LPS	Lipopolysaccharide
CR	Récepteur du complément	LT	Lymphocyte T
CSH	Cellule souche hématopoïétique	LTreg	Lymphocyte T régulateur
CXCL	C-X-C chemokine ligand	MerTK	Myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase
CXCR	C-X-C chemokine receptor	MMP	Métalloprotéinase
DAC	Dermatite allergique de contact	MPO	Myéloperoxydase
DAMP	Damage-associated molecular patterns	NET	Neutrophil extracellular traps
DC	Cellule dendritique	NK	Natural killer
DNCB	Di-nitro-chlorobenzène	NLR	NOD-like receptor
EBP	CCAAT/enhancer binding protein	Nrf2	Nuclear factor erythroid-2-related factor 2
ECM	Matrice extracellulaire	OLFM4	Olfactomedine 4
FcR	Constant fragment receptor	PAMP	Pathogen associated molecular patterns
FRO	Formes réactives d'oxygène	PRR	Pattern recognition receptor
G-CSF	Granulocytes-colony stimulating factor	PS	Phosphatidylserine
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène	rTEM	Reverse transendothelial migration
HSC	Hypersensibilité de contact	TAN	Neutrophiles associés aux tumeurs
ICAM	Intercellular adhesion molecule	Th	T helper
IFN-	Interféron	TLR	Toll-like receptor
Ig	Immunoglobuline	TNF	Tumor necrosis factor
IL-	Interleukine-	VCAM	Vascular cell adhesion molecule
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1	VLA-4	Very later antigen-4



AVANT-PROPOS



I. AVANT-PROPOS

Les neutrophiles sont les cellules les plus abondantes de la circulation sanguine. Ils sont dotés d'un puissant pouvoir antimicrobien leur permettant de former une première ligne de défense contre les pathogènes. Les nombreux travaux de ces dernières années ont mis en évidence le rôle central du neutrophile dans le système immunitaire. Des fonctions et des mécanismes originaux ont été décrits tels que la nétose, la migration inverse, la production d'une grande variété de cytokines ainsi que l'identification de différentes sous-populations. Leur implication dans la réponse immunitaire ne se limite pas à la réponse anti-infectieuse, mais concerne aussi les inflammations stériles. L'un des exemples est leur participation indispensable à l'initiation et l'orchestration de la réponse inflammatoire cutanée dans la dermatite allergique de contact (DAC), pathologie que nous avons choisi de développer durant ce travail de thèse.

En parallèle des études explorant l'implication du neutrophile en physiopathologie, d'autres études se sont focalisées sur la recherche des mécanismes régulateurs permettant de réduire ou d'orienter l'activation des neutrophiles. Un des buts est d'intégrer ces connaissances dans des stratégies thérapeutiques permettant d'améliorer la résolution des inflammations chroniques sans induire une immunosuppression systémique.

Le facteur de transcription Nrf2 (abréviation de *nuclear factor erythroid-2-related factor 2*) fait partie d'une voie régulatrice connue pour ses propriétés anti-oxydantes. Ces dernières sont liées à l'activation transcriptionnelle de gènes cytoprotecteurs codant pour des enzymes qui régulent l'homéostasie redox et éliminent les oxydants. Un rôle anti-inflammatoire de Nrf2 a également été décrit dans certaines cellules de l'immunité innée comme les macrophages et les cellules dendritiques. Notre équipe a précédemment mis en évidence un rôle protecteur anti-inflammatoire de Nrf2 dans les cellules dendritiques en réponse aux molécules chimiques allergisantes *in vitro* et dans un modèle d'allergie cutanée.



L'objectif de ce travail de thèse est d'approfondir les connaissances sur l'implication de Nrf2 dans la biologie du neutrophile. En premier lieu nous étudierons le rôle de Nrf2 dans la régulation des fonctions du neutrophile. Puis nous analyserons en second lieu la capacité de Nrf2 à moduler le recrutement, l'activation et l'accumulation des neutrophiles dans un modèle d'allergie cutanée.

Ce manuscrit de thèse comporte une étude bibliographique, deux études expérimentales et une discussion des résultats.

La première partie de l'étude bibliographique décrit l'origine, le développement et les fonctions du neutrophile. La seconde partie décrit la DAC et détaille l'historique de l'émergence du rôle du neutrophile dans l'allergie cutanée. Enfin, la troisième partie présente le facteur de transcription Nrf2 et son rôle dans la régulation de la réponse immunitaire innée aux molécules chimiques allergisantes ; cette partie-là est rédigée sous la forme d'une Revue Générale destinée à être publiée.

L'étude expérimentale comporte 2 articles scientifiques: dans le premier, nous étudions *in vitro* l'implication de Nrf2 dans la régulation des fonctions des neutrophiles murins incluant l'explosion oxydative, la nétose, la production de cytokines, la phagocytose et la migration. Dans le deuxième article, nous étudions la capacité de Nrf2 à contrôler le recrutement et l'activation des neutrophiles dans un modèle murin d'allergie cutanée. Les deux articles se basent sur des approches et techniques variées permettant de mieux comprendre l'implication de Nrf2 dans la régulation des fonctions du neutrophile.

Bien que ces travaux s'intègrent dans un cadre de recherche fondamentale, ils permettent de formuler des hypothèses sur de nouveaux axes thérapeutiques pour la résolution des inflammations chroniques dépendantes du neutrophile.



ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE



II. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La vie du neutrophile : développement et fonctions

1.1. Développement du neutrophile dans la moelle osseuse

1.1.1. Origine du polynucléaire neutrophile

La production des polynucléaires neutrophiles dans la moelle osseuse constitue environ 60% du total de l'activité hématopoïétique (1). Selon le modèle classique hiérarchique, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) peuvent se différencier en progéniteurs lymphoïdes communs (PLC) ou en progéniteurs myéloïdes communs (PMC). A leur tour, ces derniers se différencient en progéniteurs monocytes granulocytes (PMG) ou en progéniteurs mégacaryocytes érythroïdes (PME), alors que les PLC donnent naissance aux lymphocytes B (LB), aux lymphocytes T (LT) et aux NK (abréviation de *natural killer*). Les PMG se différencient en monoblastes donnant naissance aux monocytes ou en myéloblastes donnant naissance aux granulocytes matures (basophiles, éosinophiles, mastocytes et neutrophiles) suite à la granulopoïèse. Les PME sont à la base de la formation des plaquettes sanguines et des globules rouges. Des voies alternatives ont été décrites permettant une différenciation directe des CSH en PMC, PME, mégacaryocytes ou en LMPP (abréviation de *lymphoid primed multipotent progenitor*) (**Figure 1**).



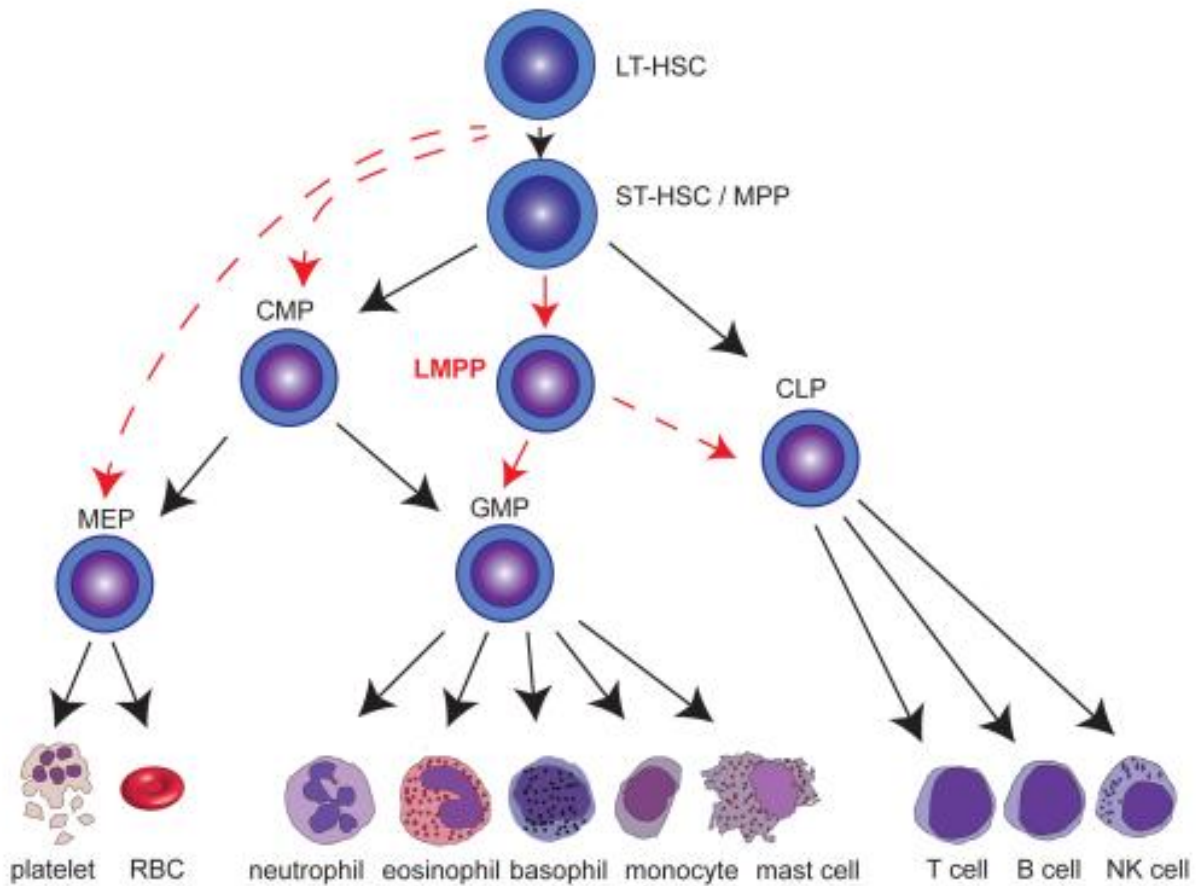


Figure 1 : La voie classique et les voies alternatives de l'hématopoïèse. D'après Nandakumar *et al.* 2016.

LT-HSC, long-term HSC; *ST-HSC*, short-term HSC; *RBC*, red blood cell; *LMPP*, lymphoid primed multipotent progenitor.

La prolifération et la différenciation des CSH sont essentiellement orchestrées par le microenvironnement cellulaire nommé niche hématopoïétique et par certains facteurs de transcription tels que le C/EBPs (abréviation de *CCAAT/enhancer binding proteins*) et GATA-1 (abréviation de *GATA Binding Protein 1*) (2-4). En effet, la différenciation des PMG en neutrophiles nécessite l'acétylation du C/EBPs ainsi qu'une diminution de l'expression du facteur GATA-1 (5,6). Les CSH qui donnent naissance aux neutrophiles se trouvent dans des niches spécialisées situées dans les régions trabéculaires des os longs ou dans les espaces compris entre le tissu osseux et la moelle osseuse. Cette localisation leur assure une proximité avec les ostéoblastes sécrétant la chimiokine CXCL12 nécessaire pour la régulation de la mobilisation des neutrophiles hors de la moelle osseuse (7,8).



1.1.2. La granulopoïèse

Le développement des neutrophiles dans la moelle osseuse, du stade myéloblaste jusqu'à l'obtention d'un neutrophile mature correspond à la granulopoïèse. Ce développement dure environ 14 jours pendant lesquels les granulations sont formées dans le cytoplasme alors que le noyau acquiert sa forme segmentée. Ainsi la moelle osseuse peut renfermer trois pools cellulaires : (a) un pool de cellules souches contenant les CSH et des progéniteurs pluripotents (PMG), (b) un pool mitotique formé à partir des myéloblastes, promyélocytes et myélocytes, (c) et un troisième pool post-mitotique renfermant les métamyélocytes, les neutrophiles non-segmentés (*band neutrophils*) et les neutrophiles matures (9,10). Ces derniers possèdent un noyau segmenté et au moins trois types de granulations contenant plus de 700 protéines (11,12). La formation des différents types de granulations accompagne la transformation du noyau de sa forme arrondie à sa forme segmentée (**Figure 2**). Les granulations azurophiles ou primaires apparaissent dans le myéloblaste et le promyélocyte dont le noyau est large et arrondi. Puis, l'arrêt de la mitose est marqué par la formation des granulations spécifiques ou secondaires jusqu'au stade métamyélocyte. Les granulations tertiaires riches en gélatinase sont formées pendant la transformation du métamyélocyte en « *band* » neutrophiles, alors que les granulations riches en ficoline-1 et les vésicules sécrétoires apparaissent pendant la segmentation du noyau caractéristique du neutrophile mature (4,10,13).

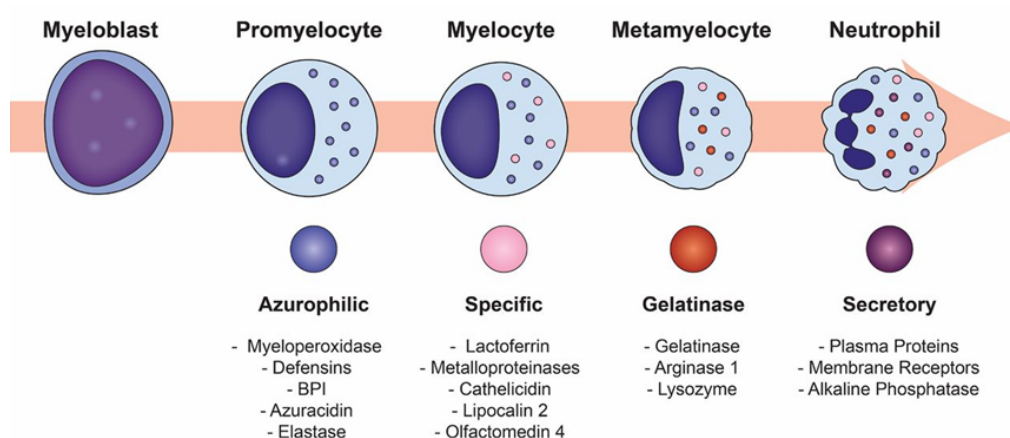


Figure 2 : Les principales étapes de la granulopoïèse et le contenu des granulations formées à chaque stade. Adapté de Lawrence *et al.* 2018.

BPI, Bactericidal/permeability-increasing protein.



1.1.3. La granulopoïèse d'urgence

Étant donné leur recrutement massif et rapide en cas de besoin, un équilibre statique s'avère indispensable entre le stockage, la granulopoïèse et le recrutement des neutrophiles. Ceci impose certaines adaptations en fonction de l'état immunitaire de l'individu, permettant de mettre en place une granulopoïèse pendant la phase de repos et une autre forme de granulopoïèse d'urgence. Dans les conditions normales, la clairance des neutrophiles apoptotiques par les macrophages s'intègre dans un contexte non-inflammatoire ralentissant la granulopoïèse, principalement *via* l'activation de la C/EBP- α suivie par la diminution du niveau du G-CSF (abréviation de *granulocytes-colony stimulating factor*). En revanche, une agression microbienne peut déclencher la granulopoïèse d'urgence médiée par une induction du C/EBP- β favorisant la production des médiateurs pro-inflammatoires tels que l'interleukine-1 β (IL-1 β), le facteur de nécrose tumoral alpha (TNF α) et le G-CSF (**Figure 3**). De ce fait, une mobilisation importante de neutrophiles matures et immatures se met en place, aboutissant à une forte neutrophilie circulante afin de couvrir le besoin en neutrophiles tissulaires dans les infections sévères (14–16). La granulopoïèse d'urgence peut être également induite par une activation directe des TLR (abréviation de *Toll-like receptors*) présents sur les progéniteurs (17). De même, des chimiokines comme le CXCL1, le CXCL2 ou bien le TNF α sont capables d'activer la production des formes réactives de l'oxygène (FRO) par les cellules myéloïdes de la moelle osseuse. Ces FRO activent des cascades de signalisation permettant une importante production de G-CSF qui déclenche la granulopoïèse d'urgence pendant une infection aiguë (18).

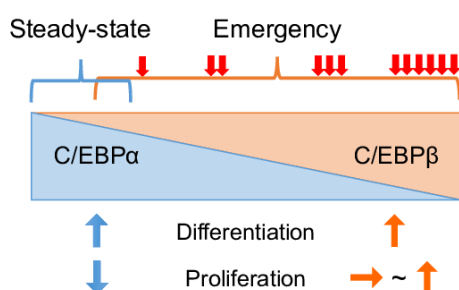


Figure 3 : Rôle du facteur de transcription C/EBP (α et β) dans la régulation et l'orientation de la granulopoïèse. D'après Hirai *et al.* 2015.

C/EBP α est actif à l'état basal. L'activation de C/EBP β permet d'augmenter la production des neutrophiles pendant la granulopoïèse d'urgence. Les deux facteurs C/EBP induisent la différenciation des neutrophiles mais jouent un rôle différent dans la régulation du cycle cellulaire: C/EBP α inhibe la prolifération des granulocytes alors que C/EBP β peut l'activer.



1.2. Migration du neutrophile

La moelle osseuse renferme une réserve de neutrophiles matures qui compte environ 120 millions de cellules chez la souris. Les neutrophiles logent dans la moelle hématopoïétique et doivent migrer à travers l'endothélium sinusoidal adjacent pour rejoindre la circulation sanguine. Cette barrière endothéliale peut jouer un rôle régulateur dans la migration des neutrophiles en surveillant leur mobilisation sélective (19). En revanche, l'homéostasie des neutrophiles dans la circulation dépend principalement de leur taux de prolifération dans la moelle, leur mobilisation de la moelle à la circulation sanguine et leur taux de clairance. A ces trois événements s'ajoute la transmigraton dans les tissus en réponse à des signaux de dangers principalement liés à une infection (20,21).

1.2.1. Mobilisation du neutrophile: de la moelle osseuse à la circulation sanguine

L'axe du récepteur CXCR4 et son ligand CXCL12, puis du récepteur CXCR2 et ses ligands CXCL1 et CXCL2 figurent parmi les principaux acteurs contrôlant l'homéostasie des neutrophiles dans le sang. Les ligands de ces 2 récepteurs sont exprimés d'une façon constitutive dans la moelle osseuse, majoritairement par les ostéoblastes pour le CXCL12 et par les cellules endothéliales pour les ligands du CXCR2. Ces 2 axes ont une action antagoniste sur la mobilisation des neutrophiles : l'axe du CXCR4 et son ligand assure une rétention des neutrophiles dans la moelle osseuse alors que l'axe du CXCR2 et ses ligands permet leur mobilisation (**Figure 4**). Au cours de leur maturation, les neutrophiles diminuent leur expression de CXCR4 en augmentant l'expression du CXCR2, ce qui représente une étape cruciale préparant leur sortie de la moelle osseuse (22–25). L'un des mécanismes permettant au CXCL12 de retenir les neutrophiles dans la moelle, est de favoriser la liaison entre l'intégrine $\alpha_4 \beta_1$ ou le VLA-4 (abréviation de *very later antigen-4*) des neutrophiles et les molécules VCAM-1 (abréviation de *vascular cell adhesion molecule 1*) des cellules endothéliales et stromales de la moelle osseuse (26). Le syndrome WHIM (abréviation de *warts, hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis*) est dû à une mutation de gain de fonction du CXCR4, responsable de l'accumulation des neutrophiles matures dans la moelle et donc



d'une neutropénie. Ce syndrome constitue une preuve du rôle incontestable de la signalisation CXCR4-CXCL12 dans la mobilisation des neutrophiles (27,28). Dans ce conflit entre les deux axes, l'axe CXCR4-CXCL12 semble dominer, étant donné que les neutrophiles doubles déficients en CXCR2 et CXCR4 présentent une migration constitutive. En revanche, les ligands du CXCR2 sont capables de désensibiliser et internaliser le CXCR4 pour inhiber la rétention des neutrophiles (20,24).

En condition inflammatoire, le G-CSF intervient en contrebalançant l'équilibre entre les deux axes de chimiokines. En effet, le G-CSF peut induire d'une façon indirecte une mobilisation des neutrophiles en diminuant le nombre des ostéoblastes sécrétant de CXCL12 et en favorisant la production des ligands du CXCR2 par les cellules endothéliales de la moelle osseuse (29,30). Cependant une étude récente a montré que le G-CSF régulait négativement la migration des neutrophiles de manière CXCR2-dépendante après la phase initiale aiguë de l'inflammation. Ainsi, la neutralisation du G-CSF *in vivo* augmente le recrutement des neutrophiles au cours des phénomènes inflammatoires (31).

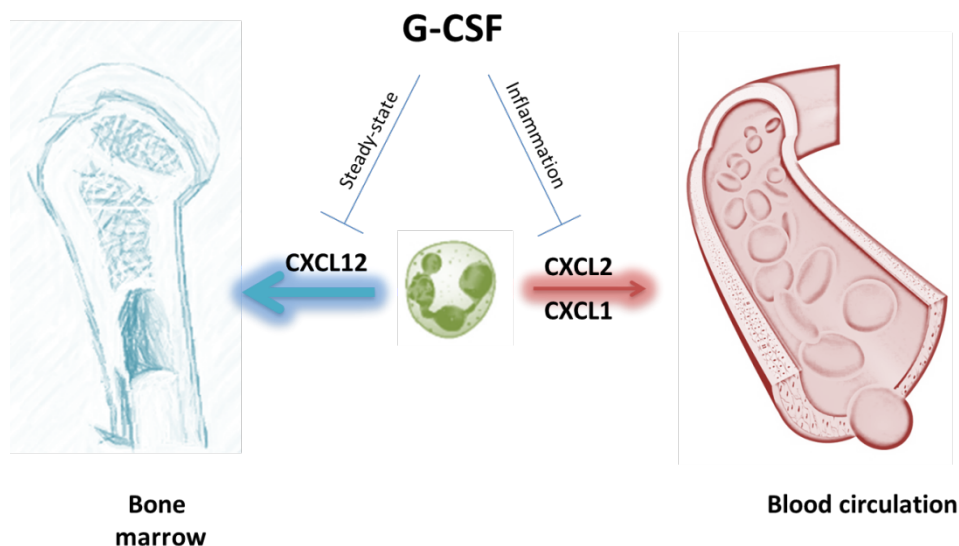


Figure 4 : Régulation chimiokine-dépendante de la mobilisation des neutrophiles de la moelle osseuse vers le sang à l'état normal et au cours de l'inflammation.

La chimiokine CXCL12 assure la rétention du neutrophile dans la moelle osseuse alors que les chimiokines CXCL1 et CXCL2 permettent sa mobilisation vers la circulation sanguine. Le G-CSF inhibe CXCL12 à l'état basal et inhibe les chimiokines CXCL1 et CXCL2 au cours de l'inflammation.



1.2.2. Transmigration du neutrophile: du vaisseau sanguin aux tissus périphériques

Dans la circulation sanguine, les neutrophiles assurent un rôle de surveillance des potentiels signaux d'alarme les conduisant à infiltrer les tissus. Suite à une invasion par un agent infectieux ou une lésion traumatique par exemple, l'homéostasie tissulaire est altérée par un grand nombre de stimulants incluant les motifs moléculaires associés à des pathogènes (PAMP) et les motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (DAMP). Par conséquent, les cellules sentinelles telles que les macrophages, les mastocytes et les cellules stromales sont activées en réponse à ces signaux de danger et secrètent des chimiokines et des médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF α attirant les neutrophiles (32). Ces derniers sont aussi capables de détecter les premiers signaux de danger *via* leurs récepteurs de reconnaissance de motifs (PRR). L'un des premiers DAMP recrutant les neutrophiles est le gradient des FRO incluant le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). En effet, l'H₂O₂ peut être produit par les cellules épithéliales grâce à l'enzyme dual oxydase (DUOX1) ; ce phénomène a été mis en évidence dans le modèle de poisson-zèbre (33,34). Sachant que le pic de production d'H₂O₂ semble très rapide, le maintien du recrutement des neutrophiles dépend des médiateurs lipidiques comme les leucotriènes et des chimiokines, surtout celles de la famille CXCL8 incluant le CXCL1, CXCL2 et CXCL8 (35).

Une fois activés, les neutrophiles doivent transmigrier à travers l'endothélium des veinules post-capillaires pour entrer dans les tissus périphériques. Cette transmigration nécessite une cascade d'événements comportant les étapes suivantes : l'attachement initial à l'endothélium vasculaire (*tethering*), le roulement (*rolling*) le long de l'endothélium, l'activation des intégrines par les chimiokines, le ralentissement du roulement (*slow rolling*), l'adhérence stable (*arrest*) et la migration apicale puis la migration à travers l'endothélium (**Figure 5**). L'étape de roulement implique majoritairement les L-sélectines qui se fixent à leurs ligands exprimés à la surface des cellules endothéliales comme les E- et P- sélectines ainsi que la P-sélectine glycoprotéine ligand-1 (PSGL-1). Cela provoque une activation des intégrines telles que l' $\alpha_L\beta_2$ -intégrine ou LFA-1 (abréviation de *lymphocyte function-associated antigen 1*) et l'antigène du macrophage-1



CD11b/CD18 (Mac-1 ou $\alpha_M\beta_2$ -intégrine) suivie d'une diminution voire une perte de l'expression des sélectines par coupure protéolytique. En outre, les chimiokines augmentent l'affinité entre les intégrines β_2 et les ICAM-1 (abréviation de *intercellular adhesion molecule-1*) permettant l'adhérence ferme qui précède la transmigration. D'autres molécules d'adhésion comme la PECAM (abréviation de *platelet endothelial cell adhesion molecule*) et le CD99 sont exprimés à la fois sur les neutrophiles et les cellules endothéliales et jouent un rôle adjuvant dans la transmigration. Les neutrophiles migrent préférentiellement par voie paracellulaire entre les cellules endothéliales mais peuvent aussi migrer par voie transcellulaire en traversant la cellule endothéliale quand l'expression des ICAM-1 est très forte ou quand les jonctions endothéliales sont très serrées comme dans la barrière hémato-encéphalique (20,32,36–40). Les protéases exprimées par les neutrophiles facilitent la transmigration, notamment par la dégradation de la matrice extracellulaire (ECM) (41,42). De même, il a été montré dans un modèle d'arthrite rhumatoïde que les premiers pools de neutrophiles recrutés produisent des cytokines comme l'IL-1 β , le CXCL2 et le CCL3 afin d'amplifier la transmigration des neutrophiles sanguins (43).

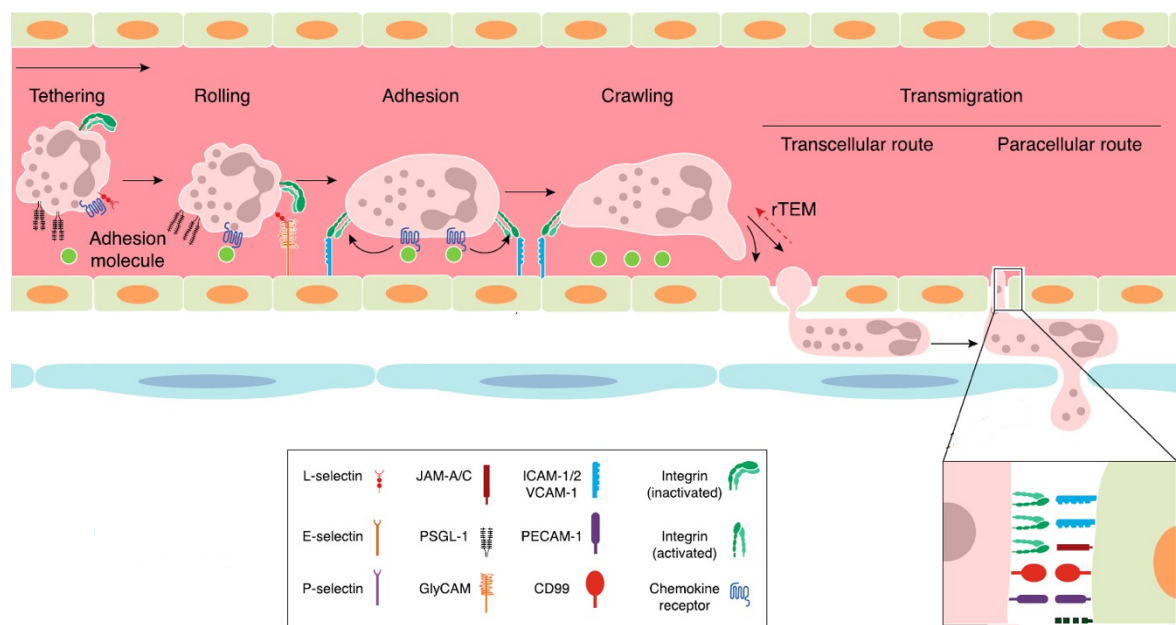


Figure 5 : Étapes de la transmigration leucocytaire à travers l'endothélium vasculaire et les molécules clés impliquées. Adapté de Hyun *et al.* 2017.

JAM, junctional adhesion molecule; *PSGL-1*, P-selectin glycoprotein ligand-1; *GlyCAM*, Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-; *ICAM-1*, intercellular adhesion molecule 1; *VCAM-1*, vascular cell-adhesion molecule-1, *PECAM-1*, platelet/endothelial-cell adhesion molecule-1; *rTEM*, reverse transendothelial migration.



1.3. Les fonctions majeures du neutrophile

1.3.1. Activation initiale et reconnaissance des pathogènes

Bien que les neutrophiles circulants soient quiescents, leur activation commence avant la transmigration à travers l'endothélium vasculaire. Une fois dans le tissu, les neutrophiles complètent leur activation et acquièrent les fonctions nécessaires pour défendre l'organisme contre les pathogènes; notamment la dégranulation, la phagocytose et l'explosion oxydative (44). L'étape initiale de l'activation des neutrophiles, appelée aussi amorçage ou *priming*, nécessite la reconnaissance des pathogènes ou des PAMP par à une large variété de récepteurs membranaires et intracellulaires incluant les PRR, les récepteurs pour les opsonines et les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (36). Parmi les PRR, les récepteurs lectines de type-C tel que la Dectine-1, les différents TLR surtout TLR-2 et -4 ainsi que les NOD-1 et -2 (abréviation de *nucleotide-binding oligomerization domain*) sont décrits pour leur rôle dans le *priming* des neutrophiles après la reconnaissance des PAMP (39,45–47). De même, les récepteurs pour les opsonines tels que les récepteurs du complément CR3 et CR4, ainsi que les récepteurs de la partie Fc des immunoglobulines G (IgG) nommés FcγR, sont indispensables pour initier la phagocytose (48,49) **(Tableau 1)**.



Tableau 1 : Liste des plus importants récepteurs du neutrophile (50).

<u>Les récepteurs couplés aux protéines G</u>	<u>Les récepteurs Fc</u>	<u>Les récepteurs des molécules d'adhérence</u>	<u>Les récepteurs aux cytokines</u>	<u>Les récepteurs de l'immunité innée</u>
<p>Récepteurs au formyl-peptides</p> <ul style="list-style-type: none"> • FPR1 (FPR) • FPR2 (FPRL1) • FPR3 (FPRL2) <p>Les récepteurs aux chimio-attractants</p> <ul style="list-style-type: none"> • BLT1 (LTB₄-rec.) • BLT2 (LTB₄-rec.) • PAFR • C5aR <p>Les récepteurs aux chimiokines</p> <ul style="list-style-type: none"> • CXCR1 (humain) • CXCR2 • CCR1 • CCR2 	<p>Récepteurs Fcγ</p> <ul style="list-style-type: none"> • FcγRI • FcγRIIA (humain) • FcγRIIB (inhibiteur) • FcγRIII (murin) • FcγRIIB (humain) • FcγRIV (murin) <p>Récepteurs Fcα</p> <ul style="list-style-type: none"> • FcαRI (humain) <p>Récepteurs Fcϵ</p> <ul style="list-style-type: none"> • FcϵRI • FcϵRII 	<p>Sélectines et ligands sélectines</p> <ul style="list-style-type: none"> • L-selectin • PSGL-1 <p>Intégrines</p> <ul style="list-style-type: none"> • LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) • Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) • VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) 	<p>Récepteurs des cytokines de type I</p> <ul style="list-style-type: none"> • IL-4R • IL-6R • IL-12R • IL-15R • G-CSFR • GM-CSFR <p>Récepteurs des cytokines de type II</p> <ul style="list-style-type: none"> • IFNAR (IFNα/β-rec.) • IFNGR • IL-10R <p>Famille IL-1R</p> <ul style="list-style-type: none"> • IL-1RI • IL1RII (decoy) • IL-18R <p>Famille TNFR</p> <ul style="list-style-type: none"> • TNFR1 (p55) • TNFR2 (p75) • Fas • LTβR • RANK • TRAIL-R2 • TRAIL-R3 	<p>Toll-like receptors</p> <ul style="list-style-type: none"> • TLR1 • TLR2 • TLR4 • TLR5 • TLR6 • TLR7 (?) • TLR8 • TLR9 <p>Lectines de type C</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dectin-1 • Mincle • MDL-1 • Mcl • CLEC-2 <p>NOD-like receptors</p> <ul style="list-style-type: none"> • NOD2 • NLRP3 <p>RIG-like receptors</p> <ul style="list-style-type: none"> • RIG-I • MDA5

1.3.2. La production des cytokines

Les cytokines constituent une grande famille de protéines qui créent des réseaux de communication et induisent des réseaux de signalisation régulant le développement et les fonctions des cellules immunitaires. Le neutrophile mature a été longtemps considéré comme une cellule hautement différenciée incapable de produire des protéines. Depuis une quinzaine d'années, il est indiscutable que cette cellule est une source importante et variée de cytokines, suggérant un rôle dans la coordination et la régulation de la réponse immunitaire (51,52).

Les chimiokines représentent une grande partie des cytokines libérées par le neutrophile, soit par



dégranulation d'un stock pré-formé, soit par synthèse. Suite à son activation, le neutrophile peut sécréter une variété de chimiokines telles que le CXCL8, CXCL1, CXCL9, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, CCL17 et CCL20 (52,53). Les différentes chimiokines produites par le neutrophile contribuent au recrutement des cellules immunitaires incluant les monocytes, les cellules dendritiques (DC), les NK et les LT (54). A titre d'exemple, le surnageant des neutrophiles activés par l'interféron- γ (IFN- γ) et le lipopolysaccharide (LPS) induit le chimiotactisme des LT *helper* 17 (Th17) d'une façon CCL2 et CCL20 dépendante (55). La sous-population des neutrophiles associés aux tumeurs (TAN) secrètent des quantités importantes de CCL17 qui attirent les LT régulateurs (Treg) et altèrent ainsi l'immunité anti-tumorale (56). De même, les chimiokines sécrétées par les neutrophiles peuvent participer à l'auto-entretien de leur propre recrutement comme par exemple dans certains modèles d'arthrite via la sécrétion du leucotriène B4 (LTB4), du CCL3, du CXCL2 et de l'IL-1 β (43).

Hormis les chimiokines, les neutrophiles activés peuvent sécréter une grande variété de cytokines pro-inflammatoires, immuno-régulatrices ou anti-inflammatoires (**Figure 6**). Parmi les cytokines pro-inflammatoires sécrétées chez l'homme et la souris les plus importantes sont l'IL-1 α et β , l'IL-6, le TNF α et l'IL-18 (52,57). La capacité inédite des neutrophiles à produire l'IL-17 a pris un intérêt particulier pendant ces dernières années. Dans un modèle d'ischémie rénale comme dans le psoriasis, les neutrophiles constituent une source majeure d'IL-17 (58,59). En outre, la production de TNF α par les neutrophiles semble jouer un rôle important dans l'immunité cutanée : i) elle permet d'orienter l'activation et la migration des cellules de Langerhans dans un contexte vaccinal antiviral (60); ii) elle favorise la progression tumorale dans un modèle de mélanome induit par les radiations ultraviolettes (61). Ceci rejoint une autre étude montrant que l'IL-8 des neutrophiles augmente l'affinité et la stabilité de leurs interactions avec les cellules tumorales pour initier les métastases (62). De même les neutrophiles participent à la régulation de la maturation, la survie et les fonctions des lymphocytes B via la sécrétion de l'IL-21, du facteur BAFF (abréviation de *B-cell activating factor*) et du ligand APRIL (abréviation de *A proliferation-inducing ligand*), tous deux



membres de la famille des ligands TNF (63–65). La capacité des neutrophiles à produire l’IL-6 a été longtemps controversée dans la littérature. Une étude moléculaire récente, montre que des ligands TLR8 induisent des modifications post-transcriptionnelles au niveau de la chromatine du gène codant pour l’IL-6, permettant l’activation de ce dernier. Ainsi, l’étude démontre la capacité de production de l’IL-6 par les neutrophiles humains et le rôle du TNF α endogène permettant son amplification (57,66). Une autre étude récente montre que la libération de l’élastase et de la cathépsine G pendant la nétose activent l’IL-1 α et les cytokines de la famille de l’IL-36 (67).

La production de ces cytokines par le neutrophile confirme son rôle central dans la physiopathologie de nombreuses maladies inflammatoires aiguës et chroniques.

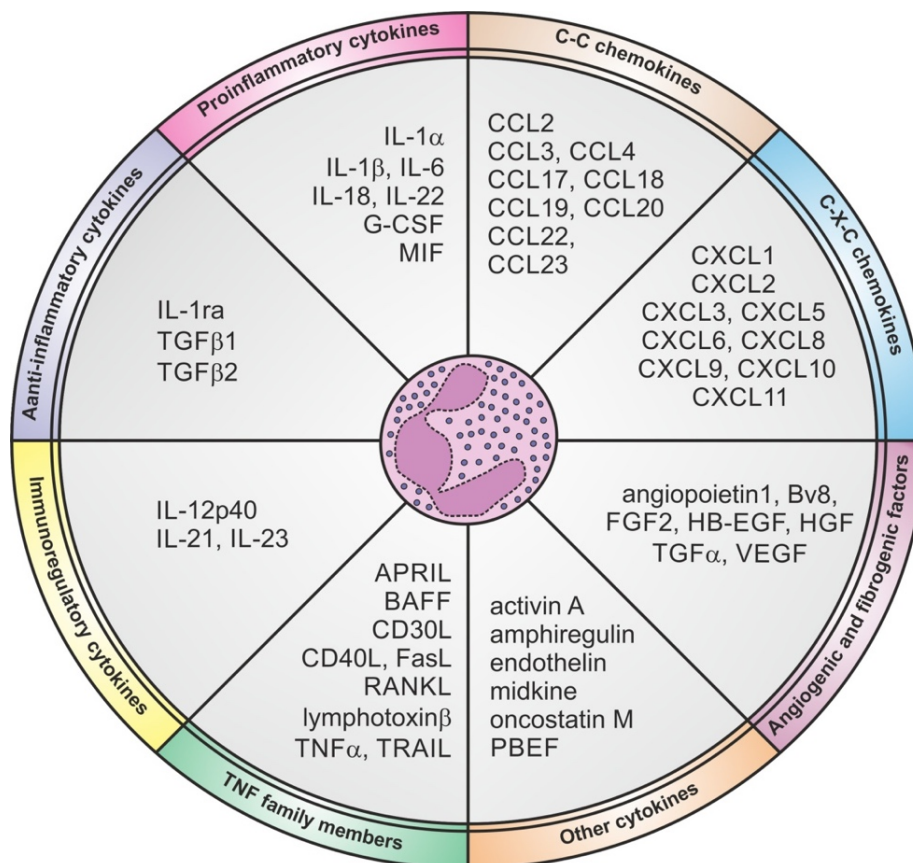


Figure 6 : Les principales cytokines secrétées par les neutrophiles humains. D’après Tamassia *et al.* 2018.



1.3.3. La phagocytose

1.3.3.1. Le neutrophile : une cellule phagocytaire puissante

La phagocytose est découverte par Elie Metchnikoff à la fin du XIX^{ème} siècle, grâce à l'observation de cellules entourant et ingérant une particule solide étrangère injectée dans le corps transparent d'une larve d'étoile de mer (68). En effet, la phagocytose est décrite actuellement comme une forme d'endocytose permettant aux cellules phagocytaires d'ingérer des particules solides ayant une taille supérieure à 0.5 μm (69). Elle se distingue de l'efferocytose et de la nécroptose qui correspondent à l'ingestion des cellules apoptotiques et nécrotiques respectivement (70). Les phagocytes professionnels incluent les éosinophiles, les monocytes, les macrophages, les DC, les ostéoclastes et les neutrophiles. Ces derniers sont des cellules phagocytaires de haut niveau, capable de phagocyter des particules ou des pathogènes opsonisés en quelques secondes (71). Ce mécanisme est médié par une cascade de signalisation et des réarrangements du cytosquelette avec l'engagement des récepteurs lectines de type-C et les récepteurs pour les opsonines. Ceci permet d'englober et d'enfermer les pathogènes opsonisés dans une vacuole appelée le « phagosome » (**Figure 7**). La maturation de ce dernier nécessite sa fusion avec les granulations primaires et secondaires qui déversent leur contenu bactéricide, principalement la myéloperoxydase (MPO) et l'élastase des granulations primaires azurophiles. Ceci permet l'assemblage des sous-unités de la NADPH oxydase pour former une chaîne complexe de transport des électrons au niveau de la membrane phagosomale, capable de transférer des électrons aux molécules d'oxygène pour la production des FRO (11,36,69,72) (cf. ci-dessous). Ce mécanisme correspond à l'explosion oxydative. Bien que la NADPH oxydase confère une activité bactéricide importante, son absence n'affecte pas la capacité des neutrophiles à détruire les *Streptococcus pneumoniae*, suggérant la présence et l'efficacité d'autres mécanismes bactéricides FRO-indépendants dans ce contexte (73).



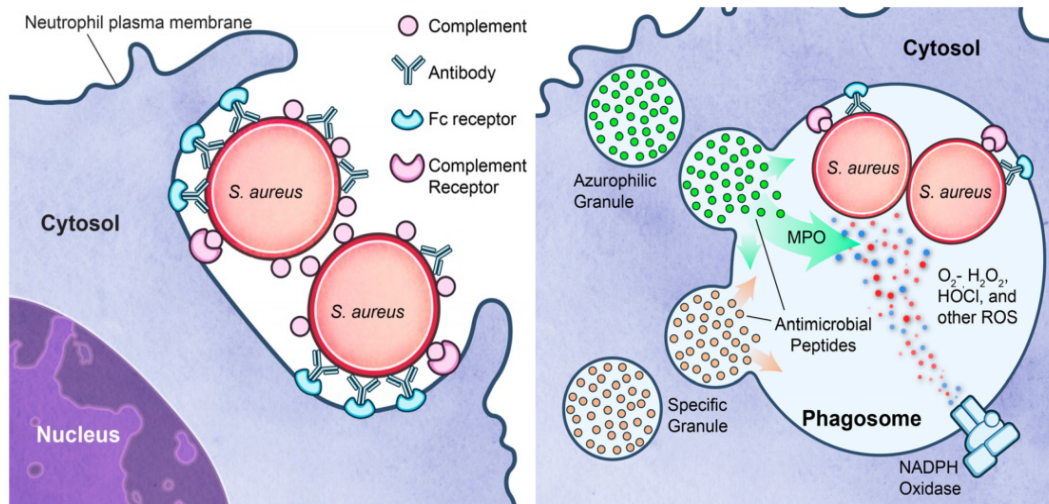


Figure 7 : Un neutrophile phagocytant des *Staphylococcus aureus* opsonisés en utilisant les différents mécanismes bactéricides. Adapté de McGuinness *et al.* 2016.

Les bactéries recouvertes d'anticorps et de protéines du complément sont reconnues par le neutrophile grâce aux récepteurs Fc et aux récepteurs du complément. L'internalisation des bactéries par phagocytose déclenche la dégranulation et la production des FRO par la NADPH oxydase dans le phagosome.

1.3.3.2. Les défauts de la phagocytose

La phagocytose est un mécanisme très efficace dans l'élimination des pathogènes mais peut présenter des anomalies. Par exemple, les granulations peuvent fusionner avec le phagosome avant sa fermeture complète conduisant à un relargage du contenu cytolitique et oxydant à l'extérieur du neutrophile (36,74). De même, une phagocytose « frustrée » peut avoir lieu si les récepteurs phagocytaires du neutrophile se fixent sur des complexes immuns ou des protéines du complément présentes sur la paroi des vaisseaux. Ceci est le cas par exemple dans la vascularite thrombo-hémorragique où l'inflammation chronique induit un recrutement important de la protéine C3 du complément. Ainsi l'engagement des récepteurs CR3 (Mac-1) du neutrophile conduit au déversement du contenu de leurs granulations dans le milieu extracellulaire, exacerbant l'inflammation et maintenant l'hémorragie (75,76). Cet effet délétère des médiateurs dégranulés et des FRO libérées pendant la phagocytose frustrée à l'extérieur du phagosome, au contact des tissus environnants, est au cœur de la physiopathologie de nombreuses maladies inflammatoires aiguës comme le syndrome de détresse respiratoire aigu de l'adulte, le sepsis sévère et chronique ou la polyarthrite rhumatoïde (77) (**Figure 8**).



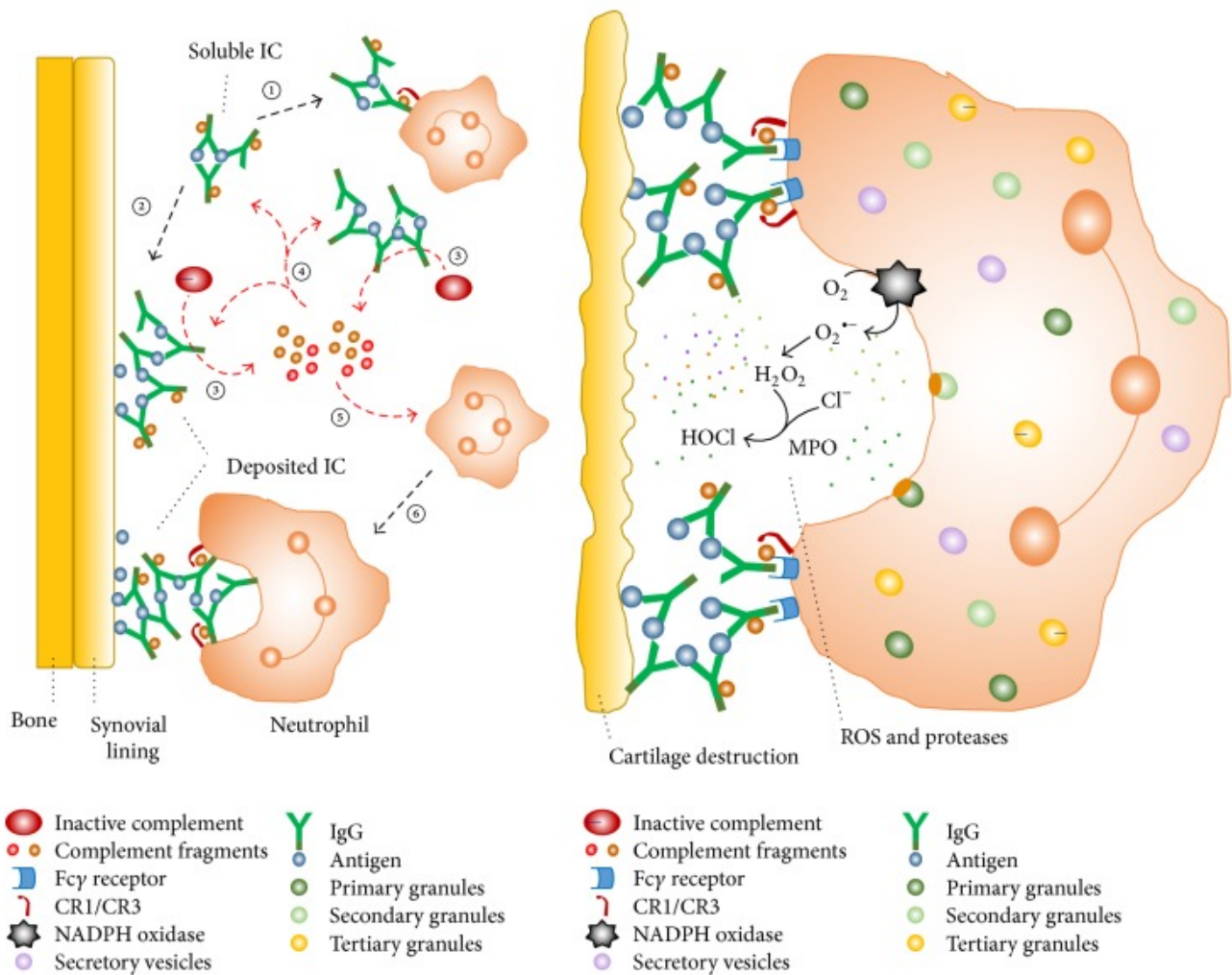


Figure 8 : L'implication de la phagocytose frustrée dans un modèle inflammatoire de polyarthrite rhumatoïde. D'après Paoliello-Paschoalato *et al.* 2015.

Les complexes immuns (IC) solubles peuvent se fixer sur les neutrophiles activés. Les IC solubles et déposés sur la membrane synoviale activent le système du complément. Cela induit la génération des fragments du complément qui se fixent sur les IC en attirant les neutrophiles. La phagocytose est ainsi activée avec une forte production de FRO et de protéases participant à la destruction du cartilage.

1.3.3.3. Spécificités de la phagocytose du neutrophile

Hormis son extrême puissance, la phagocytose dans le neutrophile présente quelques particularités qui la distinguent de celle des autres cellules phagocytaires, notamment le macrophage (78). Tout d'abord, la phagocytose du neutrophile est plus rapide que celle du macrophage, ce qui évite la dissémination des pathogènes et renforce la position du neutrophile en première ligne de défense (79). En outre, le pH du phagosome mature d'un neutrophile peut devenir alcalin (80), alors que celui du macrophage est fortement acide (81). Cet alcalinité peut s'expliquer par la forte production des FRO qui s'accompagne d'une consommation de protons (82,83). D'ailleurs, l'augmentation de



pH dans le phagosome du neutrophile peut définir des niches distinctes d'activité enzymatique, étant donné que l'activité optimale de la MPO nécessite un pH=6 alors que celles de la cathepsine G et de l'élastase ont lieu à des pH7-9 et pH8-10, respectivement (80,83). Enfin, tout ce qui précède amène à suggérer que la phagocytose dans les neutrophiles pourrait être orchestrée par un système de régulation original, distinct de celui contrôlant la phagocytose dans les autres cellules phagocytaires.

1.3.4. L'explosion oxydative du neutrophile

1.3.4.1. Mécanismes de production des FRO

Suite à la formation du phagosome ou même en réponse à des stimulants ou médiateurs pro-inflammatoires, le neutrophile produit des FRO issues de l'activation de la NADPH oxydase appartenant à la famille des NOX. Ce mécanisme est connu sous le nom d'explosion oxydative car il est accompagné d'une forte consommation d'oxygène et de glucose. La voie métabolique impliquée est indépendante de la chaîne respiratoire mitochondriale, mais nécessite l'assemblage d'une NADPH oxydase fonctionnelle (**Figure 9**). Cette dernière est formée suite à la phosphorylation de ses sous-unités et la translocation des 4 sous-unités cytoplasmiques solubles (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} et la petite protéine G Rac2) à la membrane où se trouvent les 2 protéines transmembranaires (p22^{phox} et gp91^{phox} formant le cytochrome b₅₅₈) (84,85). A noter que la gp91^{phox} nommée également NOX2, constitue le cœur catalytique de la NADPH oxydase active des cellules phagocytaires. Ainsi la NADPH oxydase activée catalyse la réduction monovalente de l'oxygène pour former l'anion superoxide O₂^{•-} :

$NADPH + 2O_2 \rightarrow NADP^+ + H^+ + 2O_2^{\bullet-}$; Transfert des électrons via la flavine adénine dinucléotide (FAD).

La formation de ce dernier initie la génération des autres FRO tel que l'H₂O₂, le radical hydroxyle (OH[•]) et l'acide hypochloreux (HOCl) selon les réactions suivantes :

$2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$; Réaction catalysée par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD).



$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + O_2$; Réaction nécessitant la présence d'un métal de transition comme le Fe^{2+} ou le Cu^{2+} .

$H_2O_2 + Cl^- + H^+ \rightarrow HOCl + H_2O$; Réaction catalysée par la MPO.

D'après ce qui précède, les FRO sont divisées en deux groupes : les radicaux libres de l'oxygène ayant des électrons célibataires non appariés et les FRO non radicalaires. Ces FRO peuvent avoir une activité bactéricide directe ou indirecte *via* la modulation de l'activité des protéases (86–88).

L'importance des FRO dans la réponse anti-infectieuse a été démontrée lors de la description de la granulomatose septique chronique (CGD) causée par une mutation dans un gène codant pour une des sous-unités de la NADPH oxydase (89), définissant des formes liées au chromosome X et des formes autosomales récessives de la maladie. Dans cette maladie, les cellules phagocytaires incluant les neutrophiles, produisent peu ou pas de FRO; les enfants souffrent d'infections bactériennes et fongiques sévères à répétition et présentent souvent des granulomes digestifs et pulmonaires (89–91).

La production du monoxyde d'azote (NO) grâce à la NO synthase (NOS) soutient et compense l'activité bactéricide des FRO (92). En effet, un modèle de souris double mutée ($gp91^{phox/-}$ et $Nos2^{-/-}$) développe des infections spontanées dues à la flore commensale, alors que les modèles simples mutés ne présentent pas ce type d'infections (93).

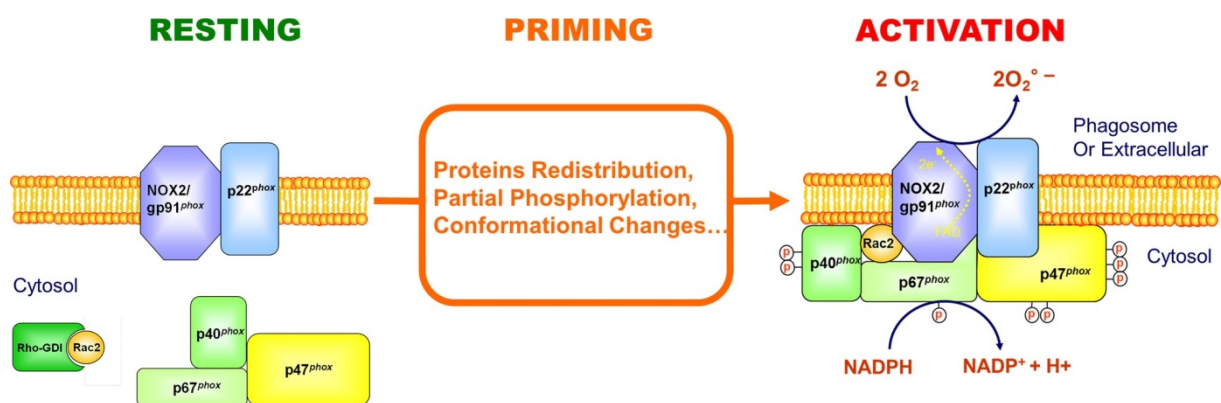


Figure 9 : L'assemblage des sous-unités de la NADPH oxydase au cours de l'activation du neutrophile. D'après El-Benna *et al.* 2016.



1.3.4.2. Les FRO : au-delà des effets antimicrobiens

Les FRO constituent un groupe chimique très réactif capable d'interagir avec des macromolécules cellulaires et induire une peroxydation des lipides, une modification des protéines et des altérations des acides nucléiques (94). Ainsi une production excessive chronique de FRO peut induire des dommages tissulaires importants et favorise leur implication dans de nombreuses maladies, notamment les cancers et des maladies inflammatoires chroniques (95–97). Donc un équilibre doit s'établir entre la production des FRO et leur clairance par les enzymes et les voies anti-oxydantes. Parmi ces enzymes, nous citerons la thioredoxine qui contribue au maintien de la balance redox en catalysant la réduction des protéines oxydées (98). Si une longue exposition à de fortes concentrations de FRO a des effets parfois délétères, de faibles concentrations peuvent avoir un effet bénéfique régulateur sur la survie, la croissance et la différenciation cellulaire ainsi que sur la réponse immunitaire (99). Par exemple, l' H_2O_2 produit par les cellules phagocytaires est capable d'activer des voies de signalisation lymphocytaires d'une façon indépendante du ligand *via* trois mécanismes : l'oxydation directe du récepteur, l'activation des protéines tyrosines kinases (PTK) ou l'inhibition des protéines tyrosines phosphatases (PTP) (100). De même dans les DC, l' H_2O_2 peut activer la réponse immunitaire spécifique (101,102). Les FRO permettent aussi l'amplification des fonctions du neutrophile principalement *via* l'activation des voies de phosphorylation de la tyrosine (103). En particulier, elles peuvent jouer un rôle dans l'activation de l'inflammasome permettant la production de certaines cytokines pro-inflammatoires (104). Donc, l'homéostasie des FRO nécessite une régulation délicate par les systèmes anti-oxydants permettant de garantir un bon fonctionnement cellulaire et d'éviter un stress oxydant incontrôlable. Ce point sera détaillé dans le chapitre introductif réservé au facteur de transcription Nrf2.



1.3.5. La dégranulation

Le neutrophile stocke des protéases et des peptides antimicrobiens dans ses granulations pour les déverser dans le phagosome pendant la phagocytose. En outre, l'activation des neutrophiles peut aussi provoquer la fusion des granulations avec la membrane cytoplasmique, permettant une sécrétion du contenu des granulations dans l'espace extracellulaire. Dans les deux cas, la libération des médiateurs préformés des granulations est appelée dégranulation ou exocytose (105). Cette dégranulation ou exocytose respecte une certaine hiérarchie, allant dans le sens contraire à celle de la granulopoïèse. En effet, une faible activation des neutrophiles peut induire l'exocytose des vésicules sécrétoires, alors que l'augmentation croissante de l'intensité de la stimulation permet l'exocytose de la ficoline-1 suivie de la gélatinase puis des granulations secondaires pour arriver finalement aux granulations primaires azurophiles (4,13). L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} s'avère responsable de la dégranulation dans cet ordre (106) et de ces taux d'exocytose 100%, 38%, 22% et 7% qui correspondent aux vésicules sécrétoires, granulations tertiaires, secondaires et primaires respectivement (107). De même, le cytosquelette est activement impliqué dans la dégranulation, surtout celle des granulations azurophiles, grâce à la réorientation des microtubules facilitant la fusion avec le phagosome (108). Cette fusion dépend aussi des protéines de la famille SNARE (abréviation de *soluble NSF attachment protein receptors*) qui forment un complexe quaternaire à partir d'un v-SNARE et de trois t-SNARE (**Figure 10**). Le remodelage d'actine et l'assemblage des microtubules permet l'interaction entre les v-SNARE des granules et les t-SNARE de la membrane cible en assurant leur fusion (109–111). Dans certaines conditions pathologiques, l'activation prolongée des neutrophiles induit une dégranulation incontrôlée. Ainsi, un taux élevé de protéase dans le plasma est un indice révélant des complications inflammatoires. Le meilleur exemple est celui de la MPO ; une concentration circulante élevée peut être associée à divers pathologies inflammatoires allant du sepsis à l'arthrite (112–114). En revanche, une étude récente a montré pour la première fois que la MPO peut aussi jouer un rôle protecteur dans un modèle d'infection sévère avec endotoxémie (115). Le contenu des granulations est doté d'une puissante



activité antimicrobienne mais il est capable d'agir sur l'activité des cytokines (20). En effet les protéases présentes dans les granulations peuvent perpétuer le recrutement des neutrophiles en activant certaines chimiokines comme l'IL-8 ou en générant des signaux chimioattractants par la dégradation de la matrice extracellulaire (116–118). D'autre part, une étude récente suggère que l'élastase peut favoriser la bactériémie dans un modèle expérimental de pneumonie en bloquant les voies de signalisation TLR-dépendantes, notamment la voie du facteur nucléaire- kappa B (NF-κB). En outre, l'élastase n'affecte pas les cytokines seulement *via* le mécanisme précédent, mais aussi via un clivage direct des cytokines pro inflammatoires, telles que l'IL-8, l'IL-6 et le TNFα (119).

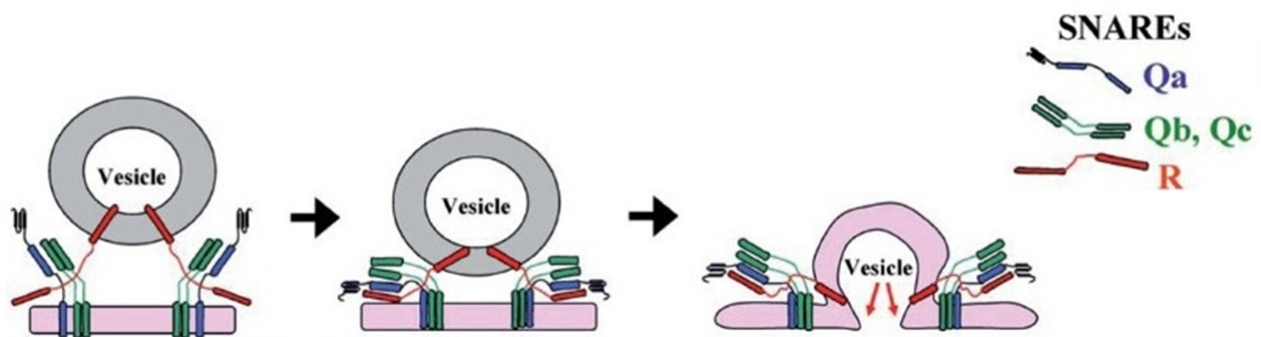


Figure 10 : La fusion membranaire médiée par la formation du complexe SNARE composé de 3 t-SNAREs (Qa, Qb et Qc) et 1 v-SNARE (R). Adapté de Sehgal *et al.* 2011.

1.3.6. La nétose

Depuis sa découverte par Zychlinsky et ses collaborateurs en 2004, la nétose est devenue l'une des fonctions les plus étudiées dans la biologie du neutrophile. Elle a été décrite initialement comme un mécanisme anti-infectieux par lequel les neutrophiles activés libèrent des « Neutrophil Extracellular Traps » ou NETs. Ces derniers sont des filaments d'ADN recouverts de peptides et d'enzymes provenant des granulations tels que la MPO et l'élastase, capables de piéger et de tuer les micro-organismes infectieux (120) (**Figure 11**). A l'heure actuelle le rôle des NETs dépasse largement la réponse anti-infectieuse ; de par les nombreux médiateurs actifs qu'ils expriment à leur surface, ils ont été impliqués dans la physiopathologie de plusieurs maladies, comme les maladies auto-immunes, la thrombose, les allergies et le cancer (121).



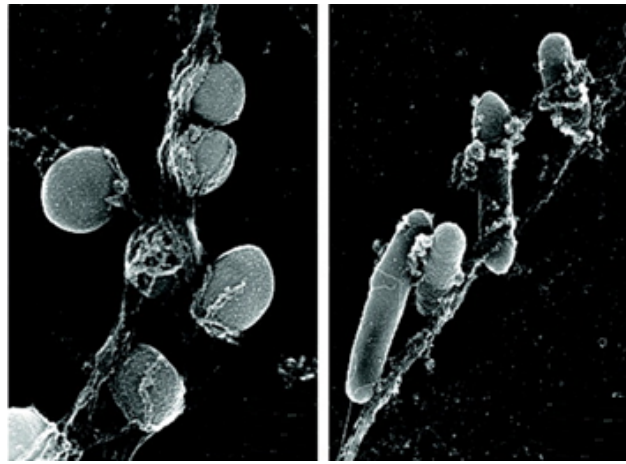


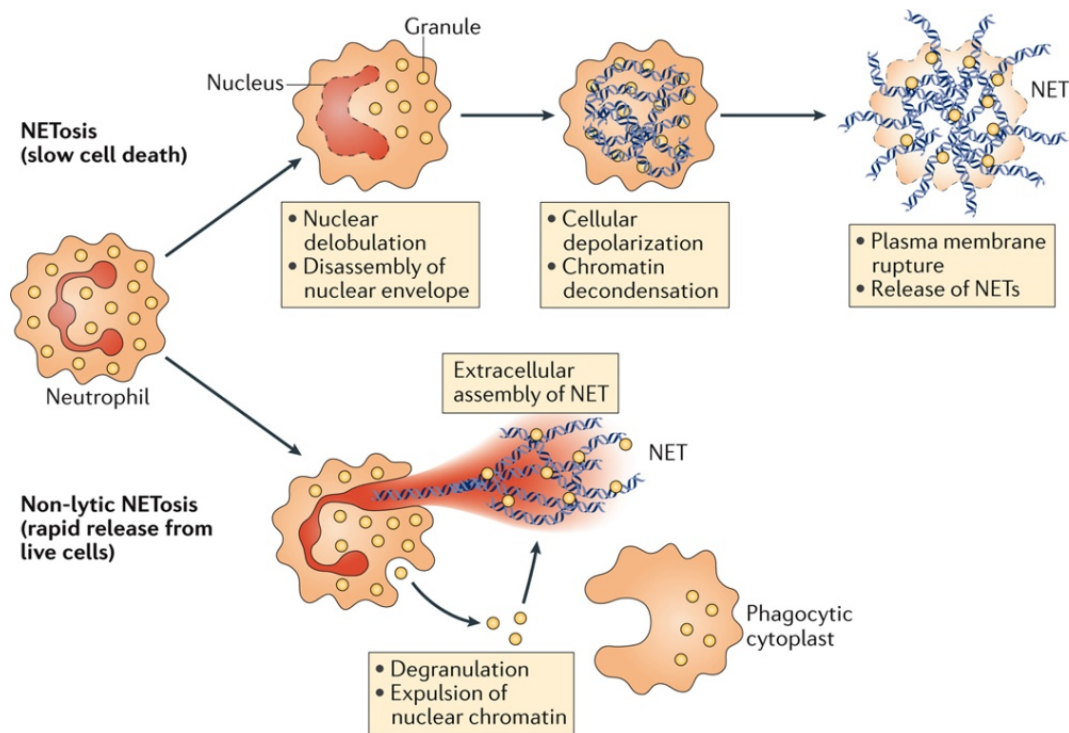
Figure 11 : Visualisation par microscopie électronique des NETs piégeant les bactéries *Staphylococcus aureus* (gauche) et *Salmonella typhimurium* (droite). D'après Brinkmann *et al.* 2004.

1.3.6.1. Les mécanismes de nétose

Pendant la dernière décennie, de très nombreux travaux ont décrit les mécanismes assurant la formation des NETs. La nétose peut être considérée comme une forme de mort cellulaire qui s'initie par une modification de la forme du noyau (perte du caractère multilobé), la dissolution de sa membrane puis une perte de la polarisation cellulaire (122). Une variété de molécules et de médiateurs inflammatoires tels que le TNF, l'IL-8, les complexes immuns, le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) ainsi que des PAMP d'origine bactérienne ou fongique sont capables de stimuler la nétose. Suite à l'activation cellulaire, les FRO produites par la NADPH oxydase stimulent la libération de MPO qui induit à son tour la translocation de l'élastase des granulations azurophiles au noyau. Ainsi l'activité protéolytique de cette dernière associée à celle de la MPO contribue au clivage des histones puis à la décondensation de la chromatine (123) (**Figure 12**). En parallèle, la chromatine subit une deuxième modification catalysée par une enzyme nucléaire appelée la protéine arginine désaminase de type 4 (PAD4), qui permet la citrullination des résidus arginine des histones (124). La décondensation de la chromatine dans le cytoplasme entraîne la fixation de nombreux composants granulaires et cytoplasmiques sur l'ADN. Quelques heures (3-8 heures) après l'activation, la perméabilisation de la membrane cytoplasmique commence, permettant la libération des NETs (121,122). La composition protéinique des NETs semble être différente en fonction des



stimulants. A titre d'exemple, deux souches appartenant à la même espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* induisent des NETs ayant au moins 50 protéines différentes et 33 protéines communes (125). Une forme alternative rapide de nétose existe, consistant en une formation de NETs à partir de l'ADN mitochondrial et indépendamment des FRO. Cette nétose rapide dite vitale n'affecte pas la viabilité du neutrophile et est encore mal connue à l'heure actuelle (126). En outre, le neutrophile peut libérer une partie ou tout le contenu de son noyau sans altérer la membrane cytoplasmique. Néanmoins, le neutrophile anucléé résultant de ce mécanisme maintient sa capacité à phagocyter les bactéries (121,127).



Nature Reviews | Immunology

Figure 12 : Les mécanismes de la nétose classique lytique et la netose rapide vitale. D'après Papayannopoulos. 2018.

1.3.6.2. Nétose ou phagocytose ?

Les signaux qui définissent le choix du neutrophile entre la phagocytose et la nétose pour prendre en charge un agent infectieux sont encore mal connus. Des hypothèses suggèrent que les conditions environnementales, le métabolisme, l'état d'activation du neutrophile ou la taille du



microorganisme peuvent déterminer le mécanisme de défense convenable (128). En effet, le neutrophile peut sélectivement former des NETs en réponse à des pathogènes de grande taille comme les hyphes de *Candida albicans* et les agrégats extracellulaires de *Mycobacterium bovis* (129,130) (**Figure 13**). L'irréversibilité du choix semble être évidente, étant donné la compétition sur l'utilisation de l'élastase et la nécessité de maintenir, contrairement à la nétose, l'intégrité du cytosquelette pour la phagocytose (128). Ainsi, les microorganismes de grande taille qui sont difficilement endocytés ne requièrent pas la séquestration de l'élastase dans un phagosome, ce qui permet sa translocation dans le noyau pour induire la nétose tout en inhibant la phagocytose (131). En revanche les petites bactéries peuvent aussi induire la nétose mais cela semble être dépendant de leur pathogénicité, sachant que les bactéries probiotiques peuvent même inhiber la formation des NETs (132). D'autres bactéries font pencher la balance dans le sens de la nétose en inhibant la maturation du phagosome ou en s'agrégeant (129,133).

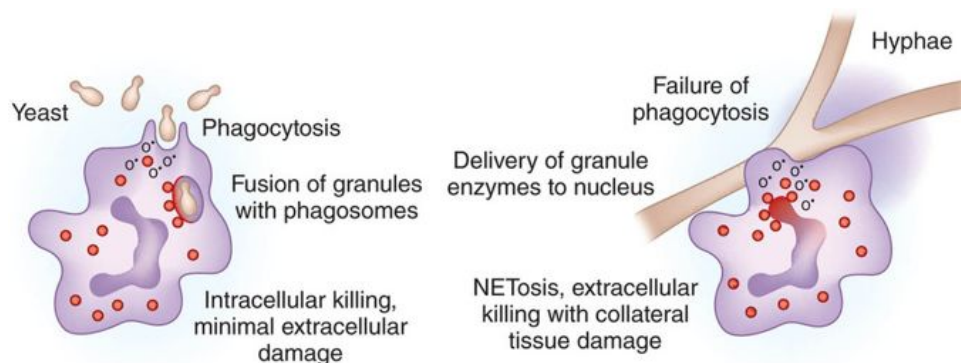


Figure 13 : Choix entre phagocytose et nétose en fonction de la taille du pathogène. D'après Wheeler & Underhill. 2014.

1.3.6.3. Pouvoir antimicrobien des NETs

Par définition, les NETs sont des pièges d'ADN recouverts d'une grande variété de molécules dotées d'un pouvoir antimicrobien. Cela est confirmé chez les patients ayant un déficit complet en MPO ainsi que dans un modèle murin correspondant, au cours desquels on observe une incapacité à contrôler les infections par des hyphes fongiques (129,134). De même, suite à une thérapie génique restaurant la NOX2, les patients atteints de CGD retrouvent une nétose normale et une bonne



protection contre l'aspergillose (135). Bien que la nétose soit efficace dans l'élimination des pathogènes de grande taille, ses effets antimicrobiens semblent être sélectifs. L'absence de NET dans le modèle de souris PAD4^{-/-} n'affecte pas l'évolution de la bactériémie dans certains contextes de sepsis bactériens (136,137). Dans le même sens, une étude a partiellement remis en cause la capacité des NETs à tuer les pathogènes, en montrant que ces derniers survivent et sont capables de proliférer une fois libérés du piège du neutrophile (138). A noter que les pathogènes ont développé des mécanismes pour échapper aux NETs tels que l'expression des nucléases et DNAses pour les dégrader ou la modification dans la composition de leur paroi polysaccharidique pour réduire la fixation des NETs (139–141).

1.3.6.4. Rôle des NETs dans la physiopathologie de maladies inflammatoires

Une production excessive de NETs est observée au cours de diverses maladies. Dans le contexte infectieux, les NETs peuvent altérer l'épithélium pulmonaire en réponse aux infections fongiques et induire des dommages tissulaires durant certain sepsis bactériens (129,142). Les NETs participent aussi aux thromboses et sont des sources de molécules inflammatoires et d'auto-antigènes (143–145). Ceci explique leur implication dans plusieurs maladies auto-immunes telles que le lupus systémique ou la polyarthrite rhumatoïde (146–148). D'une façon intéressante, notre équipe montre que les NETs sont fortement présents dans l'asthme allergique et que la sévérité de la pathologie est corrélée avec la production systémique des NETs (article en préparation). Cette liste réduite et non exhaustive est en expansion continue prouvant la forte implication des NETs dans les pathologies inflammatoires. Cela explique l'intérêt particulier accordé à la compréhension des mécanismes et à l'identification des différentes voies de signalisations participant à la nétose.



1.4. L'hétérogénéité des neutrophiles : polarisation ou sous-populations prédéfinies ?

La présence de différentes sous-populations de neutrophiles a été mise en évidence, notamment dans certains contextes inflammatoires, grâce à la cytométrie en flux qui permet d'établir les profils phénotypiques appropriés. Néanmoins, l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des neutrophiles reste un sujet de débat qui nécessite une meilleure compréhension des mécanismes.

1.4.1. Les sous-populations dans les conditions non-inflammatoires

Partant de la moelle osseuse, les neutrophiles humains immatures commencent par exprimer le CD15 et le CD11b puis l'expression du CD16 et du CD10 augmente avec la maturation. Chez la souris, les neutrophiles immatures sont identifiés $CD11b^+ Ly6G^{faible} Ly6B^{intermédiaire} CD117^+ CD115^-$. La maturation est marquée par l'augmentation de l'expression du Ly6G et la perte de l'expression du CD117 (149). D'une façon intéressante, la rate des souris peut contenir des neutrophiles ayant un phénotype proche de celui des précurseurs de la moelle ($Ly6G^{int}$ et $CD117^+$) et capable de se proliférer et se mobiliser en cas d'infection (150). Dans le sang, les neutrophiles âgés humains et murins sont caractérisés par la diminution de l'expression du CD62L et par l'expression du CXCR4, car ce dernier est essentiel pour le retour des neutrophiles à la moelle osseuse (151,151).

Parmi les molécules qui caractérisent les neutrophiles matures circulants émergent le CD177 et l'olfactomedine 4 (OLFM4). Le CD177 est une glycoprotéine exprimée sur la membrane cytoplasmique et la membrane des granulations (152). Elle est connue pour son rôle dans la régulation de l'activité de la protéinase 3 (PR3) (153). Son expression est variable d'un individu à l'autre (environ 50% des neutrophiles), mais augmente dans les contextes inflammatoires, notamment dans l'auto-immunité (154,155). Bien que les neutrophiles $CD177^+$ produisent de faibles quantités de cytokines pro-inflammatoires, ils sont dotés d'une forte activité bactéricide (156). L'OLFM4 est une glycoprotéine localisée majoritairement dans les granulations. Le pourcentage des neutrophiles $OLFM4^+$ peut varier de 10 à 30% dans la circulation (157–159)



(Figure 14). Les modèles murins déficients en OLFM4 ont une meilleure capacité antimicrobienne dans des modèles de sepsis (160). De même, un pourcentage important de neutrophiles OLFM4⁺ chez l'homme est associé à un mauvais pronostic dans le choc septique (161). Enfin, une petite population (3%) de neutrophile pro-angiogénique (PAN) a été aussi identifiée chez l'homme comme chez la souris, exprimant le CXCR4, le VEGFR1 (abréviation de *Vascular endothelial growth factor receptor 1*) et le CD49d. Le recrutement de cette sous-population aux tissus hypoxiques s'avère indispensable pour la néoformation des vaisseaux (162).

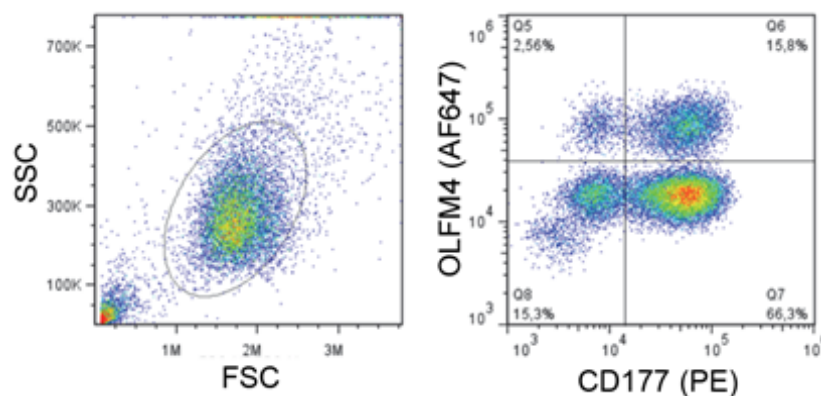


Figure 14 : Analyse phénotypique des neutrophiles d'un donneur sain en fonction de l'expression du CD177 et/ou de l'OLFM4. D'après Welin *et al.* 2013.

Une représentation bi-paramétrique de cytométrie en flux montrant l'existence de 4 populations de neutrophiles phénotypiquement différents en fonction de l'expression du CD177 et OLFM4.

Il existe également des neutrophiles marginaux dans la circulation qui peuvent transmigrer en l'absence d'inflammation dans des organes comme la rate, le foie, les poumons et la peau. A titre d'exemple, un nombre important de neutrophiles marginaux sont présents au niveau de l'endothélium vasculaire de la peau, mais seule une petite population réussit à franchir la barrière aboutissant à la peau. La capacité particulière de ces dernières cellules peut suggérer leur appartenance à une sous-populations phénotypiquement et fonctionnellement distincte (149,163).



1.4.2. Les sous-populations dans les conditions inflammatoires

L'identification des sous-populations de neutrophiles impliquées dans les maladies inflammatoires est d'une extrême importance dans la recherche des cibles thérapeutiques. La sous-population de neutrophiles de faible densité (LDN) constitue l'une des premières pistes (164). Cette sous-population est retrouvée parmi les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) dans divers pathologies (164–167). La fonction de ces neutrophiles est plutôt dépendante du contexte : si leur rôle est pro-inflammatoire dans les maladies auto-immunitaires et les infections (168,169), ils sont au contraire immunosuppresseurs dans le cancer et nommés MDSC (abréviation de *myeloid-derived suppressor cells*) (167,170,171). Comme pour les macrophages, une polarisation N1/N2 est décrite dans les neutrophiles associés aux tumeurs (TAN), désignant une population anti-tumorogène et une autre pro-tumorogène respectivement (**Figure 15**). Cette polarisation est orientée par des médiateurs cytokiniques tels que l'angiotensine II, l'IFN de type I et le facteur de croissance tumoral- β (TGF- β) (172–175). D'une façon intéressante l'inhibition de ce dernier induit la transition des N2 en N1 (174).

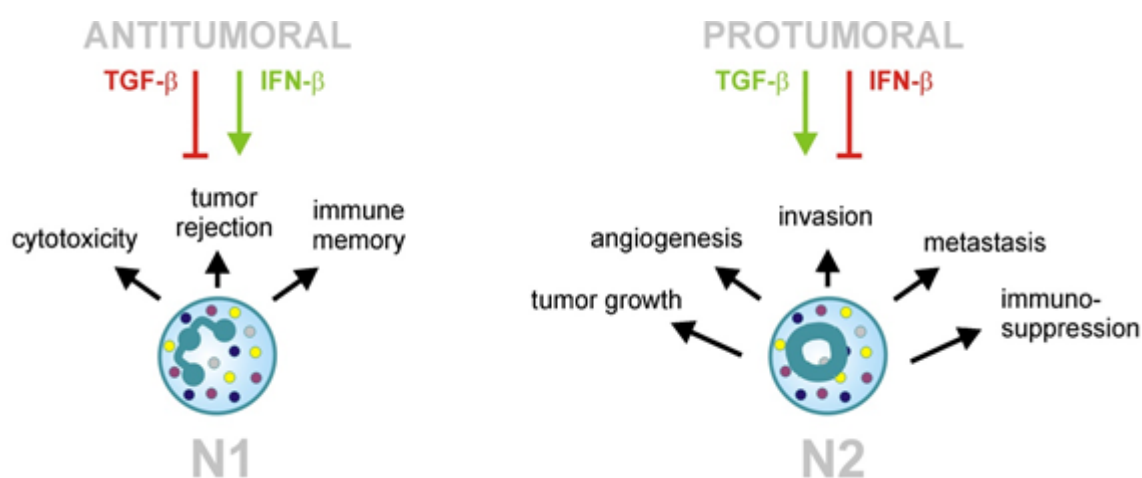


Figure 15 : La polarisation et les fonctions des neutrophiles associés aux tumeurs N1/N2. Adapté de Piccard *et al.* 2011.

Bien que la polarisation des TAN soit potentiellement induite par le microenvironnement, jusqu'à présent aucune étude ne prouve que les différentes sous-populations de neutrophiles sont le fruit d'une forte plasticité ou que ces neutrophiles dérivent de sous-populations prédéfinies et différentes dès les premières stades immatures. Si l'hypothèse de plasticité est valable, une stratégie



d'immuno-modulation locale permettra d'orienter la polarisation des cellules. En revanche, si les études valident la deuxième hypothèse, des déplétions spécifiques seront la solution pour inhiber des sous-populations de neutrophiles aggravant un contexte pathologique. Dans les deux cas, une meilleure compréhension des mécanismes permettra d'adapter les stratégies thérapeutiques, assurer un ciblage spécifique des sous-populations et peut-être trouver des traitements inédits pour certaines maladies (149,158,176).

1.5. Clairance du neutrophile

Étant donné leur cytotoxicité et leur courte durée de vie (177,178), un rythme rapide de renouvellement s'impose pour une élimination quotidienne d'environ 10^9 neutrophiles/kg (179,180). Pour ce faire, la majorité des neutrophiles âgés débutent leur apoptose spontanée et seront éliminés par les macrophages *via* un mécanisme appelé « l'efferocytose ». La clairance des neutrophiles apoptotiques ou nécrotiques par les macrophages est aussi indispensable dans l'inflammation pour initier la résolution de l'inflammation (181,182). D'autre part, une minorité de neutrophiles recrutés aux tissus enflammés sont capables de regagner la circulation par migration inverse (183).

1.5.1. L'apoptose et l'efferocytose

L'élimination des neutrophiles a lieu essentiellement dans les poumons, la rate, le foie et la moelle osseuse (184–186). Les neutrophiles déclenchent l'efferocytose suite à leur apoptose réalisée selon deux grandes voies de signalisation. La voie intrinsèque est due à une perte d'équilibre entre les facteurs anti- et pro- apoptotiques induisant la perte d'intégrité de la membrane mitochondriale avec la libération du cytochrome c. Ce dernier facilite l'activation séquentielle des caspases permettant l'activation de la caspase 3. La voie extrinsèque consiste en une activation de la caspase 3 d'une façon dépendante de la caspase 8, en réponse à des messagers solubles tels que le Fas-L, TRAIL



(abréviation de *tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) et le TNF α (187). L'apoptose peut s'accompagner de la production de certains médiateurs (IL-6, IL-8, CXCL1...) par les cellules apoptotiques (188).

Dans ce contexte apoptotique la synapse phagocytaire s'engage dans des interactions récepteur-ligand entre les cellules apoptotiques et les cellules phagocytaires. Hormis la fragmentation d'ADN, plusieurs modifications apparaissent au niveau de la membrane des neutrophiles apoptotiques, notamment l'externalisation de la phosphatidylserine (PS) due à l'inactivation de l'aminophospholipide translocase (189). De même quelques protéines intracellulaires se fixent à la membrane cytoplasmique suite à leur libération comme l'annexine-I et la calréticuline qui est reconnue par les récepteurs LRP (abréviation de *Lipoprotein receptor-related protein*). En parallèle, le neutrophile apoptotique diminue l'expression de certains récepteurs incluant le CD16 (F γ RIII), CD31, CD35 (CR1), CD47, CD50 (ICAM-3), le CD88 (C5aR) et le CD120a (TNF-R1) (190–192).

Du côté de la cellule phagocytaire, l'efferocytose implique activement des familles de récepteurs tels que les intégrines, les récepteurs de la PS, le CD36, les récepteurs du complément, les MerTK (abréviation de *myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase*) et les LRP (192–194). En effet, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ avec l'aide du *scavenger* CD36 reconnaissent la thrombospondine (THBD) qui assure un pont entre le macrophage et le neutrophile apoptotique (194,195) (**Figure 16**). Le CD36 est un récepteur constitutif d'efferocytose capable de consolider les synapses en se liant aux extrémités oxydées de la PS et des lipoprotéines de basse densité (LDL) (196). D'autres protéines sériques comme le MFG-E8 (abréviation de *milk fat globule epidermal growth factor 8*) peuvent aussi favoriser les ponts entre les PS des cellules apoptotiques et les $\alpha_v\beta_3$ des macrophages (197). Les récepteurs du complément CR3 et CR4 jouent un rôle aussi dans l'efferocytose des neutrophiles apoptotiques recouverts par les protéines du complément (198). De même, les MerTK sont associées à la polarisation M2 des macrophages favorable pour l'efferocytose. Les M2 augmentent l'expression des MerTK alors que l'inhibition de ces derniers réduit l'efferocytose (199–201).



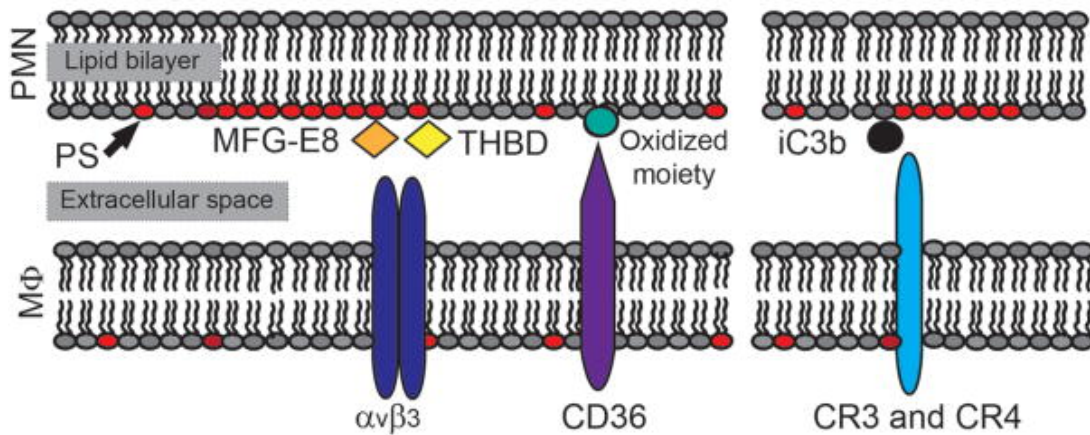


Figure 16 : Les récepteurs et ligands fortement impliqués dans l'efferocytose. Adapté de Greenlee-Wacker *et al.* 2016.

PMN, polynucléaire neutrophile ; *MΦ*, macrophage.

Il est important ici de noter que l'inhibition d'un seul récepteur d'efferocytose n'a jamais pu l'inhiber complètement montrant une sorte de redondance des voies et aussi une coopération entre les différents récepteurs pour consolider la synapse phagocytaire. L'efferocytose est altérée dans certaines maladies inflammatoires comme la mucoviscidose, l'asthme, la fibrose pulmonaire idiopathique, certaines glomérulonéphrites et l'athérosclérose (192,202). Une étude récente a montré que l'efferocytose active la NADPH oxydase dans les macrophages. Ainsi, la digestion des cellules apoptotiques est altérée dans les macrophages des patients CGD (203). L'échec ou le retard de l'efferocytose peuvent conduire à la nécrose des cellules apoptotiques suivie par la lyse des neutrophiles qui relarguent leur contenu cytotoxique en exacerbant l'inflammation (204) (**Figure 17**).

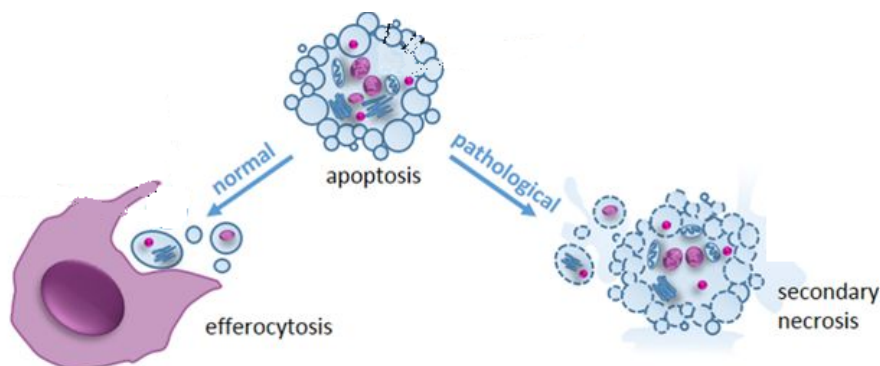


Figure 17 : L'altération de l'efferocytose en conditions pathologiques induisant une nécrose secondaire. Adapté de Roth *et al.* 2015.



1.5.2. La migration inverse

De nos jours, il est admis que dans certains contextes, le neutrophile peut échapper à la clairance physiologique en retournant dans la circulation sanguine. Cette migration inverse a été visualisée chez le poisson zèbre montrant la capacité du neutrophile à quitter un tissu enflammé en effectuant une migration transendothéliale inverse (rTEM) (205). L'activation de la voie HIF1 α (abréviation de *hypoxia-inducible factor 1 α*) semble diminuer la rTEM ainsi que l'apoptose des neutrophiles, pour maintenir l'inflammation (206). Les neutrophiles humains montrent la même capacité de rTEM *in vitro* à travers une monocouche endothéliale. Ces neutrophiles se caractérisent par une forte expression de l'ICAM-1 et une faible expression du CXCR1, un phénotype retrouvé dans le sang des patients ayant une inflammation systémique (207). Bien que quelques études suggèrent que les neutrophiles en rTEM soient plus actifs et produisent plus de FRO, le fait que la rTEM soit liée à un phénotype pro- ou anti-inflammatoire n'est pas encore clairement démontré (183). Chez la souris, les travaux du laboratoire de S. Nourshargh montrent que la diminution de l'expression du JAM-C (abréviation de *junctional adhesion molecule C*) permet la rTEM à travers les jonctions cellulaires. Ainsi, la délétion ou l'inhibition de JAM-C favorise la dissémination de l'inflammation dans un modèle de lésions d'ischémie-reperfusion (208,209). En outre, les neutrophiles circulants des patients ayant une pancréatite aiguë associée à des lésions pulmonaires expriment fortement des marqueurs de la rTEM, suggérant un rôle pour celle-ci dans l'exacerbation des pathologies inflammatoires (210). D'autres études *in vitro* ont montré que le neutrophile peut fuir un gradient de chimioattractant. Ce *retrotaxis* est favorisé en présence de la lipoxine A4 (LXA4) qui est un médiateur anti-inflammatoire, suggérant que la rTEM s'intègre plutôt dans le cadre de la résolution de l'inflammation (211). Bien que la rTEM soit mise en évidence dans des modèles pertinents, elle reste un sujet de débat. (i) S'agit-il d'une simple désensibilisation des récepteurs aux chimiokines induisant une répulsion passive ? (ii) Quel sera le sort des neutrophiles effectuant la rTEM : désactivation ? durée de vie prolongée ? (iii) S'agit-il d'une sous-population spécifique de neutrophile ?



Au total, le neutrophile joue un rôle central dans l'immunité. Son importante capacité migratoire lui permet de transmigrer à travers l'endothélium vasculaire en répondant principalement à un gradient de chimiokines. Le neutrophile infiltre ainsi rapidement le site d'infection pour empêcher la dissémination des pathogènes. La phagocytose associée à la production des FRO et à la dégranulation, ainsi que la nérose, lui permettent d'éliminer efficacement les pathogènes. Le neutrophile contribue aussi à l'orchestration de la réponse immunitaire *via* la sécrétion des cytokines. Enfin, le neutrophile entre en apoptose pour initier la résolution de l'inflammation (Figure 18).

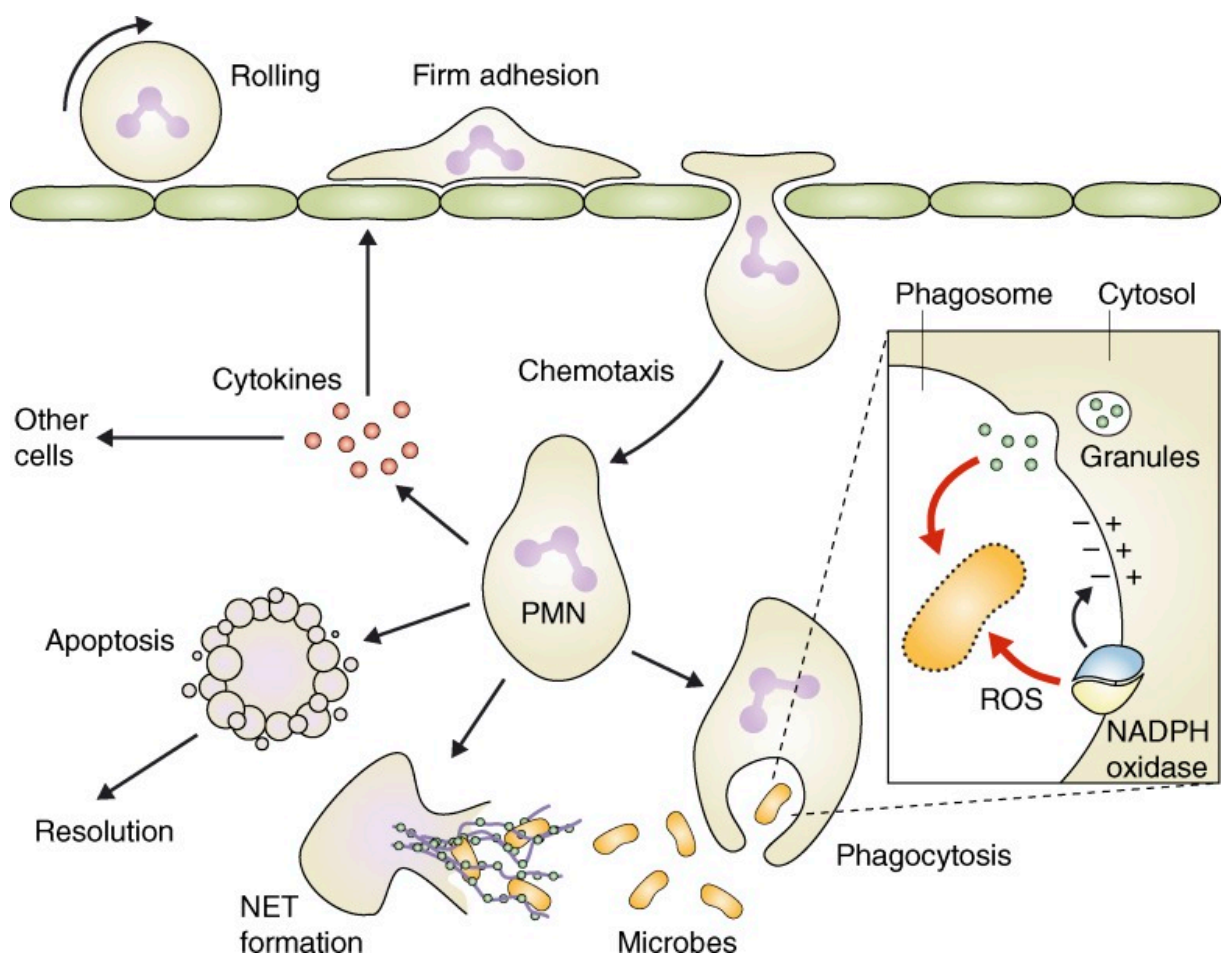


Figure 18 : Schéma récapitulatif des fonctions antimicrobiennes du neutrophile après sa transmigration endothéliale. D'après Mócsai. 2013.



2. Rôle émergent du neutrophile dans l'hypersensibilité de contact

2.1. La dermatite allergique de contact

La dermatite allergique de contact (DAC) ou eczéma de contact est une maladie constituant un problème majeur de santé publique ; elle affecte 15 à 20% de la population et représente environ 20% des maladies professionnelles (212,213). A la différence de la dermatite irritante de contact (DIC) qui implique une réponse inflammatoire due à l'effet toxique direct des molécules chimiques; la DAC implique une réponse immunitaire complexe médiée à la fois par l'immunité innée et adaptative. Il s'agit d'une hypersensibilité de type IV ou retardée selon la classification de Gell et Coombs, en réponse à des allergènes capable d'induire une réponse immunitaire spécifique. Ces allergènes sont souvent de petites molécules chimiquement réactives, de faible poids moléculaire (< 500 Da) appelées haptènes. Une fois dans la peau, les haptènes s'associent à des protéines du soi *via* des réactions électrophiles pour former des néo-antigènes reconnus par le système immunitaire (213,214). La susceptibilité de certains individus à développer une réponse d'hypersensibilité peut être liée à une déficience dans les mécanismes régulateurs, notamment une altération de la composante immunitaire tolérogène (215).

Les molécules chimiques allergisantes font désormais partie de notre vie quotidienne et sont principalement retrouvées dans les bijoux fantaisie et les accessoires métalliques (nickel) ainsi que dans les cosmétiques (coumarine, eugénol) (214,216)... Certaines allergies aux médicaments comme les antibiotiques (la pénicilline, les aminoglycosides), les anesthésiques (benzocaine, lidocaine) et les anti-inflammatoires non stéroïdiens topiques, peuvent se manifester cliniquement sous forme de réactions inflammatoires cutanées (217) (**Figure 19**).





Figure 19 : Aspects cliniques des éruptions eczémateuses induites par le nickel (à gauche) et des éruptions morbilliformes dans une dermatite médicamenteuse à l'ampicilline (à droite). D'après *Color Atlas of Pediatric Dermatology 2008*.

2.2. Diagnostic

Les symptômes cliniques de la DAC dépendent de plusieurs facteurs tels que la nature de l'allergène, la localisation et la fréquence d'exposition. En général, la DAC commence par un prurit intense suivi par l'apparition de lésions cutanées allant de l'érythème vésiculaire transitoire à une tuméfaction importante accompagnée de bulles et parfois d'ulcération. Le diagnostic est souvent basé sur l'aspect clinique des lésions et sur les antécédents d'exposition. La profession du patient, ses habitudes vestimentaires, ses médicaments et ses cosmétiques font partie du bilan nécessaire pour établir le diagnostic. Du point de vue clinique, la DAC n'a pas de caractéristiques totalement spécifiques ou pathognomoniques, d'où l'importance de prendre en considération les diagnostics différentiels tels que la dermatite atopique, la mycose, le parapsoriasis en plaques ou le lupus érythémateux par exemple (218). Des efforts ont été faits pour identifier des marqueurs génomiques et protéomiques ou même des algorithmes mathématiques servant d'outils dans le diagnostic, mais cela semble être complexe et très dépendant de la nature de l'allergène (219–221). Un diagnostic complet de la DAC repose sur l'identification de l'allergène grâce à des patchs tests (tests épicutanés). Ces patchs sont souvent appliqués sur la partie supérieure du dos des patients et contiennent d'infimes quantités des allergènes potentiellement incriminés, généralement la plus forte concentration non-irritante. L'analyse et l'interprétation des résultats seront effectuées entre 48 heures et 7 jours après l'application du patch, selon les recommandations internationales les plus



récentes (214,218,222). L'identification des allergènes devient de plus en plus difficile avec l'émergence continue de nouvelles molécules allergisantes. Tel est l'exemple du haut potentiel allergisant de la méthylisothiazolinone qui s'avère être un dangereux remplaçant du parabène dans les produits cosmétiques (223,224). Bien que l'exposition cutanée répétée soit indispensable pour le développement de la DAC, des variations génétiques peuvent conditionner la susceptibilité individuelle. Par exemple, une mutation de perte de fonction dans le gène codant pour la filagrine épidermique est associée à un risque important de développer une DAC en réponse au nickel (225). Cela met également en évidence le rôle protecteur de la barrière physique cutanée contre le développement de la DAC. Malgré l'association d'un polymorphisme de la N-acétyltransférase (NAT), la glutathion-S-transférase (GST), l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), le TNF et l'IL-16 à un facteur de risque élevée d'allergie cutanée (226), la valeur prédictive et la pertinence de ces marqueurs génétiques en diagnostic restent faible.

2.3. Traitement

Le traitement de la DAC dépend beaucoup de la coopération du patient. L'approche thérapeutique de base consiste à éviter une nouvelle exposition à l'allergène (227). Le traitement pharmacologique courant consiste à appliquer des émoullients seuls ou contenant des agents anti-inflammatoires, notamment les corticoïdes de classe II et III. Le choix du corticoïde dépend de la localisation et de la sévérité de la dermatite. Les antagonistes de la calcineurine sont aussi utilisés en cas d'un traitement topique à long terme au niveau des zones sensibles de la peau. La photothérapie par les rayons ultraviolets peut être le traitement de choix dans les dermatites chroniques, notamment les eczémas de la main (214,218). Bien que plusieurs traitements soient possibles, aucun ne permet une inhibition directe et spécifique de la réponse immunitaire complexe dans la DAC. Des approches visant à induire une tolérance aux allergènes par immunothérapie n'ont pas prouvé leur efficacité dans le traitement de la DAC (228,229). D'autres études ont mis en évidence le rôle protecteur des probiotiques dans les allergies cutanées, notamment leur capacité à diminuer l'incidence de



l'eczéma (230). Ainsi le microbiote intestinal et ses métabolites peuvent jouer un rôle important dans la prévention et le traitement des allergies cutanées (231). Cependant, nous manquons encore de preuves solides pour préconiser leur utilisation dans ce contexte. Enfin, certains chercheurs suggèrent que la réponse immunitaire innée précoce puisse être une cible thérapeutique permettant d'inhiber la cascade d'événements immunitaires aboutissant à la DAC (214).

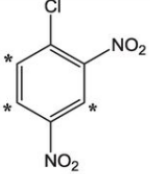
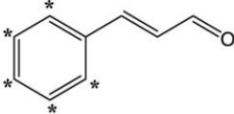
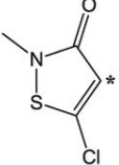
2.4. Le modèle expérimental de la DAC

L'hypersensibilité de contact (HSC) est le modèle expérimental qui mime les différents mécanismes de la DAC. Pour la sensibilisation, l'animal (souvent la souris) est traité au niveau de l'abdomen rasé avec une molécule lipophile telle que le dinitrochlorobenzène (DNCB), l'oxazolone ou le dinitrofluorobenzène (DNFB) diluée dans un solvant organique tel que l'acétone (**Tableau 2**). Après au moins 5 jours, la phase d'élicitation est induite en appliquant une plus faible concentration de la même molécule allergisante au niveau d'un autre site, souvent au niveau de l'oreille. Dans ce dernier cas, la mesure de l'épaisseur de l'oreille par le MEST (abréviation de *mouse ear swelling test*) permet d'avoir un indice pertinent concernant l'intensité de la réponse inflammatoire. Le point faible de ce modèle réside dans les circonstances de sensibilisation qui diffèrent des expositions cliniques répétées dans la DAC. Toutefois, ce modèle a permis d'explorer les différents mécanismes aboutissant à une réponse immunitaire cutanée et de mieux comprendre la physiopathologie de la DAC (232–234).



Tableau 2 : Structure chimique et catégorisation de quelques molécules chimiques sensibilisantes (235).

L'EC3 se détermine selon le test LLNA (abréviation de *local lymph node assay*) et représente la puissance de la molécule allergisante. $EC3 < 0,1$: extrême ; $0,1 \leq EC3 < 1$: forte ; $1 \leq EC3 < 10$: modérée, $10 \leq EC3 < 100$: faible. Ces molécules chimiques peuvent se lier aux résidus d'acides aminés, grâce à leurs sites électrophiles.

Chemical	Structure and position of stable isotope labels (*)	Potency category (% EC3)	Residue
1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB)		Extreme (0.05)	Cys, His, Lys, Tyr
Cinnamaldehyde		Moderate (3.0)	Arg, Cys, His, Lys
5-chloro-2-methyl-4-isothiazol-3-one (MCI)		Extreme (0.0009)	Cys, Lys, His

Dans l'HSC, la réponse allergique inflammatoire survient en deux phases : une phase de sensibilisation asymptomatique ou phase afférente et une phase d'élicitation symptomatique ou phase efférente. Durant la première phase, l'haptène traverse la barrière cutanée et forme des complexes immunogènes avec les protéines de la peau. En réponse directe aux haptènes ou à de nombreux signaux de danger (tels que les DAMP, les FRO et l'adénosine triphosphate ou l'ATP), les DC de la peau sont activées pour prendre en charge et présenter des peptides de ces complexes immunogènes. Les DC matures sont caractérisées par une augmentation d'expression du CD80, CD86 et du CCR7 leur permettant de migrer vers les ganglions drainants pour présenter les antigènes aux LT spécifiques et induire leur expansion clonale. La phase d'élicitation survient suite à une réexposition de la peau au même haptène et permet le recrutement rapide des LT effecteurs spécifiques qui sont principalement les LT CD4⁺ Th1, Th17 et les LT CD8⁺ cytotoxiques. L'activation de ces derniers permet d'induire une réponse immunitaire essentiellement médiée par



l'IFN γ et de mettre en place des fonctions cytotoxiques vis-à-vis des cellules présentant l'haptène, notamment les kératinocytes et les DC. Cette réponse cytotoxique est responsable des signes cliniques observés dans la DAC, notamment les éruptions cutanées érythémateuses et l'œdème (212,213,216,236–242). La phase inflammatoire sera suivie par une phase de résolution impliquant fortement les LT CD4⁺ régulateurs (Tregs). Ces derniers peuvent circuler entre la peau et les ganglions drainants pour inhiber la prolifération des LT effecteurs (243). Une population de Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ a été décrite dans l'HSC pour sa capacité à inhiber les LT CD8⁺, *via* l'induction de l'expression d'ICOS (abréviation de *inducible T-cell costimulator*) (244).

Le rôle de l'immunité innée dans l'HSC a été classiquement lié à la simple présentation de l'antigène par les DC. Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont montré que le pouvoir allergisant des haptènes dépend étroitement de son irritabilité et de son rôle adjuvant, en d'autres termes sa capacité à induire une réponse innée immédiate et non spécifique, générant des signaux de dangers indispensables pour l'activation, la maturation et la migration des DC pour activer les LT spécifiques (213,240). Les kératinocytes, les mastocytes et les neutrophiles figurent parmi les principales cellules contribuant à l'inflammation cutanée d'une façon non spécifique de l'antigène (236). En premier lieu, les kératinocytes participent à l'immunité innée en sécrétant des cytokines telles que l'IL-6, le TNF, l'IL-33, l'IL-1 β et l'IL-18. Ces 2 dernières sont notamment essentielles pour la maturation et la migration des DC (213,245). Bien que leur implication soit controversée, les mastocytes s'avèrent aussi indispensables pour le développement de l'HSC. Les mastocytes déclenchent leur propre recrutement pendant la phase de sensibilisation et contribuent au recrutement des neutrophiles (246,247). Une étude récente a montré que les mastocytes amplifient l'HSC de sévérité moyenne, mais contribuent à l'inhibition de l'HSC sévère ou chronique en sécrétant l'IL-10 (248,249).



2.5. La place du neutrophile dans l'HSC : aperçu historique

Pendant longtemps le rôle du neutrophile dans l'HSC a été sous-estimé et réduit à la simple exacerbation de la réponse inflammatoire cutanée. En effet, l'importance du neutrophile dans l'immunité cutanée réside dans sa capacité à infiltrer la peau très rapidement suite à une agression en réponse à des médiateurs chimioattractants, principalement les chimiokines secrétées par les cellules résidentes (250).

La mise en évidence de l'implication du neutrophile dans l'HSC date de 1999, à la faveur de travaux montrant que le recrutement des neutrophiles pendant la phase d'élicitation est indispensable pour le recrutement des LT CD8⁺. Le recrutement de ces neutrophiles est essentiellement dépendant du CXCL1 secrété par les kératinocytes. En effet, cette étude a montré que l'HSC est inhibée en absence du CXCL1, alors que l'injection intradermique de neutrophiles permet de rétablir un recrutement normal des LT CD8⁺ spécifiques de l'haptène. A l'époque, les auteurs de l'étude ont conclu que l'infiltration en neutrophiles facilitait le recrutement des LT CD8⁺ pendant la phase d'élicitation (251).

Deux ans plus tard, la cinétique du recrutement des neutrophiles à la peau a été décrite chez des patients allergiques. En effet, 24 heures après l'application de l'allergène, l'œdème au niveau de l'épiderme augmente parallèlement à l'infiltration des lymphocytes T, des monocytes/macrophages et des neutrophiles. Parmi ces 3 populations, les LT forment la population prédominante alors que les neutrophiles sont les moins représentés. Les chimiokines prédominantes dans les heures suivant l'élicitation sont CCL2 et CCL5 (252).

En 2004, une étude plus approfondie a confirmé le lien étroit entre les neutrophiles et les LT CD8⁺ pendant la phase d'élicitation. La déplétion des neutrophiles par injection d'anticorps anti-Ly6G (Clone RB6.8C5) avant l'élicitation, supprime le recrutement des LT effecteurs en réponse à différentes concentrations du DNFB. De même, l'injection de neutrophiles à la peau pendant l'élicitation potentialise la réponse inflammatoire. En revanche, la seule présence de neutrophiles et



de l'haptène au niveau de la peau ne suffit pas pour induire une HSC en l'absence des LT spécifiques. Cette étude a donc mis en évidence la capacité des neutrophiles à guider la réponse T spécifique indispensable pour l'induction de l'HSC (253).

En 2010, une étude originale a montré que l'expression du récepteur Nod-like 12 (NLRP12) est nécessaire pour améliorer la capacité migratoire des neutrophiles et des DC dans deux modèles d'HSC (en réponse à l'oxazolone ou à l'isothiocyanate de fluorescéine). Ainsi, les souris déficientes en NLRP12 développent une faible inflammation cutanée sans altération détectable de l'activation de l'inflammasome et de la production des cytokines clés de l'HSC comme l'IL-1 β (254).

En 2012, l'équipe de Robert L. Fairchild a démontré que les expressions du Fas Ligand et de la perforine par les neutrophiles sont indispensables pour la migration des LT effecteurs à travers la barrière vasculaire pendant la phase d'élicitation d'une HSC induite par le DNFB (255).

Peu après, en 2014, Christensen *et al.* ont apporté des éléments nouveaux dans l'implication des neutrophiles dans l'HSC. D'une part, cette équipe a montré que le G-CSF contribue au recrutement des neutrophiles à la peau pendant la phase d'élicitation d'une HSC induite par le DNFB. Tout d'abord, ils ont montré que le nombre de neutrophile augmente dans le sang et la peau des souris quelques heures après l'élicitation. Puis, en utilisant un anticorps plus spécifique (anti-Ly6G, clone 1A8) pour la déplétion des neutrophiles chez la souris, ils ont réévalué l'effet de l'absence des neutrophiles sur l'inflammation cutanée dans l'HSC. Ainsi l'injection de ce clone, n'affecte ni la concentration d'IL- β et d'IFN- γ ni le nombre des LT CD8⁺ dans la peau et les ganglions drainants. Ces résultats ont donc remis en question les résultats de l'équipe américaine de Fairchild et montré que le rôle des neutrophiles dans l'HSC était peut-être surestimé (256).

En parallèle, une autre étude parue la même année a montré que la déplétion en neutrophiles par un anti-Ly6G (Clone 1A8) au cours de la phase de sensibilisation ou la phase d'élicitation ne modifie pas la formation des agrégats de DC (clusters) dans l'HSC induite par le DNFB (257).



Un peu plus tard, en 2015, l'équipe allemande de Stéphane Martin a participé à une étude qui se basait non seulement sur la stratégie de déplétion par les anticorps anti-Ly6G (Clone 1A8), mais aussi sur un modèle murin portant une modification génétique. Il s'agit du modèle $LysM^{Cre/Cre} Mcl-1^{flox/flox}$ présentant un déficit sélectif en neutrophiles qui ont besoin de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (abréviation de *myeloid cell leukemia-1*) pour assurer leur survie. L'équipe a ainsi montré que les neutrophiles sont recrutés massivement à la peau pendant la phase de sensibilisation en réponse aux mastocytes et y produisent des FRO, des enzymes protéolytiques telles que la gélatinase et des cytokines indispensables pour l'HSC telles que l'IL-1 β et le CXCL2. En parallèle, la déplétion en neutrophile suite à une sensibilisation par le TNCB (abréviation de *2,4,6-trinitrochlorobenzene*) altère la migration des DC aux ganglions drainants et affecte ainsi l'activation des LT. Ils ont également montré que la déplétion en neutrophiles pendant la phase de sensibilisation était suffisante pour inhiber fortement l'HSC (247). Cette même hypothèse a été testée par Christensen *et al.*, mais le lot de souris dédié à la validation de cette hypothèse a eu trois injections d'anticorps déplétant au lieu d'une seule injection avant la sensibilisation: une première au jour -1 avant la sensibilisation, une deuxième au jour J-1 et une troisième au jour J+1 après l'élicitation (256).



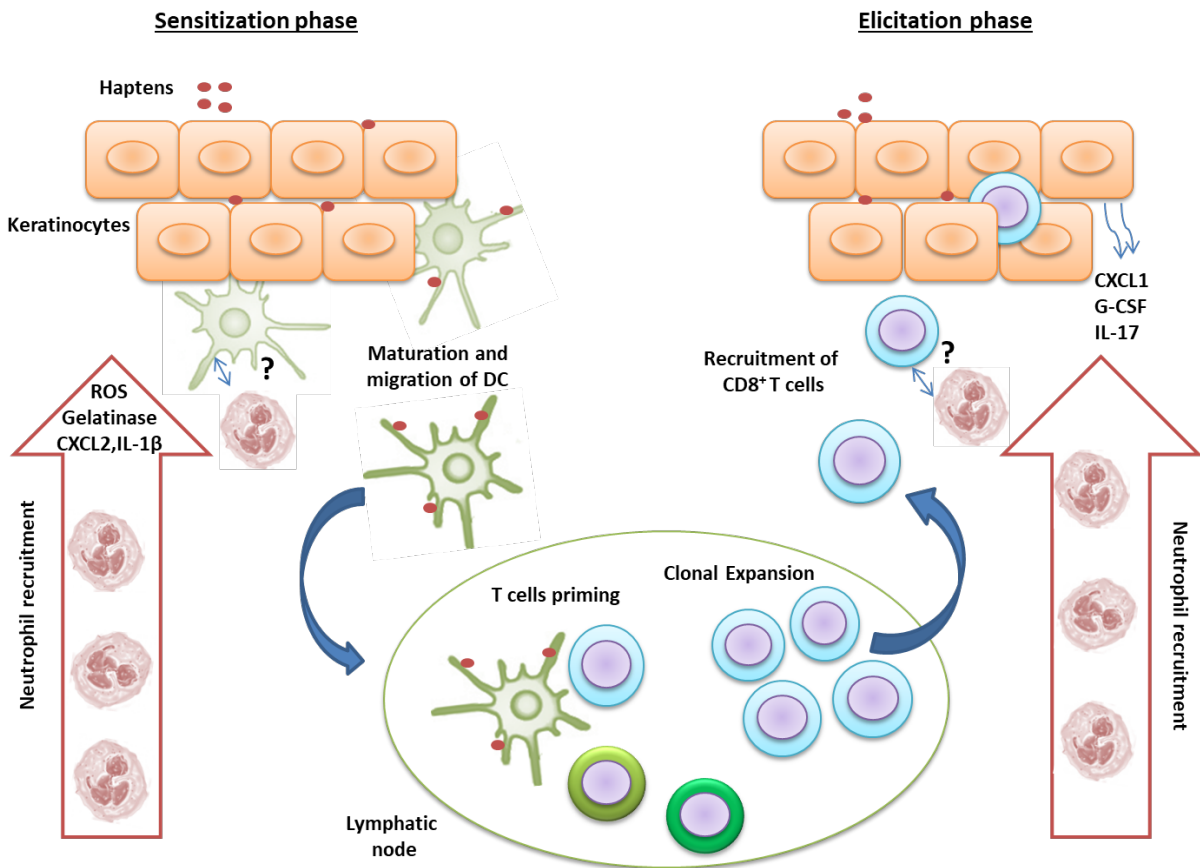


Figure 20 : L'implication du neutrophile dans les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'HSC.

Pendant la phase de sensibilisation, l'haptène traverse la barrière cutanée et sera pris en charge par les DC résidentes. Ces dernières acquièrent leur maturation lors de la migration vers les ganglions drainants où elles activent et induisent l'expansion clonale des LT spécifiques. Une deuxième application du même haptène déclenche la phase d'élicitation marquée par un recrutement massif des LT CD8⁺ spécifiques. Les neutrophiles interviennent dans la première phase et produisent des FRO, des cytokines telles que CXCL2, IL-1 β et des protéases comme la gélatinase. Pendant la phase d'élicitation, les neutrophiles sont principalement recrutés en réponse au CXCL1, G-CSF et l'IL-17. Les neutrophiles participent à l'orchestration du duo DC-LT, mais les mécanismes de leurs interactions avec ces cellules restent mal connus.

Il est donc maintenant acquis que le neutrophile est un acteur important dans l'HSC (**Figure 20**). Sa participation en tant que cellule prenant en charge les haptènes et pouvant les présenter aux LT n'a jamais été démontrée. Ainsi, son implication dans les 2 phases de l'HSC est plutôt dépendante de ses fonctions innées, notamment la production de cytokines, de protéases et de FRO nécessaires pour une activation optimale des DC. Plus récemment, une étude a mis en évidence l'importance de l'expression de l'aquaporine 9 par les neutrophiles pendant la phase de sensibilisation de l'HSC. Cette étude a aussi montré que les neutrophiles acquièrent une expression des molécules du



complexe majeur d'histocompatibilité (CMH II), CD80 et CD86 suite à la sensibilisation (258). Ce dernier résultat permet de faire l'hypothèse que le neutrophile pourrait agir comme cellule présentatrice d'antigène dans l'HSC.

Enfin, une étude récente a dévoilé un rôle pour les cellules T dermiques $\gamma\delta$ dans le recrutement des neutrophiles pendant la phase d'élicitation via la sécrétion d'IL-17 (259).

L'analyse de l'historique des études portant sur les fonctions du neutrophile dans l'HSC (**Figure 21**), prouve que le potentiel de cette cellule ne doit pas être sous-estimé dans un contexte T-dépendant. L'absence du neutrophile dans l'HSC a un impact direct sur la maturation des DC et le recrutement des LT spécifiques. L'infiltration de la peau par les neutrophiles constitue donc une étape clé dans l'orchestration de la réponse immunitaire et ainsi pourrait être considérée comme une cible thérapeutique pour le contrôle des allergies cutanées.

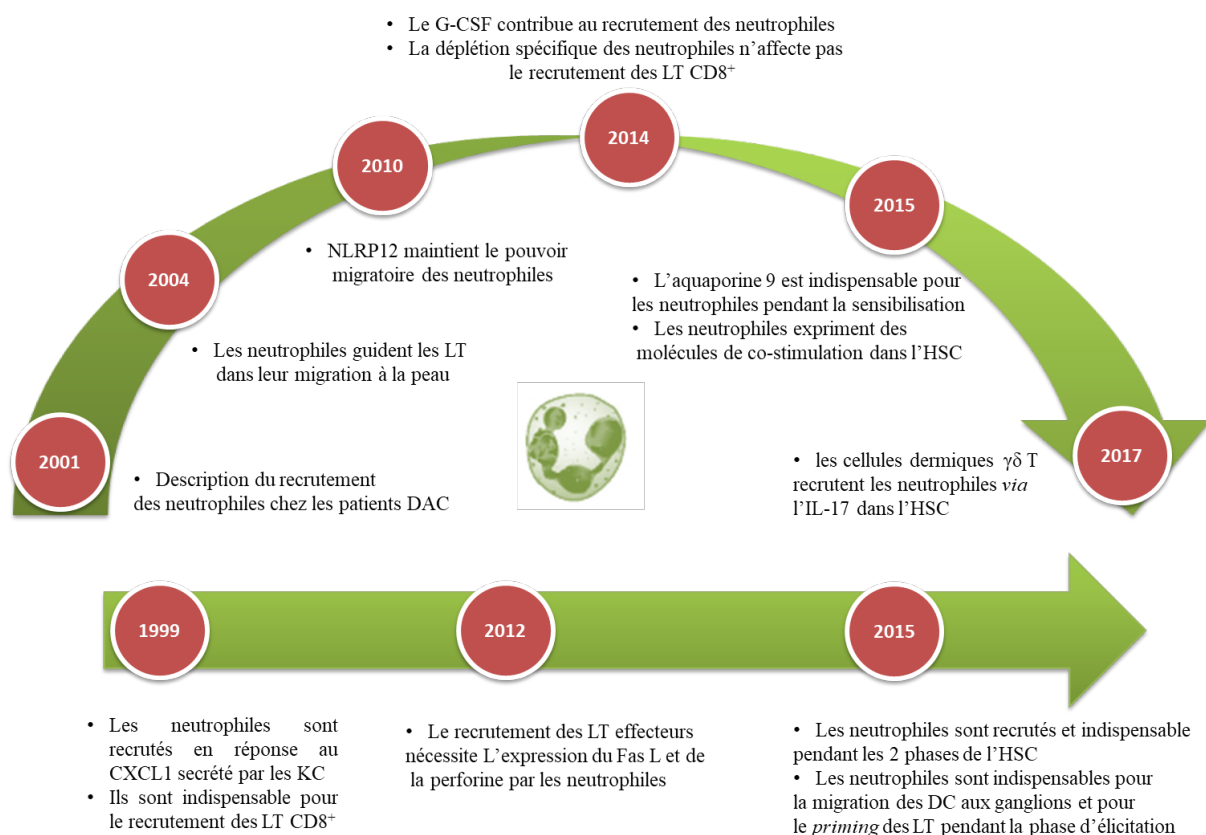


Figure 21 : Historique des études portant sur le rôle du neutrophile dans l'HSC.

La flèche rectiligne représente les études principales formant le point de départ pour les études placées sur le demi-cercle fléché.



3. Implication de Nrf2 dans la réponse immunitaire innée aux sensibilisants chimiques cutanées

Cette troisième partie de l'étude bibliographique est rédigée en anglais, sous forme de revue destinée à la publication. Elle introduit le facteur de transcription Nrf2 et se focalise sur son rôle protecteur dans la régulation de la réponse inflammatoire cutanée aux molécules chimiques allergisantes.

Résumé

La peau forme une barrière physique et immunitaire qui protège les organes internes des agressions environnementales. L'exposition aux produits chimiques représente une source de perturbation pour l'homéostasie de la peau. En particulier, les molécules chimiques allergisantes peuvent agir comme des haptènes et déclencher une réponse immunitaire spécifique. En première ligne de défense, les cellules immunitaires innées orchestrent la réponse cutanée contre les molécules chimiques allergisantes qui élucident les voies oxydatives et inflammatoires. En parallèle, la voie Nrf2/Keap1 joue un rôle clé dans la régulation du stress oxydant *via* l'activation de la transcription d'une batterie de gènes cytoprotecteurs. Ces derniers sont fortement impliqués dans l'élimination des FRO et dans la détoxification cellulaire. Nrf2 peut ainsi contribuer à l'homéostasie de la peau principalement *via* la régulation du stress oxydant. Les molécules chimiques allergisantes activent Nrf2 dans les différentes cellules immunitaires innées de la peau, y compris les cellules de Langerhans, les kératinocytes et les cellules dendritiques. Plusieurs études suggèrent que Nrf2 est capable de réguler la réponse inflammatoire cutanée en réponse à ces molécules, mais les mécanismes de la régulation sont mal connus et semblent être dépendants de la composante oxydante. Dans cette revue, nous soulignons le rôle de Nrf2 dans le contrôle de la réponse immunitaire innée de la peau aux molécules chimiques allergisantes en soulignant son rôle anti-inflammatoire dans l'HSC.



Nrf2 involvement in the chemically-induced skin innate immunity

Abstract

Exposure to chemicals represents a disturbance source for skin homeostasis. In particular, chemical sensitizers could act like haptens and triggers an inflammatory immune response. In the defense line, innate immune cells orchestrate skin response against chemical sensitizers that elucidate oxidative and inflammatory pathways. In parallel, Nrf2/Keap1 pathway is a major regulator of cellular oxidative stress having a ubiquitous expression. In response to chemical sensitizers, Nrf2 is activated in the different skin innate immune cells including Langerhans cells, keratinocytes and dendritic cells. In this context, Nrf2 shows a strong protective capacity through the downregulation of the oxidative stress and the inflammatory pathways. For the purpose of this review we underline the role of Nrf2 in the control of the innate immune skin response to chemical sensitizers.

3.1. Cutaneous innate immunity

Long ago, the skin was considered as a passive physical barrier protecting the internal organs from environmental assaults. In 1978, Streilein proposed that skin has its own integrated immune function and introduced the term of skin-associated lymphoid tissues “SALT”. He suggested that this specialized function is mediated by keratinocytes, Langerhans cells and immune-competent lymphocytes working in concert to ensure an efficient protection (260,261). Unlike adaptive immunity, the innate response does not refer to a specific recognition of antigens, but rather come into play immediately or very early against nonself-antigens. Innate cells are the frontline of immune protection against invading pathogens. They are equipped with a large variety of pattern-recognition receptors (PRR) including Toll-like receptors (TLRs), nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs) and RNA helicases (RIG-I (retinoid acid-inducible gene-I) that detect both pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs). Recognition of these molecular patterns by PRRs induces the activation of intracellular signaling pathway resulting in the release of pro-inflammatory



cytokines mainly *via* the TLR-dependent signaling pathway (262,263). Main resident innate immune cells, such as Langerhans cells and keratinocytes in the epidermis or dendritic cells (DC) subpopulations, mastocytes and macrophages in the dermis, supervise the most exposed organ to danger signals and orchestrate the immune response. Initiation of chemokine release by resident cells leads to a rapid recruitment of circulating immune cells, mainly neutrophils and pro-inflammatory monocytes (236).

3.1.1. Principal resident and recruited innate immune cells

Keratinocytes

Although they form a complex and well-structured physical barrier constituting 90% of the epidermis, it is well established that keratinocytes play a major role in skin immunity, as a connector between environmental signals and the underlying immune cells (264,265). In particular, keratinocytes can detect pathogens *via* their TLR (266) and produce antimicrobial peptides (AMPs) such as cathelicidin and β -defensins (267). In addition, keratinocytes can produce several chemokine such as CCL1, CCL2, CCL5, CCL11, CCL13, CCL17, CCL18, CCL20 and CCL22; as well as pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-18 (268,269). Interestingly, a recent study revealed that keratinocyte could produce IL-23 known to orchestrate chronic skin inflammation in psoriasis (270). Another study has demonstrated that human keratinocytes are more competent in inflammasome activation than murine keratinocytes (271).

Langerhans cells

Discovered by Paul Langerhans in 1868, Langerhans cells (LC) are antigen presenting cells deriving from the monocytic lineage and represents 2 to 4% of the epidermis (272,273). Not long ago, LC were defined as epidermal DC that migrate to the draining lymph node and prime antigen-specific T. Nowadays, LC are considered to be a subset of tissue-resident macrophages that share key properties with macrophages such as embryonic origin and their capacity to self-renew within the epidermis (274,275). LC are characterized by their expression of langerin (CD207), a C-type



lectin receptor (CLR) required for antigen recognition and internalization that result in the formation of Birbeck granule (276). While LC capacity to cross-present antigens to CD8⁺ T cells remains a topic of debate (277–279), it is proven that LC ensure immune tolerance and protection in contact hypersensitivity (CHS) through the inhibition allergen-specific CD8⁺ T cells and the activation of specific regulatory T cells expressing the inducible T-cell co-stimulator (ICOS) (280). Moreover, recent study has demonstrated that LC are necessary for the expansion of polyclonal regulatory T cells dependently from IL-2 in a CD4⁺ T cell-mediated autoimmune model (281).

Dendritic cells

Skin DC are specialized cells that recognize and process antigens in the skin and then migrate to the draining lymph nodes to promote a T effector response. Therefore, immune synapse formation requires a high expression of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 that orientate the differentiation of T helper (Th) cells (282). Skin DC present many subtypes such as dermal DC (dDC), conventional DC (cDC) and monocyte-derived DC (mDC) (283,284). dDC represents the major DC population in the skin and could be divided into two populations: Langerin⁺ dDC that coexpress the CD103 in mice or CD141^{high} in humans and Langerin⁻ dDC in mice or CD14⁻/CD1a⁺ in humans (285). Langerin⁺ dDC and not LC play a key role in inducing immune response and present a unique cross-presentation capacity among skin DC populations (279,286,287). Recent study has uncovered a critical role for skin-resident T cells in the modulation of dDC migratory behavior in response to tissue self-antigens (288). In parallel, using CHS assay, it has been demonstrated that the expression of the gap junction protein Connexin43 is critical for a directed DC migration toward CCL21 (289).

Macrophages and monocytes

Macrophages are antigen-presenting cells better recognized for their innate functions, in particular their heterogeneity-defining phagocytic capacity during pathogens infection and tissue damage (290). Skin-resident macrophages have an embryonic origin and are self-maintained through proliferation, while



infiltrating macrophages derived from Ly-6C^{hi} inflammatory monocytes. Nevertheless, monocytes could enter the skin in the steady state and give rise to macrophages or DC, or regain the circulation without any differentiation (291). Resident macrophages could be classically activated (M1) through PRR signaling pathways triggering the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-12, TNF and IL-23. Moreover, macrophages could be alternatively activated during Th2-mediated immune responses under the influence of IL-4 and IL-13 (268,292). These alternatively activated macrophages, referred to as regulatory M2 macrophages, could display distinct functions and phenotypes according to their origin, but generally promote the resolution of skin inflammation partly via IL-10 and transforming growth factor- β (TGF β) secretion (293,294). In CHS, M2 macrophages secrete CXCL2 to attract dDC leading to an accumulation of DC-T cell clusters in skin, therefore depletion of monocytes/macrophages before elicitation suppresses the inflammatory response (257,295).

Neutrophils

The rapid recruitment of neutrophils into the skin is a key protection mechanism against infections. In line with resident cells activation, in particular keratinocytes activation, neutrophils infiltrate the skin toward inflammatory mediators such as IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF, CXCL1 and CXCL8 (268). Although neutrophils ensure an efficient protection against pathogens, their inappropriate activation could be responsible for severe skin inflammatory and autoimmune diseases (296). Neutrophils secrete IL-17 in psoriasis, affecting thus the IL-23/IL-17 axis balance and maintaining the positive feedback loop of cutaneous inflammation (297,298). Although recent studies have evidenced that skin infiltration by neutrophils during both phases of CHS is essential to induce an inflammatory response, their involvement in antigen presentation is still debated (247,256,258).



3.2. Skin exposure to chemical sensitizers

3.2.1. Allergic contact dermatitis

Skin is frequently exposed to chemical stress representing a novel range of molecules that could directly or indirectly challenge its immune components and may lead to hypersensitivity reactions. Allergic contact dermatitis (ACD) is a common inflammatory disease due to skin sensitization by chemical allergens. CHS is a well-accepted mice model of ACD reproducing the multi-step process of skin sensitization and elicitation in human ACD. It is a frequent manifestation of immune hypersensitivity, in contrast to irritant contact dermatitis (ICD) that result from a direct toxic effect of chemical agents on keratinocytes without specific immune mechanisms (299). The growing prevalence of ACD, approximately 15%-20%, is associated with an increased exposure to environmental and industrial products (212,241). Chemical sensitizers constitute an important group of low molecular weight contact allergens (MW < 500 Dalton) and behave as haptens, that could be inorganic such as nickel ion and cobalt, or organic usually found in fragrances, adhesives, preservatives and dyes (213,300). Complete haptens are highly reactive electrophilic molecules that bind directly to self-proteins reactive nucleophilic chains, while pro- and pre-hapten require further activation and chemical transformation to become reactive. Several factors drive protein haptenation within skin proteome including the nucleophilicity, steric hindrance, competition for binding and local pH (301).

It is well established that following first skin penetration during the asymptomatic sensitization phase, haptens should bind to skin proteins in order to become immunogenic. Haptens or haptenated conjugates can induce oxidant stress response in skin resident immune cells participating in their activation. Subsequently, LC and dDC process the conjugates and migrate to the draining lymph node to prime hapten-specific T cells with a preferential Th1 or Th17 polarization. The elicitation phase of ACD results from second exposure to the same hapten and leads to skin infiltration by cytotoxic T cells secreting interferon-gamma (IFN- γ), killing the haptenized cells and contributing to keratinocytes apoptosis (302).



3.2.2. Haptens recognition by skin cells

The sensitization potential of haptens critically depends on their irritancy, considered as necessary to promote stress responses and to supply innate immune cells with further danger signals (213,240). The direct hapten-induced inflammation, called xenoinflammation, produce DAMPs that are endogenous danger signals including hyaluronic acid (HA) fragments, heat shock proteins, uric acid and extracellular ATP (303,304). Interestingly, mice deficient in both TLR2 and TLR4 failed to develop CHS even in the absence of bacterial flora. Thus, endogenous host-derived signals are sufficient and required to engage TLR2 and TLR4 in response to chemical sensitizers (305). Moreover, recent study has revealed that TLR3 signaling participates in the induction of chronic CHS (306). Upon their penetration, chemical sensitizers induce ROS production in the skin, participating in the breakdown of the extracellular matrix (ECM) (303). Among the released endogenous signals, ROS- and hyaluronidase-dependent HA degradation may lead to TLR2- and TLR4-mediated DC activation (303). In addition, PRRs could be quite valuable for direct hapten recognition by skin cells. The best example being that of nickel ion, known for its capacity to engage two non-conserved histidine residues in human TLR4, absent in mice TLR4 (307). As for NOD-like receptors, they have shown significant capacity to activate the innate immunity through the formation of the multi-protein complexes called inflammasomes. A functional inflammasome could activate the caspase-1 leading to the cleavage of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 into their bioactive forms (308). Different mice models have supported the involvement of inflammasome activity in skin innate response to chemical sensitizers (309,310). Importantly, NLRP12^{-/-} mice display deficient inflammatory response to either oxazolone or fluorescein isothiocyanate (FITC) with a reduced DC migration capacity, while LC migration is impaired in caspase-1^{-/-} mice exposed to the 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (DNFB) (254,309). Given the importance of DC/LC migration in CHS, NLR/caspase activity seems to provide secondary inflammatory signals ensuring DC/LC full activation. Besides PRRs recognition, proteomic-based approaches are nowadays suggesting that chemical sensitizers may trigger intracellular signaling



pathway via direct interaction with cellular proteins. For example, FITC activates p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathways through direct haptentation of specific amino acid residues within critical intracellular proteins in THP-1 cells (human leukemic monocyte) (311). Other molecules like DNFB, induces ROS production through direct interaction and depletion of cytoplasmic glutathione (GSH) in THP-1 cells (312).

3.3. Skin gets by with a little help from Nrf2

3.3.1. Nrf2 in oxidative/xenobiotic stress

As stated previously, redox homeostasis could shape the innate immune response to chemical sensitizers and protect against inflammation. Among the signaling pathways that are redox sensitive, we can mention nuclear factor-kappa B (NF- κ B), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and thioredoxin (313–315). Up to now, Nrf2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2) is considered as the master cytoprotective transcription factor that regulates cellular oxidative stress and could particularly drive detoxification and excretion mechanisms of both organic xenobiotics and toxic metals (316,317). Given its protective functions, an evolutionary conservation of Nrf2 has been defined in vertebrates, with a protein homology ranging from 49% in zebrafish to 89% in cows when compared to humans (318). Nrf2 activity is tightly regulated by its cytosolic repressor Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1). At basal state, Nrf2 binds on the ETGE and DLG motifs two molecules of Keap1, that are linked to the ubiquitination ligase Cullin-3 (Cul-3). This latter promotes Nrf2 ubiquitination followed by its proteasomal degradation with a half-life of 20 minutes approximatively. Following an exposure to oxidants or electrophilic stress, Nrf2 escaped the degradation and is mainly activated after specific modification of Keap1 cysteine thiols. Subsequently, Nrf2 undergoes a critical post-translational phosphorylation and translocates into the nucleus where it forms a complex with small Maf protein and binds to DNA in a specific sequence called antioxidant response element (ARE). In consequence, Nrf2 initiates the transcription of a battery of cytoprotective genes such as NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (*nqo1*), heme oxygenase 1 (*ho-1*), glutathione S-transferase (*gst*), catalase, superoxide dismutase (*sod*) and



glutamate-cysteine ligase modifier subunit (*gclm*) (316,319,320) (**Table 3**). Among Nrf2 downstream targets, *nqo1* is one of the most robustly inducible genes and its activation is strictly dependent from Nrf2 (321). Several Nrf2 activators have been identified, with a high capacity to modify specific cysteines in Keap1 that is known to be a cysteine-rich protein with more than 25 cysteine residues. For instance, sulforaphane (SFN) is an isothiocyanate compound derived from cruciferous vegetables (such as broccoli) used as a pharmacological activator of Nrf2 (322). SFN has a preference to modify the cysteine151 leading to an alteration in the Keap1-Nrf2-Cul3 complex conformation and to further stabilization and accumulation of Nrf2 (323). Although SFN could exert neuroprotective, anti-inflammatory, and anticancer effects, Nrf2 activation may be diverted by cancer cells to promote a certain resistance to drug and escape immune surveillance (324–328).

Table 3 : Principal functions of five antioxidant enzymes encoded by Nrf2 target genes.

Gene name	Abbreviation	Enzyme principal functions
NAD(P)H quinone oxidoreductase-1	NQO1	Ensures reduction of quinones, scavenges superoxide
Heme oxygenase-1	HO-1	Catalyzes heme degradation to carbon monoxide
Catalase	CAT	Transforms hydrogen peroxide into water and oxygen
Superoxide dismutase	SOD	Catalyzes the dismutation of superoxide radicals to molecular oxygen and hydrogen peroxide
Glutathione S-transferase	GST	Promotes the nucleophilic attack by glutathione on electrophilic molecules

3.3.2. Nrf2 in inflammation: crosstalk with NF-κB and inflammasomes

Both NF-κB and inflammasomes are key inflammatory pathways mediating immune responses in infection and inflammation. IκB, the negative regulator of NF-κB transcription factor, is phosphorylated by IκB kinase (IKK) during oxidative stress, leading to the release and nuclear



translocation of NF- κ B. The latter induces the transcription of pro-inflammatory mediators such as IL-6, TNF- α and cyclooxygenase-2 (COX-2) (329). Nrf2 and NF- κ B signaling pathways interact *via* multiple mechanisms. It has been demonstrated that Keap1 mediates IKK proteasomal degradation leading to NF- κ B inhibition. This could result in a competitive binding between Nrf2 and IKK with Keap1 (330). The increased HO-1 activity that depends on Nrf2 activation, also participates in NF- κ B inhibition (331). In parallel, the canonical NF- κ B subunit p65 can alter Nrf2 pathway. Indeed, overexpression of p65 leads to the translocation of Keap1 into the nucleus and the disruption of Nrf2-ARE interactions (332). In addition, p65 and Nrf2 competes for the transcriptional co-activator CBP (CREB-binding protein) that acetylates non-histone proteins to improve assembly of the transcriptional machinery. Therefore, knockdown of p65 reduces Nrf2 deprivation from CBP (333) (**Figure 22**).

NF- κ B activation is required for NLRP3 inflammasome priming, while Nrf2 activation could inhibit both pathways to limit inflammation. The NLR family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome is a multiprotein complex that senses danger signals including PAMPs, DAMPs and ROS. The activation of NLRP3 mediates IL-1 β secretion followed by the process of cell death known as pyroptosis (334). Nrf2 reduces ROS levels through the activation of antioxidant target genes and inhibits NLRP3 priming. Indeed, a recent study has evidenced that Nrf2 is a key inhibitor of NLRP3 inflammasome *via* the activation of the thioredoxin1 in cerebral ischemia reperfusion injury (335). Last, the multi-domain protein p62 provides a critical link between Nrf2, NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathways. Nrf2 and NF- κ B contribute to p62 induction in oxidative stress, while p62-mediated positive feedback loop supports NF- κ B as well as Nrf2 activation through the autophagosomal degradation of Keap1. However, p62 inhibits the NLRP3 inflammasome (336,337). Thus, p62 protein maintains a cellular homeostasis to ensure resistance to redox stress and inflammation dependently from Nrf2. Altogether, Nrf2 participates in the control of inflammation through inhibitory crosstalk with the two key inflammatory pathways NF- κ B and NLRP3 inflammasome (331,336).



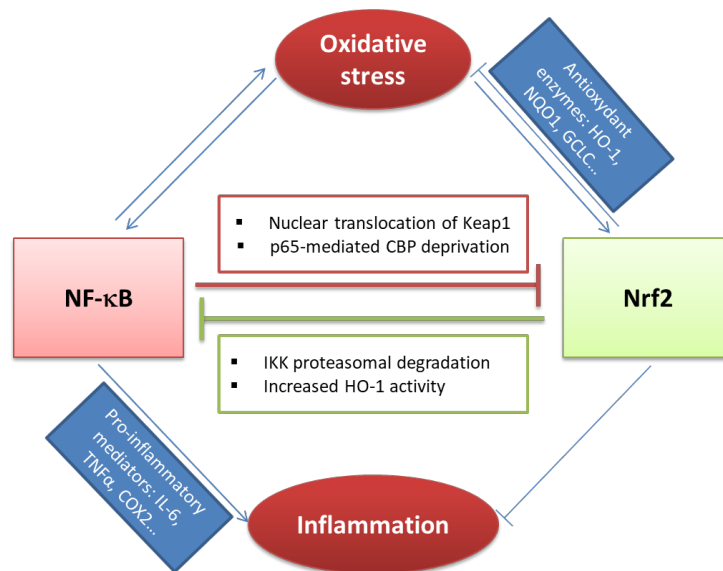


Figure 22 : Crosstalk between Nrf2 and NF-κB transcription factors.

Both pathways are sensitive to oxidative stress that induces their activation. Nrf2 antagonizes NF-κB activation through IKK proteasomal activation and HO-1 activity end-products. In parallel, NF-κB downregulates Nrf2 via p65-mediated CBP deprivation as well as p65-induced Keap1 nuclear translocation. Nrf2 and NF-κB are regulated antagonistically. If Nrf2 predominates, it decreases inflammation and oxidative stress through activation of antioxidant enzymes. When NF-κB predominates, it leads to pro-inflammatory mediators secretion and maintains the oxidative stress.

3.3.3. Regulation of skin innate immunity by Nrf2

Nrf2 is a key transcription factor required for skin homeostasis mostly through modulation of the redox balance. Indeed, the electrophilic property of chemical sensitizers promotes the activation of Nrf2 in the skin. Nrf2 is ubiquitously expressed but can modulate innate immune cells activation and function in different ways. Using a model of normal human epidermal keratinocytes (NHEK), it has been demonstrated that Nrf2 improves keratinocytes differentiation through the upregulation of specific differentiation markers such as loricrin and keratin 10 (338). Interestingly, recent study has revealed that Nrf2 expression in keratinocytes ensures a rescue effect on UV-induced DNA damage and apoptosis in melanocytes (339). Furthermore, Nrf2 activation increases IL-36 γ expression in keratinocytes leading to an increased proliferation (340). In psoriasis, Nrf2 is activated in response to inflammatory cytokines and enhance the expression of hyperproliferation-related keratins (341). Few studies have focused on the role of Nrf2 in keratinocyte immune response to chemical sensitizers, in particular its effect on cytokine production. Nevertheless, given its importance in



sensing chemical stress, evaluation of Nrf2 activation in keratinocytes *in vitro* models becomes a useful tool participating in the prediction of chemicals skin sensitization potential (342,343).

In contrast, numerous studies have specifically investigated Nrf2 role in DC response to chemical sensitizers in different cell models. We have demonstrated that chemical sensitizers such as nickel, dinitrochlorobenzene (DNCB) and cinnamaldehyde (CinA) were able to increase Nrf2 protein level in CD34-DC and THP-1 cells (considered as human monocytic cells) associated with an up-regulation of target genes *ho-1* and *nqo1*, while irritants such as SDS and benzalkonium chloride (BZK) failed to induce Nrf2 accumulation. A positive correlation between Nrf2 target genes induction and chemical reactivity to cysteine has been established; however lysine-reactive chemicals were unable to activate Nrf2. These results proved that chemical reactivity of contact sensitizers provides necessary danger signals for DC Nrf2-dependent activation (344,345). The use of Nrf2 knock-out mice allowed pinpointing the specific effects of Nrf2 in DC response to chemical sensitizers. Indeed, using a proteomic approach, we identified a set of Nrf2-dependent and Nrf2-independent promising biomarkers that are regulated in hapten-induced DC activation. Thus, 7 ARE-containing Nrf2 targets were described relevant in response to chemical sensitizers: HSPA9, voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC1), glutathione S-transferase omega-1 (GSTO1), ferritin light chain 1 (FTL1), peroxiredoxin 1 (PRDX1), SOD2 and transketolase TKT (346). Then using as transcriptional approach, we showed that the lack of Nrf2 in bone marrow-derived DC (BMDC) prevents the up-regulation of antioxidant genes in response to DNCB and CinA leading notably to a higher production of ROS and reduced levels of intracellular GSH. Furthermore, Nrf2 was able to control the chemically-induced apoptotic pathways in DC, through the up-regulation of *bcl-2* gene expression (347). Far from chemical sensitizers, the majority of studies in different inflammatory contexts revealed that Nrf2 downregulates DC activation, notably the expression of co-stimulatory molecules such as CD86 and CD80 and affects the subsequent activation of T cells (348–351).



Although Nrf2 may play a pivotal role in all skin immune cells populations, only its involvement in DC response to chemical sensitizers was widely investigated, while its implication in other population such as LC, macrophages and neutrophils, remains underappreciated. One question raises in all cases: does the anti-inflammatory role of Nrf2 could be independent from its capacity to regulate the oxidative stress? The best answer could be found in the study of Nrf2 implication in macrophages biology. A breakthrough study revealed that Nrf2 directly counteracts the transcription of pro-inflammatory cytokine genes revising a long-held view that Nrf2 regulates inflammation by redox control. This study provides a chromatin immunoprecipitation (ChIP-seq)-based molecular approach suggesting that Nrf2 binds to the proximity of IL-6 and IL-1 β gene transcription start site, interfering thus with the recruitment of RNA polymerase chain. In contrast to the classically adopted hypothesis, this mechanism is totally independent from ROS levels and ARE, and is not a simple consequence to anti-oxidant upstream event (352). In line with these data, Nrf2 has the capacity to up-regulate the expression of the macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) and CD36, two scavenger receptors that are highly required for bacteria phagocytosis and elimination of apoptotic neutrophils respectively, promoting thus the resolution of inflammation (353–356).

Although clear evidence about Nrf2 implication in macrophages functions has emerged, its involvement in neutrophils biology remains a topic of debate. Many studies have argued a correlation between Nrf2 activation in neutrophils and the modulation of their hyper-reactive phenotype in inflammatory contexts such as sepsis and chronic periodontitis (357–359). To go up a level in this setting and replace correlations by evident proof, a transgenic mice model displaying Nrf2-specific deletion in myeloid cells was recently created. Interestingly, high Nrf2 mRNA levels were quantified in neutrophils of the wound tissue and of the blood, 10-fold higher than in monocytes and lymphocytes. Surprisingly, Nrf2 deletion in myeloid cells doesn't exacerbate the inflammatory response or alter the wound healing capability in mice (360). These striking results may put into question the existing correlations concerning Nrf2 role in neutrophils and suggest that these inflammatory cells possess redundant and alternative anti-oxidant mechanisms. Nevertheless,



neutrophils are among the first cells to be recruited to chemically-treated skin in response to resident cells secreted chemokines (247). Thus, their recruitment and their state of activation may indirectly rely on Nrf2 expression in skin resident cells.

Altogether, this review highlights that Nrf2 is key regulator of innate immune cells, in particular the most common pathway induced by chemical sensitizers (**Figures 23,24**). Consistently, Nrf2 is actually considered as a key biomarker able to differentiate sensitizers from non-sensitizers chemicals. Furthermore, the important need for alternatives to animal testing, led to the development of a keratinocytes-based *in vitro* assay, relying on Nrf2 activation as a key event to identify sensitizers (342,361). Although numerous toxicological studies have characterized at the molecular level the underlying mechanisms in the principal skin cells (keratinocytes and DC), few immunological studies took into consideration the complexity of interactions between the different actors of the immune system that could drive response to chemical sensitizers in an unpredictable way. To overcome the lack, our group addressed the question *in vivo*, using a Nrf2 knock-out model. In response to moderate and strong chemical sensitizers, CinA and DNCB respectively, Nrf2 decreases skin inflammation during the elicitation phase of CHS in a concentration-dependent manner. Indeed, the mouse ear swelling test showed approximately 2-fold higher percentage of ear thickness increase, 48 h after challenge. Moreover, using the local lymph node assay (LLNA), we detected a more important proliferation of lymph nodes cells during the sensitization phase of CHS, suggesting that Nrf2 controls activation and migration of skin DC. This exacerbated proliferation was not observed exclusively in response to DNCB and CinA that react specifically with cysteine residues, but also in response to trimethylaluminium (TMA) that reacts with lysine residues and to mixed reactive compound like isophorone diisocyanate (IPDI). Interestingly, Nrf2 was also able to regulate skin irritation in response to chemical irritants that fail to induce Nrf2 in cell models, revealing that such an ideal substitute for animal models is yet to exist (362). This last result is in accordance with a recent *in vivo* study showing the Nrf2 target gene *nqo1* controls skin irritation in response to croton oil through the protection and maintenance of dendritic epidermal T cells (DETC) (363).



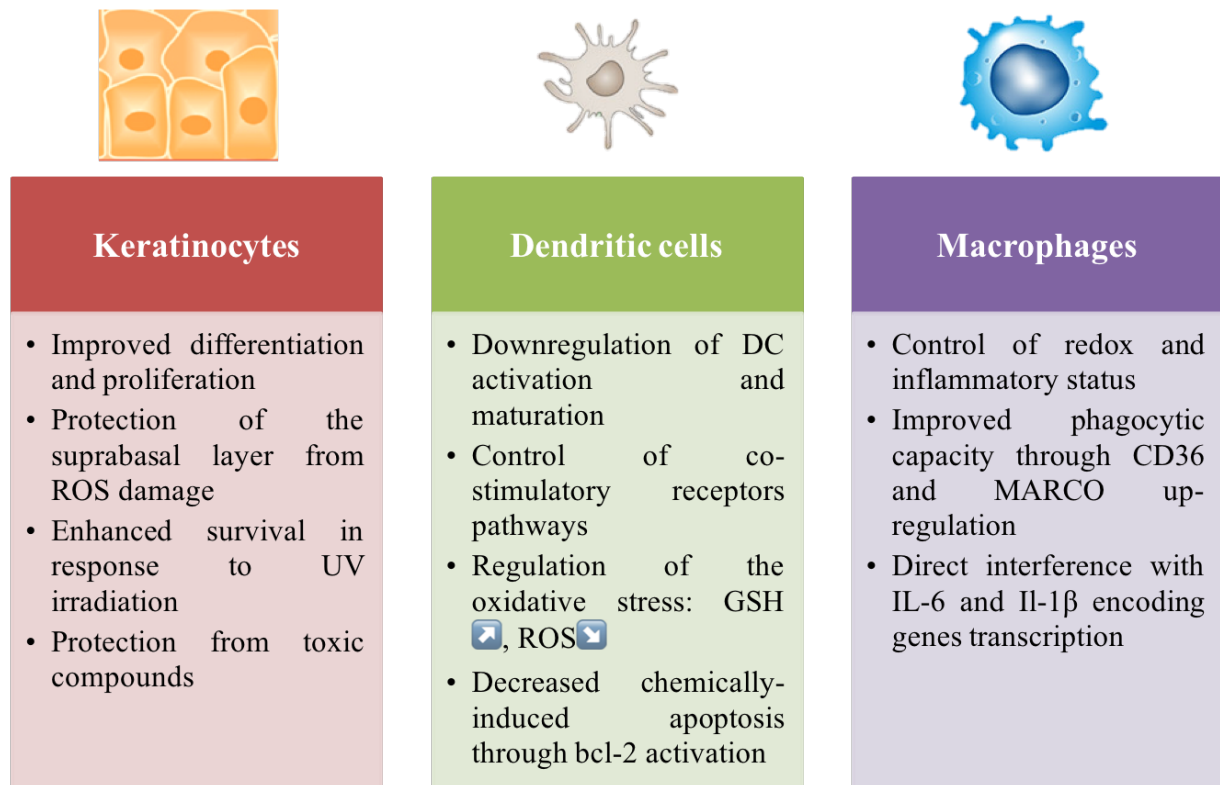


Figure 23 : Role of Nrf2 in the principal skin innate immune cells including keratinocytes, dendritic cells and macrophages.

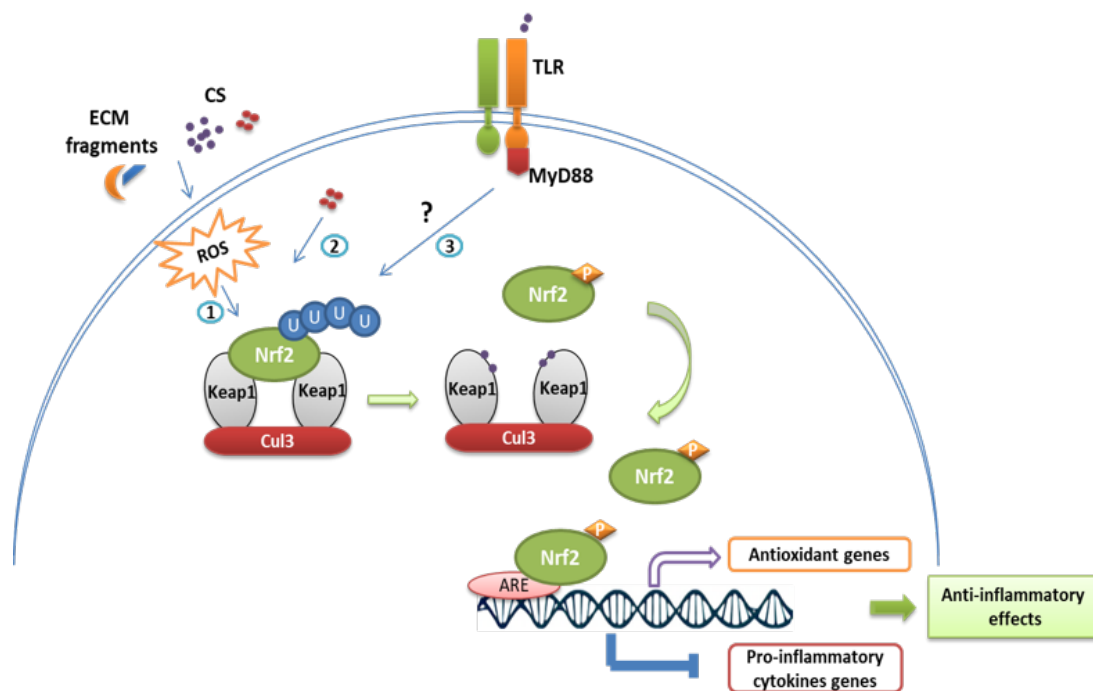


Figure 24 : Nrf2 stabilization and anti-inflammatory effects following immune cells exposure to chemical sensitizers.

In homeostatic conditions, Nrf2 is continuously repressed by the Keap1-Cul3 complex and ubiquitylated. Exposure to chemical sensitizers (CS) activates Nrf2/Keap1 pathway through different ways: 1) ROS-mediated activation resulting from CS irritancy and degradation of extracellular matrix (ECM), 2) direct chemical modification of Keap1, 3) TLR-dependent activation. Thus, modifications on Keap1 lead to Nrf2 stabilization and phosphorylation. Nrf2 translocates then to the nucleus where it binds to ARE sequences promoting the transcription of antioxidant genes and inhibiting the transcriptional activity of several genes encoding pro-inflammatory cytokines.



Recently, we have proven *in vivo* that DNCB activates Nrf2 target genes in skin cells and regulates the transcription of genes encoding inflammatory cytokines such as IL-1 β and CCL20. Furthermore, Nrf2 knock-out mice display a rich chemokine microenvironment associated with an uncontrolled recruitment of neutrophils and monocytes. We have also demonstrated for the first time that macrophages could play a critical Nrf2-dependent role in the chemically induced skin inflammation (unpublished data).

3.4. Future directions

Taken together, Nrf2 is a major regulator in skin response against chemical sensitizers. These latter trigger inflammatory responses in skin innate immune cells associated with Nrf2 activation. Consequently, a battery of cytoprotective enzymes counterbalances the cellular oxidative stress mainly through ROS elimination. Although Nrf2 downregulates pro-inflammatory cytokines pathways in macrophages *via* direct gene regulation, further studies are required to better understand the mechanism of Nrf2 contribution in other skin innate immune cells. Nowadays, there is a growing interest in new pertinent tests to evaluate the sensitization potential of frequently-used chemicals that are flooding the market every day, with new potential sensitizers. On the other hand, several Nrf2 activators are proving anti-inflammatory protective effect in clinical trials. Thus, the importance of Nrf2 emerges not only in risk assessment but also as a potential therapeutic target against the chemically-induced skin inflammation.





ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

III. ÉTUDE EXPERIMENTALE

1. Objectifs du travail

Le neutrophile est une cellule inflammatoire connue pour son pouvoir antimicrobien, mais ses mécanismes de défense doivent être finement régulés pour éviter les dommages tissulaires. Le neutrophile joue aussi un rôle crucial dans les réponses inflammatoires stériles comme dans la DAC. Cette dernière est une pathologie inflammatoire cutanée fréquente due à des expositions répétées à une molécule allergisante. Notre équipe a précédemment montré que le facteur de transcription Nrf2, régulateur clé du stress oxydant cellulaire, joue un rôle protecteur dans l'allergie cutanée. De même, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle protecteur et anti-inflammatoire de Nrf2 dans les cellules immunitaires, notamment les macrophages et les cellules dendritiques.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'implication du facteur de transcription Nrf2 dans la biologie du neutrophile. Dans un premier temps, nous avons étudié la capacité de Nrf2 à réguler les fonctions du neutrophile *in vitro*. Puis nous avons exploré les mécanismes par lesquels Nrf2 inhibe l'allergie cutanée dans un modèle *in vivo*, en nous focalisant sur sa capacité à contrôler le recrutement et l'accumulation des neutrophiles à la peau.

Dans la première partie expérimentale, les fonctions des neutrophiles isolés de la moelle osseuse de souris sauvages et de souris déficientes en Nrf2 ont été comparées. Ainsi nous avons évalué l'activation et l'activité anti-oxydante de Nrf2 dans les neutrophiles. Ensuite nous avons étudié son implication dans la régulation des fonctions principales du neutrophile : la production des FRO, la nétose, la production des cytokines pro-inflammatoires, la phagocytose et la migration. Le but de ce travail a été d'évaluer l'effet anti-inflammatoire de Nrf2 dans le neutrophile en identifiant les fonctions affectées en son absence. Cette partie s'est intégrée dans le cadre de l'identification de nouvelles voies immuno-modulatrices potentielles contrôlant l'hyper-activation des neutrophiles et



permettant de limiter les dégâts qui peuvent en résulter au cours des pathologies inflammatoires.

Dans la deuxième partie expérimentale, nous nous sommes penchés sur le rôle de Nrf2 dans la régulation des événements immunitaires précoces dans l'allergie cutanée, notamment le recrutement des neutrophiles. L'HSC a servi de modèle expérimental de la DAC. Ainsi, nous avons comparé la réponse immunitaire de souris sauvages et de souris déficientes en Nrf2 au cours des premières heures suivant le premier contact de la peau avec le DNCB. En particulier, nous avons quantifié le recrutement et analysé le phénotype des neutrophiles, monocytes, macrophages et DC. De même nous avons exploré le microenvironnement cutané pour comprendre l'impact de Nrf2 sur certaines voies transcriptionnelles impliquées dans la régulation du stress oxydant, la réparation tissulaire et la production de cytokines. Cette partie a permis de décrire une série d'évènements moléculaires et cellulaires régulés par Nrf2 au cours de la réponse immunitaire précoce aux molécules chimiques allergisantes. Cette approche a principalement souligné le rôle de Nrf2 dans la régulation du recrutement des neutrophiles lors de la phase de sensibilisation de l'HSC, étroitement liée au développement de la réponse adaptative au cours de la phase d'élicitation.

Ces travaux fondamentaux ont pour but de proposer des axes thérapeutiques basés sur les connaissances concernant l'implication de Nrf2 dans les fonctions du neutrophile, principalement dans les réactions inflammations cutanées.



2. Résultats expérimentaux

2.1. Manuscrit 1 : Nrf2 diminue l'activation des neutrophiles en réponse au zymosan et module la migration

2.2. Manuscrit 2 : Nrf2 régule le recrutement et l'accumulation des neutrophiles au cours de l'hypersensibilité de contact



2.1. Manuscrit 1 : Nrf2 diminue l'activation des neutrophiles en réponse au zymosan et module la migration

Résumé de l'article 1 (soumis dans *Plos one*)

Les polynucléaires neutrophiles constituent la première ligne de défense contre les pathogènes et leur activation doit être strictement régulée afin d'éviter des effets délétères. Le facteur de transcription Nrf2 régule le stress oxydant et/ou diminue les fonctions inflammatoires dans différentes cellules telles que les cellules dendritiques et les macrophages. Cependant, peu de données sont disponibles en ce qui concerne son implication dans la biologie du neutrophile.

Nous avons donc étudié le potentiel rôle protecteur de Nrf2 dans les fonctions du neutrophile, telles que l'explosion oxydative, la nétose, la migration, la production de cytokines et la phagocytose, principalement en réponse au zymosan. Nous avons montré que ce dernier induit une accumulation de Nrf2 dans les neutrophiles, permettant l'activation de certains gènes cibles, notamment *ho-1*, *nqo1* et *catalase*. Ainsi, Nrf2 diminue l'explosion oxydative induite par le zymosan; l'activation préalable de Nrf2 par le sulforaphane confirme bien son implication. De même, Nrf2 diminue la transcription des gènes codant pour le TNF α et le CCL3 en réponse au zymosan, suggérant un rôle pour Nrf2 dans la régulation de la production de cytokines proinflammatoires. Cependant, Nrf2 n'est pas impliqué dans la nétose, ni dans la phagocytose. En absence de Nrf2, la migration spontanée des neutrophiles semble affectée. En outre, la capacité migratoire des neutrophiles en réponse aux chimiokines CXCL2 et CXCL12 est moins importante dans les neutrophiles déficients en Nrf2, malgré une expression normale des récepteurs CXCR2 et CXCR4 et un niveau normal d'ATP. Nrf2 semble donc nécessaire pour une migration optimale.

L'ensemble de ces résultats suggère que Nrf2 joue un rôle protecteur et anti-inflammatoire dans les neutrophiles. En particulier, il régule négativement leur activation en réponse au zymosan et s'avère nécessaire pour une migration adéquate.



Nrf2 downregulates zymosan-induced neutrophil activation and modulates migration

HELOU Doumet Georges*, **BRAHAM Sarah***, **DE CHAISEMARTIN Luc*†**, **GRANGER Vanessa*†**, **DAMIEN Marie-Hélène***, **PALLARDY Marc***, **KERDINE-RÖMER Saadia*‡**
and CHOLLET-MARTIN Sylvie*†‡

* Inflammation, Chimiokines et Immunopathologie, INSERM UMR996, Univ.Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92290, Châtenay-Malabry, France.

† Laboratoire d'immunologie, «Autoimmunité et Hypersensibilités», Hôpital Bichat-Claude Bernard, AP-HP, Paris, France.

‡ SKR and SCM equally contributed to the study

Short title: The role of Nrf2 transcription factor in neutrophil biology

Key words: Reactive oxygen species, netosis, migration, phagocytosis, zymosan

Corresponding author: Sylvie Chollet-Martin, INSERM UMR996, UFR de Pharmacie, 5 Rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, tel : 00 33 1 46 83 55 27, email : sylvie.chollet-martin@u-psud.fr



Abbreviations

BM	Bone marrow
DC	Dendritic cell
GILZ	Glucocorticoid-induced leucine zipper
GPx	Glutathione peroxidase
HO-1	Heme oxygenase-1
IL-	Interleukin
Keap 1	Kelch-like ECH-associated protein 1
MPO	Myeloperoxidase
NET	Neutrophil extracellular traps
NOX2	NADPH oxidase 2
NQO1	NAD(P)H quinone oxidoreductase 1
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
PMN	Polymorphonuclear neutrophils
ROS	Reactive oxygen species
SFN	Sulforaphane
TLR	Toll-like receptor
TNF α	Tumor necrosis factor α



Abstract

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) are the first line of defense against pathogens and their activation needs to be tightly regulated in order to limit deleterious effects. Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) transcription factor regulates oxidative stress and/or represses inflammation in various cells such as dendritic cells or macrophages. However, its involvement in PMN biology is still unclear.

Using Nrf2 KO mice, we thus aimed to investigate the potential protective role of Nrf2 in PMN various functions such as oxidative burst, netosis, migration, cytokine production and phagocytosis, mainly in response to zymosan. We found that zymosan induced Nrf2 accumulation in PMN leading to the upregulation of some target genes including *ho-1*, *nqo1* and *catalase*. Nrf2 was able to decrease zymosan-induced PMN oxidative burst; sulforaphane-induced Nrf2 hyperexpression confirmed its implication. *tnfa* and *ccl3* gene transcription was decreased in zymosan-stimulated Nrf2 KO PMN, suggesting a role for Nrf2 in the regulation of proinflammatory cytokine production. However, Nrf2 was not involved in netosis or phagocytosis. Finally, spontaneous migration of Nrf2 KO PMN was lower than that of WT PMN. Moreover, in response to low concentrations of CXCL2 or CXCL12, Nrf2 KO PMN migration was decreased despite similar CXCR2 and CXCR4 expression and ATP levels in PMN from both genotypes. Nrf2 thus seems to be required for an optimal migration.

Altogether, these results suggest that Nrf2 has a protective role in several PMN functions. In particular, it downregulates their activation in response to zymosan and is required for an adequate migration.



Introduction

Polymorphonuclear neutrophils (PMN) are the first cells to be mobilized against pathogens present in both blood and tissues. They possess a variety of killing mechanisms such as reactive oxygen species (ROS) release during oxidative burst, secretion of cytolytic enzymes and cytokines, phagocytosis and formation of neutrophil extracellular traps (NETs). They are central players in critical illness [1,2] and in chronic inflammation [3]; therefore, their activation needs to be tightly regulated to avoid tissue damage. Over the past two decades, a large number of studies have evidenced that PMN can also behave like immune-regulatory cells (4,2). Among the recently described mechanisms, one can emphasize the following: i) myeloperoxidase (MPO), a key PMN enzyme, can decrease mortality in a sepsis model and regulate inflammation [5,6], ii) our group and others have described PMN-induced dendritic cells modulation in particular *via* NETs [7,8], iii) NADPH oxidase 2 (NOX2) can limit inflammation in some situations [9] iiiii) several inhibitory receptors and mediators have been described such as immunoglobulin-like transcript 4 or Glucocorticoid- Induced Leucine Zipper (GILZ) [10,11].

Among the antioxidant and cytoprotective factors, nuclear factor (erythroïd-derived 2)-like 2 (Nrf2) is a transcription factor known as a master cell protector from ROS and electrophilic insult [12]. At basal state, Nrf2 is repressed by its negative regulator kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap 1) [13]. Cellular exposure to oxidative stress or electrophiles can alter Keap1 conformation leading to nuclear translocation of Nrf2 [14]. Consequently, Nrf2 activates a battery of cytoprotective genes, such as *nqo1* [NAD(P)H quinone oxidoreductase 1], *ho-1* (heme oxygenase-1) and *catalase*, all characterized by their antioxidant response element (ARE) regulatory sequence [12,15]. Typical Nrf2 activators, such as sulforaphane (SFN) and tert-butylhydroquinone (tBHQ), interact with certain cysteine residues of Keap1 implicating an electrophilic modification [16]. In addition, Nrf2 can be activated by endogenous inflammatory products such as 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) and NO-derived products [17].



The Nrf2-Keap1 pathway is involved in dendritic cell (DC) and macrophage functions [18]. In particular, we have shown that Nrf2 controls cell death induced by contact sensitizers in DCs and upregulates antioxidant genes like *gsr*, *catalase*, *gpx* and *nos2* controlling ROS production [19,20]. Recently, we participated to the description of Nrf2 involvement in the control of fibrosis and autoimmunity during sclerodermia [21]. The absence of Nrf2 in immature DCs (iDCs) raises the intracellular levels of ROS and results in an enhanced co-stimulatory receptor expression associated with an increased antigen-specific CD8 T cell stimulation capacity [22]. Furthermore, the absence of Nrf2 downregulates the phagocytic functions of DCs [22] and macrophages [23,24], in particular *via* CD36 expression (22,24). In addition, Nrf2 downregulates the transcription of pro-inflammatory cytokine genes in macrophages such as *il-6*, *il-1 β* and *tnfa*, independently of redox control [19,26] and is involved in the expansion of suppressive myeloid-derived suppressor cells in steady state and during sepsis [27].

In contrast to DCs and macrophages, few studies have evaluated the role of Nrf2 in PMN. It has been suggested that ROS regulation, one of the major role of Nrf2, could participate in global Nrf2 anti-inflammatory effect [24]. As Nrf2 activation is one of the ROS regulation pathways (both mitochondrial [28] and NOX2 derived-ROS [9,29,30]), it can be assumed that Nrf2 could be a potential regulator of NOX2-dependent PMN functions, such as netosis. Indeed, the *ex vivo* ROS production capacity of PMN from Nrf2 Knock-out mice (Nrf2 KO) has been shown to be increased during sepsis [24,31], in severe periodontitis [32] or in a model of wound healing [33].

Our aim was to better understand the role of Nrf2 in the regulation of oxidative burst and several other PMN functions. For that purpose, we chose to use zymosan as a stimulus. Indeed, this insoluble cell wall preparation from *Saccharomyces cerevisiae* is known to activate phagocytes (TLR-2 and Dectin ligands) via the phosphorylation of p47phox subunit and rac2 activation [34]. We thus compared *in vitro*, several functions of bone marrow (BM)-derived PMN from wild type (WT) mice and Nrf2 KO mice. We found that Nrf2 exhibited a protective role in zymosan-stimulated PMN. Indeed, Nrf2 was shown to activate the transcription of the cytoprotective genes



nqo-1, *ho-1* and *catalase*, to downregulate the pro-inflammatory genes *tnf α* and *ccl3* and to reduce ROS production. Also, an optimal migration was linked to Nrf2 expression. Interestingly, Nrf2 was not required for phagocytosis or NET release in our model. These findings could help clarifying the implication of Nrf2 in clinical situations associated with PMN recruitment and/or activation. Moreover, these new findings could improve the comprehensive evaluation yet to be developed for the Nrf2-targeted therapy, as recently discussed by Cuadrado *et al.* [35].



Material and methods

Mice

Wild-Type (WT, $nrf2^{+/+}$) and Nrf2 Knock-Out mice (Nrf2 KO, $nrf2^{-/-}$) were generated from inbred C57BL/6J background $nrf2$ heterozygous mice. Nrf2^{-/-} mice [36] were provided by the RIKEN BRC according to a MTA to Prof S. Kerdine-Römer. 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 2010/63/EU. Mice were bred side by side in ventilated racks within a specific pathogen-free facility. Age- and sex-matched mice were used at 8-14 weeks of age. Genotyping was performed by PCR using genomic DNA that was isolated from tail snips as described [36].

BM-derived PMN isolation

PMN were isolated from BM using the mouse neutrophil isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergish Glabash, Germany) according to the manufacturer's instructions. In brief, cells were collected from the femur and tibia and resuspended in phosphate buffered saline (PBS) solution containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) and 2 mM Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA). Cell suspension was then filtrated through pre-separation filters 70 μ M (Miltenyi Biotec) to remove cell aggregates or large particles and ensure effective magnetic cell labeling. Cells were incubated with biotin-antibody cocktail for 10 min, washed and incubated with anti-biotin microbeads for 15 min. Finally, cell suspension was washed and applied onto a LS column placed in a magnetic field. Flow-through containing unlabeled cells representing the enriched PMN suspension, were collected and suspended in Hank's balanced salt solution (HBSS) supplemented with 0.5% heat-inactivated fetal calf serum (FCS). Cells were kept at 4–8°C during staining and magnetic bead isolation. Cell purity and viability were assessed by flow cytometry (FACS Calibur, BD Biosciences, San Jose, USA) using antibodies against CD11b and Ly-6G (BioLegend, London, UK) and was always $\geq 95\%$ (**Supplemental Figure 1**).



***In vitro* Nrf2 activation by sulforaphane**

In some experiments, sulforaphane (SFN) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used in order to strongly activate Nrf2 in WT PMN. Cells (1×10^6 /ml) were pre-incubated with SFN (1 μ M or 5 μ M) for 4 h at 37 °C with 5% CO₂. As SFN can be toxic in some conditions, we checked that none of the SFN concentrations were either toxic or induced apoptosis within 4 h, using the Annexin V/7-amino-actinomycin (AnnV/7AAD) counterstaining (BioLegend) followed by flow cytometry (FACS Calibur, Becton Dickinson). Cells positive for Annexin V and negative for 7-AAD were considered as apoptotic cells (always below 3%), whereas double positive cells were considered as necrotic cells (always below 8%) (**Supplemental Figure 2**).

Nrf2 quantification using flow cytometry

WT PMN (1×10^6 /ml) were stimulated with SFN (1 μ M or 5 μ M), or with zymosan (5 μ g/ml) for 4 h at 37 °C with 5% CO₂. After fixation and permeabilization using a commercial kit according to the manufacturer's instructions (ThermoFisher Scientific, California, USA), cells were incubated with a rabbit monoclonal anti-Nrf2 antibody (ab62352, Abcam, Cambridge, UK), and then with a goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 IgG (ThermoFisher Scientific). IgG antibody isotype control was used as a negative control (BD Biosciences). Intracellular Nrf2 expression was quantified in all the samples using an Attune NxT flow cytometer (Thermofisher Scientific). In some experiments, whole BM cells were stained directly without PMN isolation; in that case, the anti-Ly6G antibody was used to identify PMN.

Quantitative real-time RT-PCR analysis

Total RNA was extracted after lysis of PMN treated for 4 h (1×10^6 cells/ml) with RNA-PLUS reagent (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Total RNA pellets were resuspended in RNase-free water and quantified by spectrophotometry. First-strand cDNA was synthesized from total RNA on a thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany). The reaction used 1 μ g of total RNA, a dNTP mixture (containing 25 mM dATP, dGTP, dCTP, and dTTP) and 50 μ M oligo (dT) primers



(MWG Biotech, Ebersberg, Germany). Reverse transcription was performed in 1× AMV reverse transcriptase reaction buffer (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), with RNase inhibitor (RNasine; Promega) at 40 U/μl, AMV reverse transcriptase (Promega) at 10 U/μl, and RNase-free water, to a final volume of 10 μl. A control without reverse transcriptase was used to confirm the absence of DNA contamination. Real-time PCR was performed with SYBR Green technology on a CFX96 system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Each reaction mix consisted of 1:50 diluted cDNA in a 4 μl final volume of nuclease-free water; 0.5 μM of each forward and reverse primer for *ho-1*, *nqo1*, *catalase*, *il-6*, *tnfα*, *gapdh*, and *b-actin*; and Sso Advanced Supermix (Bio-Rad) in a total reaction volume of 10 μl. The following specific primers were used (forward and reverse, respectively): *ho-1*: 5'-AGG GTC AGG TGT CCA GAG AA-3' and 5'-CTT CCA GGG CCG TGT AGA TA-3'; *nqo1*: 5'-ACG GGG ACA TGA ACG TCA TTC T-3' and 5'-AGT GTG GCC AAT GCT GTA AAC C-3'; *catalase*: 5'-GTG GTT TTC ACT GAC GAG ATG GCA-3' and 5'-TCG TGG GTG ACC TCA AAG TAT CC-3'; *il-6*: 5'-AGT TGC CTT CTT GGG ACT GA-3' and 5'-CAG AAT TGC CAT TGC ACA AC-3'; *tnfα*: 5'-CAC CAC GCT CTT CTG TCT AC-3'; *ccl3*: 5'-ACC ACT GCC CTT GCT-3' and 5'-TGG AAT CTT CCG GCT-3'; *il-1β*: 5'-ACA GCA GCA CAT CAA-3' and 5'-GCA GGT TAT CAT CAT-3'; *gapdh*: 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA G-3' and 5'-GAT CCA GGG ATG ATG TTC-3'; *β-actin*: 5'-CCT TCT TGG GTA TGG AAT C-3' and 5'-AGG TCT TTA CGG ATG TCA AC-3'.

After 30 s at 95°C for Sso7dfusion polymerase activation, amplification was allowed to proceed for 44 cycles, each consisting of denaturation at 95°C for 5 s and annealing/extension at 60°C for 5 s. Eightfold serial dilutions of mixed cDNA (from different samples) were analyzed for each target gene, allowing us to construct linear standard curves from which the efficiency (E) of each PCR run was evaluated. SYBR green fluorescence was detected at the end of each elongation cycle, after which a melting curve was constructed to confirm the specificity of the PCR products. Quantification was performed with CFX Manager Software (Bio-Rad), and data were analyzed by the $\Delta\Delta C_t$ method. Ratios were calculated as the geometric mean of $(1 + E)^{-\Delta\Delta C_t}$, where E is the efficiency and $\Delta\Delta C_t$ is



the target gene expression of treated cells compared with normal levels in untreated cells, with correction for the expression of the reference genes β -actin and GAPDH. Results are expressed as the fold factor increase (i.e., ratio of $(1 + E)^{-\Delta\Delta Ct}$ of treated cells/ $(1 + E)^{-\Delta\Delta Ct}$ of untreated WT cells).

Analysis of ROS production

The sum of intra- and extra-cellular ROS produced was quantified by luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindione)-amplified chemiluminescence assay. Isolated WT and Nrf2 KO PMN were seeded at 1×10^5 /well in a white flat bottom 96-well plate (Costar, Kennebunk ME, USA) and treated with 0.06 mM luminol (Sigma-Aldrich). Cells were then stimulated with increasing concentrations of zymosan (1, 5, 10 and 50 μ g/ml). In some experiments, a preincubation with SFN 1 μ M for 4 h was carried out before cell stimulation, allowing an optimal Nrf2 expression in WT PMN. PMN without stimulation were used as controls. ROS-dependent chemiluminescence was analyzed immediately using a multimode microplate reader (TristarTM LB941 Berthold, Bad Wildbad, Germany). ROS release was monitored for 60 min every 30 sec at 37°C. All samples were tested in triplicate. The area under the curve (AUC) of each sample was calculated.

Induction, quantification and observation of neutrophil extracellular traps (NETs)

NET analysis was performed as previously described [37]. Briefly, staining with the non-cell-permeable DNA dye SYTOXgreen (Invitrogen, Carlsbad, USA) was used to evaluate the kinetics of NET formation. PMN (1×10^5) in HBSS medium were seeded to a Cellstar black 96-well plate (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany). SYTOXgreen (5 μ M) was added 20 min before PMN stimulation or not with PMA 100 nM, platelet activating factor (PAF) 10 μ M, ionomycin 4 μ M or zymosan 50 μ g/ml. The fluorescence of NET-bound SYTOXgreen (excitation: 488 nm, emission: 510 nm) was analyzed for a period of 3 h every 15 min at 37°C using LB 941 Multimode reader TriStar. NET release was calculated as the difference between the mean relative fluorescence unit (RFU) at time 15 min and the RFU at time 180 min.

To visualize NETs, fluorescence microscopy was used. Isolated WT and Nrf2 KO PMN were



seeded on polylysine-coated glass coverslips (1×10^5 cells/well), allowed to settle for 15 min at 37°C, and then stimulated with PAF at 10 μ M for 3 h. Samples without stimulation were used as controls. Samples were then fixed with 4 % paraformaldehyde for 10 min at room temperature. Supernatants were removed and coverslips were treated with goat anti-MPO IgG (Bio-Techne, Lille, France). The corresponding secondary antibody was then added: donkey anti-goat IgG AF488 (Abcam). Samples without primary antibodies were used as negative controls. As a final step, coverslips were mounted in medium containing DAPI to label DNA. Cells were analyzed by epifluorescence microscopy on a Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments Europe B.V., France).

Phagocytosis analysis

Phagocytosis analysis was performed as per supplier's instructions using pHrodo™ Red zymosan BioParticles® (Life Technologies, Carlsbad, USA) conjugate for phagocytosis. Briefly, isolated WT and Nrf2 KO PMN (1×10^6 /ml) were seeded in duplicate wells, pretreated or not with cytochalasin D (20 μ M) (Sigma-Aldrich) at 37 °C with 5% CO₂ for 30 min and then incubated for 90 min in the dark alone or with increasing concentrations of Zymosan bioparticles (5-50 μ g/ml). Using flow cytometry (FACS Calibur), phagocytosis could be quantified by the increase in particle fluorescence in acidic compartments. Cells were subjected to a one-color analysis (FL-3, PerCP) for the percent of zymosan positive cells.

Chemotaxis assay

Chemotaxis assay was performed on freshly isolated WT and Nrf2 KO PMN using transwell migration assay, as previously described [38]. Briefly, PMN (1×10^6 cells) were added to the upper chamber of Transwell® filters (3 μ m pore diameter, Costar). These chambers were placed in 24-well cell culture plates containing 600 μ L assay buffer without chemoattractant or with N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP, 1 μ M) (Sigma-Aldrich), increasing concentrations of CXCL2 (0.5-200 nM) and increasing concentrations of CXCL12 (50-400 nM) (both from BioLegend). In some experiments, cells were preincubated with AMD3100 octahydrochloride 50



nM (Sigma-Aldrich) for 30 min before being placed in the upper Transwell chamber to confirm the specificity of CXCR4-dependent migration. Chambers were then incubated for 60 min at 37°C with 5 % CO₂ and the cells that had migrated to the bottom chamber were recovered and stained with antibodies against Ly-6G (PercP, Cy5.5) and CD11b (FITC) (both from BioLegend) for flow cytometry analysis (FACS Calibur). Chemotactic indexes were then calculated by dividing the number of PMN counted in chemokine -stimulated wells by the number of PMN counted in filter-free wells (Input well) .

CXCR2 and CXCR4 expression

The expression of CXCR2 and CXCR4 on freshly isolated WT and KO PMN was evaluated using flow cytometry (FACS Calibur). First, PMN were incubated with anti-FcR antibody (anti-CD16/CD32, BD Biosciences) at 4°C for 15 min. Then, cells were washed and incubated in the dark with antibodies against Ly-6G, CXCR2 and CXCR4 or with corresponding isotypes (all from BioLegend). Ly-6G positive cells were subjected to a double-color analysis to measure the mean intensity fluorescence for both receptors.

ATP measurement

The level of ATP was measured in freshly isolated PMN using Luminescence ATP detection Assay Kit (Abcam) following the manufacturer's instructions. Isolated resting WT and Nrf2 KO PMN were seeded at 1×10^5 /well in a white flat bottom 96-well plate (Costar) without any stimulation. Samples were tested in triplicate. Luminescence was quantified using the multimode microplate reader (Tristar™ LB941 Berthold) and then converted to ATP concentration (in μ M) using standard curve.

Statistical analysis

Nonparametric analyses (Mann Whitney for unpaired data) were performed using GraphPad Prism software. Data are expressed as means \pm SEM. $P < 0.05$ was considered to denote statistical significance.



Results

Nrf2 is inducible in BM-derived WT PMN and triggers the activation of its target genes

Nrf2 is an ubiquitous transcription factor, constantly ubiquitinated by its cytosolic repressor Keap1 [39]. As a first step, we assessed Nrf2 expression and stability in WT PMN and the expression of three main target genes in response to zymosan. The SFN was used as positive control. BM cells from WT mice were stained directly after filtration in order to quantify Nrf2 *endogenous* expression in PMN, in comparison to other BM cells. As expected, Nrf2 was expressed in almost all BM cells; interestingly, its intensity of expression in PMN (identified as Ly6G⁺ cells) was at least 2 fold higher than in the rest of BM cells (**Fig. 1A**).

As Nrf2 was highly expressed in WT PMN, we evaluated its accumulation in response to an Nrf2 activator or a strong PMN stimulus. Freshly isolated BM-derived WT PMN were thus incubated alone, with SFN (a well-known Nrf2 activator) or with zymosan, for 4 h. Using flow cytometry, we could evidence that, after 4h, SFN 1 μ M and zymosan were able to significantly increase the intracellular staining of Nrf2 in WT PMN, indicating its accumulation (**Fig. 1B**).

Finally, the transcription of three downstream target genes of Nrf2 (*nqo1*, *ho-1* and *catalase*) was compared between WT and Nrf2 KO PMN, in response to SFN and zymosan. SFN induced the transcription of *nqo1*, *ho-1* and *catalase* in WT PMN (**Fig. 2**). Zymosan also induced, but to a lower extent, a significant mRNA expression of these three genes in WT PMN. Concerning Nrf2 KO PMN, only *ho-1* mRNA was slightly but not significantly induced in response to the higher concentration of zymosan suggesting an Nrf2-independent mechanism of *ho-1* transcription.

Taken together, these results strongly suggest that like SFN, zymosan is able to stabilize Nrf2 and activate its target genes in WT PMN.



Nrf2 activation in PMN participates in the regulation of zymosan-induced oxidative burst

As Nrf2 is highly expressed and inducible in PMN, we aimed to study its implication in different PMN functions. First, luminol-amplified chemiluminescence assay was used to evaluate the role of Nrf2 on both intra- and extracellular ROS production in response to zymosan. In comparison to WT, PMN from Nrf2 KO mice exhibit a shift in the kinetics of ROS production, characterized by an early peak at 25 min following stimulation with zymosan (**Fig. 3A**). In response to increasing concentrations of zymosan (1, 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$), we quantified a significantly higher production of ROS in Nrf2 KO PMN than in WT PMN suggesting an implication of Nrf2 in the regulation of ROS production (**Fig. 3B**).

Next, the effect of an important Nrf2 accumulation on the regulation of ROS production was assessed. WT and Nrf2 KO PMN were thus pre-treated or not with 1 or 5 μM of SFN at 37°C for 4 h, before stimulation with zymosan at 5 $\mu\text{g/ml}$. As shown in **Fig. 3C**, SFN-preincubation significantly decreased ROS production in WT PMN in a concentration-dependent manner. This decrease was also observed in a lesser extent in Nrf2 KO PMN after pretreatment with the highest concentration of SFN (5 μM), suggesting that SFN decreases ROS production through Nrf2 dependent and independent mechanisms.

These results provide evidence that Nrf2 activation participates in the regulation of ROS production in BM-derived PMN in response to zymosan.

Nrf2 does not impact NET release

Netosis is a relatively recently described PMN function, consisting of the release of DNA fibers decorated by numerous intracellular proteins. We thus examined for the first time the possibility that Nrf2 might also modulate this function. As zymosan is not known to be an efficient inducer of netosis, PMN were also stimulated for 3 h with three classic PMN stimuli known to induce netosis: PMA, PAF and ionomycin (**Fig. 4A**). DNA release, as a feature of NET formation, was measured by Sytox Green fluorescence. As expected, NET release depended on the stimulus used, PMA and ionomycin being more efficient than PAF and zymosan in both WT and Nrf2 KO PMN (**Fig. 4B**).



The lack of Nrf2 did not affect PMN capacity to release extracellular DNA in response to any stimuli.

Netosis was then analyzed using fluorescence microscopy. **Fig. 4C** shows web-like DNA fibers associated with MPO, released in response to 10 μ M of PAF both in WT PMN and Nrf2 KO PMN. These results confirm that PMN from both genotypes share a similar capacity to produce NETs after 3 hours of stimulation. Altogether, these results indicate that Nrf2 is not involved in classical, long-time stimulated netosis.

Nrf2 modulates the transcription of some pro-inflammatory genes

TNF α , IL-6 and IL-1 β are key pro-inflammatory cytokines produced by PMN. We sought to demonstrate whether Nrf2 could control the transcription of genes encoding these cytokines as well as the chemokine CCL3 (macrophage inflammatory protein-1 α). For that, their transcriptional level was quantified in WT and Nrf2 KO PMN stimulated or not with zymosan 5 μ g/ml for 4 h. Interestingly, the lack of Nrf2 allowed an important transcription of genes encoding CCL3, TNF α and IL-1 β in response to zymosan. As shown in **Fig.5**, Nrf2 KO PMN displayed a significantly enhanced *tnfa* and *ccl3* mRNA expression in response to zymosan as compared to WT PMN, while *il-6* and *il-1 β* mRNA expressions were not significantly increased in the absence of Nrf2.

Nrf2 is not involved in the phagocytic capacity of PMN

We then compared the phagocytic capacity between WT and Nrf2 KO PMN. This function was analyzed using pHrodo™ Red Zymosan Bioparticles™ Conjugates. We found that WT and Nrf2 KO PMN showed similar capacity to phagocyte zymosan bioparticles after 90 min, in a concentration-dependent manner. Similarly, the inhibition effect of Cytochalasin D (inhibitor of actin polymerization) was similar in both genotypes (**Fig. 6A, B**). These data suggest that Nrf2 does not seem to be involved in the phagocytosis of zymosan particles by PMN.



Nrf2 is required for an optimal PMN migration independently of chemokine receptor expression and ATP level

We finally studied the role of Nrf2 in the modulation of PMN migration. We focused on two axes (CXCR2 and CXCR4) because *in vivo* PMN recruitment relies heavily on their ligands CXCL2 and CXCL12 respectively; fMLP was used as a positive control. Using a transwell migration assay, PMN were allowed to migrate for 1 h spontaneously, toward 1 μ M of fMLP or toward gradual concentrations of CXCL2 and CXCL12. In the absence of Nrf2, PMN spontaneous migration and migration in response to fMLP were significantly decreased as compared with WT PMN migration. Concerning the response to increasing concentrations of CXCL12, both WT and Nrf2 KO PMN displayed a relatively weak capacity to migrate. Interestingly, Nrf2 KO PMN displayed a significantly decreased capacity to migrate in response to the lowest concentration of CXCL12 as compared to WT PMN. This migration was completely abolished in the presence of AMD, a competitive inhibitor of CXCL12. Concerning the dose-response of CXCL2, two distinct bell curves could be observed, one shifted with respect to the other. Indeed, Nrf2 KO PMN displayed a significant decreased capacity to migrate in response to the two lower concentrations of CXCL2, while migration in response to higher concentrations was similar in both WT and Nrf2 KO PMN (**Fig. 7A**). These results suggest that Nrf2 could participate in PMN motility by increasing their sensitivity to chemoattractants.

In order to assess whether these differences in migration in the absence of Nrf2 could be linked to differences in the expression of chemokine receptors, we analyzed CXCR4 and CXCR2 membrane expression on freshly isolated PMN. As observed, WT PMN and Nrf2 KO PMN displayed similar expression of both receptors (**Fig. 7B**), suggesting that Nrf2 can participate in PMN migration independently of chemokine receptor expression.

In order to better understand the mechanism of Nrf2 KO PMN affected migration, we analyzed the PMN phenotype after 1 h of migration by quantifying the expression of CD11b adhesion molecule. We found that the migration-induced upregulation of CD11b was significantly increased in Nrf2



KO PMN as compared with WT PMN, in response to low concentrations of CXCL2. Also, CD11b upregulation was generally higher in response to CXCL2 as compared to CXCL12 (**Fig. 7C**).

Finally, as ATP is mandatory for an optimized migration we hypothesized that ATP levels could be different in Nrf2 KO PMN. We found no significant difference between both genotypes at resting state, even if ATP levels seemed to be slightly higher in WT PMN (**Fig. 7D**).



Discussion

PMN play a key role in host defense against pathogens, but inadequate or excessive activation can lead to deleterious effects, contributing to the pathophysiology of many acute and chronic inflammatory diseases. In parallel, Nrf2 plays an active role in the control of inflammation, via several mechanisms. Here, using an *in vitro* model, we found that Nrf2 participates in the regulation of murine BM-derived PMN response to the fungal stimulus zymosan, *via* the activation of cytoprotective genes and the downregulation of pro-inflammatory genes. ROS production was depending on Nrf2 activation, while phagocytosis and netosis were similar in WT and Nrf2 KO mice. Our results thus highlight the impact of Nrf2 on PMN activation, providing new findings relevant to the regulation of neutrophil activation by zymosan.

Several studies have led to the consensus that PMN are able to finely regulate both innate and adaptive immune responses, engaging with T lymphocytes or antigen-presenting cells, releasing anti-inflammatory mediators or expressing regulatory receptors; this broader role in immunity also led to the definition of several functional PMN subpopulations [4,40–42]. In particular, our group evidenced that isolated NETs or neutrophil-derived ectosomes were able to downregulate LPS-induced DC maturation and their capacity to induce T lymphocyte proliferation [7,43]. We also evidenced that GILZ, a potent anti-inflammatory mediator implicated in cell survival, was present in human neutrophils, promoted apoptosis *via* Mcl-1 downregulation, and was upregulated in patients with the acute respiratory distress syndrome in relation to severity [11,44]. Our group is also very involved in studying the role of Nrf2 in several pathophysiological conditions. For instance, we showed that Nrf2 can control inflammation in a model of allergic contact dermatitis (both sensitization and effector phases) [45] and during sclerodermia [21]. We also highlighted the role of Nrf2 in the control of DC cell death induced by chemical sensitizers and we found that Nrf2 positively controls antioxidant genes like *gsr*, *catalase*, *gpx*, *nos2* and some immune genes in response to contact sensitizers [19]. We thus addressed the question of the potential immunoregulatory role of Nrf2 in numerous PMN functions.



Our first aim was to study Nrf2 activation in BM-derived PMN. Joshi *et al.* recently demonstrated that the transcription level of Nrf2 was strong in circulating PMN and in wound tissue PMN [33]. Here, using flow cytometry, we confirm that Nrf2 is highly expressed in BM-derived WT PMN as compared to other BM-derived cells. Moreover, using SFN, a well-characterized Nrf2 activator, we demonstrate that Nrf2 can be mobilized and activated in WT PMN as several target genes were induced; SFN was particularly potent for the activation of *nqo1* and *catalase*. In addition, our study evidences for the first time that zymosan, a TLR2 agonist is also able to mobilize Nrf2 in WT PMN and to activate the same target genes. These results showing the important activity of Nrf2 in PMN are consistent with those of Joshi *et al.* in mouse blood PMN [33], and with those of R Thimmulappa *et al.* in human PMN [31] and VC Araujo *et al.* in human PMN from fungal oral granuloma [46]. It is important to note that an Nrf2-independent *ho-1* regulation exists, as already described by Kang *et al.* and Piao *et al.* [47,48]. Moreover, we could also show that zymosan activates *ho-1* both dependently and independently from Nrf2, since a slight upregulation of this gene was observed in Nrf2 KO PMN.

Since Keap1/Nrf2 signaling maintains redox homeostasis in the cell, we studied the implication of Nrf2 in PMN oxidative burst. We thus performed a set of experiments aiming to document the implication of Nrf2 in ROS production. C Sima *et al.* have recently reported that in response to PMA, Nrf2 KO PMN displayed a normal ROS production [32]. Conversely, an enhanced ROS release in Nrf2 KO PMN has been described in the literature in response to LPS; however, experimental conditions were quite different as PMN were collected from the peritoneal fluid 4 h after thioglycolate injection [24]. In our study, we were able to detect a low but significant Nrf2-mediated regulation of ROS production in response to increasing concentration of zymosan. We chose non-opsonized zymosan as a stimulus as it has been demonstrated that it induces NADPH oxidase activation in human blood PMN leading to high ROS production [34]. Thus, the well-studied antagonistic interplay between Nrf2 and NADPH oxidase [28] could explain Nrf2 capacity to reduce zymosan-induced ROS production. Our second set of experiments was designed to greatly



upregulate Nrf2 before stimulating oxidative burst. Indeed, we found that SFN pretreatment significantly reduced zymosan-induced ROS more importantly in WT PMN than in Nrf2 KO PMN, suggesting that Nrf2 is one of the actors participating to ROS regulation in BM-derived PMN. Of note, we only used here low concentrations of SFN to avoid activation of other signaling pathways [49]. The latter results are consistent with those of Thimmulappa *et al.* using the triterpenoid CDDO-Im as Nrf2 enhancer or those of Dias *et al.* using SFN in human PMN [50,51]. Using live cell imaging of brain hippocampal glio-neuronal cultures, other authors also found that a graded expression of Nrf2 paralleled a graded ROS production [28]. Our set of results suggest that SFN regulates ROS production in PMN through Nrf2-dependent and independent mechanisms; these results are in accordance with those of O’Mealey *et al.* and Greaney *et al.* who found that SFN could modify other functions such as mitochondrial fission or inflammasome through Nrf2-dependent and -independent mechanisms [52,53].

Another PMN function that can depend on ROS is netosis. Indeed, PMN can extrude extracellular DNA fibers decorated with many proteases (such as elastase, MPO) and other proteins coming from the granules and the cytoplasm [54]. Depending on the stimulus, NETs can be induced by NOX2-dependent or -independent pathways [28]. Our kinetic data show that in response to various stimuli, WT PMN and Nrf2 KO PMN display the same capacity to produce NETs using two different techniques (extracellular DNA release and fluorescence microscopy) even at early time. As PMA-induced NET requires NOX2 [56], we suggest for the first time that Nrf2 does not control NOX2-dependent netosis in PMN. Despite its capacity to induce ROS production, zymosan failed to significantly induce netosis. Additionally, using ionomycin and PAF, we found that Nrf2 was also unable to control mitochondrial driven NOX2-independent netosis [55,56]. We can thus suggest that the modest Nrf2-dependent regulation of ROS release is not sufficient to modulate netosis in BM-derived PMN.

Several studies have documented the Nrf2-induced decrease in transcriptional expression of some



pro-inflammatory cytokines in various cell types, such as human epithelial cells or macrophages [57,58]. In PMN, few results have been reported. Here we have clearly shown that, in response to zymosan, Nrf2 KO PMN displayed a significantly increased *tnfa* and *ccl3* mRNA expression. This suggests that Nrf2 can modulate inflammatory gene transcription in BM-derived mice PMN, as already suggested in peritoneal PMN in a model of LPS-induced inflammation [31] and in human blood PMN [50]. Moreover, we could suggest that Nrf2 activation in zymosan-induced peritonitis would limit neutrophil activation and auto-recruitment mainly *via* the regulation of TNF α and CCL3 production in the peritoneal fluid [59]. Concerning IL-6, WT PMN and Nrf2 KO PMN exhibited similar transcript levels, in accordance with N Joshi *et al.* recent study [33]. Although Nrf2 decreases the transcriptional upregulation of IL-6 and IL-1 β in LPS-stimulated macrophages, no direct interference could be observed in PMN [26]. Interestingly, it was also reported that Nrf2 and its target genes were not needed for interferon γ production by lung PMN in a mouse model of pneumonia [60]. We can thus suggest that, Nrf2 is needed for the transcriptional regulation of several but not all inflammatory cytokines in PMN.

We also examined whether the lack of Nrf2 can affect PMN capacity to phagocyte zymosan particles. We found that Nrf2 KO PMN and WT PMN exhibited similar capacity to phagocyte zymosan bioparticles. While Nrf2 KO peritoneal macrophages have been described to exhibit impaired phagocytosis during sepsis as compared with WT cells [24], our results suggest that Nrf2 is not involved in PMN phagocytosis, unlike macrophages. This result highlights several specific roles of Nrf2 depending on cell types.

The role of ROS in PMN migration has been widely studied over the past few years [61,62]. A potential link between Nrf2 and PMN migration can thus be suspected. Although some studies have shown an enhanced PMN recruitment in Nrf2 KO mice in different inflammatory settings [25,63], the use of a full Nrf2 KO model could not lead to clear conclusions concerning Nrf2 role in PMN migration; in particular, Sima *et al.* suggested that Nrf2 could slow down fMLP-induced PMN migration *in vitro* as early as 15 min of migration [64]. We thus went further into this mechanism,



using an one hour-transwell migration assay with fMLP and increasing concentrations of two other chemokines, CXCL2 and CXCL12 that antagonistically modulate PMN chemotaxis [49,50]. In contrast with ROS shifted curves, the chemokine bell-shaped migration curves suggested that Nrf2 improved PMN ability to migrate toward fMLP or low concentrations of CXCL2 and CXCL12. Of note, WT and Nrf2 KO PMN displayed a similar expression of CXCR2 and CXCR4. Nrf2 has been previously reported to partially control hematopoiesis through the regulation of CXCR4 signaling [67]. Here, we saw that Nrf2 could also regulate PMN CXCR2- and CXCR4-dependent migration independently from the expression level of both receptors. To better understand the mechanism of Nrf2-modulated migration, we compared the modification of expression of β 2 integrin CD11b/CD18 after 1 h of migration and found that Nrf2 KO PMN exhibit an important upregulation of CD11b even in response to low concentrations of CXCL2. CD11b upregulation on *in vitro*-migrating PMN has already been described, in particular in a recent model of airway epithelial cells [68]. This suggests that Nrf2 ensures an optimal migration of PMN through the control of migrating cell activation level. Some studies have evidenced that Nrf2 could enhance the synthesis of ATP in various cell models [69,70]. As ATP is crucial for PMN migration [71], we thus hypothesized that ATP could be involved in the modified migration observed in Nrf2 KO PMN. However we failed to evidence a significant difference between ATP levels in resting WT and Nrf2 KO PMN suggesting that Nrf2 plays a weak role in this setting. Based on our findings, we can suggest that the intense recruitment of PMN observed in Nrf2 KO mice in several inflammatory *in vivo* models [25,63] might not be related to an intrinsic control of PMN migration by Nrf2. Nevertheless, Nrf2 could ensure an optimal PMN motility and chemokine sensing needed, in particular to drive PMN migration from the BM to the tissues at the very early stages of inflammation.

This *in vitro* evaluation of Nrf2 implication in PMN functions need also to be analyzed from a clinical point of view as Nrf2 disease and drugome have been recently defined [35]. Indeed, in the numerous clinical settings associated with significant PMN tissue infiltration and/or PMN



activation, it is important to better understand the implication and the efficiency of regulatory mechanisms including Nrf2 pathway. For instance, in the lung, activating Nrf2 leads to protective effects during acute lung injury or asthma, but also enhances advanced stages of carcinogenesis [72,73]. We can thus assume that activating or inhibiting Nrf2 in PMN-associated diseases is an important question that needs to be fully considered.

Taken together, our results contribute to a better understanding of Nrf2 protective role in PMN, particularly in response to zymosan that is a physiological stimulus mimicking a fungal infection. This study indicates that Nrf2 cytoprotective target genes are inducible in PMN and highlights its oxidative burst regulation capacity. In addition, this study demonstrates that Nrf2 is needed for an optimal PMN migration. Future research into understanding Nrf2 implication in PMN recruitment during several inflammatory contexts may provide insights and novel approaches in the field of inflammation.



Authorship

DGH performed all experiments on neutrophils, analyzed the data and wrote the manuscript. SB performed complementary experiments on macrophages. MHD performed mouse genotyping. VG and LdC reviewed netosis data. MP critically reviewed the manuscript. SKR and SCM supervised the conduct of the study and wrote the manuscript. All authors approved the final version.

Corresponding Author:

Sylvie Chollet-Martin

Inflammation, Chimiokines et Immunopathologie, INSERM UMR996, Univ.Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 92290, Châtenay-Malabry, France. Laboratoire d'immunologie, «Autoimmunité et Hypersensibilités», Hôpital Bichat-Claude Bernard, AP-HP, Paris, France.

Acknowledgments

We thank Dr. Viviana Marin-Esteban and Dr. Karl Balabanian for providing expertise in neutrophil migration and Dr. Claudine Delomenie for her expertise in transcriptional analysis. We also thank Valérie Domergue, Ayma Galland and the Institut Fédératif de Recherche IPSIT for excellent technical assistance for animal testing.

Conflict of Interest Disclosure

The authors declare no conflict of interest



References

1. McDonald B, Davis RP, Kim S-J, Tse M, Esmon CT, Kolaczowska E, et al. Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood*. 2017; blood-2016-09-741298. doi:10.1182/blood-2016-09-741298
2. Leliefeld PHC, Wessels CM, Leenen LPH, Koenderman L, Pillay J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit Care*. 2016;20: 73. doi:10.1186/s13054-016-1250-4
3. Soehnlein O, Steffens S, Hidalgo A, Weber C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2017;17: 248. doi:10.1038/nri.2017.10
4. Scapini P, Marini O, Tecchio C, Cassatella MA. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunol Rev*. 2016;273: 48–60. doi:10.1111/imr.12448
5. Reber LL, Gillis CM, Starkl P, Jönsson F, Sibilano R, Marichal T, et al. Neutrophil myeloperoxidase diminishes the toxic effects and mortality induced by lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 2017;214: 1249–1258. doi:10.1084/jem.20161238
6. Odobasic D, Kitching AR, Holdsworth SR. Neutrophil-Mediated Regulation of Innate and Adaptive Immunity: The Role of Myeloperoxidase. *J Immunol Res*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/2349817
7. Barrientos L, Bignon A, Gueguen C, Chaisemartin L de, Gorges R, Sandré C, et al. Neutrophil Extracellular Traps Downregulate Lipopolysaccharide-Induced Activation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Immunol*. 2014;193: 5689–5698. doi:10.4049/jimmunol.1400586
8. Breedveld A, Groot Kormelink T, van Egmond M, de Jong EC. Granulocytes as modulators of dendritic cell function. *J Leukoc Biol*. 2017;102: 1003–1016. doi:10.1189/jlb.4MR0217-048RR
9. Singel KL, Segal BH. NOX2-dependent regulation of inflammation. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2016;130: 479–490. doi:10.1042/CS20150660
10. Baudhuin J, Migraine J, Faivre V, Loumagne L, Lukaszewicz A-C, Payen D, et al. Exocytosis acts as a modulator of the ILT4-mediated inhibition of neutrophil functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110: 17957–17962. doi:10.1073/pnas.1221535110
11. Espinasse M-A, Hajage D, Montravers P, Piednoir P, Dufour G, Tubach F, et al. Neutrophil expression of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) anti-inflammatory protein is associated with acute respiratory distress syndrome severity. *Ann Intensive Care*. 2016;6. doi:10.1186/s13613-016-0210-0
12. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*. 2011;16: 123–140. doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x
13. Zhang DD. Mechanistic Studies of the Nrf2-Keap1 Signaling Pathway. *Drug Metab Rev*. 2006;38: 769–789. doi:10.1080/03602530600971974
14. Hayes JD, McMahon M, Chowdhry S, Dinkova-Kostova AT. Cancer Chemoprevention



- Mechanisms Mediated Through the Keap1–Nrf2 Pathway. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13: 1713–1748. doi:10.1089/ars.2010.3221
15. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kensler TW. The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem Res Toxicol*. 2005;18: 1779–1791. doi:10.1021/tx050217c
 16. Kobayashi E, Suzuki T, Yamamoto M. Roles Nrf2 Plays in Myeloid Cells and Related Disorders. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/529219
 17. Itoh K, Mochizuki M, Ishii Y, Ishii T, Shibata T, Kawamoto Y, et al. Transcription Factor Nrf2 Regulates Inflammation by Mediating the Effect of 15-Deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J2. *Mol Cell Biol*. 2004;24: 36–45. doi:10.1128/MCB.24.1.36-45.2004
 18. Al-Huseini LMA, Yeang HXA, Sethu S, Alhumeed N, Hamdam JM, Tingle Y, et al. Nuclear Factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related Factor-2 (Nrf2) Modulates Dendritic Cell Immune Function through Regulation of p38 MAPK-cAMP-responsive Element Binding Protein/Activating Transcription Factor 1 Signaling. *J Biol Chem*. 2013;288: 22281–22288. doi:10.1074/jbc.M113.483420
 19. El Ali Z, Deloménie C, Botton J, Pallardy M, Kerdine-Römer S. Dendritic cells' death induced by contact sensitizers is controlled by Nrf2 and depends on glutathione levels. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017;322: 41–50. doi:10.1016/j.taap.2017.02.014
 20. Mussotter F, Tomm JM, El Ali Z, Pallardy M, Kerdine-Römer S, Götz M, et al. Proteomics analysis of dendritic cell activation by contact allergens reveals possible biomarkers regulated by Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;313: 170–179. doi:10.1016/j.taap.2016.11.001
 21. Kaviani N, Mehlal S, Jeljeli M, Saidu NEB, Nicco C, Cerles O, et al. The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway Controls Fibrosis and Autoimmunity in Scleroderma. *Front Immunol*. 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.01896
 22. Yeang HXA, Hamdam JM, Al-Huseini LMA, Sethu S, Djouhri L, Walsh J, et al. 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*. 2012;287: 10556–10564. doi:10.1074/jbc.M111.322420
 23. Olganier D, Lavergne R-A, Meunier E, Lefèvre L, Dardenne C, Aubouy A, et al. Nrf2, a PPAR γ Alternative Pathway to Promote CD36 Expression on Inflammatory Macrophages: Implication for Malaria. *PLoS Pathog*. 2011;7. doi:10.1371/journal.ppat.1002254
 24. Kong X, Thimmulappa R, Kombairaju P, Biswal S. NADPH Oxidase-Dependent Reactive Oxygen Species Mediate Amplified TLR4 Signaling and Sepsis-Induced Mortality in Nrf2-deficient Mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010;185: 569–577. doi:10.4049/jimmunol.0902315
 25. Iizuka T, Ishii Y, Itoh K, Kiwamoto T, Kimura T, Matsuno Y, et al. Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema. *Genes Cells*. 2005;10: 1113–1125. doi:10.1111/j.1365-2443.2005.00905.x
 26. Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun*. 2016;7: ncomms11624. doi:10.1038/ncomms11624
 27. Ohl K, Fragoulis A, Klemm P, Baumeister J, Klock W, Verjans E, et al. Nrf2 Is a Central



Regulator of Metabolic Reprogramming of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Steady State and Sepsis. *Front Immunol.* 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.01552

28. Kovac S, Angelova PR, Holmström KM, Zhang Y, Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1850: 794–801. doi:10.1016/j.bbagen.2014.11.021
29. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176: 231–241. doi:10.1083/jcb.200606027
30. Segal AW. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40: 604–618. doi:10.1016/j.biocel.2007.10.003
31. Thimmulappa RK, Scollick C, Traore K, Yates M, Trush MA, Liby KT, et al. Nrf2 dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolidine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;351: 883–889. doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.102
32. Sima C, Aboodi GM, Lakschevitz FS, Sun C, Goldberg MB, Glogauer M. Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Down-Regulation in Oral Neutrophils Is Associated with Periodontal Oxidative Damage and Severe Chronic Periodontitis. *Am J Pathol.* 2016;186: 1417–1426. doi:10.1016/j.ajpath.2016.01.013
33. Joshi N, Werner S. Nrf2 is highly expressed in neutrophils, but myeloid cell-derived Nrf2 is dispensable for wound healing in mice. *PLOS ONE.* 2017;12: e0187162. doi:10.1371/journal.pone.0187162
34. Makni-Maalej K, Chiandotto M, Hurtado-Nedelec M, Bedouhene S, Gougerot-Pocidallo M-A, Dang PM-C, et al. Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: Involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase. *Biochem Pharmacol.* 2013;85: 92–100. doi:10.1016/j.bcp.2012.10.010
35. Cuadrado A, Manda G, Hassan A, Alcaraz MJ, Barbas C, Daiber A, et al. Transcription Factor NRF2 as a Therapeutic Target for Chronic Diseases: A Systems Medicine Approach. *Pharmacol Rev.* 2018;70: 348–383. doi:10.1124/pr.117.014753
36. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236: 313–322.
37. Granger V, Faille D, Marani V, Noël B, Gallais Y, Szely N, et al. Human blood monocytes are able to form extracellular traps. *J Leukoc Biol.* 2017;102: 775–781. doi:10.1189/jlb.3MA0916-411R
38. Pionnier N, Brotin E, Karadjian G, Hemon P, Gaudin-Nomé F, Vallarino-Lhermitte N, et al. Neutropenic Mice Provide Insight into the Role of Skin-Infiltrating Neutrophils in the Host Protective Immunity against Filarial Infective Larvae. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10. doi:10.1371/journal.pntd.0004605
39. Li Y, Paonessa JD, Zhang Y. Mechanism of Chemical Activation of Nrf2. *PLOS ONE.* 2012;7: e35122. doi:10.1371/journal.pone.0035122



40. Leliefeld PHC, Koenderman L, Pillay J. How Neutrophils Shape Adaptive Immune Responses. *Front Immunol.* 2015;6. doi:10.3389/fimmu.2015.00471
41. Koenderman L, Buurman W, Daha MR. The innate immune response. *Immunol Lett.* 2014;162: 95–102. doi:10.1016/j.imlet.2014.10.010
42. Hong C-W. Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity. *Immune Netw.* 2017;17: 298–306. doi:10.4110/in.2017.17.5.298
43. Turbica I, Gallais Y, Gueguen C, Tharinger H, Al Sabbagh C, Gorges R, et al. Ectosomes from neutrophil-like cells down-regulate nickel-induced dendritic cell maturation and promote Th2 polarization. *J Leukoc Biol.* 2015;97: 737–749. doi:10.1189/jlb.3A0314-132RR
44. Espinasse M-A, Pépin A, Virault-Rocroy P, Szely N, Chollet-Martin S, Pallardy M, et al. Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Is Expressed in Human Neutrophils and Promotes Apoptosis through Mcl-1 Down-Regulation. *J Innate Immun.* 2016;8: 81–96. doi:10.1159/000439052
45. El Ali Z, Gerbeix C, Hemon P, Esser PR, Martin SF, Pallardy M, et al. Allergic Skin Inflammation Induced by Chemical Sensitizers Is Controlled by the Transcription Factor Nrf2. *Toxicol Sci.* 2013;134: 39–48. doi:10.1093/toxsci/kft084
46. Araújo VC, Demasi APD, Soares AB, Passador-Santos F, Napimoga MH, Martinez EF, et al. Neutrophils in Oral Paracoccidioidomycosis and the Involvement of Nrf2. *PLOS ONE.* 2013;8: e76976. doi:10.1371/journal.pone.0076976
47. Piao MS, Park J-J, Choi J-Y, Lee D-H, Yun SJ, Lee J-B, et al. Nrf2-dependent and Nrf2-independent induction of phase 2 detoxifying and antioxidant enzymes during keratinocyte differentiation. *Arch Dermatol Res.* 2012;304: 387–395. doi:10.1007/s00403-012-1215-7
48. Kang J, Jeong MG, Oh S, Jang EJ, Kim HK, Hwang ES. A FoxO1-dependent, but NRF2-independent induction of heme oxygenase-1 during muscle atrophy. *FEBS Lett.* 2014;588: 79–85. doi:10.1016/j.febslet.2013.11.009
49. Garber K. Biochemistry: A radical treatment. *Nature.* 2012;489: S4–S6. doi:10.1038/489S4a
50. Thimmulappa Rk, Fuchs Rj, Malhotra D, Scollick C, Traore K, Bream Jh, et al. Preclinical Evaluation of Targeting the Nrf2 Pathway by Triterpenoids (CDDO-Im and CDDO-Me) for Protection from LPS-Induced Inflammatory Response and Reactive Oxygen Species in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Neutrophils. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9: 1963–1970. doi:10.1089/ars.2007.1745
51. Dias IHK, Chapple ILC, Milward M, Grant MM, Hill E, Brown J, et al. Sulforaphane Restores Cellular Glutathione Levels and Reduces Chronic Periodontitis Neutrophil Hyperactivity In Vitro. *PLoS ONE.* 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0066407
52. O’Mealey GB, Berry WL, Plafker SM. Sulforaphane is a Nrf2-independent inhibitor of mitochondrial fission. *Redox Biol.* 2016;11: 103–110. doi:10.1016/j.redox.2016.11.007
53. Greaney AJ, Maier NK, Leppla SH, Moayeri M. Sulforaphane inhibits multiple inflammasomes through an Nrf2-independent mechanism. *J Leukoc Biol.* 2016;99: 189–199. doi:10.1189/jlb.3A0415-155RR
54. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev*



55. Parker H, Dragunow M, Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J Leukoc Biol.* 2012;92: 841–849. doi:10.1189/jlb.1211601
56. Farley K, Stolley JM, Zhao P, Cooley J, Remold-O'Donnell E. A SerpinB1 regulatory mechanism is essential for restricting NETosis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2012;189: 4574–4581. doi:10.4049/jimmunol.1201167
57. Liu X, Zhang X, Ding Y, Zhou W, Tao L, Lu P, et al. Nuclear Factor E2-Related Factor-2 Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activity by Inhibiting Reactive Oxygen Species-Induced NLRP3 Priming. *Antioxid Redox Signal.* 2017;26: 28–43. doi:10.1089/ars.2015.6615
58. Ahmed SM, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2017;1863: 585–597. doi:10.1016/j.bbadis.2016.11.005
59. Watzlawick R, Kenngott EE, Liu FDM, Schwab JM, Hamann A. Anti-Inflammatory Effects of IL-27 in Zymosan-Induced Peritonitis: Inhibition of Neutrophil Recruitment Partially Explained by Impaired Mobilization from Bone Marrow and Reduced Chemokine Levels. *PLOS ONE.* 2015;10: e0137651. doi:10.1371/journal.pone.0137651
60. Gomez JC, Yamada M, Martin JR, Dang H, Brickey WJ, Bergmeier W, et al. Mechanisms of Interferon- γ Production by Neutrophils and Its Function during *Streptococcus pneumoniae* Pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;52: 349–364. doi:10.1165/rcmb.2013-0316OC
61. Hattori H, Subramanian KK, Sakai J, Jia Y, Li Y, Porter TF, et al. Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107: 3546–3551. doi:10.1073/pnas.0914351107
62. Wang G, Cao L, Liu X, Sieracki NA, Di A, Wen X, et al. Oxidant Sensing by TRPM2 Inhibits Neutrophil Migration and Mitigates Inflammation. *Dev Cell.* 2016;38: 453–462. doi:10.1016/j.devcel.2016.07.014
63. Gomez JC, Dang H, Martin JR, Doerschuk CM. Nrf2 Modulates Host Defense during *Streptococcus pneumoniae* Pneumonia in Mice. *J Immunol.* 2016;197: 2864–2879. doi:10.4049/jimmunol.1600043
64. Sima C, Aboodi GM, Lakschevitz FS, Sun C, Goldberg MB, Glogauer M. Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Down-Regulation in Oral Neutrophils Is Associated with Periodontal Oxidative Damage and Severe Chronic Periodontitis. *Am J Pathol.* 2016;186: 1417–1426. doi:10.1016/j.ajpath.2016.01.013
65. Suratt BT, Petty JM, Young SK, Malcolm KC, Lieber JG, Nick JA, et al. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood.* 2004;104: 565–571. doi:10.1182/blood-2003-10-3638
66. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* 2011;32: 452–460. doi:10.1016/j.it.2011.06.008
67. Tsai JJ, Dudakov JA, Takahashi K, Shieh J-H, Velardi E, Holland AM, et al. Nrf2 regulates haematopoietic stem cell function. *Nat Cell Biol.* 2013;15: 309–316. doi:10.1038/ncb2699
68. Deng Y, Herbert JA, Smith CM, Smyth RL. An in vitro transepithelial migration assay to



evaluate the role of neutrophils in Respiratory Syncytial Virus (RSV) induced epithelial damage. *Sci Rep.* 2018;8: 6777. doi:10.1038/s41598-018-25167-4

69. Holmström KM, Baird L, Zhang Y, Hargreaves I, Chalasani A, Land JM, et al. Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration. *Biol Open.* 2013;2: 761–770. doi:10.1242/bio.20134853
70. Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radic Biol Med.* 2015;88: 179–188. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.036
71. Harada Y, Kato Y, Miyaji T, Omote H, Moriyama Y, Hiasa M. Vesicular nucleotide transporter mediates ATP release and migration in neutrophils. *J Biol Chem.* 2018;293: 3770–3779. doi:10.1074/jbc.M117.810168
72. Vega MR de la, Dodson M, Chapman E, Zhang DD. NRF2-targeted therapeutics: New targets and modes of NRF2 regulation. *Curr Opin Toxicol.* 2016;1: 62. doi:10.1016/j.cotox.2016.10.005
73. Cho H-Y, Kleeberger SR. Noblesse Oblige: NRF2 Functions in the Airways. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;50: 844–847. doi:10.1165/rcmb.2014-0116PS



Figures legends

Figure 1: Nrf2 endogenous expression is high in PMN and increases in response to SFN and zymosan.

Freshly obtained BM cells were stained with anti-Ly6G and rabbit anti-Nrf2 IgG or with corresponding isotype, then with goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 Ab. Isolated PMN were incubated for 4 h alone (NS) or with 1 μ M of SFN before staining. **(A)** Endogenous Nrf2 was quantified in BM cells using intracellular staining followed by flow cytometry. PMN were identified as Ly6G⁺, while Ly6G⁻ cells represents the rest of BM cells. Nrf2 expression was quantified as the mean fluorescence intensity (MFI) and compared between Ly6G⁺ and Ly6G⁻ cells. Results are the mean \pm SEM of samples from 4 different mice (* p <0.05 Mann-Whitney test). **(B)** Nrf2 accumulation in isolated PMN after incubation with SFN (1 μ M) or zymosan 5 μ g/ml, was measured using flow cytometry. The ratio of Nrf2 expression was calculated by dividing the MFI of treated PMN by the MFI of untreated PMN (NS). Results are the mean \pm SEM of samples from 4 different mice (* indicates significant difference in comparison to NS PMN, * p <0.05 Mann-Whitney test).

Figure 2: Nrf2 upregulates the transcription of 3 main target genes in response to SFN and zymosan.

WT and Nrf2 KO PMN were incubated or not (NS) with the indicated concentrations of SFN or zymosan for 4 h. mRNA expression of *nqo1*, *ho-1* and *catalase* was quantified using real-time qPCR. Results are expressed as fold increase normalized to WT NS and corrected by the expression of the housekeeping genes *β -actin* and *gapdh*. Results are the mean \pm SEM of samples from 4 different mice (* indicates significant difference in comparison to NS WT PMN, * p <0.05 Mann-Whitney test).

Figure 3: Nrf2 activation decreases PMN ROS production in response to zymosan.

WT and Nrf2 KO PMN were stimulated or not with increasing concentrations of zymosan. The sum of intra- and extracellular ROS was monitored for 60 min by the luminol-amplified chemiluminescence assay. **(A)** Graph from one representative experiment shows the kinetic of ROS production in



response to zymosan 10 $\mu\text{g/ml}$. **(B)** The area under curve (AUC) from the kinetic curves of 6 independent experiments was used to calculate the ratio of ROS production (KO AUC/WT AUC). **(C)** To ensure an important Nrf2 accumulation, PMN were pretreated or not with SFN (1 or 5 μM) for 4 h then stimulated with 5 $\mu\text{g/ml}$ of zymosan. ROS production was then measured for 60 min by the luminol-amplified chemiluminescence assay and was expressed as the AUC from the kinetic curves of 6 independent experiments (n=6; *p<0.05 **p<0.01, Mann-Whitney test).

Figure 4: Nrf2 is not involved in NET release. WT and Nrf2 KO PMN were incubated for 3 h, alone or with PMA 100 nM, PAF 10 μM , ionomycin 4 μM and zymosan 50 $\mu\text{g/ml}$. Time dependent DNA release was monitored using the fluorescent SYTOXgreen. **(A)** Data from one representative experiment shows the kinetic of DNA release in response to PMA 100 nM. **(B)** Results from 4 independent experiments are expressed as the difference between RFU at time 15 min and the RFU at time 180 min. **(C)** For representative fluorescence microscopic observations of NETs, PMN were fixed upon 3 h of stimulation with 10 μM of PAF, then extracellular DNA was stained with DAPI (blue) and anti-MPO (green). Original magnification, $\times 400$. Images are representative of 4 independent experiments.

Figure 5: Nrf2 modulates *tnfa* and *ccl3* transcription. WT and Nrf2 KO PMN were incubated or not with zymosan 5 $\mu\text{g/ml}$ for 4 h. mRNA expression of *ccl3*, *tnfa*, *il-6* and *il-1 β* were measured using real-time qPCR. Results are expressed as fold increase normalized to WT NS and corrected by the expression of the housekeeping genes *β -actin* and *gapdh* (n=4; *p<0.05 Mann-Whitney test).

Figure 6: The lack of Nrf2 does not affect PMN phagocytic capacity. Cells were incubated for 90 min alone or with the determined concentrations of pHRodoTM Red Zymosan Bioparticles. **(A)** Flow cytometry-based analysis was used to evaluate PMN zymosan uptake. PMN were subjected to a one-color analysis for the percent of zymosan (25 $\mu\text{g/ml}$) positive events. **(B)** Graph representing the percentage of phagocytic PMN incubated with increasing concentrations of zymosan (5, 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$). PMN were pretreated for 30 min with 20 μM of cytochalasin D for negative control. All



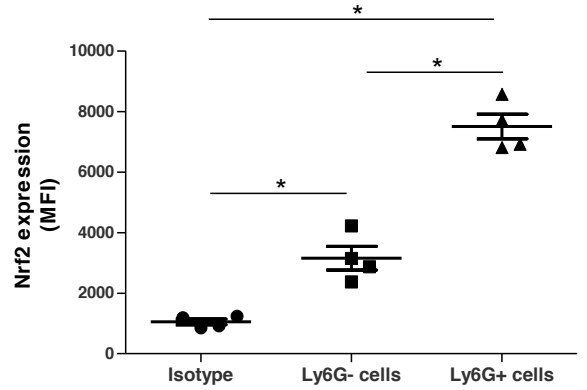
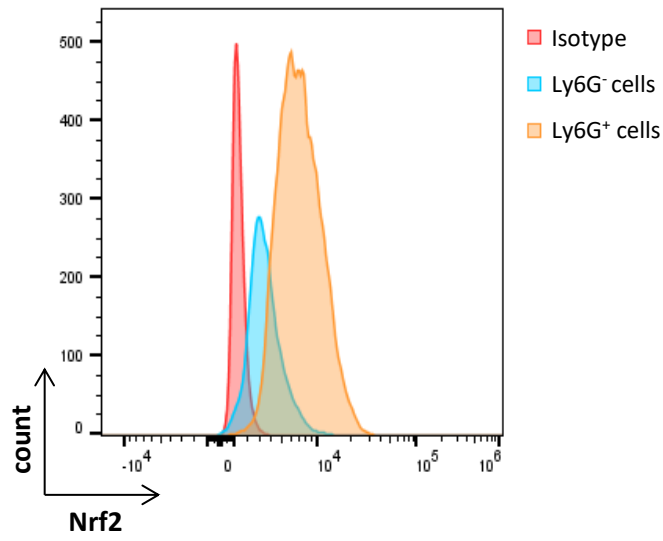
data are presented as the mean \pm SEM, n=4.

Figure 7: Nrf2 is necessary for optimal PMN migration toward CXCL12 and CXCL2 without regulating their receptor expression or ATP level. (A) WT and Nrf2 KO PMN were allowed to migrate for 1 h across transwell filters spontaneously or toward fMLP 1 μ M, CXCL12 or CXCL2. The negative control in CXCL12-dependent migration was obtained by pretreating PMN with 50 μ M of AMD300. Chemotactic indexes were then calculated by dividing the number of PMN that were counted in the chemokine-stimulated well by the number of neutrophil that were counted in the input well (*p<0.05 **p<0.01 Mann-Whitney test). **(B)** The expression of CXCR2 **(B, left panel)** and CXCR4 **(B, right panel)** were assessed on freshly isolated WT PMN (solid grey line) and Nrf2 KO PMN (dashed black line) in comparison to corresponding isotypes (unfilled curves). **(C)** The MFI fold variation of CD11b was assessed on PMN that have migrated through the transwell in comparison to PMN in the input well. **(D)** ATP levels in freshly isolated PMN were quantified using an ATP luminescent assay. The expression levels from 6 independent experiments are shown as the mean of MFI \pm SEM.



Figure 1

A



B

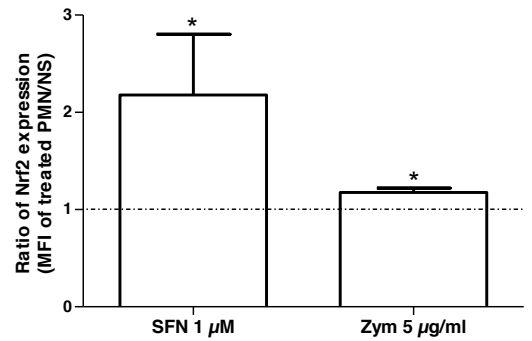
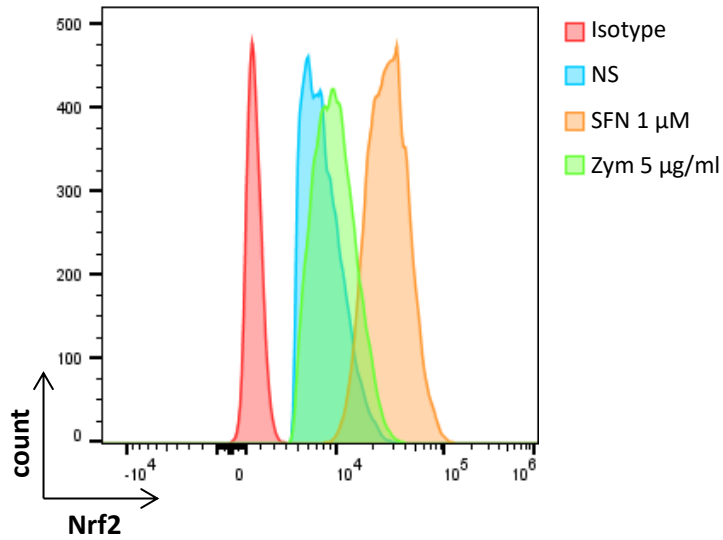


Figure 2

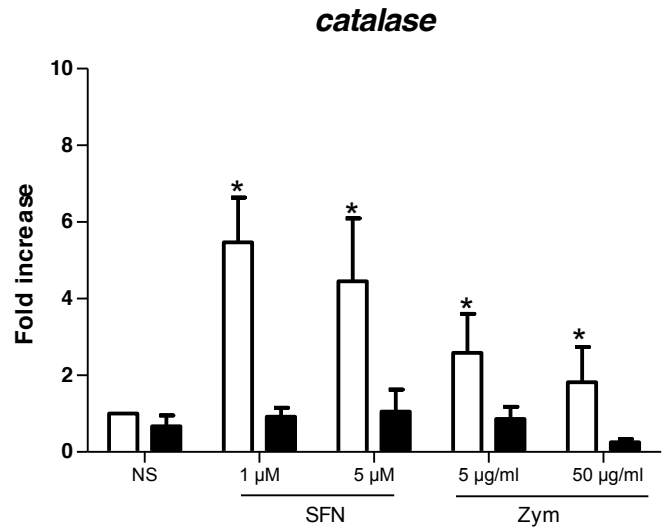
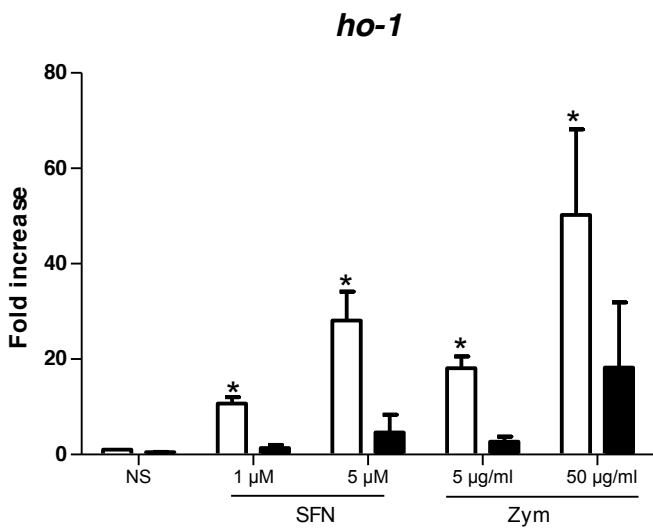
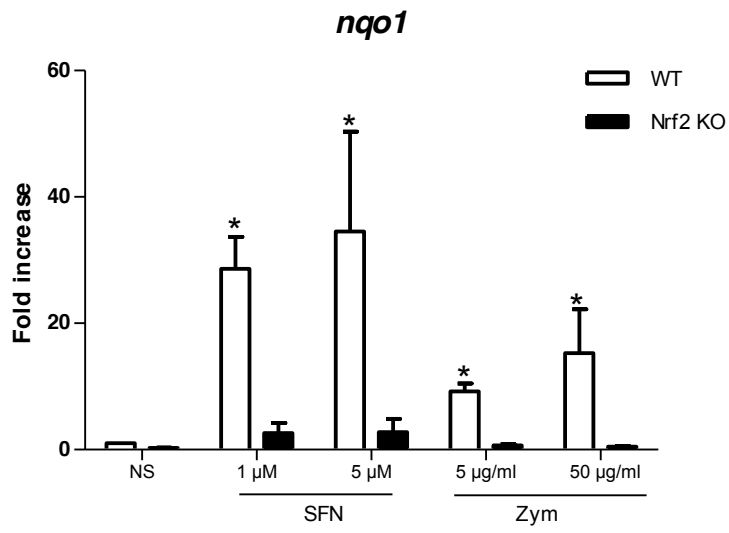
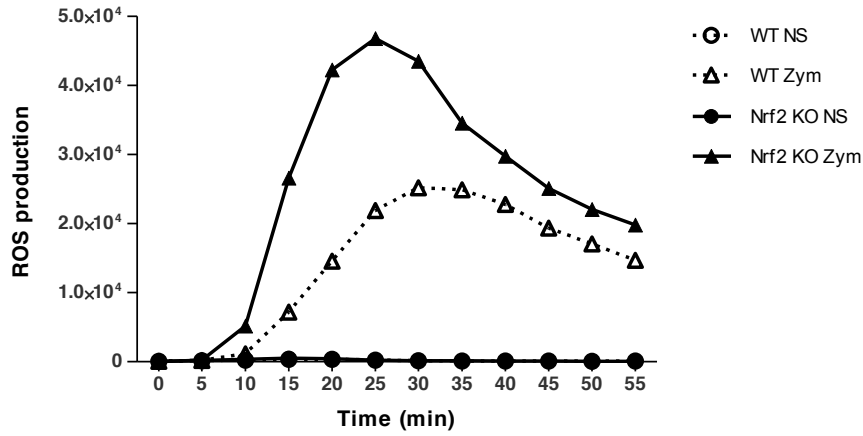
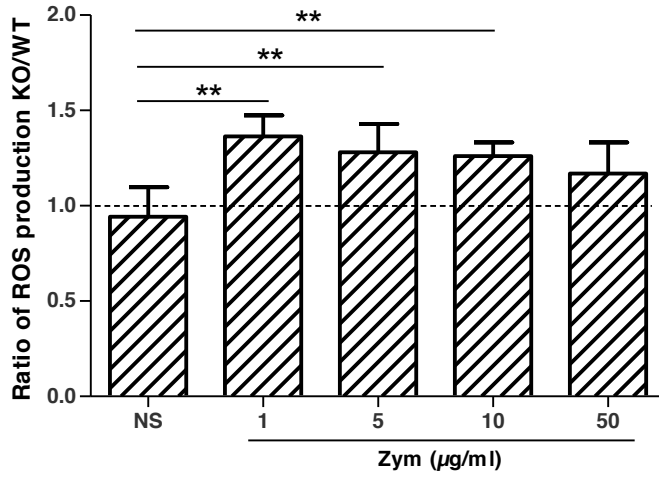


Figure 3

A



B



C

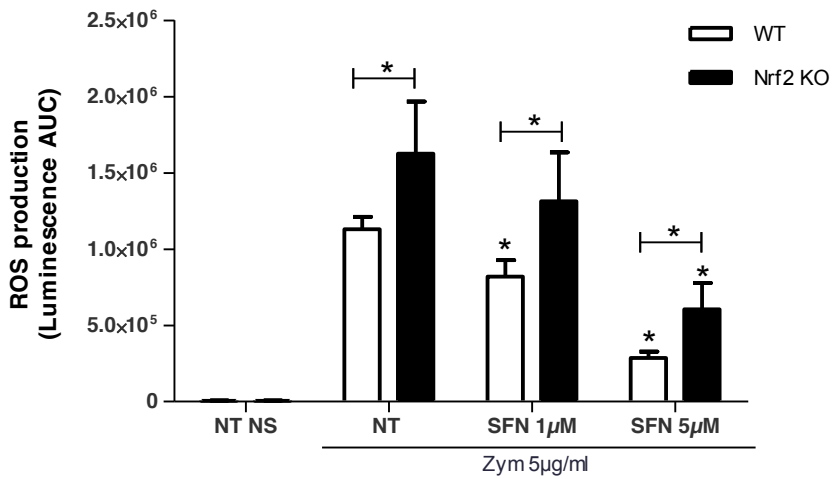
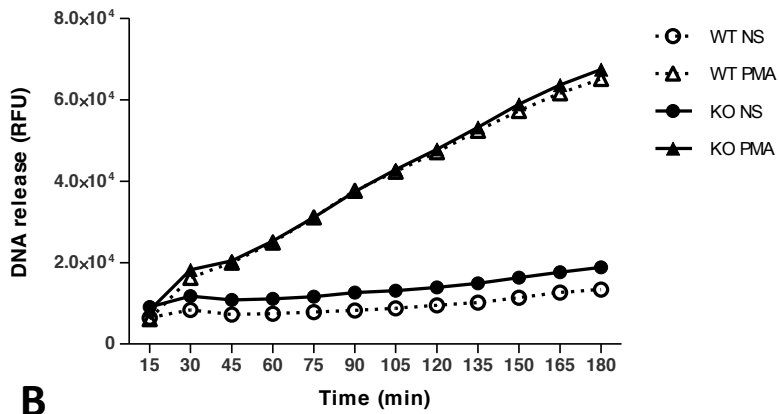
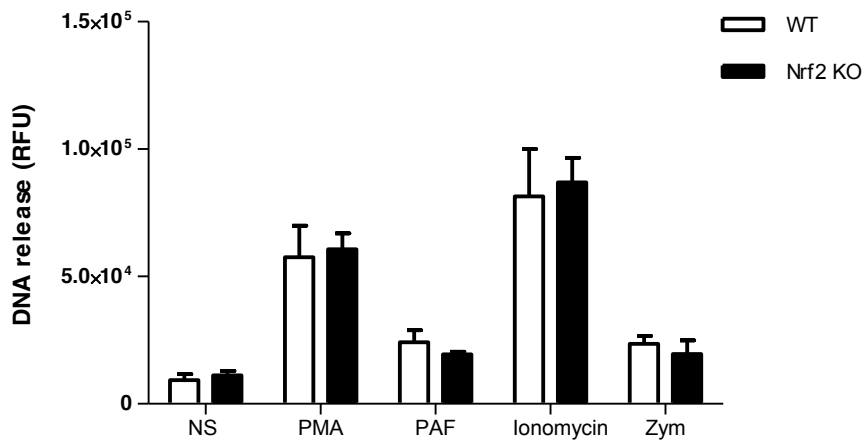


Figure 4

A



B



C

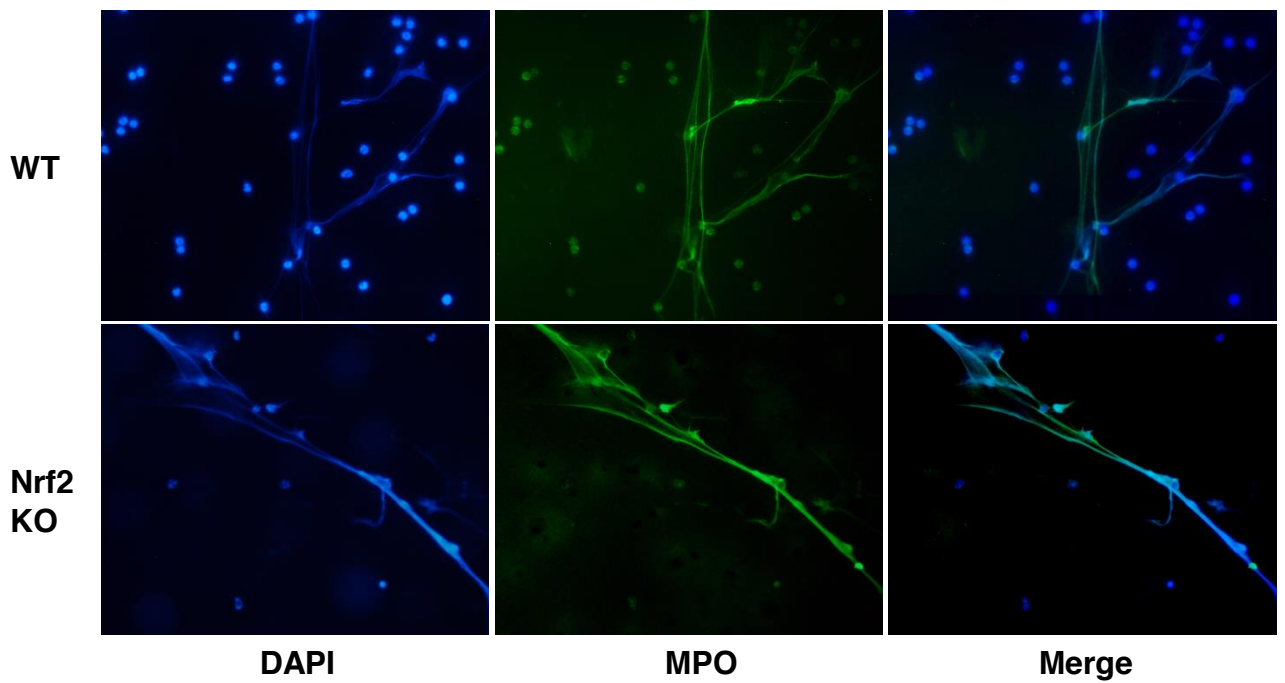


Figure 5

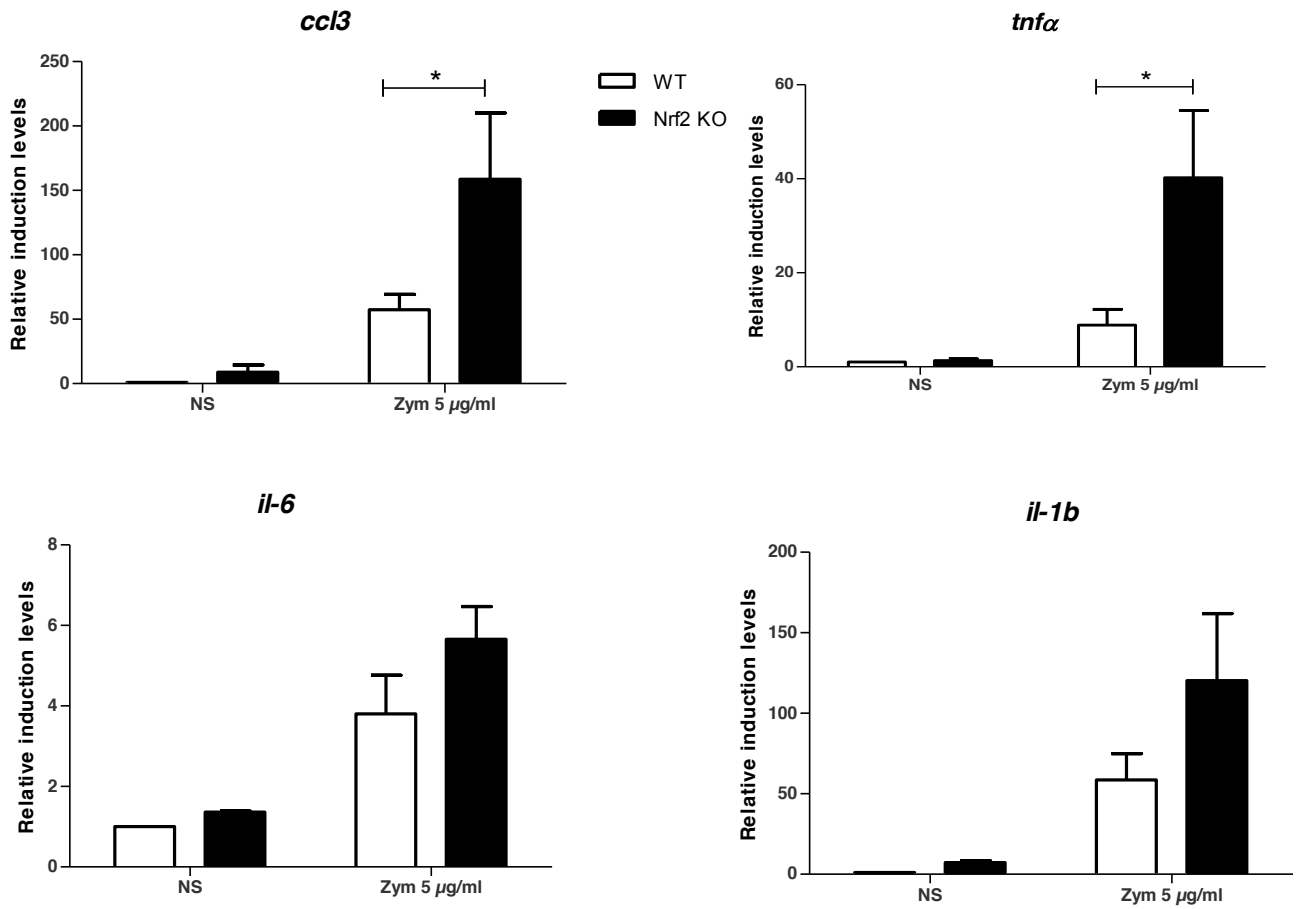
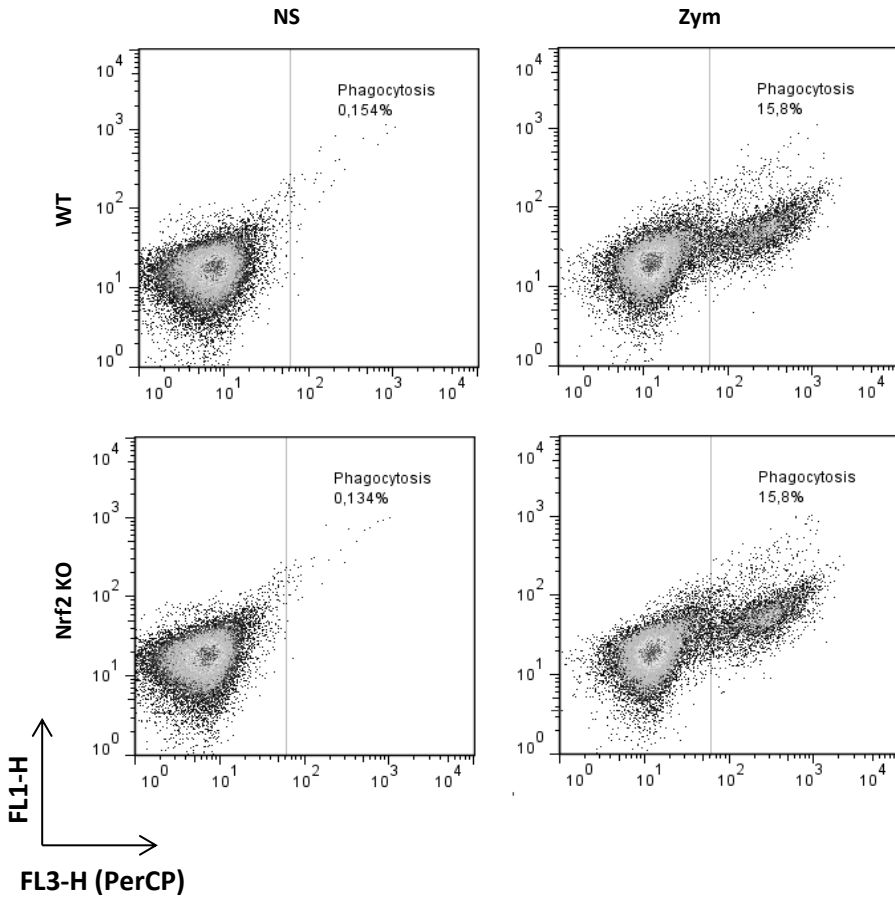


Figure 6

A



B

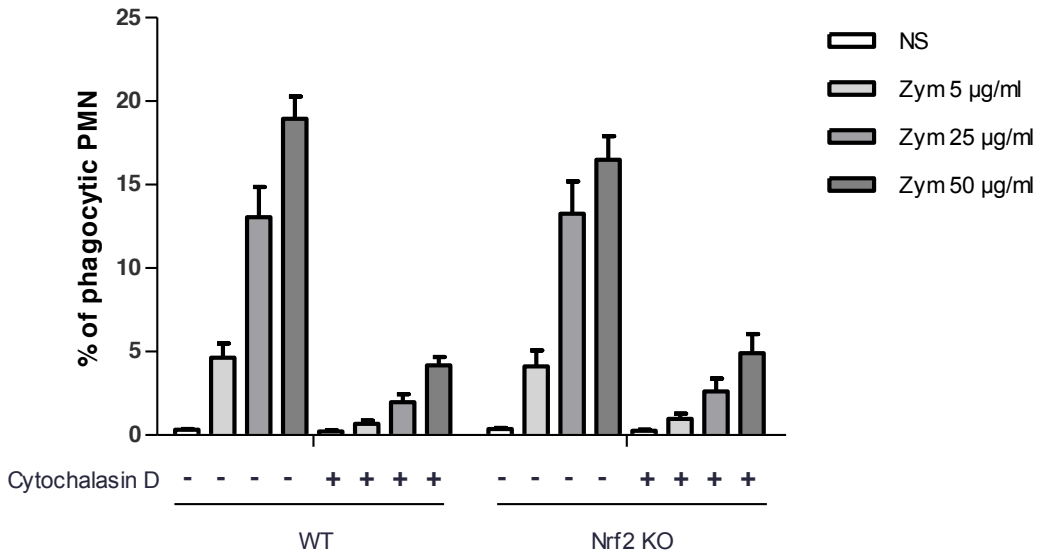
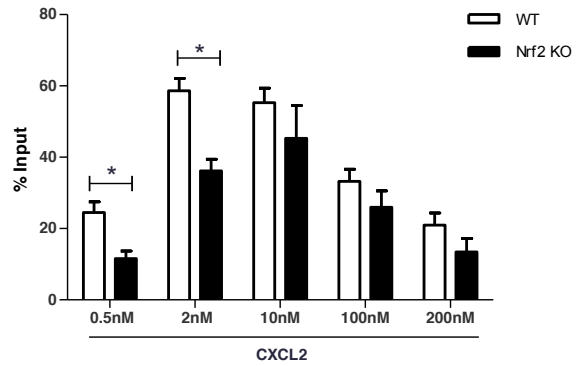
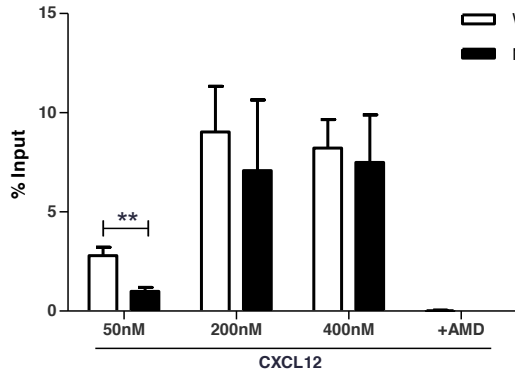
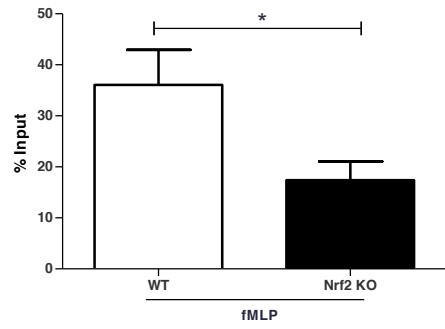
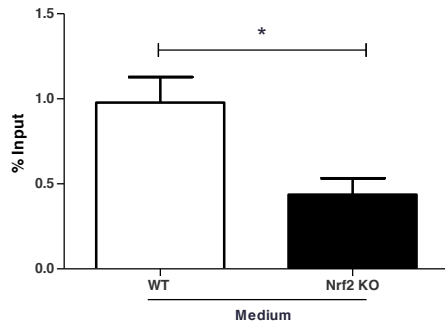
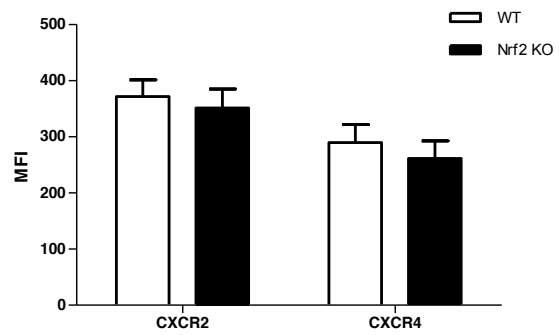
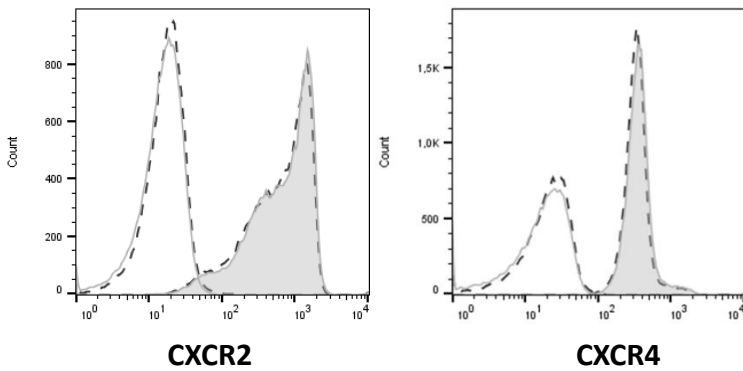


Figure 7

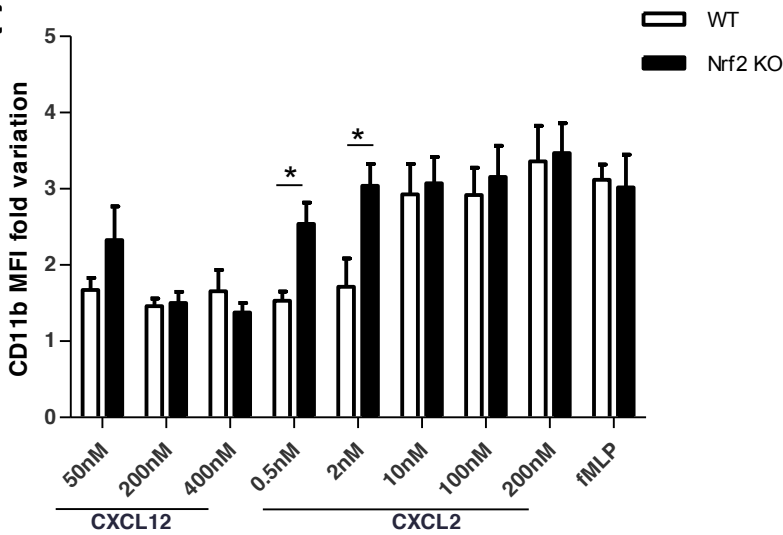
A



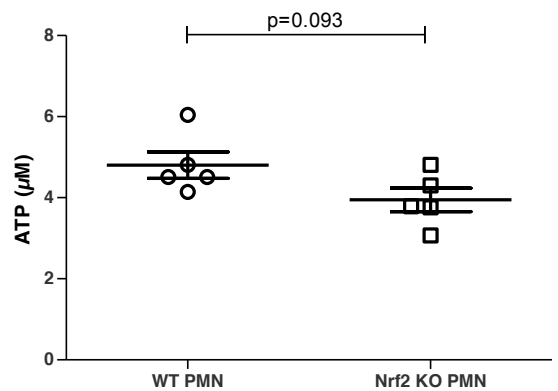
B



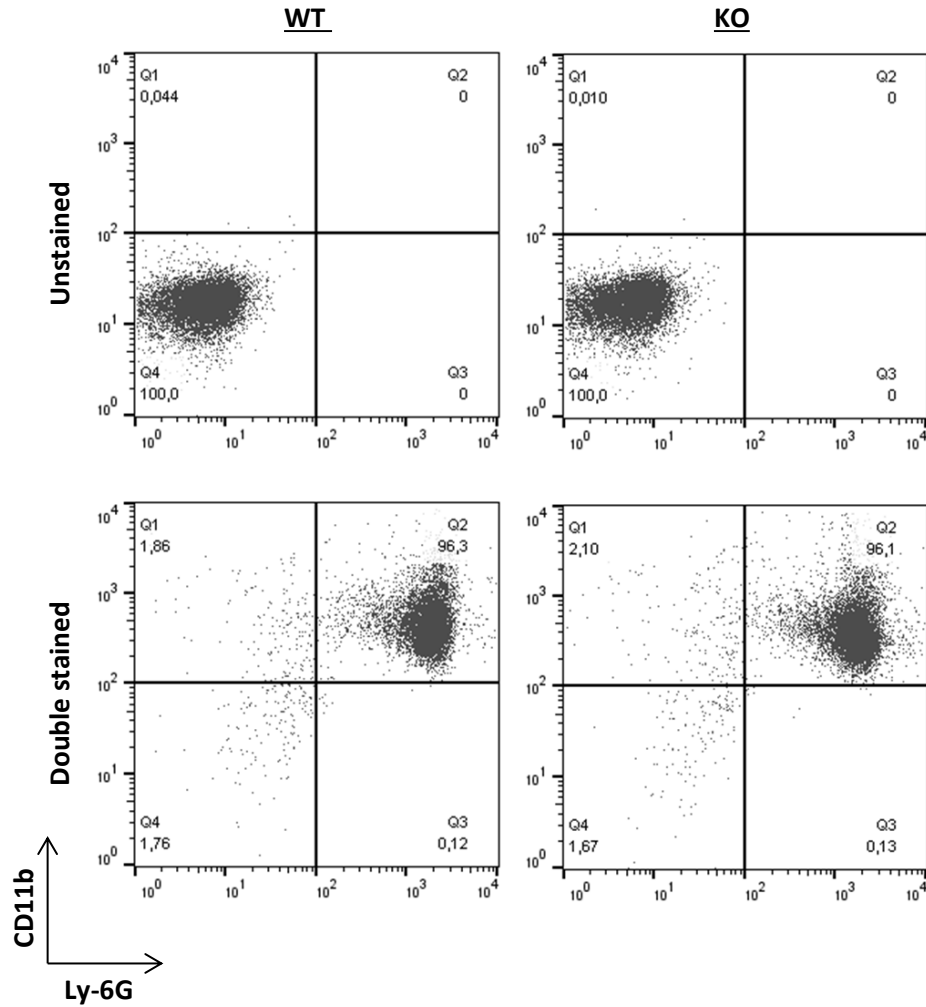
C



D



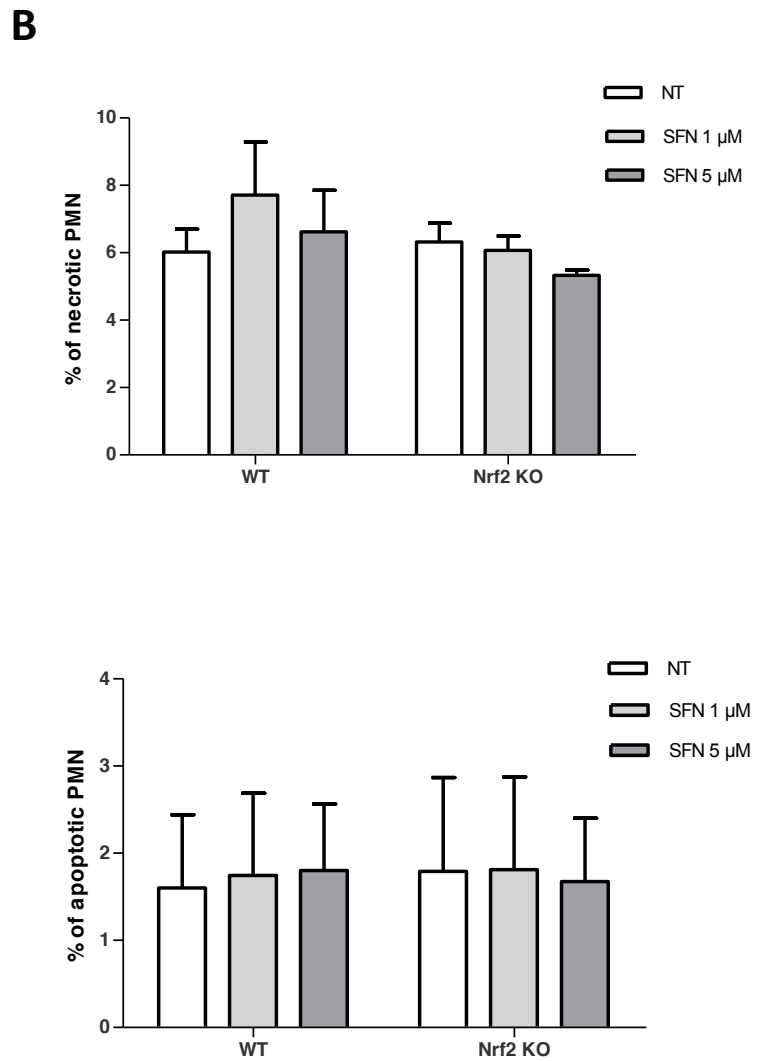
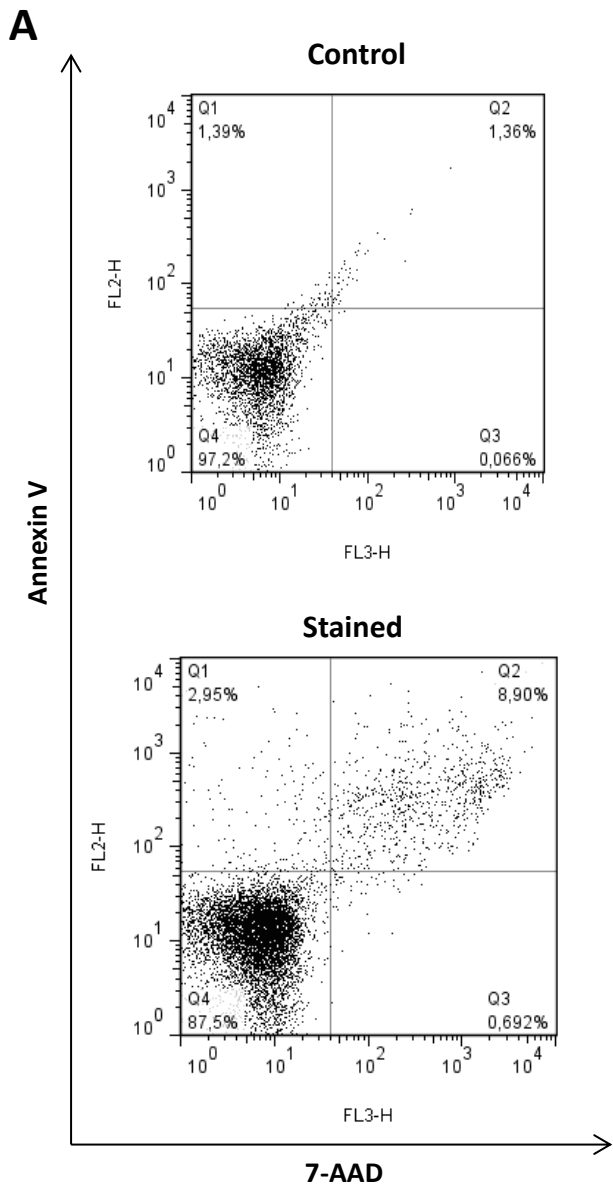
Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 1: Flow cytometry-based assessment of PMN purity

Following negative isolation, PMN purity was assessed using antibodies against Ly-6G and CD11b. Ly-6G⁺, CD11b⁺ cells represent BM PMN. PMN purity was > 95% in all experiments.

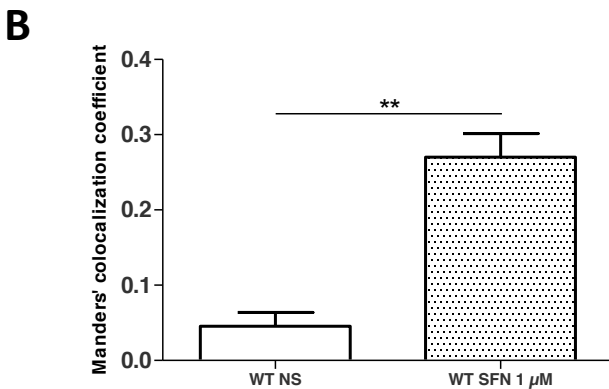
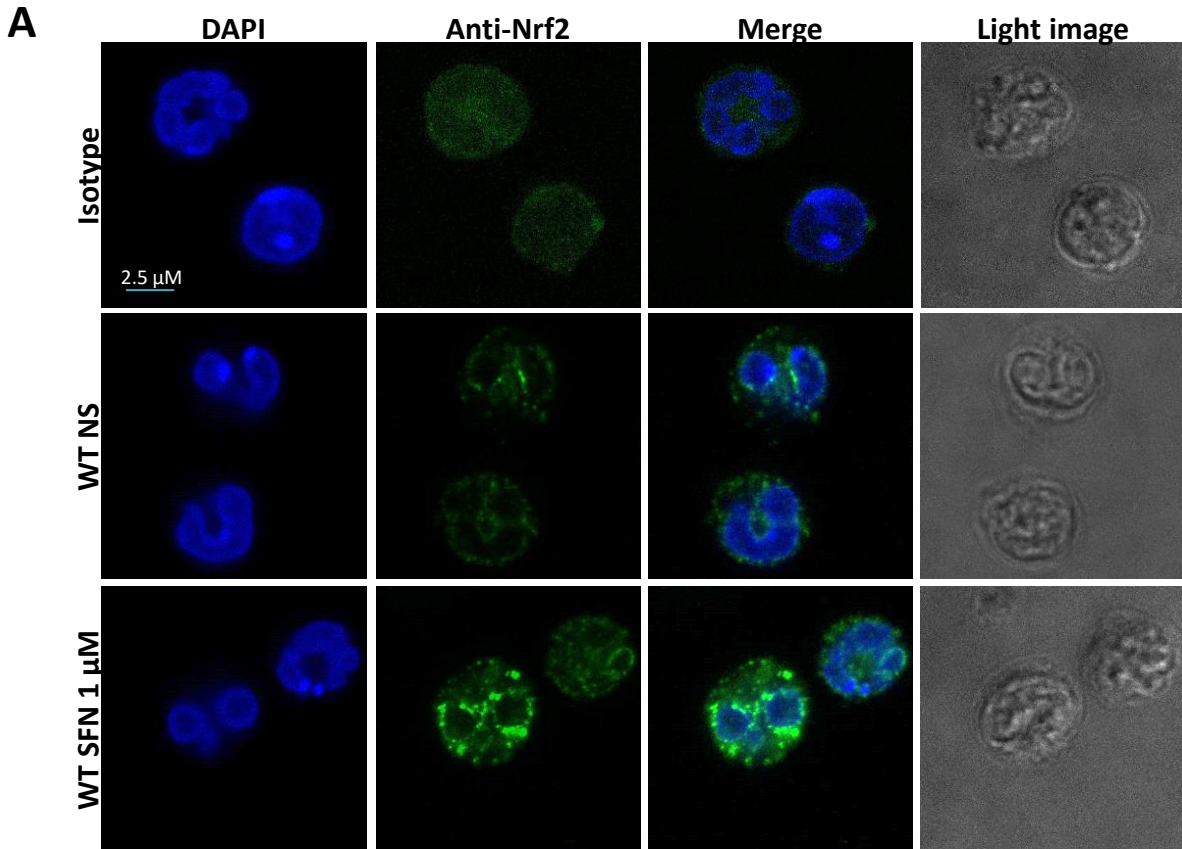
Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 2: Assessment of SFN toxicity through AnnexinV-7AAD staining

PMN were incubated alone or with the indicated concentrations of SFN for 4 h, and then stained with AnnexinV and 7-AAD. AnnV⁺ cells represent apoptotic cells while double positive cells (AnnV⁺,7-AAD⁺) represent necrotic cells. Data are shown as representative FACS analysis (A) and as the mean \pm SEM of 3 independent experiments (B).

Supplemental Figure 3*



WT and KO PMN were incubated with SFN 1 μ M for 4 h. After fixation and permeabilization, PMN were incubated with a rabbit monoclonal anti-Nrf2 antibody, and then with a goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 IgG. IgG antibody isotype was used as a negative control. Samples were then stained with DAPI to label nucleus and observed with an inverted Leica TCS SP8 microscope gated-STED using a HC PL APO CS2 63x/1.40 oil immersion objective lens.

Supplemental Figure 3: Nrf2 accumulates in SFN-treated PMN cytoplasm and translocates to the nucleus. (A) Confocal microscopy reveals Nrf2 accumulation in SFN-treated WT PMN (green fluorescence). (B) To assess Nrf2 translocation to the nucleus in SFN-treated PMN, Manders' colocalization coefficient (MCC) was calculated for DAPI (Blue) and Nrf2 (Green) colocalization (n=4, **p<0.01).



2.2. Manuscrit 2 : Nrf2 régule le recrutement et l'accumulation des neutrophiles au cours de l'hypersensibilité de contact

Résumé de l'article 2 (en révision dans *Journal of Immunology*)

La dermatite allergique de contact est une maladie inflammatoire cutanée fréquente qui dépend principalement de la réponse immunitaire adaptative. Nrf2 est un régulateur clé de l'équilibre redox et peut protéger les cellules immunitaires de la peau en réponse aux molécules chimiques allergisantes. Récemment, il a été montré que les neutrophiles jouent un rôle majeur dans le processus de sensibilisation au cours de l'hypersensibilité de contact (HSC). L'objectif de ce travail a été d'évaluer le rôle spécifique de Nrf2 dans le recrutement et l'accumulation de neutrophiles au cours l'HSC.

Des souris sauvages (WT) et des souris déficientes en Nrf2 (KO) ont été traitées avec un sensibilisant chimique fort, le dinitrochlorobenzène (DNCB). De manière intéressante, les souris KO ont montré un recrutement rapide et exacerbé des neutrophiles et des monocytes à la peau, en comparaison aux souris WT. Le rôle protecteur de Nrf2 dans la peau était associé à une transcription élevée de plusieurs gènes anti-oxydants incluant *ho-1*, *gclc*, *nqo1* et *nos3*. En outre, Nrf2 participait à la régulation de la production de chimiokines, telles que CCL2, CCL4 et CCL11. Pour la première fois, nous avons observé que Nrf2 améliorait la capacité phagocytaire des macrophages dans l'HSC, principalement *via* l'augmentation de l'expression du récepteur *scavenger* CD36, connu pour être un récepteur important d'efférocytose. Cette régulation était indépendante de la régulation du stress oxydant cutané par Nrf2. Ainsi, Nrf2 améliore l'élimination des neutrophiles par les macrophages en évitant leur accumulation cutanée excessive et en favorisant une résolution rapide de l'inflammation.

Nos données démontrent donc que Nrf2 régule le recrutement des neutrophiles dans l'HSC indirectement *via* le contrôle du stress oxydant cutané. En parallèle, Nrf2 améliore la clairance des neutrophiles par les macrophages de la peau d'une façon dépendante de l'induction du CD36 et indépendamment de la régulation redox. Nrf2 émerge ainsi comme une cible thérapeutique potentielle dans l'inflammation cutanée.



Nrf2 regulates neutrophil recruitment and accumulation in skin during contact hypersensitivity

Doumet Georges HELOU*, **Benoît NOËL***, **Françoise GAUDIN†**, **Hervé GROUX‡**, **Zeina EL ALI***, **Marc PALLARDY***, **Sylvie CHOLLET-MARTIN*,\$,¶** and **Saadia Kerdine-Römer*,\$,¶**

* Inflammation, Chimiokines et Immunopathologie, INSERM UMR996, Univ.Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France.

† US31-UMS3679, Plateforme PHIC, Institut Paris-Saclay d'Innovation Thérapeutique (IPSIT), Clamart, France

‡ Immunosearch, Grasse, France

§UF Auto-immunité et Hypersensibilités, Hôpital Bichat, APHP, Paris, France

¶ Equal contribution (SCM and SKR)

Running title: Nrf2 defines neutrophil implication in skin allergy

Key words: Nrf2, neutrophil, innate immunity, DNCB, skin inflammation

Corresponding Author:

PROF. Saadia Kerdine-Römer
Tel : 00 33 (0) 1 46 83 57 79
Fax : 00 33 (0) 1 46 83 54 96
email : saadia.kerdine-romer@u-psud.fr



Abbreviations

BMM	Bone marrow-derived macrophages
CHS	Contact hypersensitivity
DC	Dendritic cell
DNCB	Dinitrochlorobenzene
HO-1	Heme oxygenase-1
IL-	Interleukin-
MEST	Mouse ear swelling test
NAC	N-acetyl-cystein
NQO1	NADP(H):quinone oxidoreductase1
Nrf2	NF-E2-related factor-2
PMN	Polymorphonuclear neutrophils
ROS	Reactive oxygen species



Abstract

Allergic contact dermatitis is a common skin inflammatory disease relying principally on the adaptive immune response. Nrf2 (NF-E2-related factor-2) is a key regulator of redox balance and could protect skin immune cells in response to contact allergens. It was recently shown that neutrophils play a major role in the sensitization process in contact hypersensitivity (CHS). The objective of this work was to assess the specific role of Nrf2 in neutrophil recruitment and accumulation in CHS.

Wild-type (WT) and Nrf2 knock-out (KO) mice were treated with the chemical sensitizer dinitrochlorobenzene (DNCB). Interestingly, KO mice exhibited a rapid and exacerbated neutrophil and monocyte recruitment to the skin compared to WT mice. Nrf2 protective role in the skin was associated with high transcription of several anti-oxidant genes including *hmx-1*, *gclc*, *nqo1* and *nos3*. Moreover, Nrf2 participated in the downregulation of chemokines production, such as CCL2, CCL4 and CCL11. For the first time, we observed that Nrf2 improved macrophage phagocytic capacity in CHS mainly *via* the upregulation of CD36 scavenger receptor, known to be an important efferocytosis receptor. This regulation was independent of skin oxidative stress regulation by Nrf2. Thus, Nrf2 enhances neutrophil elimination by macrophages avoiding excessive accumulation and promoting a rapid resolution of inflammation.

Altogether, our data evidence that Nrf2 regulates neutrophil recruitment in CHS indirectly *via* the control of skin oxidative stress. In parallel, Nrf2 improves neutrophil clearance by skin macrophages through direct upregulation of CD36 and independently of redox regulation. Nrf2 emerges as a critical target in chemically-induced skin inflammation.



Introduction

Allergic contact dermatitis (ACD), the most common skin disease in many countries, is a delayed-type hypersensitivity response toward low molecular weight allergens (1, 2). Mouse contact hypersensitivity (CHS) is a well-accepted model of ACD that can be induced using certain reactive chemicals such as oxazolone, fluorescein isothiocyanate (FITC) or 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) (3). These chemical sensitizers, called haptens, require a covalent interaction with skin self-proteins to become immunogenic. CHS is composed of a sensitization and an elicitation phase. During the first one, haptenated self-proteins are recognized by skin-resident dendritic cells (DC) that migrate to skin-draining lymph nodes and activate specific T cells (4, 5). Following a second contact with the same hapten, activated effector T cells traffic to the insult site and elicit a cell-mediated immune response (6). Many studies have discussed the role of polymorphonuclear neutrophils (PMN) in CHS. Recently, Weber *et al.* evidenced that PMN depletion prior to sensitization or elicitation results in a remarkable suppression of CHS, proving a crucial role for PMN during both phases of CHS (7).

Contact allergens can induce innate inflammatory signaling, directly by Toll-like receptors (TLR) triggering such as for nickel ion (8), or *via* indirect mechanisms as for organic chemicals (9). In particular, hapten-induced inflammation, called “xenoinflammation” by some authors (10, 11), is essential to activate DC and to recruit hapten-primed effector T cells (11, 12). Indeed, DC full activation may require additional signals provided by endogenous ligands such as adenosine triphosphate (ATP), hyaluronic acid fragments or biglycan (13–15). Moreover, reactive oxygen species (ROS) produced in response to contact allergens, activate the NLRP3/NALP3 inflammasome providing further endogenous activators and proinflammatory cytokines (11, 14, 16). PMN constitute an important source for exogenous ROS in CHS (7). Altogether, these findings underline the role of electrophilic/oxidative stress in the regulation of the skin immune response to chemical sensitizers (17).



To prevent an excess accumulation of ROS and reverse electrophilic stress, several phase II detoxification enzymes such as glutathione-S-transferases (GST), NADP(H):quinone oxidoreductase1 (NQO1), glutathione peroxidases (GPX) and heme oxygenase-1 (HO-1) are mobilized and are mainly regulated by the transcription factor Nrf2 (NF-E2-related factor-2) (18). Under basal conditions, Nrf2 is sequestered in the cytoplasm by its inhibitor, the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), then ubiquitinated and constantly degraded by the proteasome. Following an exposure to oxidative and/or electrophilic stress, Nrf2 is stabilized, translocates to the nucleus and binds to the antioxidant-response element (ARE) sequences, inducing the transcription of many cytoprotective genes (19–21). Using Nrf2 knock-out (KO) mice model, we recently demonstrated that Nrf2 regulates CHS, induced either by moderate or by strong sensitizers (12). Numerous studies have also highlighted its regulatory role in the innate immune response, particularly in PMN recruitment. This included different inflammatory settings such as sepsis and pneumoniae (22, 23), but to the best of our knowledge not in an allergic settings.

The objective of this work was to understand the role of Nrf2 in the regulation of PMN recruitment to the skin in CHS. We found that Nrf2 indirectly regulates PMN recruitment to the skin through modulation of redox signaling and chemokine production. Moreover, in the absence of Nrf2, macrophages showed a reduced capacity to clear PMN. Thus, the protective role of Nrf2 in CHS is mainly dependent on its capacity to regulate PMN inflammatory role.



Material and methods

Mice

Nrf2 knock-out (KO) mice were provided by the RIKEN BRC according to a MTA to Prof S. Kerdine-Römer (24). Wild-type (WT) and KO mice were generated from inbred C57BL/6J background Nrf2 heterozygous mice. Age- and sex-matched mice were used at 8-14 weeks of age. Mice were handled in accordance with the principles and procedures outlined in Council Directive.

Contact hypersensitivity

To study the sensitization phase, naive mice were treated by a single application of DNCB (25 μ l/ear, 0.5% or 1%, wt/vol in the vehicle acetone) or vehicle (both from Sigma-Aldrich, Lyon, France) on both ears. Samples were collected 2 h, 6 h, 12 h or 24 h after sensitization. In some conditions, ears were topically treated with 50 mM of the N-acetyl-cystein (NAC) (Sigma-Aldrich) or PBS 15 min before topical application of DNCB. Ears were wiped before with ethanol to allow better penetration of NAC.

To study the elicitation phase, CHS was induced as previously described (12). Briefly, mice were sensitized by one application of 100 μ l DNCB 1% or vehicle on the shaved abdomen. At day 5, mice were challenged with 20 μ l DNCB (0.5%) applied on both ears. Ear thickness was measured in triplicate, before and 24 h after challenge, using a spring-loaded micrometer (Mitutoyo, Kanagawa, Japan). The percentage of ear thickness increase was calculated as $(T_{24}-T_0)/T_0 \times 100$, where T_0 and T_{24} represent ear thickness before and 24 h after challenge, respectively.

RT-qPCR focused-gene array

Transcriptional analysis was performed as previously described (25). Briefly, total RNA was extracted using Qiazol reagent and RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Reverse transcription was performed using Random Primers and SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Saint Aubin, France). Quantitative RT-PCR was performed using SYBR Green Real-time PCR Master Mix (ROCHE Diagnostic, Grenoble, France). The amplification reaction was



completed in a LC480 System (ROCHE Diagnostics). Data from 30 genes (**Sup. Table**) were normalized to the following 3 house-keeping genes: Glucuronidase β , β 2 microglobuline, and « non-POU domain containing, octamer-binding » (NONO).

Immunohistological analysis

Ear skin sections were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA, VWR, France) overnight and embedded in paraffin. Paraffin sections (5 μ m) were stained with hematoxylin-eosin (H&E, VWR, France). For immunofluorescence staining, deparaffinized sections were incubated with anti-MPO (AF3667 R&D, Lille, France) and anti-Ly6G/C (Gr-1) (NBP2-00441 Novus, Lille, France) and then with goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 or anti-rat Alexa Fluor 594 (Life Technologies, Saint-Aubin, France). DNA was visualized using DAPI counterstaining. Images were acquired using the digital slide scanner HPF-NanoZoomer RS2.0 (Hamamatsu) coupled to a high definition 3-CCD digital camera.

Quantification of skin chemokines

Ear skin was cut into small pieces and added into tubes containing 250 μ l of RIPA lysis buffer and lysing beads (1.4 mm ceramic spheres). Tissue digestion was performed using the Percellys tissue homogenizer (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). The LEGENDplex™ Mouse Proinflammatory Chemokine Panel (13-plex) was used as per supplier's instructions (BioLegend, San Diego, USA) to quantify chemokines in skin homogenate supernatants. Chemokine concentration was calculated according to the mean fluorescence intensity (MFI) of each bead batch (sensitivity \geq 2.4 pg/ml).

Samples processing

For the preparation of single-cell suspensions from the skin, ears were split into dorsal and ventral parts and incubated for 30 min at 37°C/5% CO₂ in 0.2 mg/ml of Dispase II (Roche, Basel, Switzerland) diluted in PBS. Skin tissue was cut into small pieces and incubated for 90 min at 37°C/5% CO₂ in RPMI containing 1.5 mg/ml collagenase type IV (Worthington Biochemical



Corporation, New Jersey, USA). Single-cell suspensions were obtained by passing the digest through a 40- μ m cell strainer.

Antibodies and flow cytometry

Leukocyte populations from ear skin samples, were analyzed by flow cytometry. Cell suspensions were incubated with the Fc blocker rat anti-mouse CD16/CD32 antibody (Clone 2.4G2, BD Biosciences, New Jersey, USA) for 20 min before staining. Single cells were excluded from dead cells using the LIVE/ DEAD Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit (BioLegend). Cell staining was performed using the following antibodies: CD45-APC-Cy7 (Clone 30-F11, BioLegend), CD11b-PB (Clone M1/70, BioLegend), CD11c-APC (Clone HL3, BD Pharmingen), CD86-FITC (Clone GL1, BD Pharmingen) or CD64-FITC (Clone X54-5/7.1, BioLegend), Ly6C-AF700 (Clone AL-21, BD Pharmingen), CD103-BV786 (Clone M290, BD Pharmingen), CD207-PE (Clone eBioL31, eBiosciences, Paris, France) or CD36-PE (Clone HM36, BioLegend), F4/80-PE-Cy7 (Clone BM8, BioLegend) and Ly6G-PCP-Cy5.5 (Clone 1A8, BioLegend). Absolute cell count was obtained by adding precision count beads (BioLegend) to all samples. Acquisition was performed using the BD LSRFortessa and data were analyzed using the FlowJo software (v10, Tree Star, Ashland, OR).

Generation of bone marrow-derived macrophages (BMM)

Dissociated BM cells were cultured for 3 days in supplemented RPMI containing macrophage colony stimulating factor (M-CSF) at 25 ng/ml (Miltenyi Biotec, Bergish Glabash, Germany). Non-adherent cells were seeded in new dishes and enriched with the same medium. At day 7, adherent cells were recovered by scraping in ice-cold PBS containing dispase II. BMM were then washed and resuspended in supplemented RPMI (1×10^6 /ml). BMM purity was checked using antibodies against F4/80-PE-Cy7 and CD11b-PB (both from BioLegend) and was always $\geq 95\%$ (**Sup. Fig 1A**).

Quantitative real-time RT-PCR

BMM (10^6 cells/ml) were treated for 7 h with 25 ng/ml of lipopolysaccharide (LPS) or 5 μ g/ml of Zymosan A (both from Sigma-Aldrich). Total RNA was extracted after cell lysis and reverse



transcription was performed as previously described (26). Real-time PCR was performed with SYBR Green technology on a CFX96 system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The following primers were used (forward and reverse, respectively): *cd36*: 5'-AAA CAG GCA CCA CTG TGT A-3' and 5'-GCA CAA CTT GAA CAA ATG A-3'; *gapdh*: 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA G-3' and 5'-GAT CCA GGG ATG ATG TTC-3'; *β-actin*: 5'-CCT TCT TGG GTA TGG AAT C-3' and 5'-AGG TCT TTA CGG ATG TCA AC-3'.

BMM phagocytosis test

Two different methods were used to assess BMM phagocytic capacity. First, phagocytosis was performed as per supplier's instructions using pHrodo™ Red Zymosan A BioParticles® (Life Technologies, Carlsbad, USA). Briefly, WT and KO BMM (1×10^6 /ml) were seeded in duplicate wells, pretreated or not with cytochalasin D (20 μ M) (Sigma-Aldrich) for 30 min and then incubated for 90 min alone or with Zymosan A bioparticles (5 and 25 μ g/ml). Using BD FACS Calibur, cells were subjected to a one-color analysis (FL-3, PCP) in order to evaluate the percentage of Zymosan A bioparticle-positive cells. In the second method, BMM capacity to phagocyte damaged PMN was investigated. PMN were isolated from BM using the mouse neutrophil isolation kit (Miltenyi Biotec) as per supplier's instructions. To induce their death, PMN were incubated at 56°C for 5 minutes followed by incubation at 37°C for 1 h (27). BMM were seeded at 5×10^5 cells/well into 12-well plates and then stimulated or not with 25 ng/ml of LPS (Sigma) for 12 h. BMM were then washed and damaged PMN (1×10^6 cells) were added to each well. After 12 h of co-incubation, cells were stained with anti F4/80-APC antibody (Clone BM8, eBiosciences), then fixed, permeabilized and stained with the anti Ly6G-PCP-Cy5.5 antibody. PMN or BMM incubated alone were used as controls. The percentage of double positive population for F4/80 and Ly6G represented BMM capacity to phagocyte damaged PMN.



***In vivo* PMN depletion**

One day before sensitization, mice received intraperitoneally (i.p) 80 µg of purified anti-mouse Ly6G antibody (Clone 1A8). Control mice received 80 µg of purified Rat IgG2a, κ isotype (both from BioLegend). Depletion was checked using flow cytometry (BD LSRFortessa).

Statistical Analysis

Data are expressed as mean ± S.E.M. Using GraphPad Prism 5, differences between groups were evaluated with the Mann-Whitney test and correlations were established with Spearman test. All experiments were at least repeated 3 times except for the PCR array. Differences with a p value < 0.05 were considered significant (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).



Results

Lack of Nrf2 exacerbated PMN and inflammatory monocyte recruitment to the skin early after sensitization

PMN and monocytes are among the first immune cells to be recruited after tissue injury. We first studied the capacity of Nrf2 to regulate their recruitment after skin sensitization with DNCB. Using immunohistofluorescence labelling, we found that ear skin of KO mice was significantly thicker (321 μ M vs 533 μ M) compared to WT mice at 24 h post-sensitization. Ears section showed also a higher recruitment of Ly6G/C⁺ cells to the skin in KO mice (**Fig. 1A**). Flow cytometry was then used to better characterize Ly6G/C⁺ cells representing a mix of PMN and monocytes. PMN were gated as CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺ cells from live cells and monocytes were gated as CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ CD11c⁻ Ly6C⁺ F4/80^{+/+} in the skin (**Sup. Fig 2**). In response to DNCB, PMN and monocytes were recruited to skin in WT and KO mice. However, the kinetics indicated that PMN recruitment to the skin started earlier (2 h) in KO mice and was two to three times greater than WT mice at 12 h and 24 h (**Fig. 1B**). We noted that CD11b expression was only upregulated in KO recruited PMN, suggesting their important activation (**Sup. Fig 3A**). Monocyte infiltration to the skin was delayed as compared to neutrophils and was up to 2-fold higher in KO mice compared to WT mice at 24 h post-sensitization (**Fig. 1C**). Similar results were obtained after 24 h of elicitation (**Sup. Fig 3C**), showing that Nrf2 affects PMN and monocyte recruitment to the skin during both phases of CHS.

Nrf2-dependent regulation of PMN recruitment participates in the control of DC maturation and skin inflammation in CHS

Since DC activation and maturation are key events in CHS, we wondered how the abnormal accumulation of PMN in KO mice may impact DC activation during the sensitization phase and consequently skin inflammation during the elicitation phase of CHS. For that purpose, we evaluated DC maturation based on CD86 expression after 24 h of sensitization. Skin inflammation was assessed 24 h after elicitation using the MEST to measure ear thickness.

Experiments were conducted in three models that resulted in different PMN recruitment level to the



skin. These models were used to establish correlations and to highlight the regulatory role of Nrf2 in CHS: WT mice depleted from PMN, WT mice displaying normal recruitment of PMN and KO mice exhibiting high recruitment of PMN (**Fig. 2A**).

The association between PMN percentage in the skin and CD86 expression on skin CD11b⁺ DC suggested a link between PMN recruitment to the skin and DC activation during the sensitization phase. Indeed, the reduction of PMN recruitment was associated with a decrease in CD86 expression on DC, while the lack of Nrf2 led to DC hyperactivation (**Fig. 2A**). In parallel, PMN depletion abrogated CHS while the high PMN recruitment in KO mice exacerbated the inflammatory response in CHS (**Fig. 2A**). Altogether, these results evidenced positive correlations between PMN % in the skin after sensitization, DC maturation during the sensitization phase and the inflammatory response during the elicitation phase (**Fig. 2B**), suggesting that the key role of PMN in CHS was modulated by Nrf2.

Nrf2 controls PMN recruitment through anti-oxidant mechanisms

To understand how Nrf2 regulated PMN recruitment to the skin, we explored the skin microenvironment. Our first step was to perform a PCR array on WT and KO mice skin, 6 h after sensitization with 0.5 or 1% DNCB. The obtained heat map showed a concentration-dependent upregulation of Nrf2 target genes in WT mice skin. The majority of these genes were highly implicated in ROS elimination and cell detoxification such as *gclc*, *gclm*, *hmox1*, *nqo1*, *slc7a11* and *txnrd1*. Remarkably, a battery of genes from keratin (KRT), matrix-metalloproteinase (MMP) and IL-10 (IL-19, IL-20, IL-24) families was also upregulated in WT mice only. In contrast, genes encoding for inflammatory cytokines, such as IL-1 β and CCL20, displayed higher upregulation in KO mice skin compared to WT mice skin (**Fig. 3A**).

Cutaneous chemokine production was then analyzed 24 h after skin sensitization. Several chemokines were produced both in WT and KO skin in response to DNCB 1%: CCL2, CCL3, CCL4, CCL11, CCL22 and CXCL1. Interestingly, levels of CCL2, CCL4 and CCL11 were significantly higher in KO mice skin as compared to WT mice skin (**Fig. 3B**). Other chemokines



such as CCL5, CXCL5, CXCL9, CXCL10 and CXCL13 were barely or not detectable in both mice genotypes (data not shown). These results indicated that the absence of Nrf2 led to an increase in skin chemokine production that could enhance inflammatory cells recruitment.

We then assessed the implication of redox/detox pathways in the control of PMN recruitment to the skin. Mice skin was pretreated before sensitization with NAC, a well-known antioxidant molecule depleting ROS. Results showed that 24 h after DNCB sensitization, PMN recruitment to the skin was decreased significantly in NAC-treated KO mice as compared to PBS-treated KO mice (**Fig. 3C**). Similar results were obtained with inflammatory monocytes (**Sup. Fig 3B**). Thus, chemical-induced oxidative stress is a key upstream event participating in PMN recruitment and exacerbation of skin inflammation.

Nrf2 modulates macrophages activation and upregulates the expression of the efferocytosis receptor CD36 independently from ROS

PMN accumulation in the tissues is not only dependent on their mobilization and recruitment but also on their turnover rate. Thus, we wondered if PMN elimination by resident macrophages was affected in the absence of Nrf2, leading to their abnormal accumulation. In the skin, macrophages were gated as CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ CD11c⁻ Ly6C^{+/-} F4/80^{hi} CD64^{hi} (**Sup. Fig 2**).

As the CD36 scavenger receptor is highly implicated in apoptotic PMN phagocytosis known as efferocytosis, its expression on macrophages was measured. Our results showed a significant increase in CD36⁺ skin macrophages in WT mice (from 8.03% to 19%) but not in KO mice. Furthermore, skin pretreatment with NAC didn't affect the percentage of CD36⁺ macrophages in both mice genotypes suggesting a direct Nrf2-regulation of CD36, independently from the oxidative stress (**Fig. 4A**). Macrophages from inflamed KO skin had a higher upregulation of the CD86 co-stimulatory molecule, indicating their hyperactivation (**Fig. 4B**). Taken together, these results suggested that Nrf2 regulates macrophages phenotype to improve their phagocytic capacity.



Nrf2 improves macrophages phagocytic capacity of PMN

The absence of CD36 upregulation in KO macrophages suggested their altered capacity to phagocyte PMN. We evaluated macrophages phagocytic capacity using an *in vitro* model of bone marrow derived macrophages (BMM). We measured *cd36* mRNA in BMM after their stimulation with two classical macrophage activators, LPS and Zymosan A. The level of *cd36* mRNA increased in WT BMM in response to both stimuli after 7 h of stimulation. However, KO BMM failed to induce *cd36* transcription (**Fig. 5A**). This result confirmed that Nrf2 was required for upregulation of CD36 expression in macrophages.

Next, the phagocytic capacity of macrophages was evaluated using two different techniques. In the first test, BMM were incubated with Zymosan A bioparticles that turns fluorescent once into the phagosome. Interestingly, KO BMM displayed an impaired capacity to uptake Zymosan A fluorescent bioparticles in comparison to WT BMM. Cytochalasin D was used in some conditions as a phagocytosis inhibitor (**Fig. 5B**). We then developed an efferocytosis-like test, in which BMM were incubated with heat-damaged PMN. These latter were stained with fluorescent anti-Ly6G. The double positive macrophages (F4/80⁺, Ly6G⁺) obtained after 12 h of co-incubation with damaged PMN represented the percentage of efferocytosis. Our results revealed that LPS-stimulated KO BMM displayed a decreased capacity to phagocyte damaged PMN compared to WT BMM (**Fig. 5C**). These *in vitro* experiments suggest that the lack of Nrf2 in macrophages decreases their phagocytic capacity leading to PMN accumulation in the skin of KO mice.



Discussion

PMN recruitment to the skin is a key event in CHS participating in DC activation and T cell direction into antigen-challenged skin (6, 7). Nrf2 transcription factor has been described to play a protective role in CHS (12) but mechanisms remain incompletely identified. The present study focused on Nrf2 capacity to modulate the early immune events during the sensitization phase, notably PMN recruitment to the skin. We demonstrated that Nrf2 regulates PMN recruitment to the skin through the upregulation of redox cytoprotective genes and the modulation of chemokine release. Moreover, we revealed that Nrf2 promotes the upregulation of CD36 expression on macrophages in response to DNCB and enhances macrophage phagocytic capacity leading to a better clearance of PMN. While many studies have described a key role for PMN in CHS, this study suggests Nrf2 as a master regulator of PMN action in this inflammatory context.

In agreement with our previous study demonstrating that Nrf2 regulates skin inflammation during the elicitation phase (12), the actual study showed that Nrf2 regulates PMN and monocyte recruitment to the skin during the sensitization phase. In the last decade, few studies have discussed the role of PMN in CHS. Although a growing number of studies have shown that PMN and monocytes are rapidly recruited in response to chemical sensitizers (7, 28, 29), it remains unclear how these cells are mobilized to promote a T cell-mediated inflammation. Weber *et al.* evidenced that PMN depletion prior to sensitization resulted in a remarkable suppression of CHS, also proving a crucial role for PMN during the sensitization phase (7). In parallel, many studies have highlighted an exacerbated PMN recruitment in Nrf2 KO mice in lung inflammation models (23, 30), but to the best of our knowledge not in allergic settings. Comparison between three different models displaying ascending PMN recruitment levels revealed a positive correlation between skin infiltration by PMN, DC activation and skin inflammation in CHS. Altogether, these results suggested that Nrf2 activation in the skin controls PMN recruitment leading to a downstream regulation of DC maturation and of skin inflammation during the elicitation phase of CHS.

Few studies have shown that DNCB activates Nrf2 target genes in skin cells such as



keratinocytes (31) as well as in different models of DC (human monocyte derived DC (MoDC and BMDC) (16, 32). Consistent with these studies, we demonstrated using whole skin RNA that DNCB sensitization activated a battery of Nrf2 cytoprotective target genes in skin cells including *ho-1*, *nqo1* and *gclc*. Topical pretreatment with the antioxidant molecule NAC, allowing a depletion of ROS in the skin (14), decreases PMN and monocyte recruitment in Nrf2 deficient mice. Thus, disruptions of skin redox balance in the absence of Nrf2, affects the recruitment of different inflammatory cells including PMN and monocytes. This also indicates that the anti-oxidant role of Nrf2 was highly protective towards skin inflammation. Interestingly, the activation of Nrf2 target genes was associated with an upregulation of several genes, in particular the KRT family and IL-19, IL-24 (both members of IL-10 subfamily) (33) described to play an important role in skin wound healing (34–36). In contrast, Nrf2 downregulated genes encoding CCL20 and IL-1 β , both known for their pro-inflammatory role in CHS (37–39). Furthermore, Nrf2 could interfere with inflammatory pathways encoding several key chemokines. Fourtounis *et al.* have suggested that Nrf2 downregulated the expression of CCL11 (Eotaxin-1) in human lung fibroblasts (40). In addition, Eitas *et al.* have demonstrated that monocyte treatment with a Nrf2 activator (bardoxolone methyl) reduced CCL2 production in burned patients (41). Our study has identified a group of CHS key chemokines and revealed that Nrf2 significantly decreased CCL2, CCL4 and CCL11 production in response to DNCB. We can thus suggest that Nrf2 regulates skin chemokine production indirectly through redox control (42), and might directly inhibit the transcription of pro-inflammatory cytokine genes (43). In both cases, the over production of these mediators participates in the important mobilization of inflammatory cells to the skin.

In acute inflammation, PMN homeostasis and accumulation into the tissues needs to be tightly regulated to avoid excessive mobilization from the bone marrow (44). The engulfment of apoptotic PMN by macrophages is essential for tissue homeostasis and for the resolution of tissue inflammation (45–47). For instance, PMN elimination during wound repair starts by their apoptosis leading to their phagocytosis by anti-inflammatory macrophages (48, 49). While evidence for the



involvement of scavenger receptor CD36 in mediating efferocytosis emerged long ago (50, 51), many recent studies have highlighted a role for Nrf2 in the regulation of CD36 expression (30, 52, 53). Our *in vivo* results revealed that the chemical sensitizer DNCB enhanced CD36 expression on skin macrophages in an Nrf2-dependent manner but independently from oxidative stress. In addition, we confirmed using an *in vitro* model that Nrf2 improved macrophage capacity to phagocyte damaged PMN associated with direct CD36 gene upregulation. Thus, Nrf2 could promote the resolution of skin inflammation through phagocytosis of damaged PMN by macrophages.

In summary, Nrf2 is central for the regulation of PMN recruitment and accumulation in the skin during the sensitization phase of CHS. Skin infiltration by PMN is highly dependent from Nrf2-regulated ROS level. Moreover, PMN elimination from inflamed skin can be improved by Nrf2 through CD36 upregulation on macrophages, but independently from ROS level. These mechanisms are summarized in Figure 6. This work highlights the key role of Nrf2 in PMN homeostasis in the skin and in the regulation of downstream events in CHS. Nrf2 should thus be considered as a therapeutic target in skin inflammation.



Authorship

DGH designed and performed most of the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. BN performed skin digestion and mouse genotyping. HG performed the PCR array. FG performed immunohistological experiments. ZEA provided her expertise in the MEST. MP reviewed the manuscript. SKR and SCM supervised the conduct of the study, found funding and critically reviewed the manuscript. All authors approved the final version.

Corresponding Author:

Saadia Kerdine-Römer, Inflammation, Chimiokines et Immunopathologie, INSERM, Univ.Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France.

Email: saadia.kerdine-romer@u-psud.fr

Acknowledgments

We thank Mrs. Marie Laure-Aknin and Dr. Hélène Gary (IPSIT, Facility PLAIMMO, Clamart), Dr. Claudine Deloménie (IPSIT, Trans-Prot, Châtenay-Malabry), as well as Dr. Valérie Domergue and Mrs. Ayma Galland (IPSIT, Facility Animex, Châtenay-Malabry) for excellent technical assistance.

Conflict of Interest Disclosure

The authors declare no conflict of interest.



References

1. Diepgen, T. L. 2003. Occupational skin-disease data in Europe. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 76: 331–338.
2. Thyssen, J. P., A. Linneberg, T. Menné, and J. D. Johansen. 2007. The epidemiology of contact allergy in the general population – prevalence and main findings. *Contact Dermatitis* 57: 287–299.
3. Al-Otaibi, S. T., and H. A. M. Alqahtani. 2015. Management of contact dermatitis. *J. Dermatol. Dermatol. Surg.* 19: 86–91.
4. Kaplan, D. H., B. Z. Igyártó, and A. A. Gaspari. 2012. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat. Rev. Immunol.* 12: 114–124.
5. Tončić, R. J., J. Lipozenčić, I. Martinac, and S. Gregurić. 2011. Immunology of allergic contact dermatitis. *Acta Dermatovenerol. Croat. ADC* 19: 51–68.
6. Kish, D. D., A. V. Gorbachev, N. Parameswaran, N. Gupta, and R. L. Fairchild. 2012. Neutrophil Expression of FasL and Perforin Directs Effector CD8 T Cell Infiltration into Antigen Challenged Skin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 189: 2191–2202.
7. Weber, F. C., T. Németh, J. Z. Csepregi, A. Dudeck, A. Roers, B. Ozsvári, E. Oswald, L. G. Puskás, T. Jakob, A. Mócsai, and S. F. Martin. 2015. Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 212: 15–22.
8. Schmidt, M., B. Raghavan, V. Müller, 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. *Nat. Immunol.* 11: 814–819.
9. Martin, S. F., J. C. Dudda, E. Bachtanian, A. Lembo, S. Liller, C. Dürr, 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. *J. Exp. Med.* 205: 2151–2162.
10. Martin, S. F. 2011. Allergische Kontaktdermatitis: Es „riecht“ wie eine Infektion. *Allergo J.* 20: 81–86.



11. 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: 1152–1163.
12. El Ali, Z., C. Gerbeix, P. Hemon, P. R. Esser, S. F. Martin, M. Pallardy, and S. Kerdine-Römer. 2013. Allergic Skin Inflammation Induced by Chemical Sensitizers Is Controlled by the Transcription Factor Nrf2. *Toxicol. Sci.* 134: 39–48.
13. Schaefer, L., A. Babelova, E. Kiss, H.-J. Hausser, M. Baliova, M. Krzyzankova, G. Marsche, M. F. Young, D. Mihalik, M. Götte, E. Malle, R. M. Schaefer, and H.-J. Gröne. 2005. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J. Clin. Invest.* 115: 2223–2233.
14. Esser, P. R., U. Wölfle, C. Dürr, 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.
15. Dalod, M., R. Chelbi, B. Malissen, and T. Lawrence. 2014. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J.* 33: 1104–1116.
16. El Ali, Z., C. Deloménie, J. Botton, M. Pallardy, and S. Kerdine-Römer. 2017. Dendritic cells' death induced by contact sensitizers is controlled by Nrf2 and depends on glutathione levels. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 322: 41–50.
17. Corsini, E., V. Galbiati, D. Nikitovic, and A. M. Tsatsakis. 2013. Role of oxidative stress in chemical allergens induced skin cells activation. *Food Chem. Toxicol.* 61: 74–81.
18. Vomund, S., A. Schäfer, M. J. Parnham, B. Brüne, and A. von Knethen. 2017. Nrf2, the Master Regulator of Anti-Oxidative Responses. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
19. Ma, Q. 2013. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53: 401–426.
20. Kansanen, E., S. M. Kuosmanen, H. Leinonen, and A.-L. Levonen. 2013. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1: 45–49.
21. Kensler, T. W., N. Wakabayashi, and S. Biswal. 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47: 89–116.



22. 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. 2006. Nrf2 dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351: 883–889.
23. Gomez, J. C., H. Dang, J. R. Martin, and C. M. Doerschuk. 2016. Nrf2 Modulates Host Defense during Streptococcus pneumoniae Pneumonia in Mice. *J. Immunol.* 197: 2864–2879.
24. 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236: 313–322.
25. Cottrez, F., E. Boitel, C. Auriault, P. Aeby, and H. Groux. 2015. Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model. Development of the SENS-IS assay. *Toxicol. In Vitro* 29: 787–802.
26. de Bourayne, M., Y. Gallais, Z. El Ali, P. Rousseau, M.-H. Damiens, C. Cochet, O. Filhol, S. Chollet-Martin, M. Pallardy, and S. Kerdine-Römer. 2017. Protein kinase CK2 controls T-cell polarization through dendritic cell activation in response to contact sensitizers. *J. Leukoc. Biol.* 101: 703–715.
27. Zheng, L., M. He, M. Long, R. Blomgran, and O. Stendahl. 2004. Pathogen-Induced Apoptotic Neutrophils Express Heat Shock Proteins and Elicit Activation of Human Macrophages. *J. Immunol.* 173: 6319–6326.
28. Christensen, A. D., S. Skov, and C. Haase. 2014. The role of neutrophils and G-CSF in DNFB-induced contact hypersensitivity in mice. *Immun. Inflamm. Dis.* 2: 21–34.
29. Liu, Z., F. Yang, H. Zheng, Z. Fan, S. Qiao, L. Liu, J. Tao, Q. Luo, and Z. Zhang. 2018. Visualization of T Cell-Regulated Monocyte Clusters Mediating Keratinocyte Death in Acquired Cutaneous Immunity. *J. Invest. Dermatol.* 138: 1328–1337.
30. Iizuka, T., Y. Ishii, K. Itoh, T. Kiwamoto, T. Kimura, Y. Matsuno, Y. Morishima, A. E. Hegab, S. Homma, A. Nomura, T. Sakamoto, M. Shimura, A. Yoshida, M. Yamamoto, and K. Sekizawa. 2005. Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema. *Genes Cells* 10: 1113–1125.



31. 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.* 33: 1337–1352.
32. Migdal, C., J. Botton, Z. El Ali, M.-E. Azoury, J. Guldemann, E. Giménez-Arnau, J.-P. Lepoittevin, S. Kerdine-Römer, 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.* 133: 259–274.
33. Conti, P., D. Kempuraj, S. Frydas, K. Kandere, W. Boucher, R. Letourneau, B. Madhappan, K. Sagimoto, S. Christodoulou, and T. C. Theoharides. 2003. IL-10 subfamily members: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. *Immunol. Lett.* 88: 171–174.
34. Poindexter, N. J., R. R. Williams, G. Powis, E. Jen, A. S. Caudle, S. Chada, and E. A. Grimm. 2010. IL-24 is Expressed During Wound Repair and Inhibits TGF α induced Migration and Proliferation of Keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 19: 714–722.
35. Sun, D.-P., C.-H. Yeh, E. So, L.-Y. Wang, T.-S. Wei, M.-S. Chang, and C.-H. Hsing. 2013. Interleukin (IL)-19 promoted skin wound healing by increasing fibroblast keratinocyte growth factor expression. *Cytokine* 62: 360–368.
36. Mazzalupo, S., P. Wong, P. Martin, and P. A. Coulombe. 2003. Role for keratins 6 and 17 during wound closure in embryonic mouse skin. *Dev. Dyn.* 226: 356–365.
37. Paradis, T. J., S. H. Cole, R. T. Nelson, and R. P. Gladue. 2008. Essential Role of CCR6 in Directing Activated T Cells to the Skin during Contact Hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 128: 628–633.
38. Nielsen, M. M., P. Lovato, A. S. MacLeod, D. A. Witherden, L. Skov, B. Dyring-Andersen, S. Dabelsteen, A. Woetmann, N. Ødum, W. L. Havran, C. Geisler, and C. M. Bonfeld. 2014. IL-1 β -Dependent Activation of Dendritic Epidermal T Cells in Contact Hypersensitivity. *J. Immunol.* 192: 2975–2983.
39. Nambu, A., S. Nakae, and Y. Iwakura. 2006. IL-1 β , but not IL-1 α , is required for antigen-specific T cell activation and the induction of local inflammation in the delayed-type hypersensitivity responses. *Int. Immunol.* 18: 701–712.
40. Fourtounis, J., I.-M. Wang, M.-C. Mathieu, D. Claveau, T. Loo, A. L. Jackson, M. A. Peters, A. G. Therien, Y. Boie, and M. A. Crackower. 2012. Gene expression profiling following NRF2



and KEAP1 siRNA knockdown in human lung fibroblasts identifies CCL11/Eotaxin-1 as a novel NRF2 regulated gene. *Respir. Res.* 13: 92.

41. Eitas, T. K., W. Stepp, L. Sjeklocha, C. Long, C. Riley, J. Callahan, Y. Sanchez, P. Gough, L. Knowlin, D. van Duin, S. Ortiz-Pujols, S. Jones, R. Maile, Z. Hong, S. Berger, and B. Cairns. 2017. Differential regulation of innate immune cytokine production through pharmacological activation of Nuclear Factor-Erythroid-2-Related Factor 2 (NRF2) in burn patient immune cells and monocytes. *PLOS ONE* 12: e0184164.
42. Thimmulappa, R. K., H. Lee, T. Rangasamy, S. P. Reddy, M. Yamamoto, T. W. Kensler, and S. Biswal. 2016. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J. Clin. Invest.* 116: 984–995.
43. Kobayashi, E. H., T. Suzuki, R. Funayama, T. Nagashima, M. Hayashi, H. Sekine, N. Tanaka, T. Moriguchi, H. Motohashi, K. Nakayama, and M. Yamamoto. 2016. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat. Commun.* 7: ncomms11624.
44. Nourshargh, S., S. A. Renshaw, and B. A. Imhof. 2016. Reverse Migration of Neutrophils: Where, When, How, and Why? *Trends Immunol.* 37: 273–286.
45. Koh, T. J., and L. A. DiPietro. 2011. Inflammation and wound healing: The role of the macrophage. *Expert Rev. Mol. Med.* 13: e23.
46. Mescher, A. L. 2017. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. *Regeneration* 4: 39–53.
47. Greenlee-Wacker, M. C. 2016. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol. Rev.* 273: 357–370.
48. Meszaros, A. J., J. S. Reichner, and J. E. Albina. 1999. Macrophage phagocytosis of wound neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 65: 35–42.
49. Khanna, S., S. Biswas, Y. Shang, E. Collard, A. Azad, C. Kauh, V. Bhasker, G. M. Gordillo, C. K. Sen, and S. Roy. 2010. Macrophage Dysfunction Impairs Resolution of Inflammation in the Wounds of Diabetic Mice. *PLoS ONE* 5.
50. Woo, M.-S., J. Yang, C. Beltran, and S. Cho. 2016. Cell Surface CD36 Protein in Monocyte/Macrophage Contributes to Phagocytosis during the Resolution Phase of Ischemic



Stroke in Mice. *J. Biol. Chem.* 291: 23654–23661.

51. Navazo, M. D. P., L. Daviet, J. Savill, Y. Ren, L. L. K. Leung, and J. L. McGregor. 1996. Identification of a Domain (155–183) on CD36 Implicated in the Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils. *J. Biol. Chem.* 271: 15381–15385.
52. Ishii, T., K. Itoh, E. Ruiz, D. S. Leake, H. Unoki, M. Yamamoto, and G. E. Mann. 2004. Role of Nrf2 in the Regulation of CD36 and Stress Protein Expression in Murine Macrophages: Activation by Oxidatively Modified LDL and 4-Hydroxynonenal. *Circ. Res.* 94: 609–616.
53. Olagnier, D., R.-A. Lavergne, E. Meunier, L. Lefèvre, C. Dardenne, A. Aubouy, F. Benoit-Vical, B. Ryffel, A. Coste, A. Berry, and B. Pipy. 2011. Nrf2, a PPAR γ Alternative Pathway to Promote CD36 Expression on Inflammatory Macrophages: Implication for Malaria. *PLoS Pathog.* 7.



Figures legends

Figure 1: Exacerbated recruitment of PMN and monocytes to DNCB-treated skin in the absence of Nrf2. WT and KO mice were treated with vehicle (acetone) or DNCB 1% on ears. **(A)** Representative immunofluorescence images of skin sections (24 h post-sensitization), stained with anti-Ly6G/C (red), anti-MPO (green) and DAPI (blue). Yellow dots merging the three markers represent mostly PMN, white double arrows represent ear thickness (in μm), scale bars = 50 μm . **(B, C)** Analysis of PMN and monocyte recruitment to the skin represented as a biparametric plot showing PMN (CD11b^+ , Ly6G^+ from CD45^+ live cells) or monocytes (Ly6C^+ F4/80^- from CD45^+ CD11b^+ Ly6G^- CD11c^- live cells) at 24 h post-sensitization and as graphs representing the kinetics of skin infiltration by PMN and monocytes at 2 h, 12 h and 24 h after sensitization. Graphs represent the absolute count of PMN or monocytes in the whole ears measured by flow cytometry and show mean \pm SEM from 6-8 mice (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Figure 2: Correlations between PMN recruitment to the skin, DC maturation and skin inflammation in CHS. WT and KO mice were only sensitized with DNCB 1% or sensitized then challenged with vehicle or DNCB 0.5%. A group of WT mice was injected with anti-Ly6G to deplete PMN. **(A)** Levels of PMN recruitment, CD86 expression on CD11b^+ DC and % of ear thickness increase in WT depleted mice, WT non-depleted mice and KO mice. Graphs show mean \pm SEM from 6-8 mice (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). # symbol indicates significant difference between vehicle and DNCB treated mice. **(B)** Spearman correlations between PMN % in skin, CD86 expression on CD11b^+ DC and % of ear thickness increase.

Figure 3: Oxidative and inflammatory pathways regulation by Nrf2 in skin cells. **(A)** Comparison of the messenger RNA levels of 30 genes at 6 h post-sensitization with 0.5% or 1% of DNCB. Data are expressed as a heat map in which row Z scores of the mean expression data for



triplicate arrays are shown (fold increase normalized to vehicle WT mice). Genes are divided into 3 groups according to their functions (25). **(B)** Quantification of chemokines (CCL2, CCL3, CCL4, CCL11, CCL22 and CXCL1) in WT and KO mice skin 24 h after sensitization with vehicle or DNCB 1%. The amount of chemokines in whole ear homogenates was quantified using a bead-based immunoassay. The graphs show mean \pm SEM (n=6-8). **(C)** Analysis of PMN percentage from CD45⁺ cells in WT and KO mice skin, 24 h after sensitization with vehicle or DNCB 1% with or without topical pretreatment with 50 mM of NAC. The graphs show mean \pm SEM (n=5-8, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Figure 4: Nrf2 implication in macrophage activation and CD36 expression. WT and KO mice were sensitized with vehicle or DNCB 1% on ears. **(A)** Analysis of CD36 expression on skin macrophages represented as a biparametric plot showing the % of CD36⁺ skin macrophages, 24 h after sensitization with vehicle or DNCB 1% with or without topical pretreatment with 50 mM of NAC. **(B)** CD86 expression level calculated as MFI on skin macrophages defined as CD64⁺ F4/80⁺ from CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ CD11c⁻ live cells. The graphs show mean \pm SEM from 5 to 8 (*p<0.05, **p<0.01).

Figure 5: In vitro assessment of Nrf2 implication in macrophage phagocytic capacity. BMM were stimulated with 25 ng/ml of LPS or 25 μ g/ml of Zymosan A. **(A)** Graph showing the fold increase of *cd36* mRNA between non-stimulated NS (reference) and stimulated BMM at 7 h post-stimulation. Data were normalized to *gapdh* and *β -actin* housekeeping genes. **(B)** The phagocytic capacity of BMM was assessed by flow cytometry after their incubation with Zymosan fluorescent bioparticles (90 min, 37°C, 5% CO₂). Fluorescent cells represent BMM that have internalized Zymosan A bioparticles. **(C)** Assessment of LPS-stimulated BMM capacity to phagocyte damaged PMN, using flow cytometry. BMM were stimulated or not with 25 ng/ml LPS for 12 h, then incubated or not with damaged PMN for 12 h. Cells were then stained with anti- F4/80 and anti-



Ly6G. The % of double positive cells (F4/80⁺; Ly6G⁺) represents phagocytosis percentage. Flow cytometry data are shown as a biparametric plot from one representative experiment and as the mean of phagocytosis % from 4 independent experiments. The graphs show mean \pm SEM from 4 different mice (*p<0.05). # symbol indicates significant differences between zymosan-stimulated and non-stimulated (NS) BMM.

Figure 6: Regulation of DNCB-induced CHS by Nrf2. In response to DNCB, Nrf2 is activated in skin cells and induces a transcriptional activation of its anti-oxidant target genes (*ho-1*, *nqo1*, *gclc*, *nos3*...) leading notably to ROS neutralisation. In addition, Nrf2 activation decreases chemokines production in the skin (CCL2, CCL4, CCL11...) and upregulates CD36 expression on macrophages, resulting in a controlled recruitment of inflammatory cells and an efficient clearance of apoptotic PMN. All these events participate in the regulation of the innate immune response during the sensitization phase resulting in a controlled CHS.



Figure 1

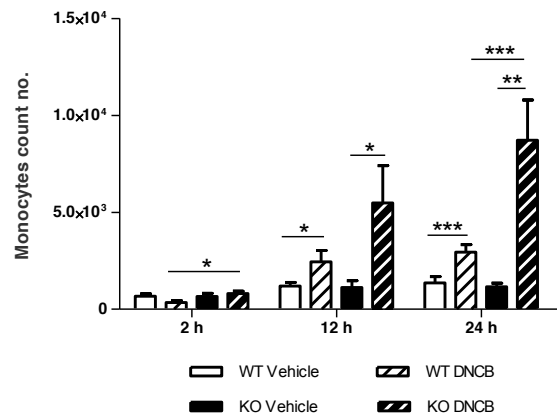
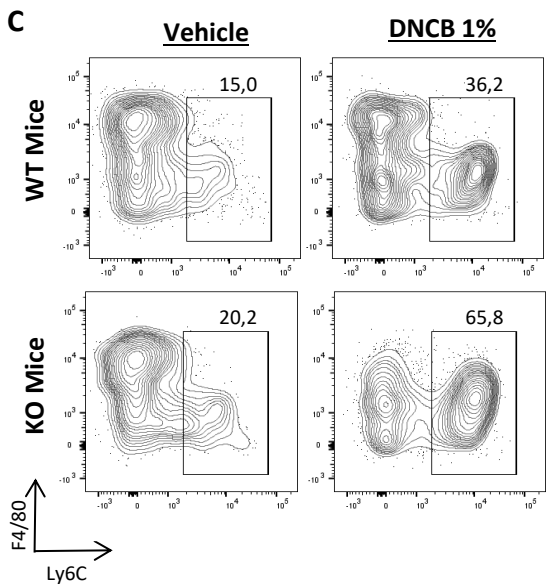
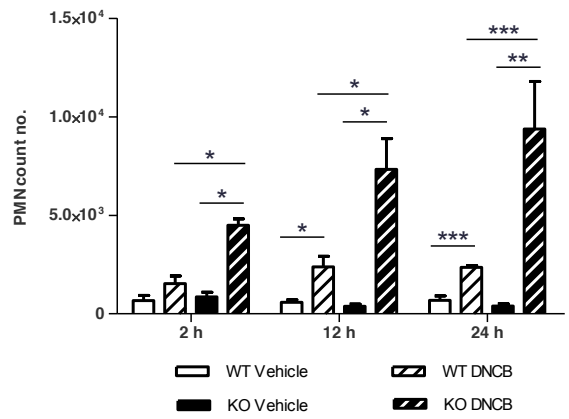
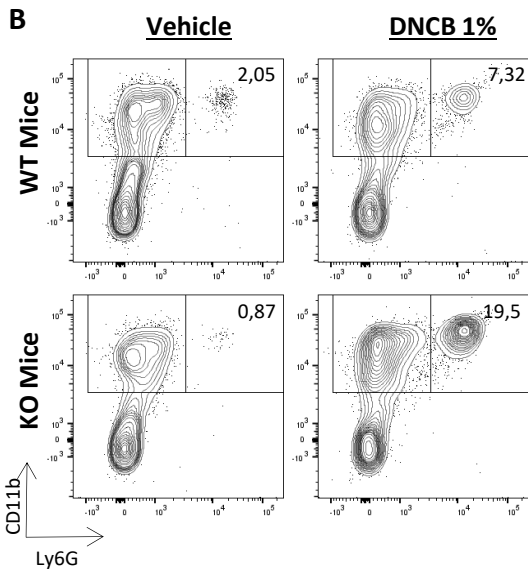
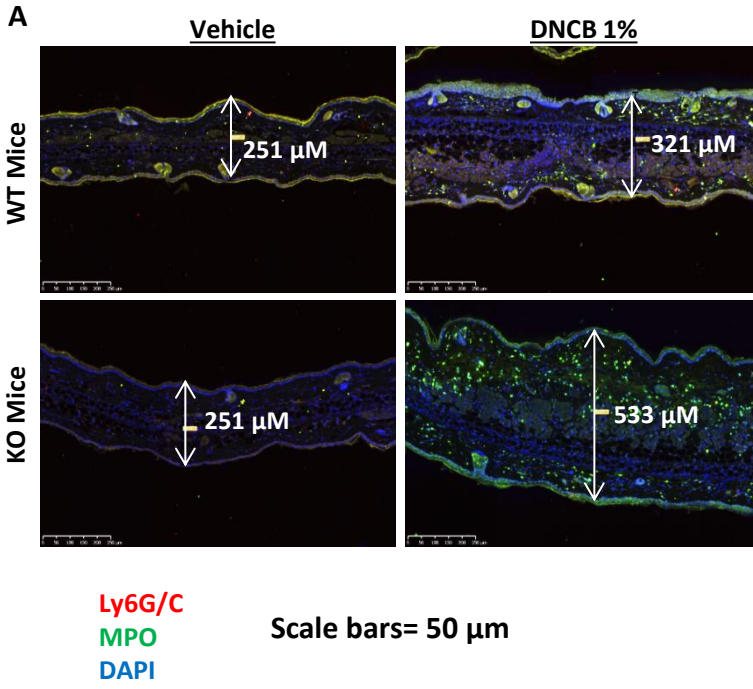
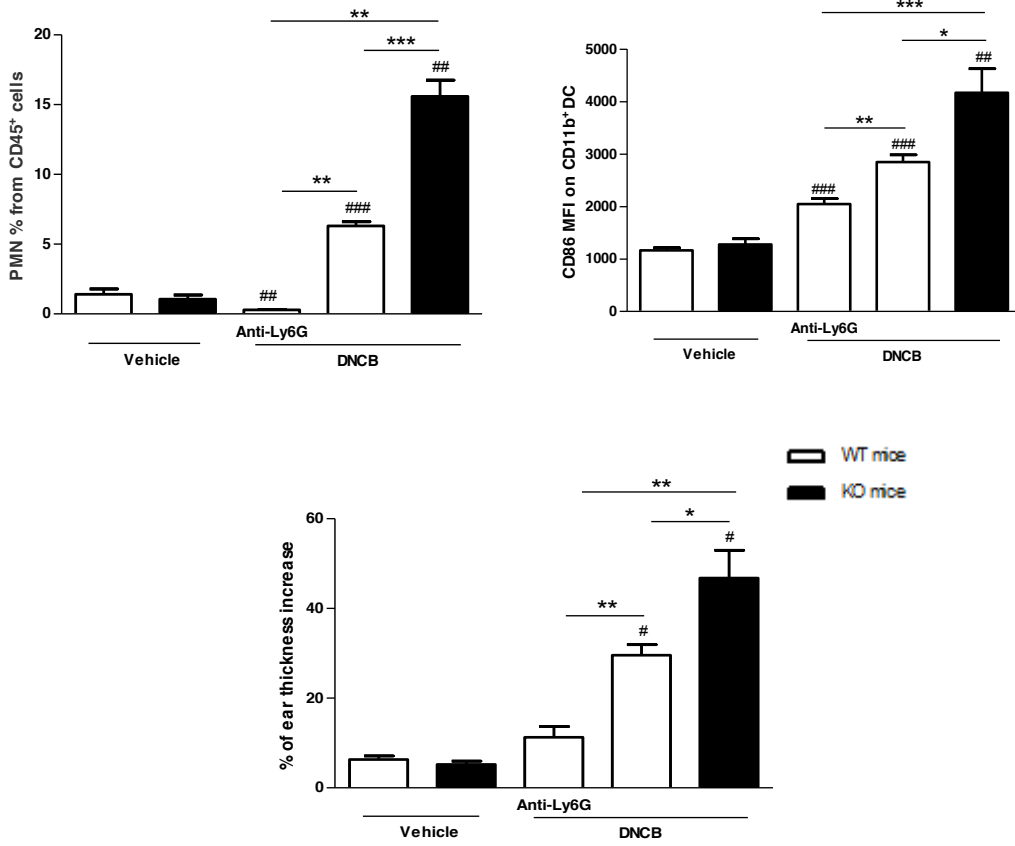


Figure 2

A



B

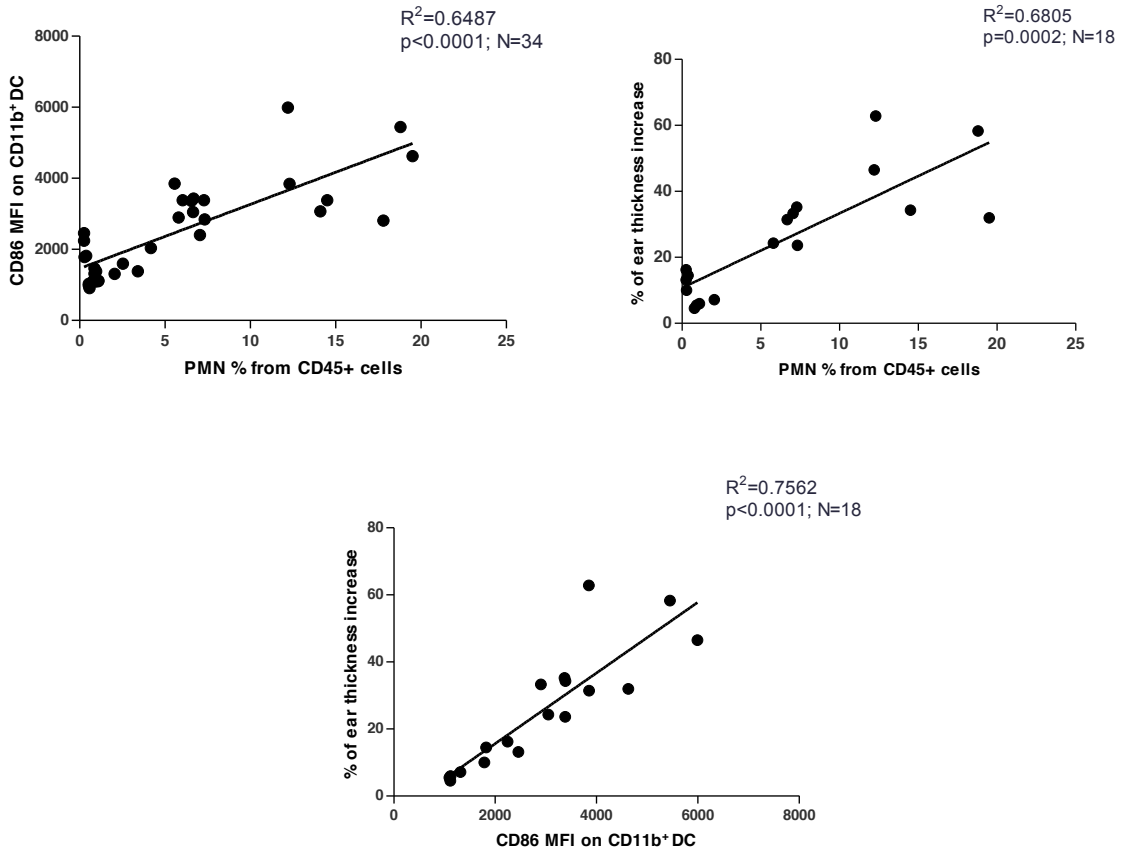


Figure 3

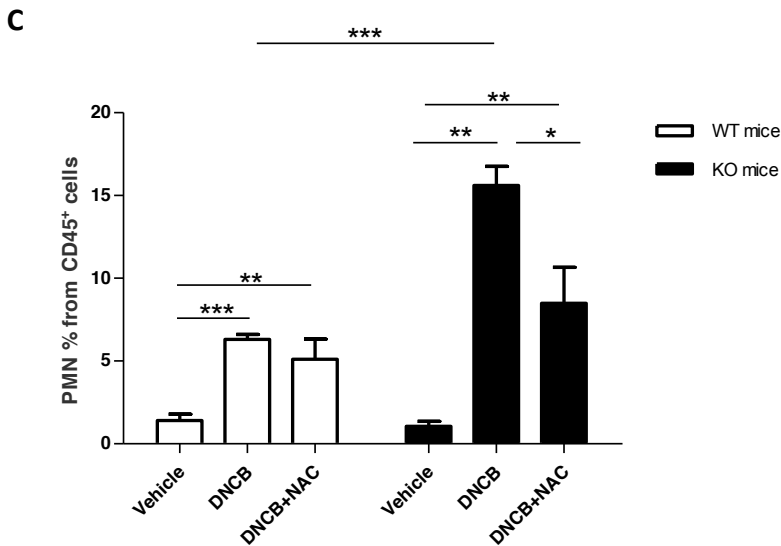
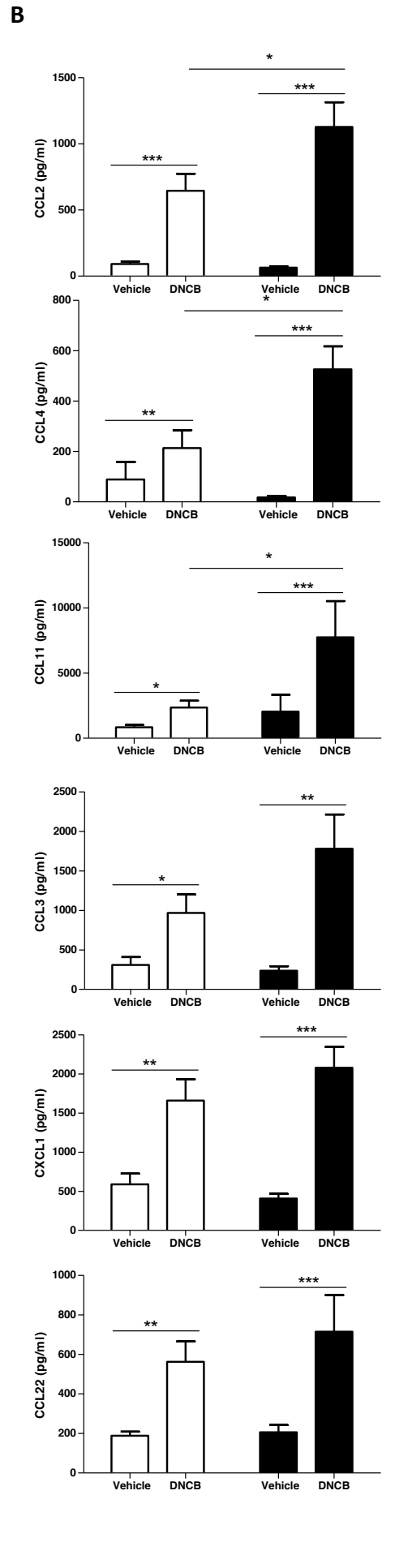
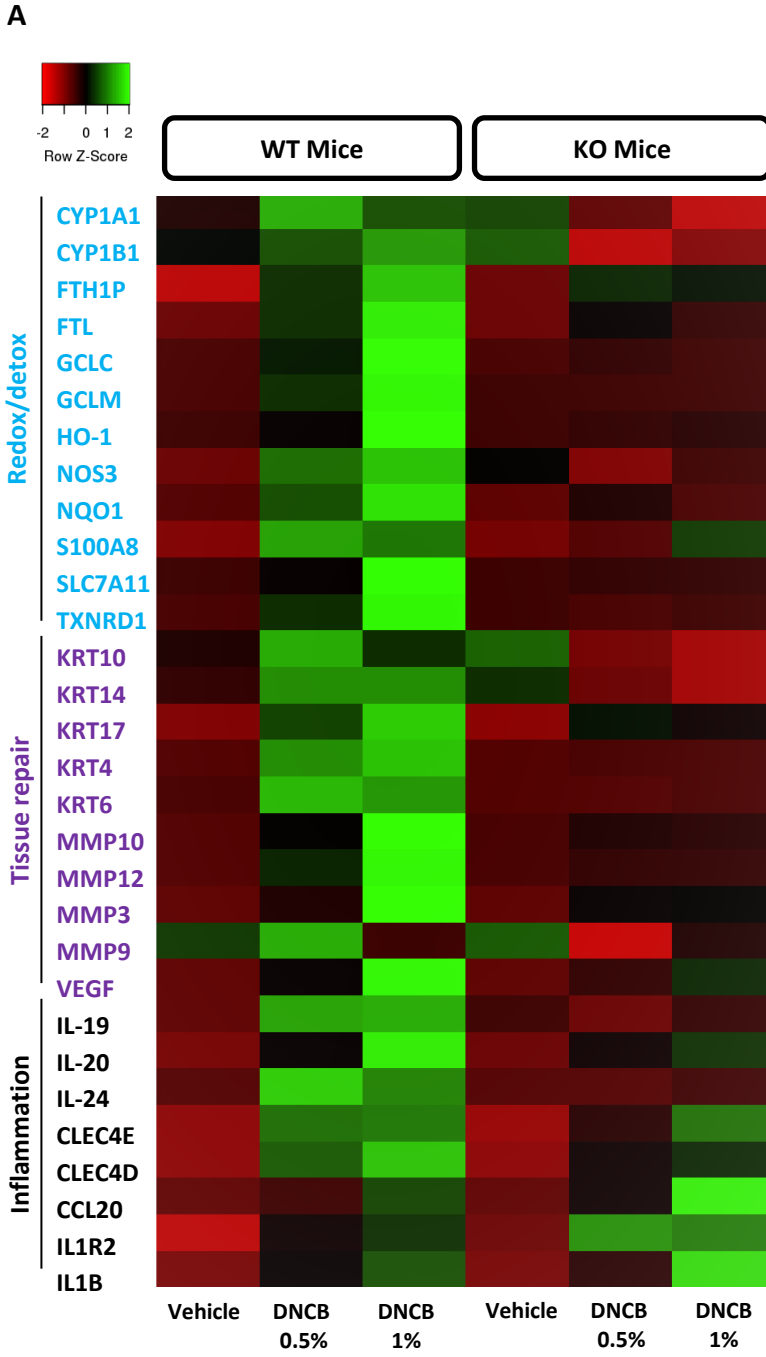


Figure 4

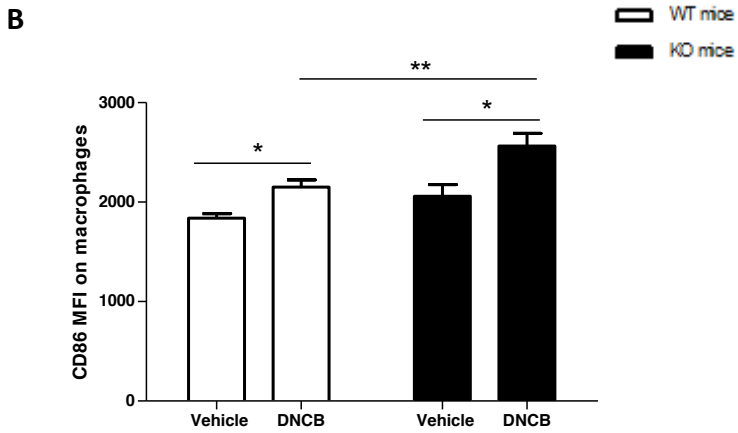
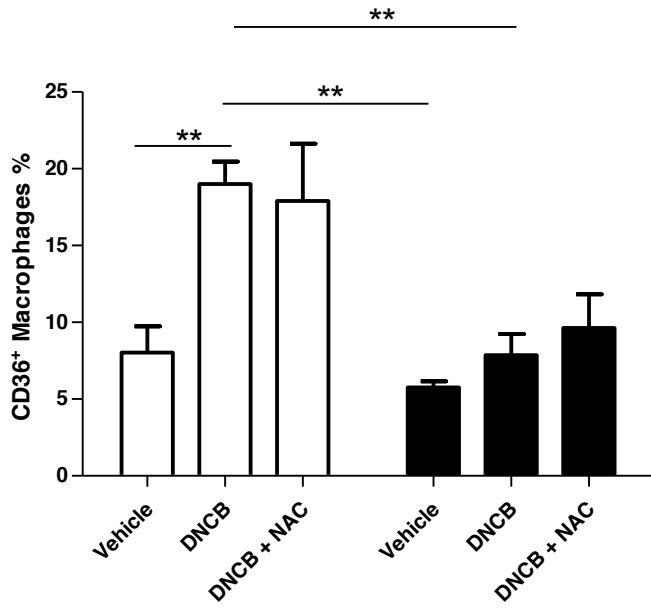
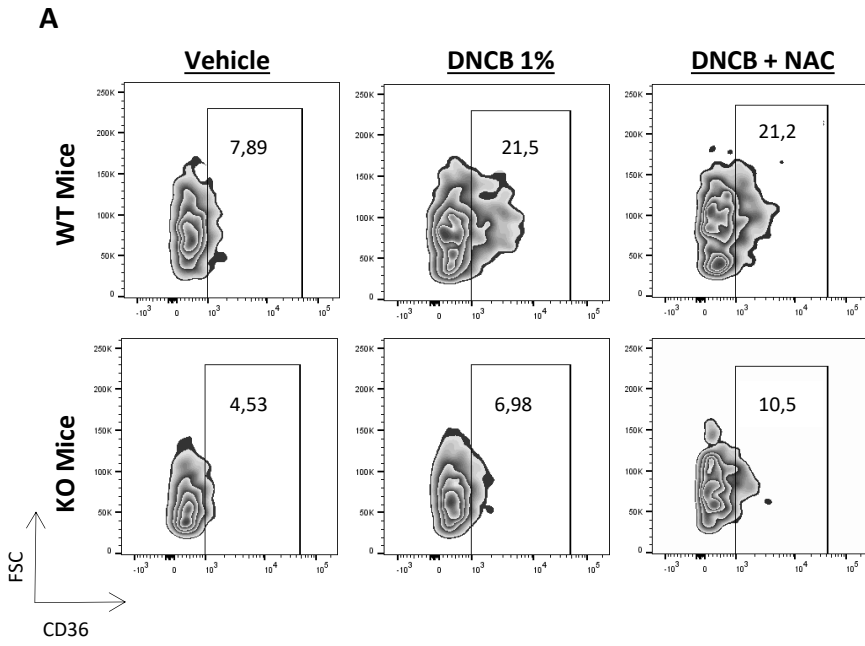


Figure 5

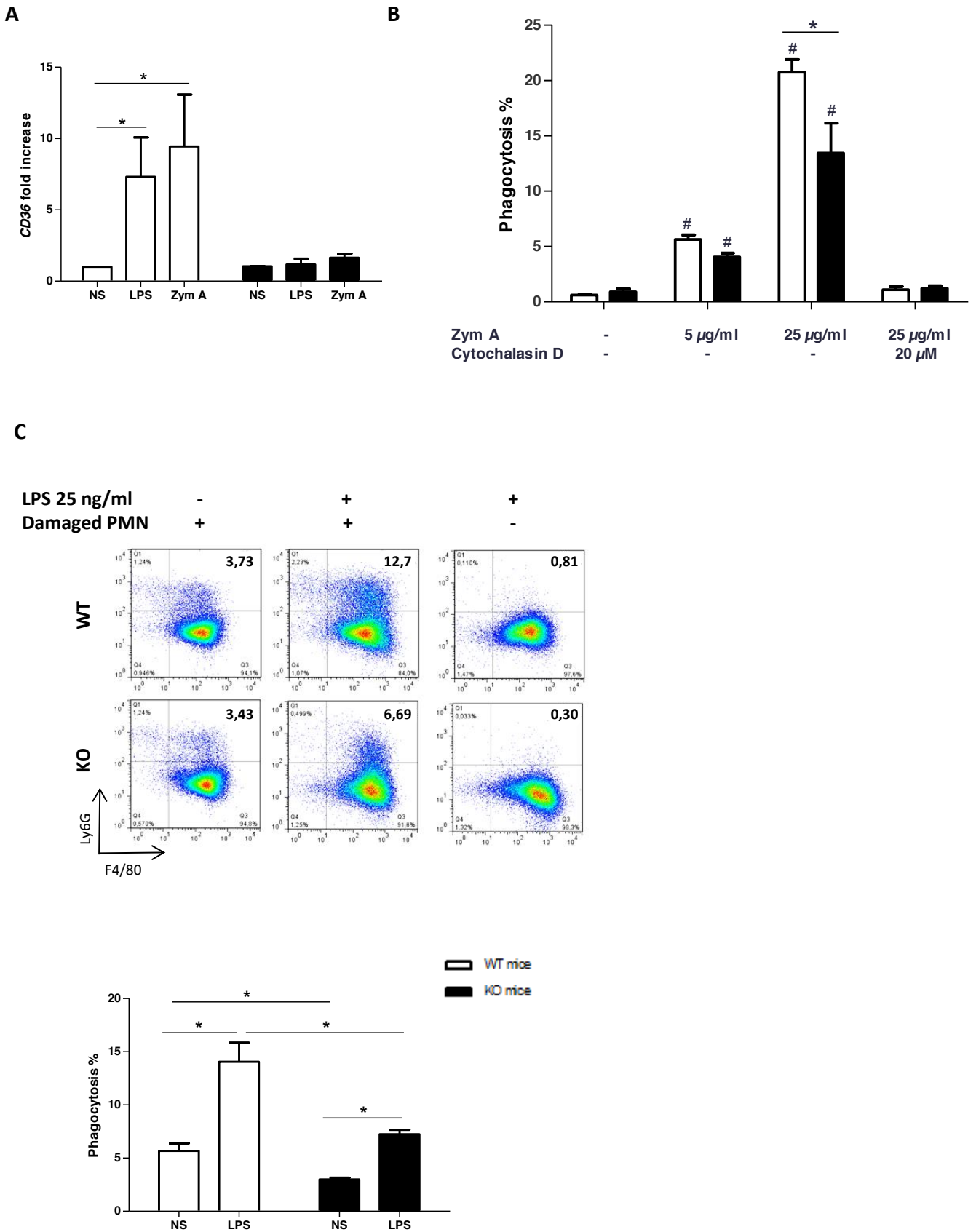
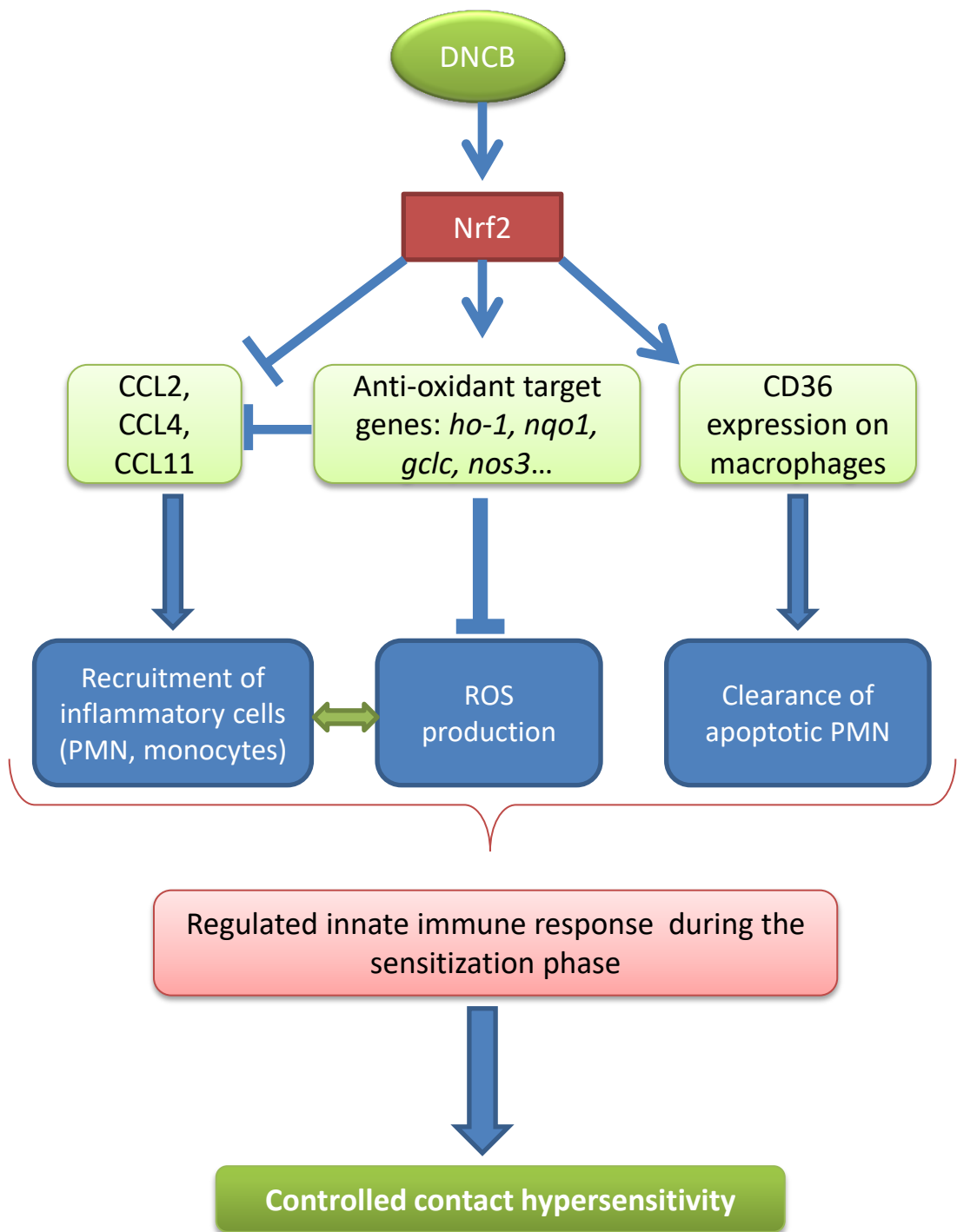


Figure 6



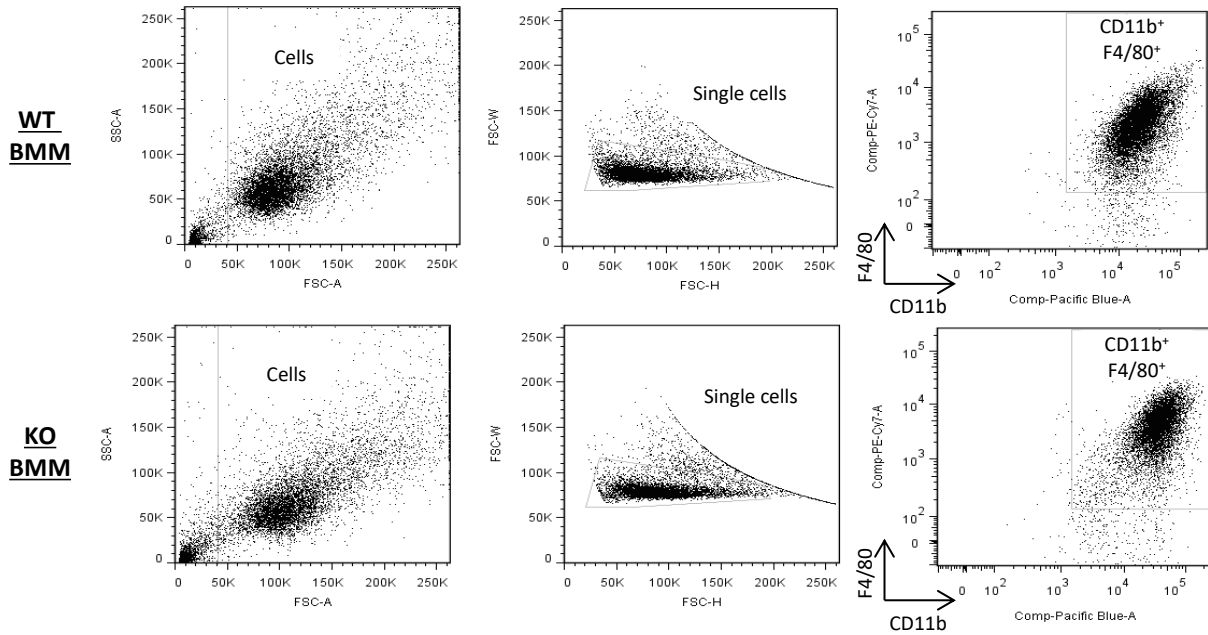
Supplementary Table

<u>Gene symbols</u>	<u>Gene names</u>	<u>Function</u>
CYP1A1	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	Redox/detox
CYP1B1	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	Redox/detox
FTH1P	Ferritin, heavy polypeptide 1	Redox/detox
FTL	Ferritin, light polypeptide	Redox/detox
GCLC	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	Redox/detox
GCLM	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	Redox/detox
HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1	Redox/detox
NOS3	Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)	Redox/detox
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	Redox/detox
S100A8	S100 calcium binding protein A8	Redox/detox
SLC7A11	Solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y + system) member 11	Redox/detox
TXNRD1	Thioredoxin reductase 1	Redox/detox
KRT10	Keratin 10	Tissue repair
KRT14	Keratin 14	Tissue repair
KRT17	Keratin 17	Tissue repair
KRT4	Keratin 4	Tissue repair
KRT6	Keratin 6	Tissue repair
MMP10	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	Tissue repair
MMP12	Matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	Tissue repair
MMP3	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	Tissue repair
MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92 kDa gelatinase, 92 kDa type IV collagenase)	Tissue repair
VEGF	Vascular endothelial growth factor A	Tissue repair
IL-19	Interleukin 19 (belongs to the IL-10 family)	Inflammation
IL-20	Interleukin 20 (belongs to the IL-10 family)	Inflammation
IL-24	Interleukin 24 (belongs to the IL-10 family)	Inflammation
CLEC4E	C-type lectin domain family 4, member D	Inflammation
CLEC4D	C-type lectin domain family 4, member D	Inflammation
CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	Inflammation
IL1R2	Interleukin 1 receptor, type II	Inflammation
IL1B	Interleukin 1, beta	Inflammation

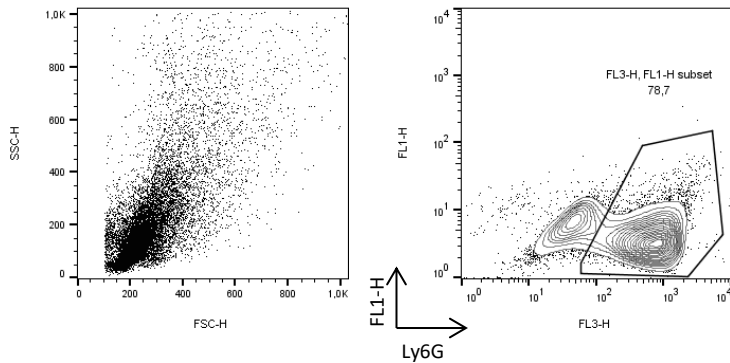
Table: Gene names and brief functional summaries. The 30 genes are grouped into 3 functional categories: redox/detox, tissue repair and inflammation.

Supplementary Figure 1

A



B



C

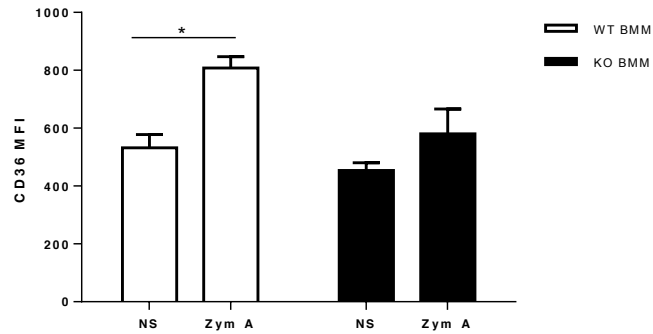


Figure 1: Representative FACS analysis of BMM purity and Ly6G expression on PMN before co-incubation. (A) BMM were identified as CD11b⁺ F4/80⁺ from single cells; BMM purity was $\geq 95\%$ in all experiments. (B) Ly6G expression assessed on heat-treated PMN before their co-incubation with BMM. (C) Graph representing the expression of CD36 on BMM, 90 min after their stimulation with zymosan A 25 $\mu\text{g/ml}$ (n=4, *p<0.05).

Supplementary Figure 2

A

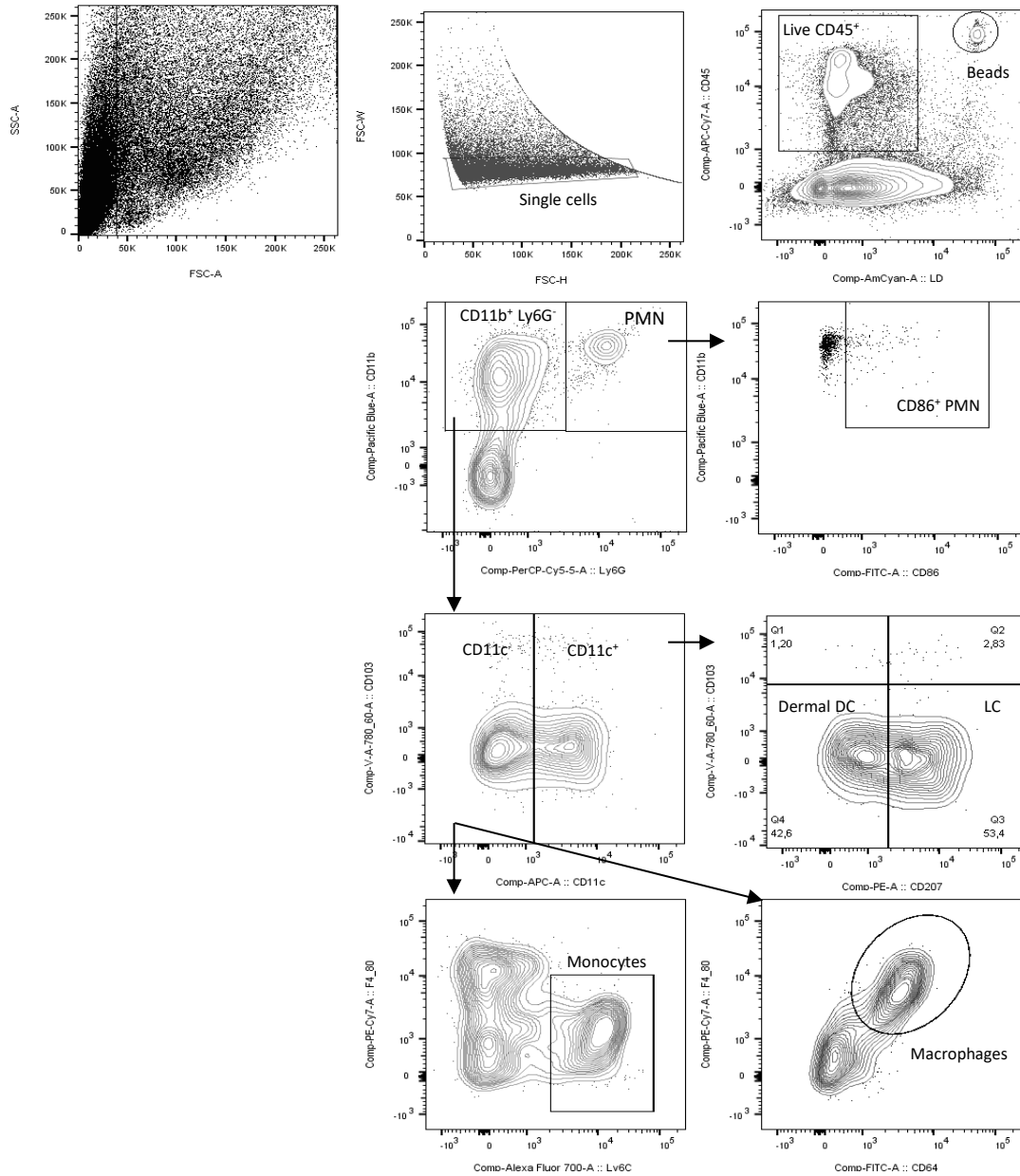


Figure 2: Flow cytometry gating strategy in skin cell suspensions. Total ear skin cells were subjected to 11 color analyses on a BD LSRFortessa. Data were analyzed using FlowJo v10. Cells were first gated on forward scatter and side scatter then on single live CD45⁺. PMN, monocytes, macrophages and dendritic cells were progressively gated from live CD45⁺ cells.

Supplementary Figure 3

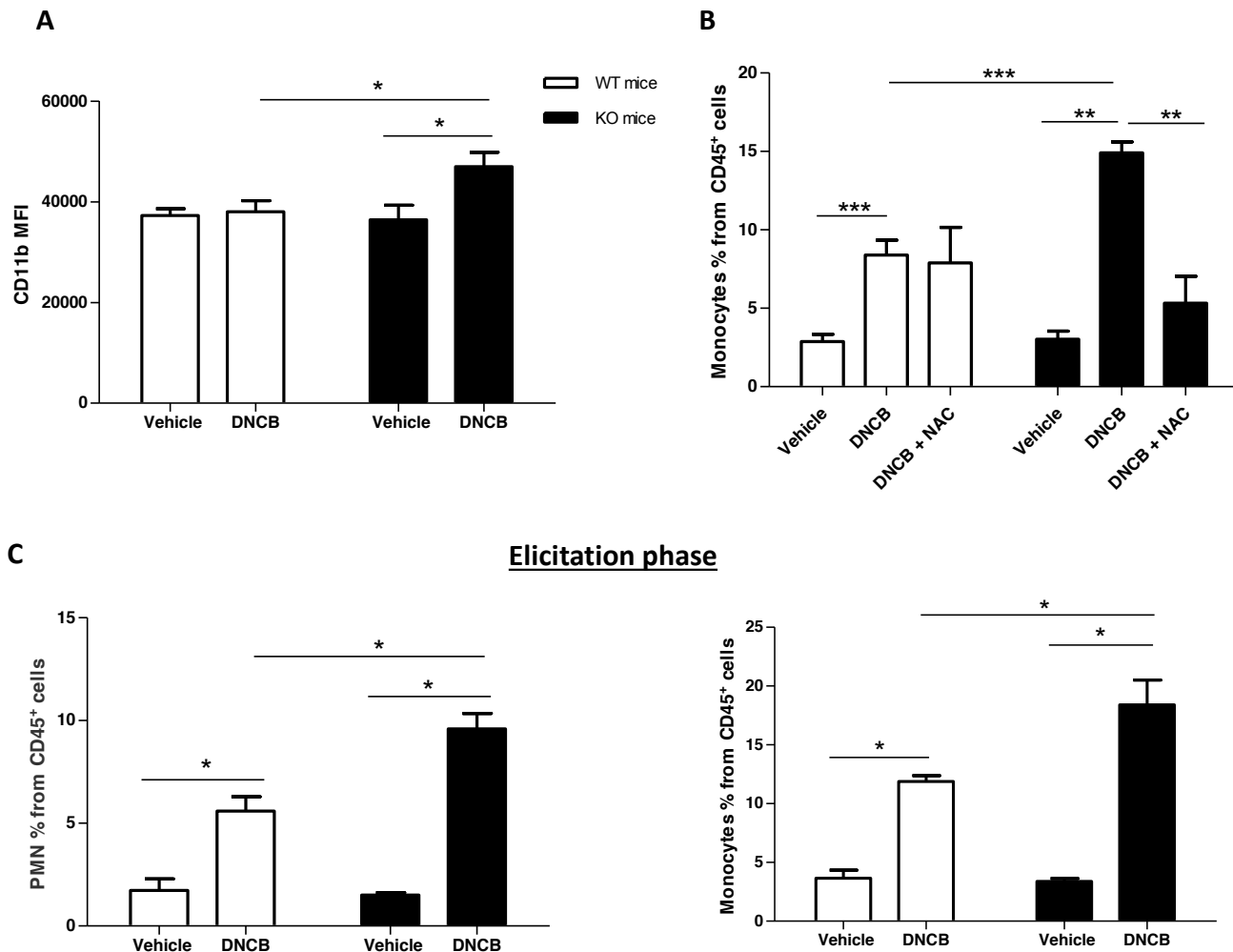


Figure 3: Nrf2-dependent regulation of monocytes and neutrophil recruitment in CHS. (A) CD11b expression level on skin PMN calculated as MFI (24 h post-sensitization). **(B)** Analysis of monocytes % from CD45⁺ cells in WT and KO mice skin, 24 h after sensitization with vehicle or DNCB 1%. Mice were topically pretreated or not with 50 mM of NAC. **(C)** Graphs representing PMN and monocyte % from CD45⁺ in inflamed ears at 24 h after challenge (elicitation phase). Graphs show mean ± SEM from 6-8 mice. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

Supplementary Figure 4*

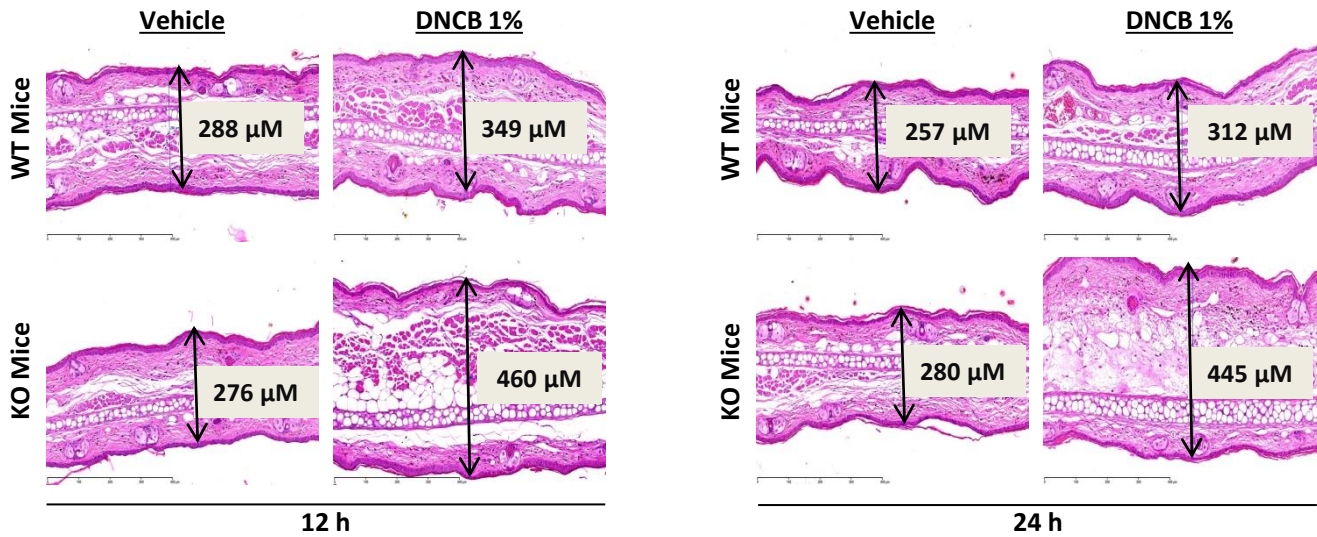


Figure 4: DNCB-induced skin inflammation. HE staining of WT and KO mice ears section used to measure ear thickness 12 h or 24 h after sensitization with the vehicle (acetone) or with DNCB 1%. Scale bars = 100 μm .

* Supplemental figures (4 to 9) were not included in the submitted article.

Supplementary Figure 5*

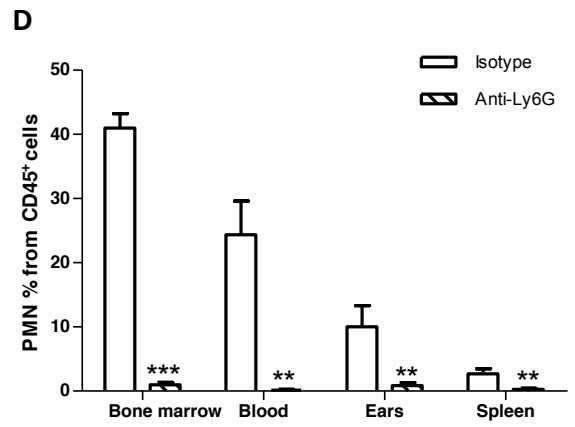
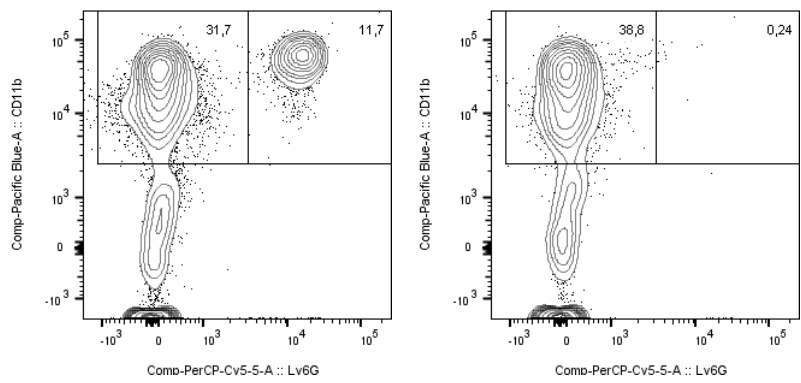
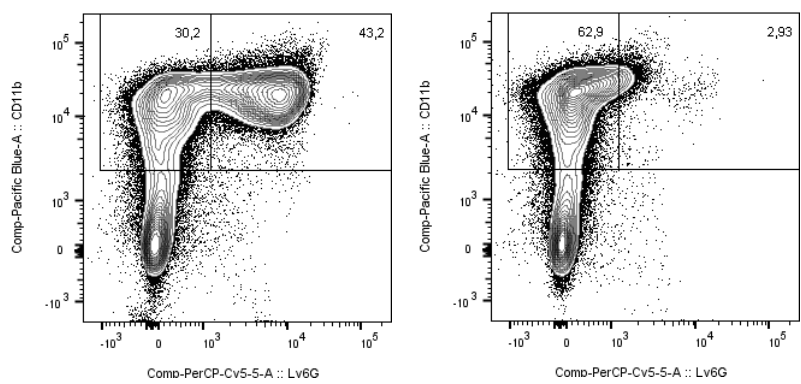
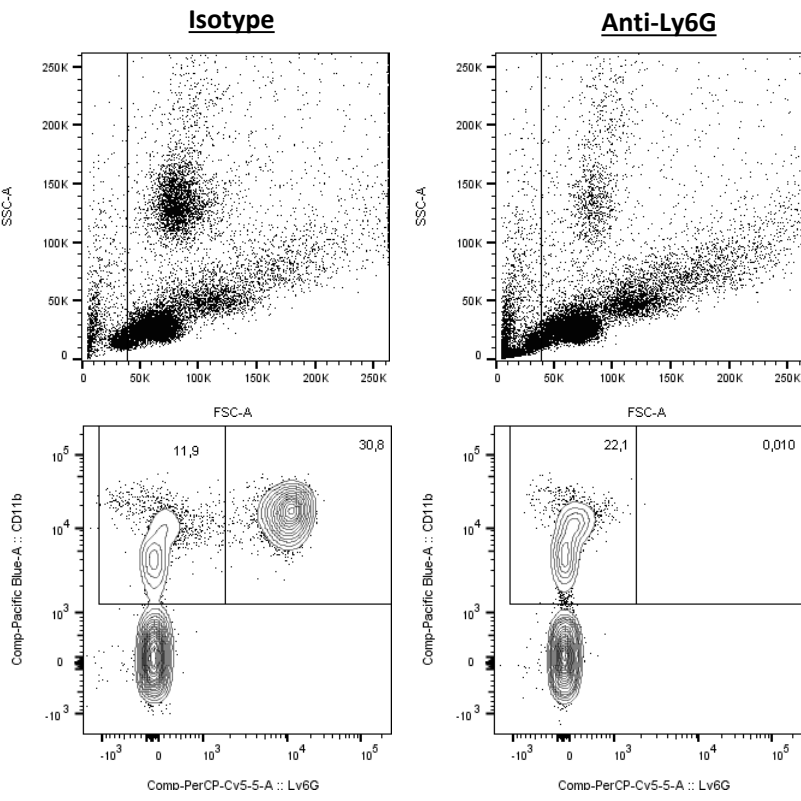
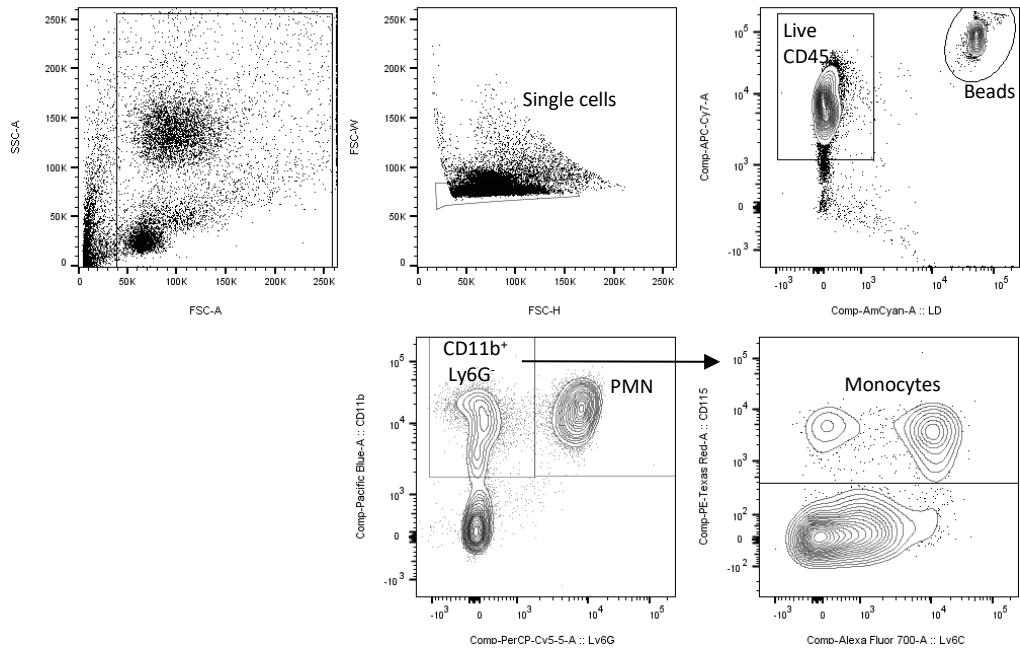


Figure 5: Verification of PMN depletion in isotype and anti-Ly6G injected mice. Gating analysis showed a reduction in high SSC cells population in depleted mice blood, associated with a complete loss of PMN defined as CD11b⁺ Ly6G⁺ cells in blood (A), bone marrow (B) and skin (C). (D) Graph representing the percentage of PMN from CD45⁺ cells in different organs. (n=4, **p<0.01, ***p<0.001)

Supplementary Figure 6*

A



B

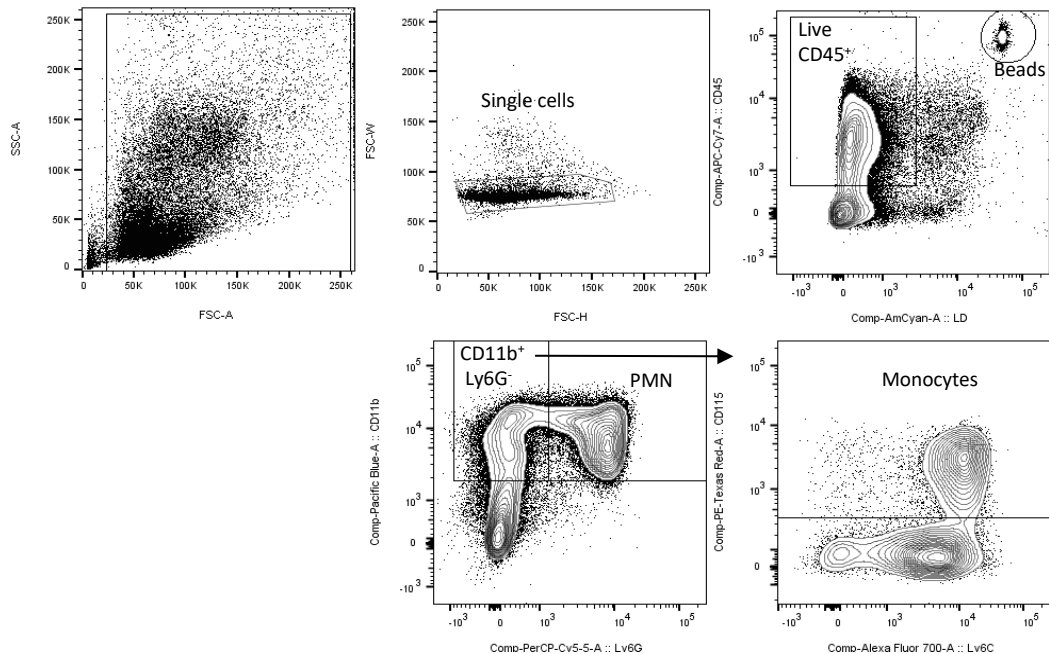


Figure 6: Flow cytometry gating strategy in blood and bone marrow cell suspensions. Bone marrow (BM) cells were obtained from femur and tibia and then filtrated through pre-separation filters 70 μ M. Before studying whole blood leukocytes, hypotonic red blood cell lysis was performed and isotonicity was restored using ice-cold PBS. Blood (**A**) and bone marrow (**B**) cells were subjected to 6 color analyses on a BD LSRFortessa using FlowJo v10. First they were gated on forward scatter and side scatter then on single Live dead CD45. From this whole population of live CD45⁺ cells, PMN and monocytes were progressively gated.

Supplementary Figure 7*

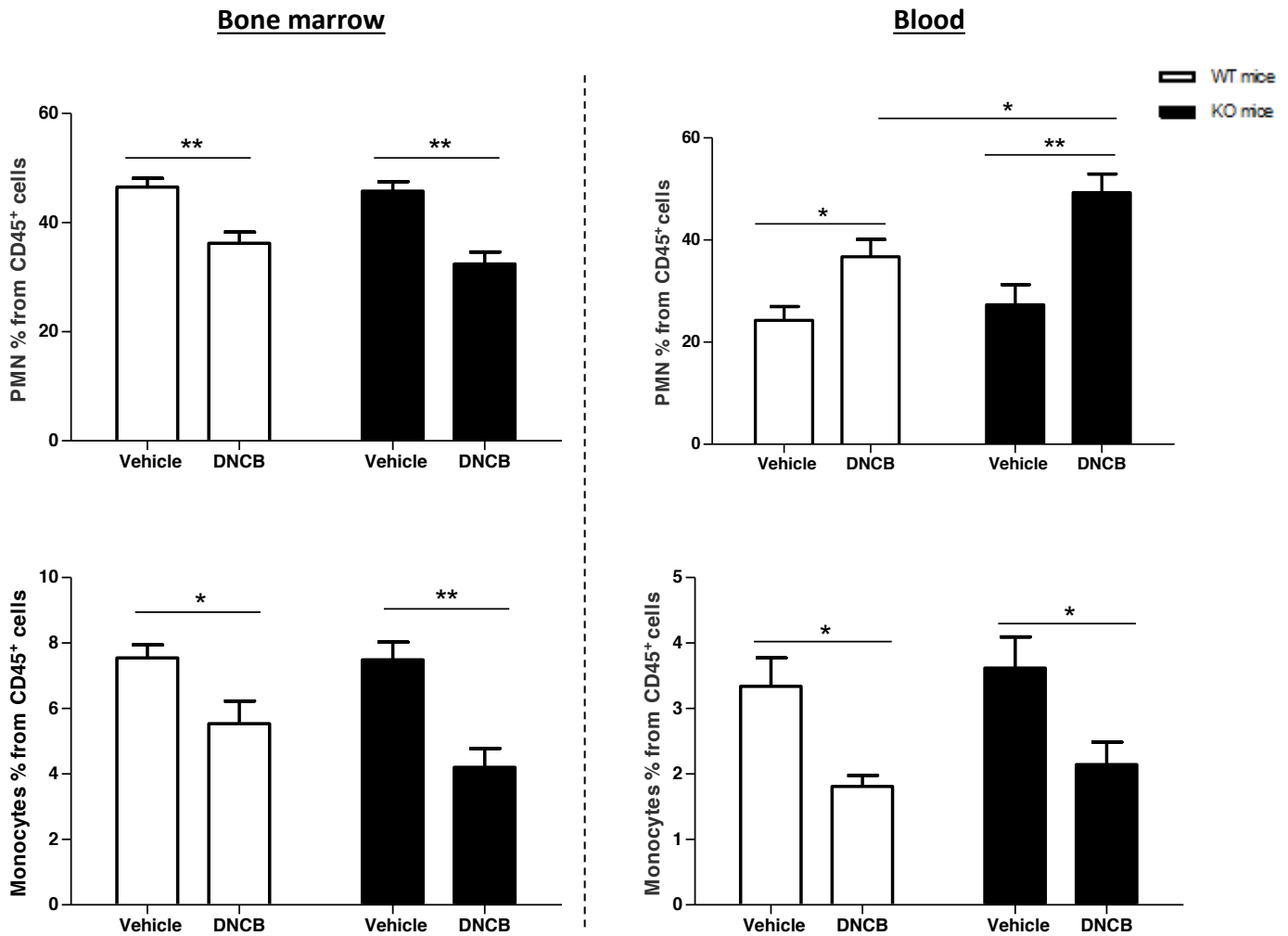


Figure 7: PMN and monocytes mobilization from bone marrow to the blood in response to DNCB. Variation of PMN and monocytes % from CD45⁺ cells in the bone marrow and the blood at 24 h after sensitization with DNCB 1%. Graphs show mean \pm SEM from 6-8 mice (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Supplementary Figure 8*

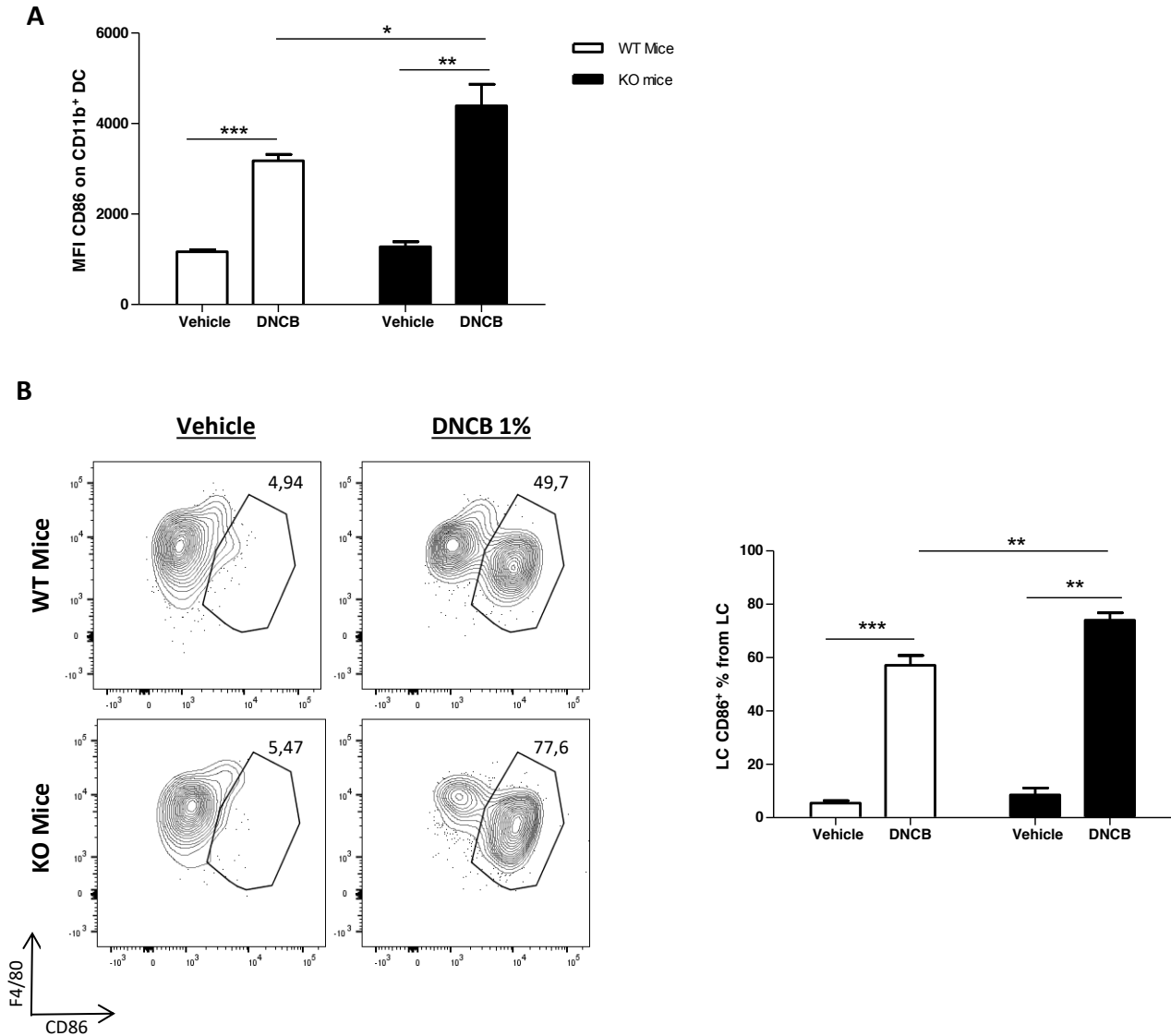


Figure 8: Expression of CD86 costimulatory molecule on skin DC CD11b⁺ CD11c⁺. WT and KO mice were sensitized on ears with vehicle or DNCB 1%. **(A)** Graph representing CD86 expression calculated as MFI on skin CD11b⁺ DCs defined as CD11c⁺ from CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ live cells. **(B)** CD86⁺ LC% from total LC that were gated as CD207⁺ CD103⁻ from CD11b⁺ DC, represented as flow cytometry biparametric plot and as graph grouping different experiments. The graphs show mean \pm SEM from 6-8 mice (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Supplementary Figure 9*

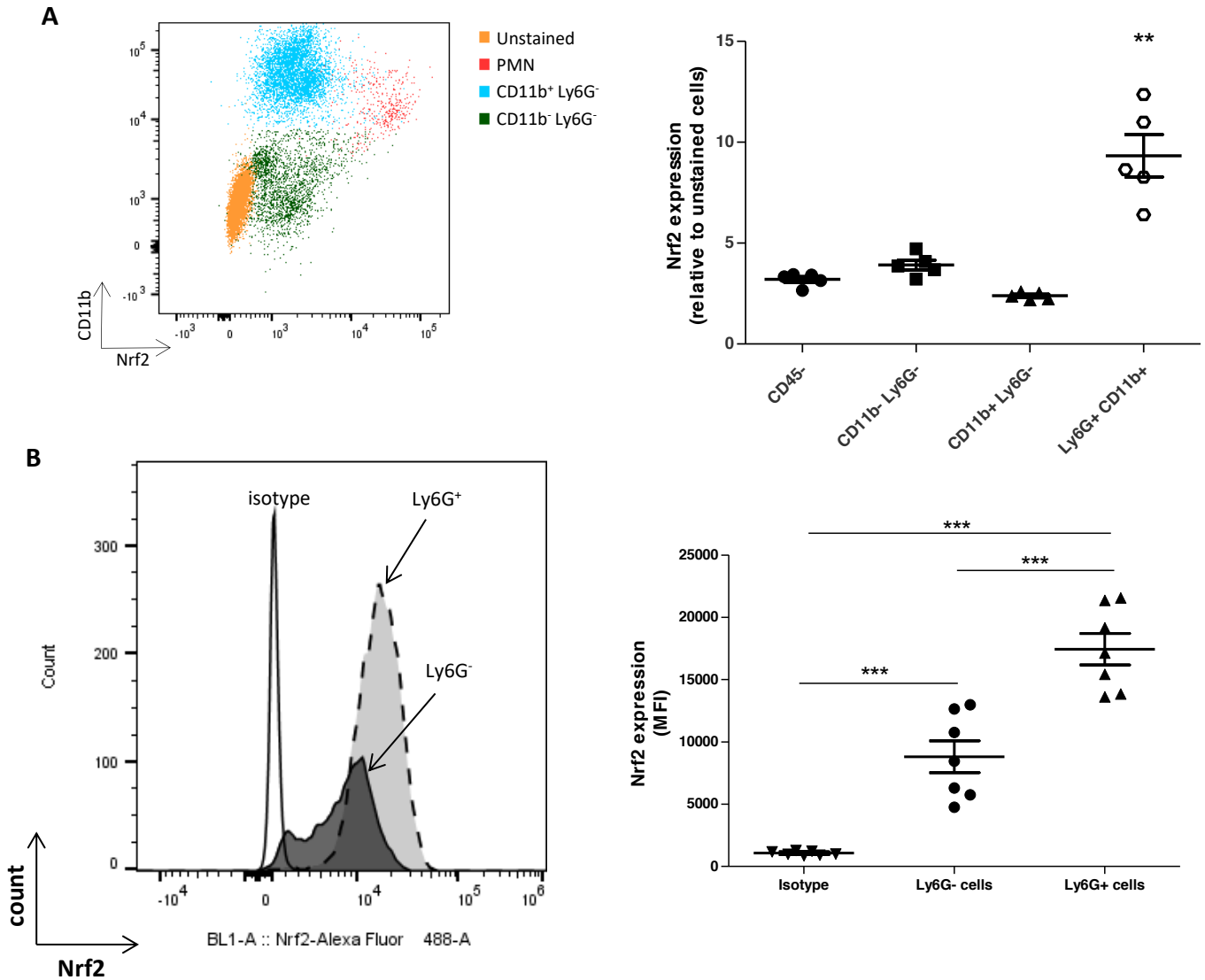


Figure 9: Nrf2 expression in skin and blood. For Nrf2 intracellular staining, cells were fixed and permeabilized using a commercial kit according to the manufacturer's instructions (ThermoFisher Scientific, California, USA). Cells were then incubated with a rabbit monoclonal anti-Nrf2 antibody (ab62352, Abcam, Cambridge, UK). The corresponding secondary antibody was then added: goat anti-rabbit AF488 IgG (ThermoFisher Scientific). IgG antibody isotype control was used for negative controls (BD Biosciences). **(A)** Analysis of Nrf2 expression in skin immune cells (CD45⁻, PMN, CD45⁺ CD11b⁻ cells, CD11b⁺ Ly6G⁻ cells and unstained cells) from WT mice, represented as a biparametric plot and as a graph grouping data from 5 different mice. The graph represents the fold increase of Nrf2 MFI on stained cells compared to its MFI on unstained cells. **(B)** Analysis of Nrf2 expression in blood immune cells (Ly6G⁺ and Ly6G⁻ cells) from WT mice represented as a flow cytometry histogram and as a graph grouping MFI data from 7 different mice. The graphs show mean \pm SEM (**p<0.01, ***p<0.001).

DISCUSSION



IV. DISCUSSION

Le neutrophile a été classiquement considéré comme une cellule de l'immunité innée particulièrement connue pour ses fonctions antimicrobiennes, notamment la phagocytose, la dégranulation et la production des FRO. La liste de ces fonctions s'est élargie pendant les dernières décennies, ce qui a suscité un regain d'intérêt pour le rôle du neutrophile dans la réponse immunitaire (158). Tout d'abord, il est maintenant évident que le neutrophile est une source de nombreuses cytokines dans différents contextes physiologiques ou pathologiques (57). En outre, la nétose, initialement décrite pour son rôle antimicrobien, s'avère impliquée dans de nombreuses pathologies inflammatoires, notamment dans les maladies auto-immunes (122). Des nouvelles approches, notamment l'imagerie intra-vitale, ont permis de mieux connaître le neutrophile et de changer notre perception de ses fonctions dans l'immunité : une plus longue demi-vie, la migration inverse, la présence de différentes sous-populations et son implication dans la réponse adaptative (158). Ainsi le neutrophile a un rôle central dans l'inflammation, cependant son activation doit être finement régulée pour éviter des dommages tissulaires par exemple.

Pour contrôler l'activation du neutrophile et éviter sa dérégulation, des voies de signalisation et des mécanismes protecteurs doivent exister dans les contextes inflammatoires pathologiques. Notre équipe s'est intéressée à l'identification de ces mécanismes et a récemment exploré le rôle anti-inflammatoire de la protéine GILZ (abréviation de *glucocorticoid-induced leucine zipper*) dans le neutrophile, notamment son implication dans l'induction de l'apoptose et son rôle régulateur dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë (364,365). En parallèle, un autre volet de nos travaux de recherche se focalise sur la voie anti-oxydante Keap1/Nrf2. Nous avons ainsi montré grâce à un modèle de souris déficientes en Nrf2, le potentiel régulateur de cette protéine dans la réponse inflammatoire des DC aux molécules chimiques allergisantes *in vitro* et dans un modèle d'HSC (347,362). Dans la présente étude, nous avons analysé le rôle de Nrf2 dans la régulation des fonctions du neutrophile *in vitro* et dans l'allergie cutanée.



L'activation de Nrf2 dans les neutrophiles et l'induction de ses gènes cibles

A l'état basal, le facteur de transcription Nrf2 est inhibé par son répresseur cytoplasmique Keap1 et constamment dégradé par la voie du protéasome. En réponse à un stress oxydant ou à des molécules électrophiles, Nrf2 se stabilise dans le cytoplasme et migre dans le noyau pour activer une série de gènes cibles codant pour des enzymes cytoprotectrices (366). L'expression de Nrf2 est ubiquitaire, mais son niveau d'expression dans le neutrophile semble être exceptionnellement important. Une étude récente a montré que les neutrophiles circulants et tissulaires présentaient une grande quantité d'ARN messagers codant pour la protéine Nrf2, à l'état basal et dans un modèle murin de cicatrisation cutanée (360). De même, les neutrophiles sont les cellules qui présentent la plus importante expression d'HO-1 dans le sang humain (367). Dans notre étude, nous montrons aussi une abondance de la protéine Nrf2 totale (par cytométrie en flux) dans les neutrophiles de différents tissus (moelle osseuse, sang et peau) comparés aux autres cellules immunitaires. Cependant, la forte accumulation de la protéine Nrf2 dans le cytoplasme en réponse à l'activateur sulforaphane, est associée à une faible migration au noyau. Le cas de Nrf2 peut ressembler à celui de la protéine PCNA (abréviation de *proliferating cell nuclear antigen*). En effet, il a été montré que la protéine nucléaire PCNA impliquée dans la survie cellulaire, a une localisation particulière propre au neutrophile puisqu'elle est abondante dans le cytoplasme (368). Cela peut suggérer que l'abondance de Nrf2 dans le neutrophile représente aussi une particularité liée à une transcription importante du gène codant Nrf2 et/ou un défaut de dégradation cytoplasmique. La capacité de Nrf2 à induire la transcription de ses gènes cibles ainsi que les conditions impliquant cette activation n'ont pas été étudiées précédemment dans le neutrophile. Notre modèle montre que le facteur de transcription Nrf2 est activable et fonctionnel dans les neutrophiles de la moelle osseuse malgré sa faible migration nucléaire par rapport à l'importante accumulation cytoplasmique. Ainsi, la transcription de ses gènes cibles comme *ho-1*, *nqo1* et *catalase* est induite en réponse au sulforaphane considéré comme contrôle positif et en réponse au stimulant fongique, le « zymosan A ». Cela suggère pour la première fois que Nrf2 peut être mobilisé dans un neutrophile activé pour jouer un rôle anti-



oxydant protecteur. En outre, l'activation de Nrf2 en réponse à des molécules non électrophiles, notamment le zymosan A qui est principalement un ligand TLR2, rejoint d'autres études montrant que les voies de signalisation des TLR peuvent activer Nrf2, notamment après une dégradation p62 dépendante de Keap1 (369).

Rôle de Nrf2 dans la régulation des fonctions du neutrophile

- **La production des FRO**

Parmi ses propriétés antimicrobiennes, le neutrophile est connu pour son exceptionnelle capacité à produire de grandes quantités de FRO suite à l'activation de la NADPH oxydase pendant l'explosion oxydative (85). Des études ont montré une régulation mutuelle entre la NADPH oxydase et Nrf2 : a) la NADPH oxydase active Nrf2 *via* la production des FRO, b) l'absence de Nrf2 induit une augmentation de l'expression de la sous-unité NOX2 dans les cellules neuro-gliales murines (370), et c) la sous-unité p47^{phox} interagit directement avec la protéine Nrf2 pour l'activer en inhibant son ubiquitination, ainsi l'absence de p47^{phox} dans les macrophages murins s'accompagne d'une diminution de l'expression des gènes cibles de Nrf2 (371). La NADPH oxydase active donc Nrf2 qui à son tour inhibe la NADPH oxydase et élimine les FRO (372). Malgré le fait que le rôle anti-oxydant de Nrf2 ait été démontré dans d'autres cellules immunitaires incluant les macrophages et les DC, les études qui ont exploré son rôle dans la régulation de la production des FRO par les neutrophiles, sont controversées. Thimmulappa *et al.* ont montré que Nrf2 régule d'une façon importante la production des FRO dans les neutrophiles péritonéaux recrutés en réponse au thioglycollate et stimulés par le LPS (357). En revanche, deux études récentes, ne confirment pas l'implication de Nrf2 dans la régulation de la production des FRO par les neutrophiles isolés de la moelle osseuse (360,373). Notre travail montre que Nrf2 diminue, de manière modérée, la production de FRO en réponse au zymosan A. Ce dernier induit une production importante de FRO, suggérant une forte activation de la NADPH oxydase et par la suite une régulation par Nrf2. Cette variabilité dans les résultats de la littérature suggère qu'un signal lié



à une activation préalable (signal chimique, migration...), semble nécessaire pour que Nrf2 puisse moduler la production des FRO dans les neutrophiles. En effet, l'activation préalable de Nrf2 par le sulforaphane permet une importante réduction de la production des FRO, due en partie à l'activation de Nrf2. Le même résultat a été obtenu dans les neutrophiles humains sanguins traités avec le sulforaphane (358). Bien que le sulforaphane soit une molécule prometteuse pour réduire la production des FRO par les neutrophiles, notre étude montre que cette régulation ne dépend pas que de l'activation de Nrf2.

- ***La nétose***

Le déclenchement de la forme lytique de la nétose requiert la production des FRO par la NADPH oxydase (122). Ainsi, la faible capacité de Nrf2 à réguler la production des FRO se traduit par une incapacité à contrôler la nétose. En effet, nous avons montré que Nrf2 ne régule pas la libération des NETs par les neutrophiles de la moelle osseuse, et ce en réponse à plusieurs stimulants classiques de la nétose tels que le PMA, l'ionomycine et le PAF. Bien entendu, cela n'exclut pas la possibilité qu'une surexpression de Nrf2 dans les neutrophiles puisse réguler la nétose. Il serait donc intéressant d'étudier la capacité de Nrf2 à réguler la nétose dans les neutrophiles du péritoine afin de retrouver une certaine corrélation avec les résultats de Thimmulappa *et al.* concernant la production des FRO. Étant donné la forte implication des NETs dans différentes pathologies inflammatoires, l'exploration des différents mécanismes régulateurs s'avère indispensable pour la découverte de cible prometteuse limitant les dégâts de la nétose.

- ***La production de cytokines***

L'activation du facteur de transcription NF- κ B est indispensable dans l'inflammation, notamment pour l'activation de la transcription des gènes pro-inflammatoires et la régulation de l'inflammasome (374). Les propriétés anti-inflammatoires de Nrf2 dépendent en partie de sa capacité à inhiber le facteur NF- κ B, limitant ainsi la production des cytokines clés de l'inflammation telles que TNF α et IL-6. Une étude récente montre que Nrf2 peut inhiber la



production des cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages indépendamment de la régulation du stress oxydant, en bloquant directement le recrutement de l'ARN polymérase II (352). De même, plusieurs études ont établi des corrélations entre le niveau d'activation de Nrf2 et la production des cytokines pro-inflammatoires dans différents modèles murins (366,375–377). Néanmoins, Joshi *et al.* ne retrouvent pas des résultats similaires avec les neutrophiles dans un modèle de cicatrisation cutanée (360). Dans notre modèle *in vitro*, Nrf2 régule la transcription des gènes codants pour le TNF, CCL3 et l'IL-1 β . En revanche, nous n'observons pas de régulation détectable du gène codant pour la production d'IL-6. Sachant que la production des cytokines engage des interactions entre de multiples voies de signalisation (52), d'autres voies immuno-modulatrices semblent compenser l'activité de Nrf2 et masquer l'effet de son absence à l'échelle transcriptionnelle et protéique.

- ***La phagocytose***

Bien que quelques études mettent en évidence le rôle de Nrf2 dans l'augmentation de la capacité phagocytaire des macrophages et des DC (351,356,378,379), aucune étude n'a évalué la capacité phagocytaire des neutrophiles en absence de Nrf2. Notre travail révèle qu'à la différence des macrophages et des DC, Nrf2 n'affecte pas la phagocytose des neutrophiles de la moelle osseuse. Par ailleurs, la phagocytose des neutrophiles a la particularité d'être associée à une forte production de FRO rendant le phagosome alcalin, suggérant encore une fois que les mécanismes de régulation dans le neutrophile sont moins dépendants de Nrf2 par rapport à ceux d'autres cellules de l'immunité innée.

- ***La migration***

La migration permet d'une façon particulière au neutrophile d'infiltrer très rapidement les tissus infectés en assurant la première ligne de défense et de protection. La plupart des études existantes sont réalisées *in vivo* et se basent sur l'utilisation des souris totalement déficientes en Nrf2. Ces études montrent que l'absence de Nrf2 induit un recrutement exacerbé des neutrophiles dans



différents contextes pathologiques principalement ceux affectant les voies respiratoires (380–382). Toutefois ces modèles ne prouvent pas que Nrf2 régule spécifiquement la migration des neutrophiles. En effet, Nrf2 n'affecte pas la capacité de migration des neutrophiles *in vitro* en réponse aux chimioattractants, mais peut diminuer la vitesse de leur migration (373). Nos résultats sont en accord avec ces travaux, mais nous montrons de plus que Nrf2 peut améliorer la capacité des neutrophiles à migrer en réponse au fMLP, à CXCL2 et CXCL12. L'expression des récepteurs CXCR4 et CXCR2 n'est pas affectée en absence de Nrf2. De manière intéressante, le neutrophile déficient en Nrf2 présente une expression anormalement importante du CD11b en réponse aux chimioattractants, qui pourrait jouer un rôle dans sa migration dans le modèle de *transwell*. Nos tests de migration *in vitro* suggèrent que la migration exacerbée des neutrophiles observée *in vivo* dans les souris déficientes en Nrf2, serait plutôt liée à l'altération du microenvironnement chimiokinique au niveau du site inflammatoire. Un lien a été montré entre Nrf2 et le récepteur CXCR4, permettant de réguler la rétention et la mobilisation des cellules souches hématopoïétique (383). Nrf2 semble donc contribuer à l'homéostasie du neutrophile en particulier sa mobilisation de la moelle osseuse qui est fortement dépendante des axes CXCR4 et CXCR2 (20).

Rôle de Nrf2 dans la régulation du recrutement des neutrophiles au cours de l'HSC

Pour aborder le sujet dans un contexte inflammatoire cutané induit par une molécule chimique allergisante, une étude *in vivo* dans l'HSC a été réalisée. Ce modèle a été choisi principalement pour trois raisons :

- a) La nature électrophile des molécules chimiques utilisées pour induire l'HSC telles que le DNCB et l'oxazolone. Ainsi ces molécules peuvent activer Nrf2 dans les cellules de la peau, comme démontré par notre équipe dans des modèles cellulaires de DC murins et humains (345,347).
- b) Le rôle protecteur de Nrf2 dans l'HSC démontré au sein de notre équipe, mettant en évidence l'implication de Nrf2 dans ce contexte inflammatoire (362).



- c) Le rôle clé des neutrophiles dans les deux phases de l'HSC comme démontré récemment par l'équipe de S.Martin (247).

L'étude *in vivo* montre que suite à un premier contact avec le DNCB, les souris déficientes en Nrf2 présentent une inflammation cutanée importante associée à un recrutement exacerbé des cellules circulantes inflammatoires incluant les neutrophiles et les monocytes. La régulation du recrutement de ces cellules par Nrf2 est fortement dépendante de sa capacité à réduire le stress oxydant cutané généré par le DNCB. Ainsi, une production excessive et incontrôlée des FRO, contribue à l'exacerbation du recrutement des neutrophiles et des monocytes d'une façon similaire. En d'autres termes la production des FRO dans la peau est l'un des facteurs initiaux et principaux qui orientent et déterminent l'intensité de la réponse inflammatoire cutanée aux DNCB. Cela rejoint les études de la littérature montrant le rôle crucial des FRO dans l'initiation de la réponse inflammatoire cutanée aux molécules chimiques allergisantes (303). A noter que les neutrophiles constituent une source principale de FRO dans l'HSC (247); suggérant leur implication dans le maintien de l'inflammation cutanée.

Notre modèle de souris déficientes en Nrf2, apporte une preuve supplémentaire sur le rôle clé du neutrophile et de Nrf2 dans l'HSC. En effet, des corrélations établies entre différents lots de souris montrent que l'intensité de recrutement des neutrophiles pendant la phase de sensibilisation corrèle positivement avec le niveau d'activation des DC et avec l'intensité de l'inflammation cutanée pendant la phase d'élicitation. Par ailleurs, l'implication des neutrophiles dans la physiopathologie de l'HSC est contrôlée par Nrf2. Ces corrélations sont consistantes à la fois avec les précédents résultats de notre équipe montrant un rôle protecteur de Nrf2 dans l'HSC (362) et avec les résultats de l'équipe de S. Martin montrant le rôle clé des neutrophiles dans la phase de sensibilisation de l'HSC (247). Notre équipe a précédemment montré que les NETs et les ectosomes des neutrophiles sont capables de diminuer la maturation des DC et d'induire une polarisation Th2 (384,385), mais la nature des interactions entre le neutrophile et la DC dans l'HSC reste mal connue. D'une façon



intéressante, nous montrons ici que le recrutement des neutrophiles contribue fortement à l'activation et la maturation des DC cutanées dans l'HSC, de manière dépendante de Nrf2. Ce dernier est donc engagé dans la régulation des événements cellulaires précoces suivant l'exposition cutanée aux molécules chimiques allergisantes, suggérant que son activation optimale pourrait limiter ou même bloquer le processus de sensibilisation.

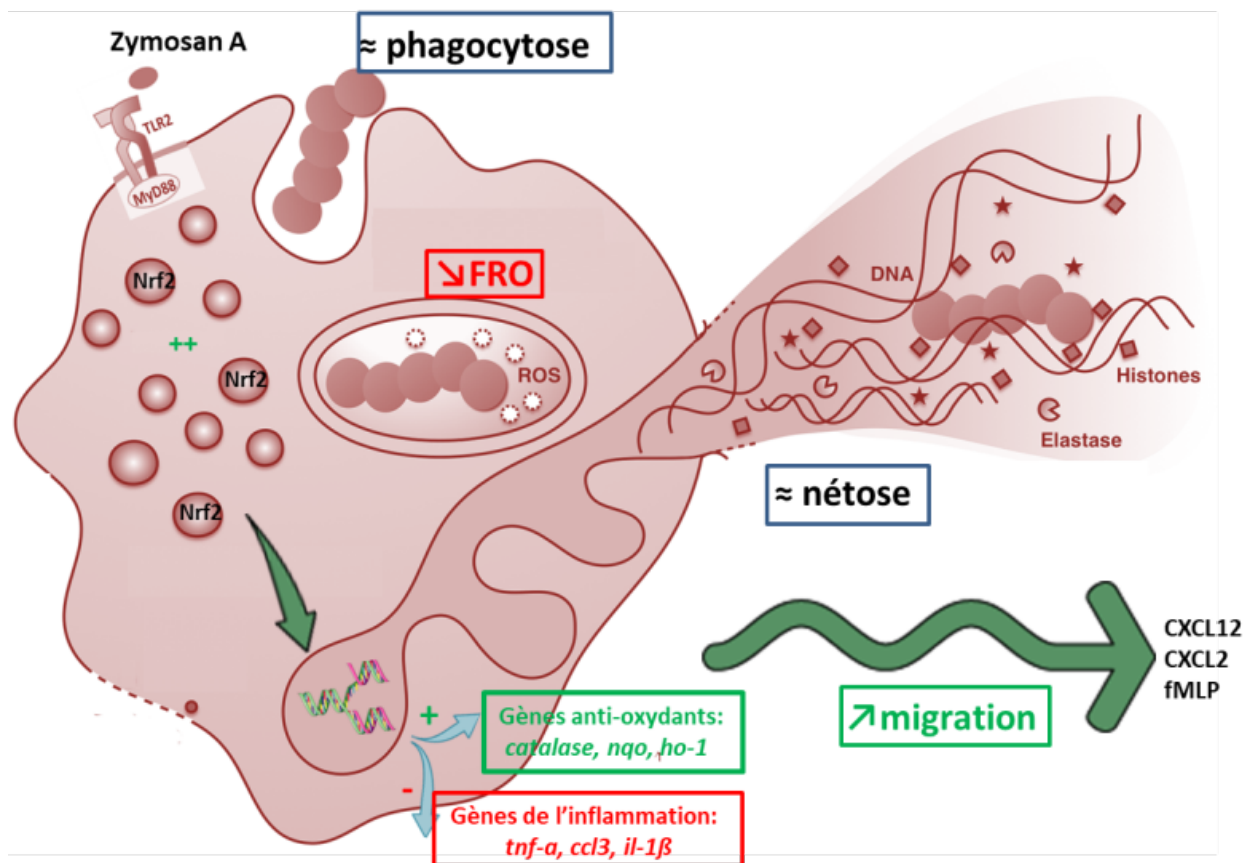


Figure 25 : Schéma récapitulatif montrant le rôle protecteur de Nrf2 dans le neutrophile activé par le zymosan A.

Nrf2 et microenvironnement cutané

L'étude du microenvironnement cutané montre que la molécule allergisante DNCB active les gènes cibles anti-oxydants de Nrf2 tels que *ho-1*, *nqo1*, *nos3* et *gclc*, comme précédemment décrits par notre équipe dans des modèles de culture cellulaire incluant les mo-DC, les THP-1 et les BMDC (345,347,386). Par ailleurs, le rôle central de Nrf2 dans la réponse cutanée aux allergènes est à la base de la validation de la méthode d'essai ARE-Nrf2 luciférase. Ce test *in vitro* dans un modèle de kératinocytes, se base sur l'induction des voies dépendantes de Nrf2 pour distinguer les molécules sensibilisantes des non-sensibilisantes (OCDE 2018, Essai n° 442D). Notre étude montre de nouvelles voies modulées dépendamment de Nrf2 dans la peau sensibilisée au DNCB: a) activation d'une série de gènes fortement impliqués dans la réparation tissulaire, notamment les gènes de la famille des kératines, b) activation de certains gènes codant les métalloprotéinases telles que la MMP3, la MMP10 et la MMP12, c) activation des gènes codant les cytokines anti-inflammatoires de la famille d'IL-10 (IL-19 et IL-24) et d) contrôle de l'activation des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et le CCL20. Ces gènes candidats peuvent être directement régulés par Nrf2 ou *via* des voies dépendantes de son activité anti-oxydante.

En régulant la transcription des gènes codant pour les chimiokines, Nrf2 participe au contrôle du microenvironnement chimiokinique qui est responsable de l'afflux des cellules inflammatoires à la peau. CCL2, CCL4 et CCL11 sont parmi les chimiokines fortement régulées par Nrf2 dans la peau sensibilisée au DNCB. En particulier, le gène codant pour CCL11 nommé aussi éotaxine, a été proposé comme un nouveau gène cible de Nrf2 (387). A noter que la régulation de la production des chimiokines n'est pas nécessairement dépendante d'une régulation transcriptionnelle directe mais pourrait être liée à la régulation du stress oxydant cutané par Nrf2. Ceci permet de limiter la génération des signaux de danger de type FRO et DAMP et par conséquent limiter l'induction des voies de signalisation responsables de la production des chimiokines, notamment les voies TLR-dépendantes. De même, la forte transcription Nrf2-dépendante de certains gènes de la famille des MMP peut contribuer au clivage puis à l'inactivation des chimiokines, notamment CCL2 et CCL11,



et à la régulation de l'afflux des cellules inflammatoires (388–390). Si la capacité de Nrf2 à réguler directement certains gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires est mise en évidence dans les macrophages, des études supplémentaires seront nécessaires pour comprendre les mécanismes de cette régulation dans la réponse inflammatoire cutanée aux sensibilisants chimiques.

Rôle de Nrf2 dans l'efferocytose

L'élimination des neutrophiles apoptotiques par les macrophages, connue aussi sous le nom d'efferocytose, figure parmi les premiers mécanismes permettant la résolution de l'inflammation (192). Bien que le recrutement des neutrophiles suite à la sensibilisation aux allergènes chimiques soit dépendant du stress oxydant et du microenvironnement chimiokinique, leur accumulation anormale peut être liée à une efferocytose altérée. En effet, nous avons montré que Nrf2 régule l'activation des macrophages dans la peau et permet l'induction, en réponse au DNCB, d'un récepteur principal de l'efferocytose, le CD36. La transcription du gène codant CD36 nécessite une activation directe par Nrf2, indépendante de l'équilibre redox. Ainsi l'absence de Nrf2 dans les macrophages diminue leur capacité phagocytaire, notamment leur capacité à phagocyter les neutrophiles. A noter que la forte expression Nrf2-dépendante de certaines MMP dans la peau peut stimuler l'apoptose des neutrophiles (391,392). La capacité de Nrf2 à activer CD36, a été aussi décrite dans d'autres pathologies infectieuses et inflammatoires comme le paludisme (355,393) et l'athérosclérose (394). CD36 émerge donc dans notre étude comme une nouvelle cible, dont l'activation pourrait participer à l'accélération du processus de résolution des inflammations cutanées induites par les allergisants chimiques.

Il a été montré que la MMP12, principalement produite par les macrophages, augmente leur capacité phagocytaire et réduit l'infiltration des neutrophiles dans un modèle de péritonite (389,390). En parallèle, les macrophages de polarisation M2 mais pas les M1 exacerbent l'inflammation cutanée en produisant la MMP12, dans un modèle d'HSC induite par le DNFB



(395,396). Nos résultats montrent une forte activation transcriptionnelle du gène codant la MMP12, dépendamment de Nrf2, pendant les premières heures suivant la sensibilisation. Cependant, nous suggérons un rôle anti-inflammatoire Nrf2-dépendant joué par les macrophages, notamment les macrophages CD36⁺ lors de la phase de sensibilisation de l'HSC. Une caractérisation phénotypique approfondie des macrophages cutanés sera donc nécessaire pour mieux définir le rôle de Nrf2 dans leur polarisation en réponse aux allergisants chimiques, étudier les caractéristiques phénotypiques de la sous-population CD36⁺ et comprendre le rôle de la MMP12 macrophagique pendant la phase de sensibilisation. En outre, il est important aussi de comprendre le devenir et la polarisation des monocytes qui infiltrent massivement la peau en absence de Nrf2 pendant la phase de sensibilisation. Bien que théoriquement, les monocytes doivent se différencier en macrophages dans les tissus, des études ont bouleversé ce dogme et montré une polarisation particulière des monocytes dans certains contextes inflammatoires. En particulier, une étude récente a caractérisé une population de monocytes CCR2⁺ recrutés aux poumons pendant la phase précoce d'un modèle de fibrose induite par les nanoparticules de silice. Ces monocytes sont identifiés M-MDSCs (abréviation de *monocytic myeloid-derived suppressor cells*) à cause de leur capacité inédite à inhiber la prolifération des LT et à contribuer au dépôt de collagène sans se différencier en macrophages (397). Cela suggère que l'exploration du phénotype et des fonctions des monocytes/macrophages pendant la phase de sensibilisation de l'HSC ainsi que le rôle de Nrf2 dans leur polarisation, promettrait aussi d'apporter une importante avancée dans la compréhension des allergies cutanées.



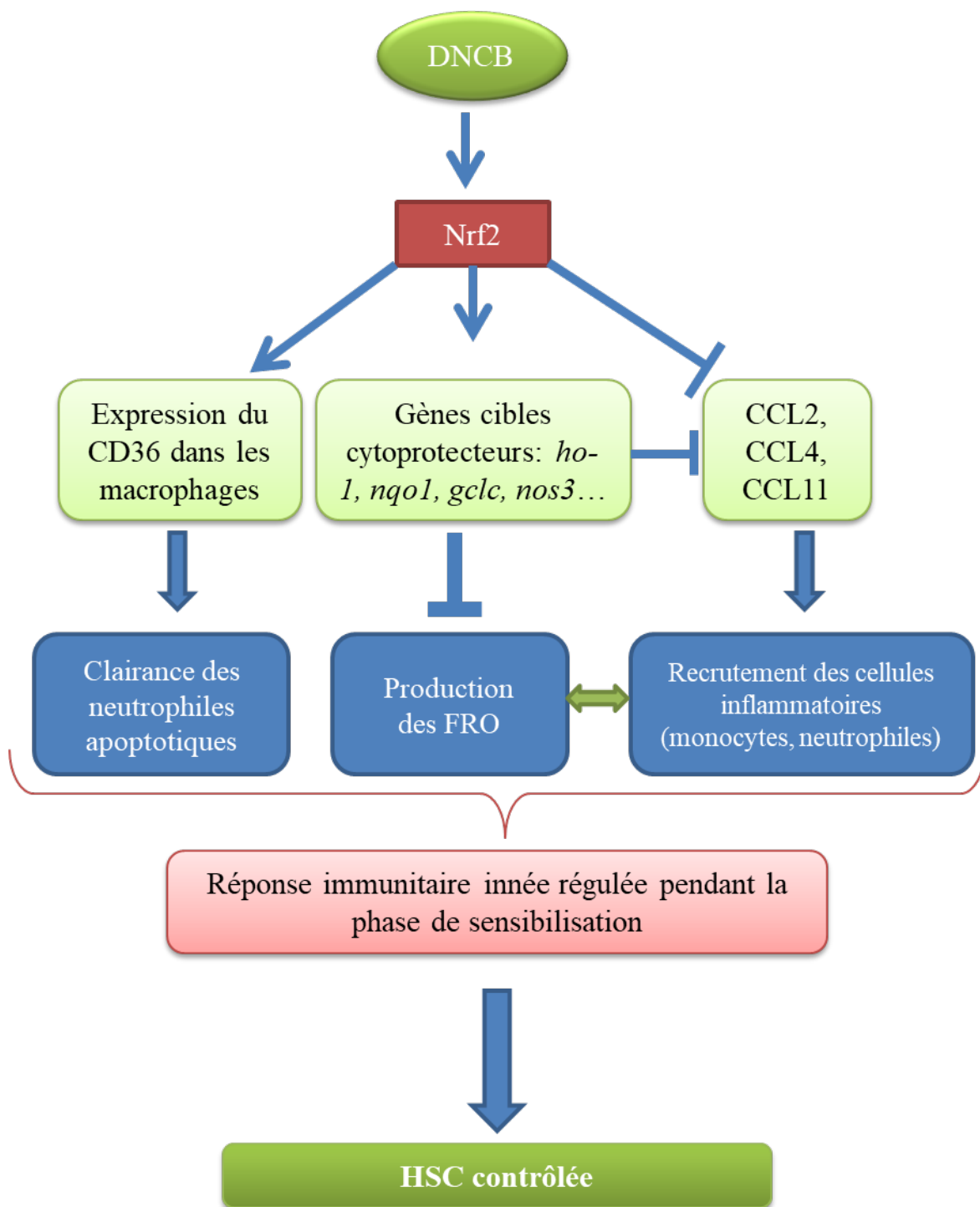


Figure 26: Schéma récapitulatif montrant le rôle protecteur de Nrf2 dans la réponse allergique cutanée au DNCB.



Globalement, notre modèle *in vitro* montre que Nrf2 est fortement exprimé dans les neutrophiles et joue un rôle protecteur suite à leur stimulation, en activant des gènes cibles cytoprotecteurs, en diminuant la transcription des gènes de l'inflammation et en réduisant la production des FRO. Cependant, l'absence de Nrf2 n'affecte que modérément certaines autres fonctions du neutrophile. Ces résultats sont en échos avec ceux des précédentes études de l'équipe montrant que l'activation de la protéine GILZ induit des effets pré-résolutifs dans le neutrophile mais son absence n'affecte ni les fonctions classiques, ni l'apoptose spontanée (Thèse M-A. Espinasse, 2013). Cela suggère que le neutrophile est doté de multiples mécanismes anti-inflammatoires qui coopèrent pour assurer la protection la meilleure possible lors des puissantes phases d'activation, notamment pendant l'explosion oxydative. Nous pouvons citer par exemple la thioredoxine-1 conférant des effets anti-oxydants et anti-inflammatoires dans le neutrophile (398), ainsi que la voie de signalisation de la phosphatidylinositol 3-kinase (399). HO-1 peut également être compté parmi ces voies compensatrices, étant donné sa possible activation indépendante de Nrf2, sa forte capacité à inhiber la voie NF- κ B et sa forte expression dans les neutrophiles (331,400,401). Ainsi, la délétion d'une voie régulatrice redondante, n'induit pas nécessairement des modifications détectables dans la biologie du neutrophile. Une telle redondance des voies ne semble pas être aussi efficace dans d'autres cellules immunitaires. En revanche, un modèle de gain de fonction serait original pour adresser les effets protecteurs de Nrf2 dans le neutrophile, sachant que les activateurs pharmacologiques disponibles comme le sulforaphane, manquent de spécificité et requièrent une longue durée de traitement pour induire une activation optimale de Nrf2 alors que la vie du neutrophile est assez courte.

En parallèle, Nrf2 régule fortement les événements précoces dans l'HSC, notamment le recrutement des neutrophiles et des monocytes à la peau ainsi que l'activation des DC, en modulant le microenvironnement cutané. Nrf2 est aussi indispensable pour induire la résolution de l'inflammation cutanée *via* les macrophages. Cette implication indiscutable de Nrf2 dans la régulation de la réponse immunitaire innée aux molécules chimiques allergisantes, permet alors de



le proposer comme une authentique et potentielle cible thérapeutique pour inhiber l'immunité innée cutanée et éviter une cascade d'évènements immunitaires conduisant aux inflammations chroniques. Plusieurs molécules sont identifiées comme activatrices de Nrf2. Les plantes sont une source généreuse de molécules activatrices de Nrf2 comme la curcumine dans le curcuma, les anthocyanines dans les fruits rouges et les isothiocyanates (sulforaphane) dans le brocoli et les choux de Bruxelles. Ces molécules montrent dans nombreuses études des effets anti-oxydants et anti-inflammatoires dépendants de l'activation de Nrf2 (366). Par exemple, la curcumine possède des effets neuro-protecteurs dans différents modèles dont l'épilepsie (402). Le sulforaphane est actuellement en phase d'essai clinique principalement pour la prévention et/ou le traitement des maladies cancéreuses comme le cancer des poumons et le cancer de la vessie (ClinicalTrials.gov). Néanmoins, les bénéfices de l'activation de Nrf2 sont parfois controversés; bien que le rôle préventif de Nrf2 contre l'apparition des tumeurs ait été observé, l'activation prolongée de Nrf2 dans les cellules tumorales pourrait induire une résistance à la chimiothérapie (328).

Une stratégie thérapeutique reposant sur l'activation de Nrf2 dans l'HSC doit donc prendre en considération le ratio bénéfice/risque. En particulier, une activation prolongée de Nrf2 au niveau de la peau peut être délétère : altération de la barrière lipidique de l'épiderme, hyper-prolifération des kératinocytes (403,404) et effets pro-tumorigènes résultant de l'immunosuppression (328). Ainsi, l'activation de Nrf2 doit être transitoire et contrôlée pour éviter les effets secondaires résultants. Certaines études proposent un système d'administration dermique basé sur les nanotechnologies, permettant de mieux contrôler la diffusion des molécules activatrices au niveau de la peau uniquement et éviter un passage systémique (405). L'efficacité clinique de cette approche reste à démontrer mais de tels systèmes innovants peuvent offrir une opportunité et un espoir pour contrôler une variété de pathologies cutanées.



CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

V. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Les études expérimentales réalisées *in vitro* montrent que le facteur de transcription **Nrf2** joue un rôle protecteur dans les **neutrophiles** de la moelle osseuse de souris en induisant la transcription de ses gènes cibles codant pour des enzymes **anti-oxydantes** et en diminuant la transcription des gènes codant pour des cytokines inflammatoires. L'activation de Nrf2 diminue la production des **FRO** par les neutrophiles stimulés. De même, Nrf2 permet une **migration optimale** des neutrophiles en réponse aux chimiokines CXCL2 et CXCL12. Ainsi, Nrf2 semble être indispensable pour maintenir l'**homéostasie** des neutrophiles dans les niches hématopoïétiques. En revanche, l'absence de Nrf2 n'affecte pas la nétose ni la phagocytose, suggérant qu'il n'est pas impliqué dans ces deux fonctions ou bien qu'une redondance avec une autre voie immuno-modulatrice permet de compenser son absence.

Dans un modèle murin d'allergie cutanée, nous montrons que Nrf2 est fortement impliqué dans la régulation de l'inflammation cutanée pendant la phase de sensibilisation de l'HSC. En effet, Nrf2 limite le recrutement des cellules inflammatoires telles que les neutrophiles et les monocytes. Ceci est lié à la régulation du **stress oxydant cutané** et de la **production des chimiokines**. En outre, Nrf2 accélère la **résolution de l'inflammation** en induisant l'expression des récepteurs de l'efferocytose, notamment le CD36, par les macrophages. Ceci augmente leur capacité phagocytaire et permet une meilleure clairance des neutrophiles pour accélérer le processus de résolution. Ainsi, la régulation de ces événements immunitaires innés par Nrf2 contrôle l'inflammation cutanée induite dans l'HSC.

Nrf2 participe donc au contrôle des fonctions du neutrophile et régule son recrutement et son élimination de la peau en réponse aux molécules chimiques allergisantes. Le rôle **anti-inflammatoire** précoce de Nrf2 dans l'**allergie cutanée** suggère que son activation pourrait devenir une stratégie **thérapeutique** prometteuse en dermatologie.



Ces études apportent une plus ample compréhension du rôle de Nrf2 dans la biologie du neutrophile et ses mécanismes de régulation dans la réponse cutanée innée aux molécules chimiques allergisantes. Néanmoins, des études supplémentaires seront nécessaires pour pouvoir exploiter ces connaissances à des fins thérapeutiques. En particulier, des modèles de gain de fonction pourraient mieux révéler le rôle anti-inflammatoire de Nrf2 dans les neutrophiles. En parallèle, le développement de nouvelles molécules activatrices de Nrf2, ayant une meilleure spécificité, serait indispensable pour la recherche fondamentale et thérapeutique.

Notre étude met en évidence une forte expression de Nrf2 dans les neutrophiles par rapport aux autres cellules immunitaires. Néanmoins, les effets de l'absence de Nrf2 dans les neutrophiles sont relativement modérés par rapport aux DC et aux macrophages. Ainsi, il sera intéressant de mener une étude moléculaire approfondie permettant d'expliquer l'intérêt de cette forte expression dans la biologie du neutrophile.

Le travail réalisé *in vivo* dans le modèle d'HSC, met en évidence le rôle de Nrf2 dans la régulation des événements immunitaires innés en réponse au DNCB. Ce dernier étant un stimulant fort, il est nécessaire de valider ces résultats avec d'autres molécules ayant un potentiel allergisant moins important, comme le cinnamaldéhyde, pour se rapprocher des conditions d'exposition clinique. En outre, il serait intéressant de vérifier si les mécanismes Nrf2-dépendants décrits dans notre travail existent aussi dans d'autres pathologies cutanées inflammatoires impliquant les neutrophiles, comme le psoriasis ou la dermatite irritante de contact.

La méthode semi-quantitative de cytométrie en flux, développée et mise au point au cours de ces travaux de thèse, montre que la quantification de Nrf2 dans un pool hétérogène de cellules sans nécessité d'isolement, est possible. Ceci permet d'envisager l'exploration assez simple de Nrf2 dans des études cliniques afin de mieux comprendre son implication dans des pathologies inflammatoires. En particulier, une variabilité du niveau d'activation de Nrf2 en réponse aux molécules allergisantes pourrait apporter des éléments expliquant la susceptibilité particulière de



certaines individus à développer des allergies cutanées.

Enfin, nos travaux apportent de nouvelles données pouvant être mises à profit pour envisager de mieux valoriser le potentiel anti-inflammatoire de Nrf2 dans des applications thérapeutiques au cours de l'allergie cutanée ou d'autres maladies cutanées inflammatoires. Plusieurs essais cliniques sont en cours avec des molécules activatrices de Nrf2, comme le RT408 (triterpénoïde) dans la dermatite radio-induite (406,407) et le resvératrol (stilbénoloïde) dans la rectocolite hémorragique (408). D'autres molécules sont déjà utilisées en clinique comme le diméthylfumarate (triterpénoïde) pour inhiber la progression de la sclérose en plaque et dont le mécanisme d'action dépend en grande partie de l'activation de Nrf2 (409). Néanmoins, comme Nrf2 orchestre de multiples voies de signalisation, il est important d'identifier les cibles spécifiques dans chaque contexte inflammatoire pour utiliser des molécules appropriées et éviter ainsi les effets larges et incontrôlables dus à l'activation excessive et inappropriée de Nrf2.

Pour conclure, si la compréhension du rôle de Nrf2 dans la régulation des fonctions du neutrophile nécessite encore d'autres études, son pouvoir anti-oxydant et anti-inflammatoire dans l'allergie cutanée permet d'envisager de prochaines études orientées vers sa modulation pharmacologique et ses applications thérapeutiques.



RÉFÉRENCES



VI. REFERENCES

1. Kennedy AD, DeLeo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res.* 2009 Mar 1;43(1–3):25–61.
2. Nandakumar SK, Ulirsch JC, Sankaran VG. Advances in understanding erythropoiesis: evolving perspectives. *Br J Haematol.* 173(2):206–18.
3. Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, et al. DISTINCT ROUTES OF LINEAGE DEVELOPMENT RESHAPE THE HUMAN BLOOD HIERARCHY ACROSS ONTOGENY. *Science.* 2016 Jan 8;351(6269):aab2116.
4. Lawrence SM, Corriden R, Nizet V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2018 Jan 3;82(1):e00057-17.
5. Bartels M, Govers AM, Fleskens V, Lourenço AR, Pals CE, Vervoort SJ, et al. Acetylation of C/EBP ϵ is a prerequisite for terminal neutrophil differentiation. *Blood.* 2015 Mar 12;125(11):1782–92.
6. Fiedler K, Brunner C. The role of transcription factors in the guidance of granulopoiesis. *Am J Blood Res.* 2012 Jan 1;2(1):57–65.
7. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W-G, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003 Oct;425(6960):836–41.
8. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol.* 2014 Jul;15(7):602–11.
9. Bainton DF, Ullyot JL, Farquhar MG. The Development of Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocytes in Human Bone Marrow: Origin and Content of Azurophil and Specific Granules. *J Exp Med.* 1971 Oct 1;134(4):907–34.
10. Cowland JB, Borregaard N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev.* 2016;273(1):11–28.
11. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, Rieber N, Radsak M, Bernuth H von, et al. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLOS Pathog.* 2015 Mar 12;11(3):e1004651.
12. Rørvig S, Østergaard O, Heegaard NHH, Borregaard N. Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. *J Leukoc Biol.* 2013 Oct;94(4):711–21.
13. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 2003 Nov;5(14):1317–27.
14. Manz MG, Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol.* 2014 May;14(5):302–14.
15. Hirai H, Zhang P, Dayaram T, Hetherington CJ, Mizuno S, Imanishi J, et al. C/EBP β is required for “emergency” granulopoiesis. *Nat Immunol.* 2006 Jul;7(7):732–9.
16. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity.* 2005 Mar;22(3):285–94.



17. Bugl S, Wirths S, Radsak MP, Schild H, Stein P, André MC, et al. Steady-state neutrophil homeostasis is dependent on TLR4/TRIF signaling. *Blood*. 2013 Jan 31;121(5):723–33.
18. Kwak H-J, Liu P, Bajrami B, Xu Y, Park S-Y, Nombela-Arrieta C, et al. Myeloid cell-derived reactive oxygen species externally regulate the proliferation of myeloid progenitors in emergency granulopoiesis. *Immunity*. 2015 Jan 20;42(1):159–71.
19. Burdon PCE, Martin C, Rankin SM. Migration across the sinusoidal endothelium regulates neutrophil mobilization in response to ELR + CXC chemokines. *Br J Haematol*. 2008 Jul;142(1):100–8.
20. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol*. 2011 Oct;32(10):452–60.
21. Lerman YV, Kim M. Neutrophil Migration under normal and sepsis conditions. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2015;15(1):19–28.
22. Suratt BT, Petty JM, Young SK, Malcolm KC, Lieber JG, Nick JA, et al. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood*. 2004 Jul 15;104(2):565–71.
23. Eash KJ, Means JM, White DW, Link DC. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood*. 2009 May 7;113(19):4711–9.
24. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest*. 2010 Jul 1;120(7):2423–31.
25. Martin C, Burdon PCE, Bridger G, Gutierrez-Ramos J-C, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines Acting via CXCR2 and CXCR4 Control the Release of Neutrophils from the Bone Marrow and Their Return following Senescence. *Immunity*. 2003 Oct 1;19(4):583–93.
26. Petty JM, Lenox CC, Weiss DJ, Poynter ME, Suratt BT. Crosstalk between CXCR4/stromal derived factor-1 and VLA-4/VCAM-1 pathways regulates neutrophil retention in the bone marrow. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Jan 1;182(1):604–12.
27. Badolato R, Donadieu J. How I treat warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis (WHIM) syndrome. *Blood*. 2017 Jan 1;blood-2017-02-708552.
28. de Wit RH, Heukers R, Brink HJ, Arsova A, Maussang D, Cutolo P, et al. CXCR4-Specific Nanobodies as Potential Therapeutics for WHIM syndrome. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017 Oct;363(1):35–44.
29. Wengner AM, Pitchford SC, Furze RC, Rankin SM. The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):42–9.
30. Semerad CL, Liu F, Gregory AD, Stumpf K, Link DC. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity*. 2002 Oct;17(4):413–23.
31. Bajrami B, Zhu H, Kwak H-J, Mondal S, Hou Q, Geng G, et al. G-CSF maintains controlled neutrophil mobilization during acute inflammation by negatively regulating CXCR2 signaling. *J Exp Med*. 2016 Aug 16;jem.20160393.



32. Williams MR, Azcutia V, Newton G, Alcaide P, Luscinskas FW. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol.* 2011 Oct;32(10):461–9.
33. Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature.* 2009 Jun;459(7249):996–9.
34. Pase L, Layton JE, Wittmann C, Ellett F, Nowell CJ, Reyes-Aldasoro CC, et al. Neutrophil-delivered myeloperoxidase dampens the hydrogen peroxide burst after tissue wounding in zebrafish. *Curr Biol CB.* 2012 Oct 9;22(19):1818–24.
35. Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci J Virtual Libr.* 2008 Jan 1;13:2400–7.
36. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:181–218.
37. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatol Oxf Engl.* 2010 Sep;49(9):1618–31.
38. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007 Sep;7(9):678–89.
39. Li X, Utomo A, Cullere X, Choi MM, Milner DA, Venkatesh D, et al. The β -Glucan Receptor Dectin-1 Activates the Integrin Mac-1 in Neutrophils via Vav Protein Signaling to Promote *Candida albicans* Clearance. *Cell Host Microbe.* 2011 Dec 15;10(6):603–15.
40. Hyun Y-M, Hong C-W. Deep insight into neutrophil trafficking in various organs. *J Leukoc Biol.* 2017 Sep;102(3):617–29.
41. Smigiel KS, Parks WC. Chapter Five - Matrix Metalloproteinases and Leukocyte Activation. In: Khalil RA, editor. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [Internet]. Academic Press; 2017. p. 167–95. (Matrix Metalloproteinases and Tissue Remodeling in Health and Disease: Cardiovascular Remodeling; vol. 147).
42. Young RE, Voisin M-B, Wang S, Dangerfield J, Nourshargh S. Role of neutrophil elastase in LTB₄-induced neutrophil transmigration in vivo assessed with a specific inhibitor and neutrophil elastase deficient mice. *Br J Pharmacol.* 2007 Jul;151(5):628–37.
43. Chou RC, Kim ND, Sadik CD, Seung E, Lan Y, Byrne MH, et al. Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. *Immunity.* 2010 Aug 27;33(2):266–78.
44. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med.* 2013 Jul 1;210(7):1283–99.
45. Bonfim CV, Mamoni RL, Blotta L, Souza MH. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2009 Nov 1;47(7):722–33.
46. Ajendra J, Specht S, Ziewer S, Schiefer A, Pfarr K, Parčina M, et al. NOD2 dependent neutrophil recruitment is required for early protective immune responses against infectious *Litomosoides sigmodontis* L3 larvae. *Sci Rep.* 2016 Dec 22;6:39648.
47. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function.



Blood. 2003 Oct 1;102(7):2660–9.

48. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*. 2012 Jun 14;119(24):5640–9.
49. Lukácsi S, Nagy-Baló Z, Erdei A, Sándor N, Bajtay Z. The role of CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in complement-mediated phagocytosis and podosome formation by human phagocytes. *Immunol Lett*. 2017;189:64–72.
50. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*. 2013 Nov;17(3):638–50.
51. Cassatella MA. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol*. 1999;73:369–509.
52. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella M. Neutrophil-Derived Cytokines: Facts Beyond Expression. *Frontiers in Immunology*. 2014;5.
53. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev*. 2000 Oct;177:195–203.
54. Selders GS, Fetz AE, Radic MZ, Bowlin GL. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regen Biomater*. 2017 Feb;4(1):55–68.
55. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*. 2010 Jan 14;115(2):335–43.
56. Mishalian I, Bayuh R, Eruslanov E, Michaeli J, Levy L, Zolotarov L, et al. Neutrophils recruit regulatory T-cells into tumors via secretion of CCL17--a new mechanism of impaired antitumor immunity. *Int J Cancer*. 2014 Sep 1;135(5):1178–86.
57. Tamassia N, Bianchetto-Aguilera F, Arruda-Silva F, Gardiman E, Gasperini S, Calzetti F, et al. Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the “dark side of the moon.” *Eur J Clin Invest*. 2018 May 17;e12952.
58. Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Jul 1;187(1):490–500.
59. Li L, Huang L, Vergis AL, Ye H, Bajwa A, Narayan V, et al. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN- γ -mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2010 Jan 4;120(1):331–42.
60. Epaulard O, Adam L, Poux C, Zurawski G, Salabert N, Rosenbaum P, et al. Macrophage- and Neutrophil-Derived TNF- α Instructs Skin Langerhans Cells to Prime Antiviral Immune Responses. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014 Sep 1;193(5):2416–26.
61. Bald T, Quast T, Landsberg J, Rogava M, Glodde N, Lopez-Ramos D, et al. Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiogenesis and metastasis in melanoma. *Nature*. 2014 Mar;507(7490):109–13.
62. Huh SJ, Liang S, Sharma A, Dong C, Robertson GP. Transiently Entrapped Circulating Tumor Cells Interact with Neutrophils to Facilitate Lung Metastasis Development. *Cancer*



Res. 2010 Jul 15;70(14):6071–82.

63. Coquery CM, Wade NS, Loo WM, Kinchen JM, Cox KM, Jiang C, et al. Neutrophils contribute to excess serum BAFF levels and promote CD4⁺ T cell and B cell responses in lupus-prone mice. *PloS One*. 2014;9(7):e102284.
64. Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L, Gentile M, et al. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol*. 2011 Dec 25;13(2):170–80.
65. Parsa R, Lund H, Georgoudaki A-M, Zhang X-M, Guerreiro-Cacais AO, Grommisch D, et al. BAFF-secreting neutrophils drive plasma cell responses during emergency granulopoiesis. *J Exp Med*. 2016 Jul 25;213(8):1537–53.
66. Zimmermann M, Aguilera FB, Castellucci M, Rossato M, Costa S, Lunardi C, et al. Chromatin remodelling and autocrine TNF α are required for optimal interleukin-6 expression in activated human neutrophils. *Nat Commun*. 2015 Jan 23;6:6061.
67. Clancy DM, Henry CM, Sullivan GP, Martin SJ. Neutrophil extracellular traps can serve as platforms for processing and activation of IL-1 family cytokines. *FEBS J*. 2017;284(11):1712–25.
68. Tauber AI. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Nov;4(11):897–901.
69. Gordon S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*. 2016 Mar 15;44(3):463–75.
70. Henson PM, Bratton DL. Recognition and Removal of Apoptotic Cells. *Phagocyte-Pathog Interact*. 2009 Jan 1;3:41–65.
71. Segal AW, Dorling J, Coade S. Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical and morphological studies*. *J Cell Biol*. 1980 Apr;85(1):42–59.
72. McGuinness W, Kobayashi S, DeLeo F. Evasion of Neutrophil Killing by *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*. 2016;5(1):32.
73. Standish AJ, Weiser JN. Human neutrophils kill *Streptococcus pneumoniae* via serine proteases. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Aug 15;183(4):2602–9.
74. Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJD, Banerjee A, Silliman CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol*. 78(5):1025–42.
75. Hirahashi J, Mekala D, Ziffle JV, Xiao L, Saffaripour S, Wagner DD, et al. Mac-1 Signaling via Src-Family and Syk Kinases Results in Elastase-Dependent Thrombohemorrhagic Vasculopathy. *Immunity*. 2006 Aug 1;25(2):271–83.
76. Wang Y, Gao H, Shi C, Erhardt PW, Pavlovsky A, A Soloviev D, et al. Leukocyte integrin Mac-1 regulates thrombosis via interaction with platelet GPIIb α . *Nat Commun*. 2017 May 30;8:15559.
77. Paoliello-Paschoalato AB, Marchi LF, de Andrade MF, Kabeya LM, Donadi EA, Lucisano-Valim YM. Fc γ and Complement Receptors and Complement Proteins in Neutrophil



Activation in Rheumatoid Arthritis: Contribution to Pathogenesis and Progression and Modulation by Natural Products. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM*. 2015;2015:429878.

78. Lee C-Y, Herant M, Mankovich A, Lam J, Heinrich V. Comparison of the Phagocytosis Mechanics of Neutrophils, Monocytes, and Macrophages. *Biophys J*. 2012 Jan 31;102(3):562a.
79. Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J*. 2002 Sep 15;366(Pt 3):689–704.
80. Levine AP, Duchon MR, Villiers S de, Rich PR, Segal AW. Alkalinity of Neutrophil Phagocytic Vacuoles Is Modulated by HVCN1 and Has Consequences for Myeloperoxidase Activity. *PLOS ONE*. 2015 Apr 17;10(4):e0125906.
81. Ip WKE, Sokolovska A, Charriere GM, Boyer L, Dejardin S, Cappillino MP, et al. Phagocytosis and phagosome acidification are required for pathogen processing and MyD88-dependent responses to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Jun 15;184(12):7071–81.
82. Jankowski A, Scott CC, Grinstein S. Determinants of the Phagosomal pH in Neutrophils. *J Biol Chem*. 2002 Feb 22;277(8):6059–66.
83. Foote J, Levine A, Behe P, Duchon M, Segal A. Imaging the Neutrophil Phagosome and Cytoplasm Using a Ratiometric pH Indicator. *Journal of Visualized Experiments*. 2017;(122).
84. El-Benna J, Dang PM-C, Gougerot-Pocidallo M-A, Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2005 Jun;53(3):199–206.
85. Belambri SA, Rolas L, Raad H, Hurtado-Nedelec M, Dang PM-C, El-Benna J. NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *Eur J Clin Invest*. 2018 May 14;e12951.
86. El-Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Marie J-C, Gougerot-Pocidallo M-A, Dang PM-C. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol Rev*. 2016;273(1):180–93.
87. Nunes P, Demaurex N, Dinauer MC. Regulation of the NADPH oxidase and associated ion fluxes during phagocytosis. *Traffic Cph Den*. 2013 Nov;14(11):1118–31.
88. Kuijpers T, Lutter R. Inflammation and repeated infections in CGD: two sides of a coin. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2012 Jan;69(1):7–15.
89. Rider NL, Jameson MB, Creech CB. Chronic Granulomatous Disease: Epidemiology, Pathophysiology, and Genetic Basis of Disease. *J Pediatr Infect Dis Soc*. 2018 May 9;7(suppl_1):S2–5.
90. van den Berg JM, van Koppen E, Ahlin A, Belohradsky BH, Bernatowska E, Corbeel L, et al. Chronic granulomatous disease: the European experience. *PloS One*. 2009;4(4):e5234.
91. Foster CB, Lehrnbecher T, Mol F, Steinberg SM, Venzon DJ, Walsh TJ, et al. Host defense molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease. *J Clin Invest*. 1998 Dec 15;102(12):2146–55.



92. Schairer DO, Chouake JS, Nosanchuk JD, Friedman AJ. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence*. 2012 May 1;3(3):271–9.
93. Shiloh MU, MacMicking JD, Nicholson S, Brause JE, Potter S, Marino M, et al. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity*. 1999 Jan;10(1):29–38.
94. Freinbichler W, Colivicchi MA, Stefanini C, Bianchi L, Ballini C, Misini B, et al. Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Jun 1;68(12):2067–79.
95. Mu W, Liu L. Reactive Oxygen Species Signaling in Cancer Development. *Reactive Oxygen Species*. 2017.
96. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Mar 1;20(7):1126–67.
97. Mateen S, Moin S, Khan AQ, Zafar A, Fatima N. Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *PloS One*. 2016;11(4):e0152925.
98. Lee S, Kim SM, Lee RT. Thioredoxin and Thioredoxin Target Proteins: From Molecular Mechanisms to Functional Significance. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Apr 1;18(10):1165–207.
99. Di Meo S, Reed T, Venditti P, Victor V. Harmful and Beneficial Role of ROS. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:1-3.
100. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol*. 2002 Dec;3(12):1129–34.
101. Rutault K, Alderman C, Chain BM, Katz DR. Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radic Biol Med*. 1999 Jan;26(1–2):232–8.
102. Sheng K-C, Pietersz GA, Tang CK, Ramsland PA, Apostolopoulos V. Reactive Oxygen Species Level Defines Two Functionally Distinctive Stages of Inflammatory Dendritic Cell Development from Mouse Bone Marrow. *J Immunol*. 2010 Mar 15;184(6):2863–72.
103. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med*. 2007 Jan 15;42(2):153–64.
104. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):210–5.
105. Sheshachalam A, Srivastava N, Mitchell T, Lacy P, Eitzen G. Granule Protein Processing and Regulated Secretion in Neutrophils. *Frontiers in Immunology*. 2014;5.
106. Sengeløv H, Kjeldsen L, Borregaard N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1993 Feb 15;150(4):1535–43.
107. Rørvig S, Honore C, Larsson L-I, Ohlsson S, Pedersen CC, Jacobsen LC, et al. Ficolin-1 is present in a highly mobilizable subset of human neutrophil granules and associates with the cell surface after stimulation with fMLP. *J Leukoc Biol*. 2009 Dec;86(6):1439–49.
108. Tapper H, Furuya W, Grinstein S. Localized exocytosis of primary (lysosomal) granules



- during phagocytosis: role of Ca²⁺-dependent tyrosine phosphorylation and microtubules. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2002 May 15;168(10):5287–96.
109. Lacy P, Eitzen G. Control of granule exocytosis in neutrophils. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2008 May 1;13:5559–70.
 110. Jena BP. Role of SNAREs in membrane fusion. *Adv Exp Med Biol*. 2011;713:13–32.
 111. Sehgal PB, Lee JE. Protein trafficking dysfunctions: Role in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ*. 2011;1(1):17–32.
 112. Stamp LK, Khalilova I, Tarr JM, Senthilmohan R, Turner R, Haigh RC, et al. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl*. 2012 Oct;51(10):1796–803.
 113. Kothari N, Keshari RS, Bogra J, Kohli M, Abbas H, Malik A, et al. Increased myeloperoxidase enzyme activity in plasma is an indicator of inflammation and onset of sepsis. *J Crit Care*. 2011 Aug 1;26(4):435.e1-435.e7.
 114. Johnson JL, Ramadass M, He J, Brown SJ, Zhang J, Abgaryan L, et al. Identification of Neutrophil Exocytosis Inhibitors (Nexinhibs), Small Molecule Inhibitors of Neutrophil Exocytosis and Inflammation DRUGGABILITY OF THE SMALL GTPase Rab27a. *J Biol Chem*. 2016 Sep 12;291(50):25965–82.
 115. Reber LL, Gillis CM, Starkl P, Jönsson F, Sibilano R, Marichal T, et al. Neutrophil myeloperoxidase diminishes the toxic effects and mortality induced by lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 2017 May 1;214(5):1249–58.
 116. Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007 Dec;82(6):1375–81.
 117. Weathington NM, Houwelingen AH van, Noerager BD, Jackson PL, Kraneveld AD, Galin FS, et al. A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nat Med*. 2006 Mar;12(3):317–23.
 118. Joosten LAB, Netea MG, Fantuzzi G, Koenders MI, Helsen MMA, Sparrer H, et al. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1beta. *Arthritis Rheum*. 2009 Dec;60(12):3651–62.
 119. Domon H, Nagai K, Maekawa T, Oda M, Yonezawa D, Takeda W et al. Neutrophil Elastase Subverts the Immune Response by Cleaving Toll-Like Receptors and Cytokines in Pneumococcal Pneumonia. *Frontiers in Immunology*. 2018;9.
 120. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
 121. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. *J Innate Immun*. 2018 Jun 15;1–8.
 122. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2017;18(2):134-147.
 123. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and



- myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010 Nov 1;191(3):677–91.
124. Rohrbach A, Slade D, Thompson P, Mowen K. Activation of PAD4 in NET formation. *Frontiers in Immunology.* 2012;3.
 125. Dwyer M, Shan Q, D’Ortona S, Maurer R, Mitchell R, Olesen H, et al. Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. *J Innate Immun.* 2014;6(6):765–79.
 126. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009 Nov;16(11):1438–44.
 127. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013 Oct 17;122(16):2784–94.
 128. Manfredi AA, Ramirez GA, Rovere-Querini P, Maugeri N. The Neutrophil’s Choice: Phagocytose vs Make Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol.* 2018;9:288.
 129. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.* 2014 Nov;15(11):1017–25.
 130. Wheeler ML, Underhill DM. Time to cast a larger net. *Nat Immunol.* 2014 Nov;15(11):1000–1.
 131. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. *Cell Rep.* 2014 Jul 24;8(3):883–96.
 132. Vong L, Lorentz RJ, Assa A, Glogauer M, Sherman PM. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2014 Feb 15;192(4):1870–7.
 133. Johnson MB, Criss AK. *Neisseria gonorrhoeae* phagosomes delay fusion with primary granules to enhance bacterial survival inside human neutrophils. *Cell Microbiol.* 2013 Aug;15(8):1323–40.
 134. Milligan KL, Mann D, Rump A, Anderson VL, Hsu AP, Kuhns DB, et al. Complete Myeloperoxidase Deficiency: Beware the “False-Positive” Dihydrorhodamine Oxidation. *J Pediatr.* 2016 Sep 1;176:204–6.
 135. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood.* 2009 Sep 24;114(13):2619–22.
 136. de Jong HK, Koh GC, Achouiti A, van der Meer AJ, Bulder I, Stephan F, et al. Neutrophil extracellular traps in the host defense against sepsis induced by *Burkholderia pseudomallei* (melioidosis). *Intensive Care Med Exp.* 2014 Dec;2(1):21.
 137. Martinod K, Fuchs TA, Zitomersky NL, Wong SL, Demers M, Gallant M, et al. PAD4-deficiency does not affect bacteremia in polymicrobial sepsis and ameliorates endotoxemic shock. *Blood.* 2015 Mar 19;125(12):1948–56.



138. Menegazzi R, Decleva E, Dri P. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? *Blood*. 2012 Feb 2;119(5):1214–6.
139. Walker MJ, Hollands A, Sanderson-Smith ML, Cole JN, Kirk JK, Henningham A, et al. DNase Sda1 provides selection pressure for a switch to invasive group A streptococcal infection. *Nat Med*. 2007 Aug;13(8):981–5.
140. Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol CB*. 2006 Feb 21;16(4):401–7.
141. Wartha F, Beiter K, Albiger B, Fernebro J, Zychlinsky A, Normark S, et al. Capsule and d-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol*. 9(5):1162–71.
142. Kolaczowska E, Jenne CN, Surewaard BGJ, Thanabalasuriar A, Lee W-Y, Sanz M-J, et al. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat Commun*. 2015 Mar 26;6:6673.
143. Kimball A, Obi A, Diaz J, Henke P. The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis. *Frontiers in Immunology*. 2016;7.
144. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 2009 Jun;15(6):623–5.
145. Knight JS, Kaplan MJ. Lupus neutrophils: “NET” gain in understanding lupus pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol*. 2012 Sep;24(5):441–50.
146. Yu Y, Su K. Neutrophil Extracellular Traps and Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Cell Immunol*. 2013 Apr;4.
147. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013 Mar 27;5(178):178ra40.
148. Papadaki G, Kambas K, Choulaki C, Vlachou K, Drakos E, Bertias G, et al. Neutrophil extracellular traps exacerbate Th1-mediated autoimmune responses in rheumatoid arthritis by promoting DC maturation. *Eur J Immunol*. 2016;46(11):2542–54.
149. Deniset JF, Kubes P. Neutrophil heterogeneity: Bona fide subsets or polarization states? *J Leukoc Biol*. 2018 May;103(5):829–38.
150. Deniset JF, Surewaard BG, Lee W-Y, Kubes P. Splenic Ly6G^{high} mature and Ly6G^{int} immature neutrophils contribute to eradication of *S. pneumoniae*. *J Exp Med*. 2017 Apr 18;jem.20161621.
151. Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chèvre R, A-González N, et al. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*. 2013 May 23;153(5):1025–35.
152. Stroncek DF. Neutrophil-specific antigen HNA-2a, NB1 glycoprotein, and CD177. *Curr Opin Hematol*. 2007 Nov;14(6):688–93.
153. Jerke U, Marino SF, Daumke O, Kettritz R. Characterization of the CD177 interaction with



the ANCA antigen proteinase 3. *Sci Rep.* 2017 Feb 27;7:43328.

154. Wu Z, Liang R, Ohnesorg T, Cho V, Lam W, Abhayaratna WP, et al. Heterogeneity of Human Neutrophil CD177 Expression Results from CD177P1 Pseudogene Conversion. *PLOS Genet.* 2016 May 26;12(5):e1006067.
155. Xie Q, Klesney-Tait J, Keck K, Parlet C, Borchering N, Kolb R, et al. Characterization of a novel mouse model with genetic deletion of CD177. *Protein Cell.* 2015 Feb;6(2):117–26.
156. Zhou G, Yu L, Fang L, Yang W, Yu T, Miao Y, et al. CD177+ neutrophils as functionally activated neutrophils negatively regulate IBD. *Gut.* 2018 Jun;67(6):1052–63.
157. Clemmensen SN, Bohr CT, Rørvig S, Glenthøj A, Mora-Jensen H, Cramer EP, et al. Olfactomedin 4 defines a subset of human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2012 Mar;91(3):495–500.
158. Kubes P. The enigmatic neutrophil: what we do not know. *Cell Tissue Res.* 2018 Mar;371(3):399–406.
159. Welin A, Amirbeagi F, Christenson K, Björkman L, Björnsdóttir H, Forsman H, et al. The Human Neutrophil Subsets Defined by the Presence or Absence of OLFM4 Both Transmigrate into Tissue In Vivo and Give Rise to Distinct NETs In Vitro. *PLOS ONE.* 2013 Jul 29;8(7):e69575.
160. Liu W, Yan M, Liu Y, McLeish KR, Coleman WG, Rodgers GP. Olfactomedin 4 inhibits cathepsin C-mediated protease activities, thereby modulating neutrophil killing of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in mice. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2012 Sep 1;189(5):2460–7.
161. Alder MN, Opoka AM, Lahni P, Hildeman DA, Wong HR. Olfactomedin 4 is a Candidate Marker for a Pathogenic Neutrophil Subset in Septic Shock. *Crit Care Med.* 2017 Apr;45(4):e426–32.
162. Massena S, Christoffersson G, Vågesjö E, Seignez C, Gustafsson K, Binet F, et al. Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans. *Blood.* 2015 Oct 22;126(17):2016–26.
163. Zanardo RCO, Bonder CS, Hwang JM, Andonegui G, Liu L, Vestweber D, et al. A down-regulatable E-selectin ligand is functionally important for PSGL-1-independent leukocyte-endothelial cell interactions. *Blood.* 2004 Dec 1;104(12):3766–73.
164. Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol.* 2013 Jul;35(4):455–63.
165. Fu J, Tobin MC, Thomas LL. Neutrophil-like low-density granulocytes are elevated in patients with moderate to severe persistent asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2014 Dec 1;113(6):635-640.e2.
166. Darcy CJ, Minigo G, Piera KA, Davis JS, McNeil YR, Chen Y, et al. Neutrophils with myeloid derived suppressor function deplete arginine and constrain T cell function in septic shock patients. *Crit Care Lond Engl.* 2014 Aug 1;18(4):R163.
167. Condamine T, Dominguez GA, Youn J-I, Kossenkov AV, Mony S, Alicea-Torres K, et al. Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear



myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol*. 2016 Aug;1(2).

168. Davis RE, Sharma S, Conceição J, Carneiro P, Novais F, Scott P, et al. Phenotypic and functional characteristics of HLA-DR⁺ neutrophils in Brazilians with cutaneous leishmaniasis. *J Leukoc Biol*. 2017;101(3):739–49.
169. Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Mar 15;184(6):3284–97.
170. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, Mishalian I, Kisos H, Levy L, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep*. 2015 Feb 3;10(4):562–73.
171. Scapini P, Marini O, Tecchio C, Cassatella MA. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunol Rev*. 2016;273(1):48–60.
172. Shrestha S, Noh JM, Kim S-Y, Ham H-Y, Kim Y-J, Yun Y-J, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonist attenuate tumor growth via polarization of neutrophils toward an antitumor phenotype. *Oncoimmunology*. 2016;5(1):e1067744.
173. Jablonska J, Leschner S, Westphal K, Lienenklaus S, Weiss S. Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J Clin Invest*. 2010 Apr;120(4):1151–64.
174. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*. 2009 Sep 8;16(3):183–94.
175. Piccard H, Muschel RJ, Opdenakker G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012 Jun 1;82(3):296–309.
176. Silvestre-Roig C, Hidalgo A, Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood*. 2016 Jan 1;blood-2016-01-688887.
177. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. 2010 Aug;31(8):318–24.
178. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JAM, et al. In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2010 Jul 29;116(4):625–7.
179. Athens JW, Raab SO, Haab OP, Mauer AM, Ashenbrucker H, Cartwright GE, et al. Leukokinetic studies. Iii. The distribution of granulocytes in the blood of normal subjects*. *J Clin Invest*. 1961 Jan;40(1):159–64.
180. McCracken JM, Allen L-AH. Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. *J Cell Death*. 2014;7:15–23.
181. Martin CJ, Peters KN, Behar SM. Macrophages Clean Up: Efferocytosis and Microbial Control. *Curr Opin Microbiol*. 2014 Feb;0:17–23.



182. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN, Stockinger B, Tak PP. The resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(1):59–66.
183. de Oliveira S, Rosowski EE, Huttenlocher A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol*. 2016 Jun;16(6):378–91.
184. Adrover JM, Nicolás-Ávila JA, Hidalgo A. Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends Immunol*. 2016 May 1;37(5):334–45.
185. Furze RC, Rankin SM. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*. 2008 Nov;125(3):281–8.
186. Suratt BT, Young SK, Lieber J, Nick JA, Henson PM, Worthen GS. Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Oct;281(4):L913–921.
187. Gabelloni ML, Trevani AS, Sabatté J, Geffner J. Mechanisms regulating neutrophil survival and cell death. *Semin Immunopathol*. 2013 Jul;35(4):423–37.
188. Cullen SP, Henry CM, Kearney CJ, Logue SE, Feoktistova M, Tynan GA, et al. Fas/CD95-induced chemokines can serve as “find-me” signals for apoptotic cells. *Mol Cell*. 2013 Mar 28;49(6):1034–48.
189. Fadok VA, de Cathelineau A null, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001 Jan 12;276(2):1071–7.
190. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2002 Dec;2(12):965–75.
191. Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS. Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Jan 1;5(1):a008748.
192. Greenlee-Wacker MC. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol Rev*. 2016 Sep;273(1):357–70.
193. Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, et al. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1992 Dec 15;149(12):4029–35.
194. Fadok VA, Warner ML, Bratton DL, Henson PM. CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J Immunol Baltim Md 1950*. 1998 Dec 1;161(11):6250–7.
195. Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest*. 1992 Oct;90(4):1513–22.
196. Greenberg ME, Sun M, Zhang R, Febbraio M, Silverstein R, Hazen SL. Oxidized phosphatidylserine–CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent



- phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med*. 2006 Nov 27;203(12):2613–25.
197. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*. 2002 May 9;417(6885):182–7.
 198. Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB. Complement-dependent Clearance of Apoptotic Cells by Human Macrophages. *J Exp Med*. 1998 Dec 21;188(12):2313–20.
 199. Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, et al. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature*. 2001 May 10;411(6834):207–11.
 200. Zizzo G, Hilliard BA, Monestier M, Cohen PL. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires “M2c” polarization and MerTK induction. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Oct 1;189(7):3508–20.
 201. McColl A, Bournazos S, Franz S, Perretti M, Morgan BP, Haslett C, et al. Glucocorticoids induce protein S-dependent phagocytosis of apoptotic neutrophils by human macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Aug 1;183(3):2167–75.
 202. Vandivier RW, Henson PM, Douglas IS. Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest*. 2006 Jun;129(6):1673–82.
 203. Bagaitkar J, Huang J, Zeng MY, Pech NK, Monlish DA, Perez-Zapata LJ, et al. NADPH oxidase activation regulates apoptotic neutrophil clearance by murine macrophages. *Blood*. 2018 Jan 1;blood-2017-09-809004.
 204. Roth S, Agthe M, Eickhoff S, Möller S, Karsten CM, Borregaard N, et al. Secondary necrotic neutrophils release interleukin-16C and macrophage migration inhibitory factor from stores in the cytosol. *Cell Death Discov*. 2015 Nov 30;1:15056.
 205. Yoo SK, Huttenlocher A. Spatiotemporal photolabeling of neutrophil trafficking during inflammation in live zebrafish. *J Leukoc Biol*. 2011 May;89(5):661–7.
 206. Elks PM, van Eeden FJ, Dixon G, Wang X, Reyes-Aldasoro CC, Ingham PW, et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1 α (Hif-1 α) delays inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model. *Blood*. 2011 Jul 21;118(3):712–22.
 207. Buckley CD, Ross EA, McGettrick HM, Osborne CE, Haworth O, Schmutz C, et al. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J Leukoc Biol*. 2006 Feb;79(2):303–11.
 208. Nourshargh S, Renshaw SA, Imhof BA. Reverse Migration of Neutrophils: Where, When, How, and Why? *Trends Immunol*. 2016 May 1;37(5):273–86.
 209. Woodfin A, Voisin M-B, Beyrau M, Colom B, Caille D, Diapouli F-M, et al. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils *in vivo*. *Nat Immunol*. 2011 Aug;12(8):761–9.
 210. Wu D, Zeng Y, Fan Y, Wu J, Mulatibieke T, Ni J, et al. Reverse-migrated neutrophils regulated by JAM-C are involved in acute pancreatitis-associated lung injury. *Sci Rep*. 2016 Feb 4;6:20545.



211. Hamza B, Wong E, Patel S, Cho H, Martel J, Irimia D. Retrotaxis of human neutrophils during mechanical confinement inside microfluidic channels. *Integr Biol Quant Biosci Nano Macro*. 2014 Feb;6(2):175–83.
212. Thyssen JP, Linneberg A, Menné T, Johansen JD. The epidemiology of contact allergy in the general population – prevalence and main findings. *Contact Dermatitis*. 2007 Nov 1;57(5):287–99.
213. Kaplan DH, Igyártó BZ, Gaspari AA. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol*. 2012 Feb;12(2):114–24.
214. Martin SF, Rustemeyer T, Thyssen JP. Recent advances in understanding and managing contact dermatitis. *F1000Research*. 2018;7.
215. Balmert SC, Donahue C, Vu JR, Erdos G, Falo LD, Little SR. In vivo induction of regulatory T cells promotes allergen tolerance and suppresses allergic contact dermatitis. *J Controlled Release*. 2017 Sep 10;261:223–33.
216. Vocanson M, Hennino A, Rozières A, Poyet G, Nicolas J-F. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*. 2009 Dec 1;64(12):1699–714.
217. Lebec H, Bachot N, Gaspard I, Kerdine S, Guinépain MT, Laurent J, et al. Mechanisms of drug-induced allergic contact dermatitis. *Cell Biol Toxicol*. 1999 Feb 1;15(1):57–62.
218. Brasch J, Becker D, Aberer W, Bircher A, Kränke B, Jung K, et al. Guideline contact dermatitis. *Allergo J Int*. 2014;23(4):126–38.
219. Dhingra N, Shemer A, Correa da Rosa J, Rozenblit M, Fuentes-Duculan J, Gittler JK, et al. Molecular profiling of contact dermatitis skin identifies allergen-dependent differences in immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Aug;134(2):362–72.
220. Jakob A, Mussotter F, Ohnesorge S, Dietz L, Pardo J, Haidl ID, et al. Immunoproteomic identification and characterization of Ni²⁺-regulated proteins implicates Ni²⁺ in the induction of monocyte cell death. *Cell Death Dis*. 2017 16;8(3):e2684.
221. Soria A, Autegarden E, Amsler E, Gaouar H, Vial A, Francès C, et al. A clinical decision-making algorithm for penicillin allergy. *Ann Med*. 2017 Nov 17;49(8):710–7.
222. Johansen JD, Aalto-Korte K, Agner T, Andersen KE, Bircher A, Bruze M, et al. European Society of Contact Dermatitis guideline for diagnostic patch testing - recommendations on best practice. *Contact Dermatitis*. 2015 Oct;73(4):195–221.
223. Badaoui A, Bayrou O, Fite C, Frances C, Soria A, Pecquet C. Allergic contact dermatitis caused by methylisothiazolinone in hair gel. *Contact Dermatitis*. 2015 Dec;73(6):364–6.
224. Aerts O, Goossens A, Giordano-Labadie F. Contact allergy caused by methylisothiazolinone: the Belgian-French experience. *Eur J Dermatol*. 2015 May 1;25(3):228–33.
225. Novak N, Baurecht H, Schäfer T, Rodriguez E, Wagenpfeil S, Klopp N, et al. Loss-of-function mutations in the filaggrin gene and allergic contact sensitization to nickel. *J Invest Dermatol*. 2008 Jun;128(6):1430–5.
226. Schnuch A, Westphal G, Mössner R, Uter W, Reich K. Genetic factors in contact allergy--review and future goals. *Contact Dermatitis*. 2011 Jan;64(1):2–23.



227. Mowad CM, Anderson B, Scheinman P, Pootongkam S, Nedorost S, Brod B. Allergic contact dermatitis: Patient management and education. *J Am Acad Dermatol*. 2016 Jun 1;74(6):1043–54.
228. Siemund I, Hindsén M, Netterlid E, Güner N, Bruze M. Contact allergy in atopic individuals in relation to allergen-specific immunotherapy. *Eur J Dermatol*. 2016 May 1;26(3):271–80.
229. Spiewak R. Immunotherapy of allergic contact dermatitis. *Immunotherapy*. 2011 Aug 1;3(8):979–96.
230. West CE, Hammarström M-L, Hernell O. Probiotics during weaning reduce the incidence of eczema. *Pediatr Allergy Immunol*. 2009 Aug 1;20(5):430–7.
231. Ozdemir O. Prebiotics and Probiotics in Allergy: Potential Mechanisms of Prebiotics' and Probiotics' Actions in Allergy - (Part 1). *MOJ Immunol*. 2016 Jan 19;3(1):1–4.
232. Martin SF. Induction of contact hypersensitivity in the mouse model. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2013;961:325–35.
233. Allen IC. Contact hypersensitivity models in mice. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2013;1032:139–44.
234. Christensen AD, Haase C. Immunological mechanisms of contact hypersensitivity in mice. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2012 Jan;120(1):1–27.
235. Parkinson E, Boyd P, Aleksic M, Cubberley R, O'Connor D, Skipp P. Stable Isotope Labeling Method for the Investigation of Protein Haptination by Electrophilic Skin Sensitizers. *Toxicol Sci*. 2014 Nov 1;142(1):239–49.
236. Silvestre MC, Sato MN, dos Reis VMS. Innate immunity and effector and regulatory mechanisms involved in allergic contact dermatitis. *An Bras Dermatol*. 2018;93(2):242–50.
237. Larsen JM, Bonfeld CM, Poulsen SS, Geisler C, Skov L. IL-23 and TH17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Feb 1;123(2):486–492.e1.
238. Gaspari AA, Katz SI. Contact hypersensitivity. *Curr Protoc Immunol*. 2001 May;Chapter 4:Unit 4.2.
239. Tončić RJ, Lipozenčić J, Martinac I, Gregurić S. Immunology of allergic contact dermatitis. *Acta Dermatovenerol Croat ADC*. 2011;19(1):51–68.
240. Martin SF, Esser PR, Weber FC, Jakob T, Freudenberg MA, Schmidt M, et al. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy*. 2011 Sep 1;66(9):1152–63.
241. Peiser M, Tralau T, Heidler J, Api AM, Arts JHE, Basketter DA, et al. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Mar;69(5):763–81.
242. Sebastiani S, Albanesi C, Pità OD, Puddu P, Cavani A, Girolomoni G. The role of chemokines in allergic contact dermatitis. *Arch Dermatol Res*. 2002 Jan 1;293(11):552–9.
243. Tomura M, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, et al. Activated regulatory



T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest.* 2010 Mar;120(3):883–93.

244. Vocanson M, Rozieres A, Hennino A, Poyet G, Gaillard V, Renaudineau S, et al. Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Aug 1;126(2):280-289.e7.
245. Taniguchi K, Yamamoto S, Hitomi E, Inada Y, Suyama Y, Sugioka T, et al. Interleukin 33 is induced by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in keratinocytes and contributes to allergic contact dermatitis. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2013;23(6):428–34.
246. Dudeck A, Dudeck J, Scholten J, Petzold A, Surianarayanan S, Köhler A, et al. Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. *Immunity.* 2011 Jun 24;34(6):973–84.
247. Weber FC, Németh T, Csepregi JZ, Dudeck A, Roers A, Ozsvári B, et al. Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity. *J Exp Med.* 2015 Jan 12;212(1):15–22.
248. Gaudenzio N, Marichal T, Galli SJ, Reber LL. Genetic and Imaging Approaches Reveal Pro-Inflammatory and Immunoregulatory Roles of Mast Cells in Contact Hypersensitivity. *Front Immunol.* 2018;9:1275.
249. Reber L, Sibilano R, Starkl P, Roers A, Grimbaldeston M, Tsai M et al. Imaging protective mast cells in living mice during severe contact hypersensitivity. *JCI Insight.* 2017;2(9).
250. Neagu M, Caruntu C, Constantin C, Boda D, Zurac S, Spandidos Da, et al. Chemically induced skin carcinogenesis: Updates in experimental models (Review). *Oncol Rep.* 2016 May;35(5):2516–28.
251. Dilulio NA, Engeman T, Armstrong D, Tannenbaum C, Hamilton TA, Fairchild RL. Gro α -mediated recruitment of neutrophils is required for elicitation of contact hypersensitivity. *Eur J Immunol.* 1999 Nov 1;29(11):3485–95.
252. Goebeler M, Trautmann A, Voss A, Bröcker E-B, Toksoy A, Gillitzer R. Differential and Sequential Expression of Multiple Chemokines during Elicitation of Allergic Contact Hypersensitivity. *Am J Pathol.* 2001 Feb;158(2):431–40.
253. Engeman T, Gorbachev AV, Kish DD, Fairchild RL. The intensity of neutrophil infiltration controls the number of antigen-primed CD8 T cells recruited into cutaneous antigen challenge sites. *J Leukoc Biol.* 2004 Nov 1;76(5):941–9.
254. Arthur JC, Lich JD, Wilson JE, Ye Z, Allen IC, Gris D, et al. NLRP12 controls dendritic and myeloid cell migration to affect contact hypersensitivity. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2010 Oct 15;185(8):4515–9.
255. Kish DD, Gorbachev AV, Parameswaran N, Gupta N, Fairchild RL. Neutrophil Expression of FasL and Perforin Directs Effector CD8 T Cell Infiltration into Antigen Challenged Skin. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2012 Sep 1;189(5):2191–202.
256. Christensen AD, Skov S, Haase C. The role of neutrophils and G-CSF in DNFB-induced



- contact hypersensitivity in mice. *Immun Inflamm Dis*. 2014 Jun;2(1):21–34.
257. Natsuaki Y, Egawa G, Nakamizo S, Ono S, Hanakawa S, Okada T, et al. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol*. 2014 Nov;15(11):1064–9.
258. Moniaga CS, Watanabe S, Honda T, Nielsen S, Hara-Chikuma M. Aquaporin-9-expressing neutrophils are required for the establishment of contact hypersensitivity. *Sci Rep*. 2015 Oct 22;5:15319.
259. Jiang X, Park CO, Geddes Sweeney J, Yoo MJ, Gaide O, Kupper TS. Dermal $\gamma\delta$ T Cells Do Not Freely Re-Circulate Out of Skin and Produce IL-17 to Promote Neutrophil Infiltration during Primary Contact Hypersensitivity. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169397.
260. Streilein JW. Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *J Invest Dermatol*. 1983 Jun;80 Suppl:12s-16s.
261. Salmon JK, Armstrong CA, Ansel JC. The skin as an immune organ. *West J Med*. 1994 Feb;160(2):146–52.
262. Fukata M, Arditi M. The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*. 2013 May;6(3):451–63.
263. Krishnaswamy JK, Chu T, Eisenbarth SC. Beyond pattern recognition: NOD-like receptors in dendritic cells. *Trends Immunol*. 2013 May;34(5):224–33.
264. Pivarcsi A, Kemény L, Dobozy A. Innate immune functions of the keratinocytes. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2004;51(3):303–10.
265. Sugita K, Kabashima K, Atarashi K, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y. Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clin Exp Immunol*. 2007 Jan;147(1):176–83.
266. Lebre MC, van der Aar AMG, van Baarsen L, van Capel TMM, Schuitemaker JHN, Kapsenberg ML, et al. Human Keratinocytes Express Functional Toll-Like Receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol*. 2007 Feb 1;127(2):331–41.
267. Kisich KO, Howell MD, Boguniewicz M, Heizer HR, Watson NU, Leung DYM. The Constitutive Capacity of Human Keratinocytes to Kill *Staphylococcus aureus* Is Dependent on β -Defensin 3. *J Invest Dermatol*. 2007 Oct 1;127(10):2368–80.
268. Mann E. Review: Skin and the Immune System. *Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research*. 2014;4(3).
269. Nedoszytko B, Sokołowska-Wojdyło M, Ruckemann-Dziurdzińska K, Roszkiewicz J, Nowicki RJ. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. *Adv Dermatol Allergol Dermatol Alergol*. 2014 May;31(2):84–91.
270. Li H, Yao Q, Mariscal A, Wu X, Hülse J, Pedersen E et al. Epigenetic control of IL-23 expression in keratinocytes is important for chronic skin inflammation. *Nature Communications*. 2018;9(1).
271. Sand J, Haertel E, Biedermann T, Contassot E, Reichmann E, French L et al. Expression of



inflammasome proteins and inflammasome activation occurs in human, but not in murine keratinocytes. *Cell Death & Disease*. 2018;9(2).

272. Langerhans P. Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Arch Für Pathol Anat Physiol Für Klin Med*. 1868 Sep 1;44(2–3):325–37.
273. Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, Dai X-M, et al. Langerhans cells arise from monocytes *in vivo*. *Nat Immunol*. 2006 Mar;7(3):265–73.
274. Doebel T, Voisin B, Nagao K. Langerhans Cells – The Macrophage in Dendritic Cell Clothing. *Trends Immunol*. 2017 Nov 1;38(11):817–28.
275. Deckers J, Hammad H, Hosten E. Langerhans Cells: Sensing the Environment in Health and Disease. *Frontiers in Immunology*. 2018;9.
276. Ota F, Hirayama T, Kizuka Y, Yamaguchi Y, Fujinawa R, Nagata M, et al. High affinity sugar ligands of C-type lectin receptor langerin. *Biochim Biophys Acta*. 2018 Apr 7;
277. Klechevsky E, Morita R, Liu M, Cao Y, Coquery S, Thompson-Snipes L, et al. Functional Specializations of Human Epidermal Langerhans Cells and CD14+ Dermal Dendritic Cells. *Immunity*. 2008 Sep;29(3):497–510.
278. Henri S, Poulin LF, Tamoutounour S, Ardouin L, Williams M, de Bovis B, et al. CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J Exp Med*. 2010 Jan 18;207(1):189–206.
279. Kaplan DH. *In vivo* Function of Langerhans Cells and Dermal DC. *Trends Immunol*. 2010 Dec 1;31(12):446–51.
280. Gomez de Agüero M, Vocanson M, Hacini-Rachinel F, Taillardet M, Sparwasser T, Kissenpfennig A, et al. Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8(+) T cells and activating Foxp3(+) regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2012 May;122(5):1700–11.
281. Kitashima DY, Kobayashi T, Woodring T, Idouchi K, Doebel T, Voisin B, et al. Langerhans Cells Prevent Autoimmunity via Expansion of Keratinocyte Antigen-Specific Regulatory T Cells. *EBioMedicine*. 2017 Dec 20;27:293–303.
282. Li J-G, Du Y-M, Yan Z-D, Yan J, Zhuansun Y-X, Chen R, et al. CD80 and CD86 knockdown in dendritic cells regulates Th1/Th2 cytokine production in asthmatic mice. *Exp Ther Med*. 2016 Mar;11(3):878–84.
283. Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J*. 2014 May 16;33(10):1104–16.
284. Yazdi AS, Röcken M, Ghoreschi K. Cutaneous immunology: basics and new concepts. *Semin Immunopathol*. 2016 Jan 1;38(1):3–10.
285. Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P, et al. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity*. 2012 Jul 27;37(1):60–73.
286. Fukunaga A, Khaskhely NM, Sreevidya CS, Byrne SN, Ullrich SE. Dermal dendritic cells,



- and not Langerhans cells, play an essential role in inducing an immune response. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Mar 1;180(5):3057–64.
287. Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, et al. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103⁺ dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009 May;10(5):488–95.
 288. Ali N, Zirak B, Truong H-A, Maurano MM, Gratz IK, Abbas AK, et al. Skin-Resident T Cells Drive Dermal Dendritic Cell Migration in Response to Tissue Self-Antigen. *J Immunol*. 2018 May 1;200(9):3100–8.
 289. Ruez R, Dubrot J, Zoso A, Bacchetta M, Molica F, Hugues S et al. Dendritic Cell Migration Toward CCL21 Gradient Requires Functional Cx43. *Frontiers in Physiology*. 2018;9.
 290. A-Gonzalez N, Quintana JA, García-Silva S, Mazariegos M, Aleja AG de la, Nicolás-Ávila JA, et al. Phagocytosis imprints heterogeneity in tissue-resident macrophages. *J Exp Med*. 2017 May 1;214(5):1281–96.
 291. Jakubzick C, Gautier E, Gibbings S, Sojka D, Schlitzer A, Johnson T et al. Minimal Differentiation of Classical Monocytes as They Survey Steady-State Tissues and Transport Antigen to Lymph Nodes. *Immunity*. 2013;39(3):599-610.
 292. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010 May 28;32(5):593–604.
 293. Gundra UM, Girgis NM, Ruckerl D, Jenkins S, Ward LN, Kurtz ZD, et al. Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood*. 2014 Jan 1;blood-2013-08-520619.
 294. Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2014 May;14(5):289–301.
 295. Suwanpradid J, Shih M, Pontius L, Yang B, Birukova A, Guttman-Yassky E, et al. Arginase1 Deficiency in Monocytes/Macrophages Upregulates Inducible Nitric Oxide Synthase To Promote Cutaneous Contact Hypersensitivity. *J Immunol*. 2017 Sep 1;199(5):1827–34.
 296. Sadik C, Miyabe Y, Sezin T, Luster A. The critical role of C5a as an initiator of neutrophil-mediated autoimmune inflammation of the joint and skin. *Seminars in Immunology*. 2018;37:21-29.
 297. Keijsers RRMC, Hendriks AGM, van Erp PEJ, van Cranenbroek B, van de Kerkhof PCM, Koenen HJPM, et al. In Vivo Induction of Cutaneous Inflammation Results in the Accumulation of Extracellular Trap-Forming Neutrophils Expressing ROR γ t and IL-17. *J Invest Dermatol*. 2014 May 1;134(5):1276–84.
 298. Schön MP, Broekaert SMC, Erpenbeck L. Sexy again: the renaissance of neutrophils in psoriasis. *Exp Dermatol*. 2017 Apr 1;26(4):305–11.
 299. Jakasa I, Thyssen JP, Kezic S. The role of skin barrier in occupational contact dermatitis. *Exp Dermatol*. 2018 Jun 12;
 300. Yim E, Baquerizo Nole KL, Tosti A. Contact dermatitis caused by preservatives. *Dermat Contact Atopic Occup Drug*. 2014 Oct;25(5):215–31.



301. Parkinson E, Aleksic M, Cubberley R, Kaur-Atwal G, Vissers JPC, Skipp P. Determination of Protein Haptenation by Chemical Sensitizers Within the Complexity of the Human Skin Proteome. *Toxicol Sci.* 2018 Apr;162(2):429–38.
302. Akiba H, Kehren J, Ducluzeau M-T, Krasteva M, Horand F, Kaiserlian D, et al. Skin Inflammation During Contact Hypersensitivity Is Mediated by Early Recruitment of CD8+ T Cytotoxic 1 Cells Inducing Keratinocyte Apoptosis. *J Immunol.* 2002 Mar 15;168(6):3079–87.
303. Esser P, Wölfle U, Dürr C, von Loewenich F, Schempp C, Freudenberg M et al. Contact Sensitizers Induce Skin Inflammation via ROS Production and Hyaluronic Acid Degradation. *PLoS ONE.* 2012;7(7):e41340.
304. Weber FC, Esser PR, Müller T, Ganesan J, Pellegatti P, Simon MM, et al. Lack of the purinergic receptor P2X7 results in resistance to contact hypersensitivity. *J Exp Med.* 2010 Nov 22;207(12):2609–19.
305. Martin SF, Dudda JC, Bachtanian E, Lembo A, Liller S, Dürr C, et al. Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity. *J Exp Med.* 2008 Sep 1;205(9):2151–62.
306. Yasuike R, Tamagawa-Mineoka R, Ueta M, Nakamura N, Kinoshita S, Katoh N. The role of toll-like receptor 3 in chronic contact hypersensitivity induced by repeated elicitation. *J Dermatol Sci.* 2017 Nov;88(2):184–91.
307. Schmidt M, Raghavan B, Müller V, Vogl T, Fejer G, Tchaptchet S, et al. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol.* 2010 Sep;11(9):814–9.
308. Liu D, Rhebergen A, Eisenbarth S. Licensing Adaptive Immunity by NOD-Like Receptors. *Frontiers in Immunology.* 2013;4.
309. Antonopoulos C, Cumberbatch M, Dearman RJ, Daniel RJ, Kimber I, Groves RW. Functional Caspase-1 Is Required for Langerhans Cell Migration and Optimal Contact Sensitization in Mice. *J Immunol.* 2001 Mar 15;166(6):3672–7.
310. Watanabe H, Gaide O, Pétrilli V, Martinon F, Contassot E, Roques S, et al. Activation of the IL-1 β -Processing Inflammasome Is Involved in Contact Hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 2007 Aug 1;127(8):1956–63.
311. Guedes S, Neves B, Vitorino R, Domingues R, Cruz MT, Domingues P. Contact dermatitis: in pursuit of sensitizer's molecular targets through proteomics. *Arch Toxicol.* 2017 Feb;91(2):811–25.
312. Ferreira I, Silva A, Martins JD, Neves BM, Cruz MT. Nature and kinetics of redox imbalance triggered by respiratory and skin chemical sensitizers on the human monocytic cell line THP-1. *Redox Biol.* 2018 Jun;16:75–86.
313. Morgan MJ, Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res.* 2011 Jan;21(1):103–15.
314. Gaitanaki C, Konstantina S, Chrysa S, Beis I. Oxidative stress stimulates multiple MAPK signalling pathways and phosphorylation of the small HSP27 in the perfused amphibian



heart. *J Exp Biol.* 2003 Aug 15;206(16):2759–69.

315. Koháryová M, Kolárová M. Oxidative stress and thioredoxin system. *Gen Physiol Biophys.* 2008 Jun;27(2):71–84.
316. Huang Y, Li W, Su Z, Kong A-NT. The complexity of the Nrf2 pathway: Beyond the antioxidant response. *J Nutr Biochem.* 2015 Dec;26(12):1401–13.
317. Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2018 May 1;1865(5):721–33.
318. Maher J, Yamamoto M. The rise of antioxidant signaling—The evolution and hormetic actions of Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010 Apr 1;244(1):4–15.
319. Ma Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013;53:401–26.
320. Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. Identification of Nrf2-regulated Genes Induced by the Chemopreventive Agent Sulforaphane by Oligonucleotide Microarray. *Cancer Res.* 2002 Sep 15;62(18):5196–203.
321. Dinkova-Kostova AT, Talalay P. NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch Biochem Biophys.* 2010 Sep 1;501(1):116–23.
322. Kensler TW, Egner PA, Agyeman AS, Visvanathan K, Groopman JD, Chen J-G, et al. Keap1-nrf2 signaling: a target for cancer prevention by sulforaphane. *Top Curr Chem.* 2013;329:163–77.
323. Hu C, Egger AL, Mesecar AD, van Breemen RB. Modification of keap1 cysteine residues by sulforaphane. *Chem Res Toxicol.* 2011 Apr 18;24(4):515–21.
324. Pu D, Zhao Y, Chen J, sun Y, Lv A, Zhu S, et al. Protective Effects of Sulforaphane on Cognitive Impairments and AD-like Lesions in Diabetic Mice are Associated with the Upregulation of Nrf2 Transcription Activity. *Neuroscience.* 2018 Jun 15;381:35–45.
325. Chen C-T, Hsieh M-J, Hsieh Y-H, Hsin M-C, Chuang Y-T, Yang S-F, et al. Sulforaphane suppresses oral cancer cell migration by regulating cathepsin S expression. *Oncotarget.* 2018 Apr 3;9(25):17564–75.
326. Royston KJ, Paul B, Nozell S, Rajbhandari R, Tollefsbol TO. Withaferin A and sulforaphane regulate breast cancer cell cycle progression through epigenetic mechanisms. *Exp Cell Res.* 2018 Apr 22;
327. Mein J, Wang F-Z, Jiang Q, James D, Boddupalli S, Devaraj S. Sulforaphane attenuates inflammation by decreasing Toll-like receptor 2 and 4 expression and activity in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells (830.5). *FASEB J.* 2014 Apr 1;28(1_supplement):830.5.
328. Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer.* 2012 19;12(8):564–71.
329. Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell.* 2017 Jan 12;168(1–2):37–57.



330. Tian H, Zhang B, Di J, Jiang G, Chen F, Li H, et al. Keap1: one stone kills three birds Nrf2, IKK β and Bcl-2/Bcl-xL. *Cancer Lett.* 2012 Dec 1;325(1):26–34.
331. Wardyn JD, Ponsford AH, Sanderson CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem Soc Trans.* 2015 Aug 1;43(4):621–6.
332. Yu M, Li H, Liu Q, Liu F, Tang L, Li C, et al. Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway. *Cell Signal.* 2011 May;23(5):883–92.
333. Liu G-H, Qu J, Shen X. NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochim Biophys Acta.* 2008 May;1783(5):713–27.
334. Rabolli V, Lison D, Huaux F. The complex cascade of cellular events governing inflammasome activation and IL-1 β processing in response to inhaled particles. *Part Fibre Toxicol.* 2016 12;13(1):40.
335. Hou Y, Wang Y, He Q, Li L, Xie H, Zhao Y, et al. Nrf2 inhibits NLRP3 inflammasome activation through regulating Trx1/TXNIP complex in cerebral ischemia reperfusion injury. *Behav Brain Res.* 2018 Jan 15;336:32–9.
336. Hennig P, Garstkiewicz M, Grossi S, Di Filippo M, French L, Beer H. The Crosstalk between Nrf2 and Inflammasomes. *International Journal of Molecular Sciences.* 2018;19(2):562.
337. Ichimura Y, Waguri S, Sou Y-S, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, et al. Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol Cell.* 2013 Sep 12;51(5):618–31.
338. Lee Y, Shin J-M, Jang S, Choi D-K, Seo M-S, Kim H-R, et al. Role of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) in epidermal differentiation. *Arch Dermatol Res.* 2014 Sep 1;306(7):677–82.
339. Jeayeng S, Wongkajornsilp A, Slominski AT, Jirawatnotai S, Sampattavanich S, Panich U. Nrf2 in keratinocytes modulates UVB-induced DNA damage and apoptosis in melanocytes through MAPK signaling. *Free Radic Biol Med.* 2017 Jul 1;108:918–28.
340. Kurinna S, Muzumdar S, Köhler UA, Kockmann T, Auf dem Keller U, Schäfer M, et al. Autocrine and Paracrine Regulation of Keratinocyte Proliferation through a Novel Nrf2-IL-36 γ Pathway. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2016 01;196(11):4663–70.
341. Yang L, Fan X, Cui T, Dang E, Wang G. Nrf2 Promotes Keratinocyte Proliferation in Psoriasis through Up-Regulation of Keratin 6, Keratin 16, and Keratin 17. *J Invest Dermatol.* 2017 Oct 1;137(10):2168–76.
342. Emter R, van der Veen JW, Adamson G, Ezendam J, van Loveren H, Natsch A. Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSensTM cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol In Vitro.* 2013 Dec 1;27(8):2225–32.
343. Alloul-Ramdhani M, Tensen CP, El Ghalbzouri A. Performance of the N/TERT epidermal model for skin sensitizer identification via Nrf2-Keap1-ARE pathway activation. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA.* 2014 Aug;28(5):982–9.
344. Ade N, Leon F, Pallardy M, Peiffer J-L, Kerdine-Romer S, Tissier M-H, et al. 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 Off J Soc Toxicol.* 2009 Feb;107(2):451–60.

345. Migdal C, Botton J, El Ali Z, Azoury M-E, Guldemann J, Giménez-Arnau E, et al. 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.* 2013 Jun 1;133(2):259–74.
346. Mussotter F, Tomm JM, El Ali Z, Pallardy M, Kerdine-Römer S, Götz M, et al. Proteomics analysis of dendritic cell activation by contact allergens reveals possible biomarkers regulated by Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016 Dec 15;313:170–9.
347. El Ali Z, Deloménie C, Botton J, Pallardy M, Kerdine-Römer S. Dendritic cells' death induced by contact sensitizers is controlled by Nrf2 and depends on glutathione levels. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017 May 1;322:41–50.
348. Al-Huseini LMA, Yeang HXA, Sethu S, Alhumeed N, Hamdam JM, Tingle Y, et al. Nuclear Factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related Factor-2 (Nrf2) Modulates Dendritic Cell Immune Function through Regulation of p38 MAPK-cAMP-responsive Element Binding Protein/Activating Transcription Factor 1 Signaling. *J Biol Chem.* 2013 Feb 8;288(31):22281–8.
349. Williams MA, Rangasamy T, Bauer SM, Killedar S, Karp M, Kensler TW, et al. Disruption of the Transcription Factor Nrf2 Promotes Pro-Oxidative Dendritic Cells That Stimulate Th2-Like Immunoresponsiveness upon Activation by Ambient Particulate Matter. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2008 Oct 1;181(7):4545–59.
350. Wang J, Liu P, Xin S, Wang Z, Li J. Nrf2 suppresses the function of dendritic cells to facilitate the immune escape of glioma cells. *Exp Cell Res.* 2017 15;360(2):66–73.
351. Yeang HXA, Hamdam JM, Al-Huseini LMA, Sethu S, Djouhri L, Walsh J, et al. 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.* 2012 Mar 23;287(13):10556–64.
352. Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun.* 2016 May 23;7:ncomms11624.
353. Maruyama A, Tsukamoto S, Nishikawa K, Yoshida A, Harada N, Motojima K, et al. Nrf2 regulates the alternative first exons of CD36 in macrophages through specific antioxidant response elements. *Arch Biochem Biophys.* 2008 Sep 1;477(1):139–45.
354. Kim W, Lee H-N, Jang J-H, Kim SH, Lee Y-H, Hahn Y-I, et al. 15-Deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J2 Exerts Proresolving Effects Through Nuclear Factor E2-Related Factor 2-Induced Expression of CD36 and Heme Oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal.* 2017 Dec 10;27(17):1412–31.
355. Olganier D, Lavergne R, Meunier E, Lefèvre L, Dardenne C, Aubouy A et al. Nrf2, a PPAR γ Alternative Pathway to Promote CD36 Expression on Inflammatory Macrophages: Implication for Malaria. *PLoS Pathogens.* 2011;7(9):e1002254.
356. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Sethi S, Kong X, Yarmus L, Brown RH, et al. Targeting Nrf2



signaling improves bacterial clearance by alveolar macrophages in patients with COPD and in a mouse model. *Sci Transl Med*. 2011 Apr 13;3(78):78ra32.

357. Thimmulappa RK, Scollick C, Traore K, Yates M, Trush MA, Liby KT, et al. Nrf2 dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolidine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Dec 29;351(4):883–9.
358. Dias I, Chapple I, Milward M, Grant M, Hill E, Brown J et al. Sulforaphane Restores Cellular Glutathione Levels and Reduces Chronic Periodontitis Neutrophil Hyperactivity In Vitro. *PLoS ONE*. 2013;8(6):e66407.
359. Araújo VC, Demasi APD, Soares AB, Passador-Santos F, Napimoga MH, Martinez EF, et al. Neutrophils in Oral Paracoccidioidomycosis and the Involvement of Nrf2. *PLOS ONE*. 2013 Oct 24;8(10):e76976.
360. Joshi N, Werner S. Nrf2 is highly expressed in neutrophils, but myeloid cell-derived Nrf2 is dispensable for wound healing in mice. *PLOS ONE*. 2017 Oct 26;12(10):e0187162.
361. Natsch A. 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*. 2010 Feb;113(2):284–92.
362. El Ali Z, Gerbeix C, Hemon P, Esser PR, Martin SF, Pallardy M, et al. Allergic Skin Inflammation Induced by Chemical Sensitizers Is Controlled by the Transcription Factor Nrf2. *Toxicol Sci*. 2013 Jul 1;134(1):39–48.
363. Kitajima M, Kimura A, Suzuki H. Cutting Edge: Nqo1 Regulates Irritant Contact Hypersensitivity against Croton Oil through Maintenance of Dendritic Epidermal T Cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2018 Mar 1;200(5):1555–9.
364. Espinasse M, Hajage D, Montravers P, Piednoir P, Dufour G, Tubach F et al. Neutrophil expression of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) anti-inflammatory protein is associated with acute respiratory distress syndrome severity. *Annals of Intensive Care*. 2016;6(1).
365. Espinasse M-A, Pépin A, Virault-Rocroy P, Szely N, Chollet-Martin S, Pallardy M, et al. Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Is Expressed in Human Neutrophils and Promotes Apoptosis through Mcl-1 Down-Regulation. *J Innate Immun*. 2016;8(1):81–96.
366. Ahmed SM, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2017 Feb;1863(2):585–97.
367. Walther M, Caul AD, Aka P, Njie M, Amambua-Ngwa A, Walther B, et al. HMOX1 Gene Promoter Alleles and High HO-1 Levels Are Associated with Severe Malaria in Gambian Children. *PLOS Pathog*. 2012 Mar 15;8(3):e1002579.
368. Witko-Sarsat V, Mocek J, Bouayad D, Tamassia N, Ribeil J-A, Candalh C, et al. Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. *J Exp Med*. 2010 Nov 22;207(12):2631–45.
369. Yin S, Cao W. Toll-Like Receptor Signaling Induces Nrf2 Pathway Activation through p62-Triggered Keap1 Degradation. *Mol Cell Biol*. 2015 Aug;35(15):2673–83.
370. Kovac S, Angelova PR, Holmström KM, Zhang Y, Dinkova-Kostova AT, Abramov AY.



- Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Apr;1850(4):794–801.
371. Joo M, Kim KH. p47phox, a subunit of NADPH oxidase, enhances the function of Nrf2 (INM1P.441). *J Immunol*. 2015 May 1;194(1 Supplement):56.18-56.18.
372. Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radic Biol Med*. 2015 Nov 1;88:179–88.
373. Sima C, Aboodi GM, Lakschevitz FS, Sun C, Goldberg MB, Glogauer M. Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Down-Regulation in Oral Neutrophils Is Associated with Periodontal Oxidative Damage and Severe Chronic Periodontitis. *Am J Pathol*. 2016 Jun;186(6):1417–26.
374. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017 Jul 14;2:17023.
375. Yang H-M, Zhuo J-Y, Sun C-Y, Nie J, Yuan J, Liu Y-L, et al. Pogostone attenuates TNF- α -induced injury in A549 cells via inhibiting NF- κ B and activating Nrf2 pathways. *Int Immunopharmacol*. 2018 Jun 29;62:15–22.
376. Niino T, Tago K, Yasuda D, Takahashi K, Mashino T, Tamura H, et al. A 5-hydroxyoxindole derivative attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the p38-Nrf2 signaling axis. *Biochem Pharmacol*. 2018 Jun 22;155:182–97.
377. Park SY, Jin ML, Yi EH, Kim Y, Park G. Neochlorogenic acid inhibits against LPS-activated inflammatory responses through up-regulation of Nrf2/HO-1 and involving AMPK pathway. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2018 Jun 8;62:1–10.
378. Kim W, Kim H-U, Lee H-N, Kim SH, Kim C, Cha Y-N, et al. Taurine Chloramine Stimulates Efferocytosis Through Upregulation of Nrf2-Mediated Heme Oxygenase-1 Expression in Murine Macrophages: Possible Involvement of Carbon Monoxide. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Jul 10;23(2):163–77.
379. Brüne B, Dehne N, Grossmann N, Jung M, Namgaladze D, Schmid T, et al. Redox Control of Inflammation in Macrophages. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Aug 20;19(6):595–637.
380. Ivanciuc T, Sbrana E, Casola A, Garofalo R. Protective Role of Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Against Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus Infections. *Frontiers in Immunology*. 2018;9.
381. Gomez JC, Dang H, Martin JR, Doerschuk CM. Nrf2 Modulates Host Defense during *Streptococcus pneumoniae* Pneumonia in Mice. *J Immunol*. 2016 Oct 1;197(7):2864–79.
382. Iizuka T, Ishii Y, Itoh K, Kiwamoto T, Kimura T, Matsuno Y, et al. Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema. *Genes Cells*. 2005 Dec 1;10(12):1113–25.
383. Tsai JJ, Dudakov JA, Takahashi K, Shieh J-H, Velardi E, Holland AM, et al. Nrf2 regulates haematopoietic stem cell function. *Nat Cell Biol*. 2013 Mar;15(3):309–16.
384. Turbica I, Gallais Y, Gueguen C, Tharinger H, Al Sabbagh C, Gorges R, et al. Ectosomes from neutrophil-like cells down-regulate nickel-induced dendritic cell maturation and promote Th2 polarization. *J Leukoc Biol*. 2015 Apr;97(4):737–49.



385. Barrientos L, Bignon A, Gueguen C, Chaisemartin L de, Gorges R, Sandré C, et al. Neutrophil Extracellular Traps Downregulate Lipopolysaccharide-Induced Activation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Immunol*. 2014 Dec 1;193(11):5689–98.
386. Raffalli C, Clouet E, Kuresepi S, Damiens M-H, Lepoittevin J-P, Pallardy M, et al. Editor's Highlight: Fragrance Allergens Linalool and Limonene Allylic Hydroperoxides in Skin Allergy: Mechanisms of Action Focusing on Transcription Factor Nrf2. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2018 Jan 1;161(1):139–48.
387. Fourtounis J, Wang I-M, Mathieu M-C, Claveau D, Loo T, Jackson AL, et al. Gene expression profiling following NRF2 and KEAP1 siRNA knockdown in human lung fibroblasts identifies CCL11/Eotaxin-1 as a novel NRF2 regulated gene. *Respir Res*. 2012;13(1):92.
388. Manicone AM, McGuire JK. Matrix Metalloproteinases as Modulators of Inflammation. *Semin Cell Dev Biol*. 2008 Feb;19(1):34–41.
389. Dean RA, Cox JH, Bellac CL, Doucet A, Starr AE, Overall CM. Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR+ CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3455–64.
390. Bellac CL, Dufour A, Krisinger MJ, Loonchanta A, Starr AE, auf dem Keller U, et al. Macrophage Matrix Metalloproteinase-12 Dampens Inflammation and Neutrophil Influx in Arthritis. *Cell Rep*. 2014 Oct 23;9(2):618–32.
391. Cox JH, Starr AE, Kappelhoff R, Yan R, Roberts CR, Overall CM. Matrix metalloproteinase 8 deficiency in mice exacerbates inflammatory arthritis through delayed neutrophil apoptosis and reduced caspase 11 expression. *Arthritis Rheum*. 2010 Dec;62(12):3645–55.
392. Kolaczowska E, Koziol A, Plytycz B, Arnold B, Opdenakker G. Altered apoptosis of inflammatory neutrophils in MMP-9-deficient mice is due to lower expression and activity of caspase-3. *Immunol Lett*. 2009 Sep 22;126(1):73–82.
393. Aubouy A, Olganier D, Bertin G, Ezinmegnon S, Majorel C, Mimar S et al. Nrf2-driven CD36 and HO-1 gene expression in circulating monocytes correlates with favourable clinical outcome in pregnancy-associated malaria. *Malaria Journal*. 2015;14(1).
394. Ishii T, Itoh K, Ruiz E, Leake DS, Unoki H, Yamamoto M, et al. Role of Nrf2 in the Regulation of CD36 and Stress Protein Expression in Murine Macrophages: Activation by Oxidatively Modified LDL and 4-Hydroxynonenal. *Circ Res*. 2004 Mar 19;94(5):609–16.
395. Nakagomi D, Suzuki K, Meguro K, Hosokawa J, Tamachi T, Takatori H, et al. Matrix metalloproteinase 12 is produced by M2 macrophages and plays important roles in the development of contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 May 1;135(5):1397–400.
396. Suzuki K, Meguro K, Nakagomi D, Nakajima H. Roles of alternatively activated M2 macrophages in allergic contact dermatitis. *Allergol Int Off J Jpn Soc Allergol*. 2017 Jul;66(3):392–7.
397. Lebrun A, Re SL, Chantry M, Carrera XI, Uwambayinema F, Ricci D, et al. CCR2+ monocytic myeloid-derived suppressor cells (M-MDSCs) inhibit collagen degradation and



- promote lung fibrosis by producing transforming growth factor- β 1. *J Pathol.* 243(3):320–30.
398. Tanabe N, Hoshino Y, Marumo S, Kiyokawa H, Sato S, Kinose D, et al. Thioredoxin-1 protects against neutrophilic inflammation and emphysema progression in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *PloS One.* 2013;8(11):e79016.
399. Wrann CD, Tabriz NA, Barkhausen T, Klos A, Griensven M van, Pape HC, et al. The Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway Exerts Protective Effects during Sepsis by Controlling C5a-Mediated Activation of Innate Immune Functions. *J Immunol.* 2007 May 1;178(9):5940–8.
400. Kang J, Jeong MG, Oh S, Jang EJ, Kim HK, Hwang ES. A FoxO1-dependent, but NRF2-independent induction of heme oxygenase-1 during muscle atrophy. *FEBS Lett.* 2014 Jan 3;588(1):79–85.
401. Piao MS, Park J-J, Choi J-Y, Lee D-H, Yun SJ, Lee J-B, et al. Nrf2-dependent and Nrf2-independent induction of phase 2 detoxifying and antioxidant enzymes during keratinocyte differentiation. *Arch Dermatol Res.* 2012 Jul;304(5):387–95.
402. He Q, Jiang L, Man S, Wu L, Hu Y, Chen W. Curcumin reduces neuronal loss and inhibits the NLRP3 inflammasome activation in an epileptic rat model. *Curr Neurovasc Res.* 2018 Jul 30;
403. Schäfer M, Willrodt A-H, Kurinna S, Link AS, Farwanah H, Geusau A, et al. Activation of Nrf2 in keratinocytes causes chloracne (MADISH)-like skin disease in mice. *EMBO Mol Med.* 2014 Apr;6(4):442–57.
404. Schäfer M, Farwanah H, Willrodt A-H, Huebner AJ, Sandhoff K, Roop D, et al. Nrf2 links epidermal barrier function with antioxidant defense. *EMBO Mol Med.* 2012 May;4(5):364–79.
405. Ben-Yehuda Greenwald M, Ben-Sasson S, Bianco-Peled H, Kohen R. Skin Redox Balance Maintenance: The Need for an Nrf2-Activator Delivery System. *Cosmetics.* 2016 Jan 15;3(1):1.
406. Reisman SA, Lee C-YI, Meyer CJ, Proksch JW, Sonis ST, Ward KW. Topical application of the synthetic triterpenoid RTA 408 protects mice from radiation-induced dermatitis. *Radiat Res.* 2014 May;181(5):512–20.
407. Reisman S, Goldsberry A, Lee C, O’Grady M, Proksch J, Ward K et al. Topical application of RTA 408 lotion activates Nrf2 in human skin and is well-tolerated by healthy human volunteers. *BMC Dermatology.* 2015;15(1).
408. Samsami-Kor M, Daryani NE, Asl PR, Hekmatdoost A. Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol in Patients with Ulcerative Colitis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Pilot Study. *Arch Med Res.* 2015 May;46(4):280–5.
409. Linker RA, Haghikia A. Dimethyl fumarate in multiple sclerosis: latest developments, evidence and place in therapy. *Ther Adv Chronic Dis.* 2016 Jul;7(4):198–207.



Titre : Rôle du facteur de transcription Nrf2 dans la régulation des fonctions du neutrophile *in vitro* et dans l'allergie cutanée.

Mots clés : Neutrophile, modèle murin, hypersensibilité de contact, Nrf2, stress oxydant, allergie

Résumé : Les neutrophiles constituent une première ligne de défense contre les agents infectieux. En revanche, leur activation incontrôlée peut exacerber certaines pathologies inflammatoires telles que les allergies cutanées. Notre équipe a montré précédemment que le facteur de transcription Nrf2 connu pour son rôle antioxydant, régule l'inflammation cutanée dans l'hypersensibilité de contact (HSC). Ainsi ce travail a été mené pour évaluer *in vitro* l'implication de la voie Nrf2 dans les fonctions des neutrophiles et pour identifier son rôle dans le recrutement et l'activation des neutrophiles dans l'HSC.

In vitro, nous montrons que la protéine Nrf2 est fortement exprimée dans les neutrophiles de la moelle osseuse. Nrf2 est fonctionnelle dans les neutrophiles stimulés : il active la transcription de gènes cibles cytoprotecteurs et diminue celle des gènes de l'inflammation. Ainsi, le prétraitement des neutrophiles avec un activateur de Nrf2 tel que le sulforaphane, réduit la production des formes réactives de l'oxygène (FRO) en réponse à une stimulation. En parallèle, l'absence de Nrf2 ne semble pas affecter la phagocytose et la nérose, deux fonctions clés du neutrophile.

Enfin, Nrf2 est indispensable pour une migration optimale des neutrophiles en réponse aux chimiokines.

Au cours de l'HSC induite par le dinitrochlorobenzène (DNCB), Nrf2 régule indirectement le recrutement des neutrophiles, en contrôlant le stress oxydant cutané et les voies inflammatoires impliquées dans la production de chimiokines, notamment CCL2, CCL4 et CCL11. En outre, Nrf2 induit l'augmentation d'expression du scavenger CD36 dans les macrophages et augmente ainsi leur capacité à éliminer les neutrophiles apoptotiques pour initier la résolution de l'inflammation.

En conclusion, l'activation de Nrf2 dans les neutrophiles participe au contrôle de la production des FRO et la migration. En outre, Nrf2 émerge comme un effecteur clé dans le contrôle du recrutement et de la clairance des neutrophiles au cours de la réponse inflammatoire cutanée aux molécules allergisantes. La mise en évidence de ces mécanismes protecteurs de Nrf2 nous permet de proposer cette protéine comme nouvelle cible thérapeutique dans le contrôle d'inflammations cutanées chroniques.

Title : The role of Nrf2 transcription factor in the regulation of neutrophil functions *in vitro* and in a cutaneous allergy

Keywords : Neutrophil, contact hypersensitivity, Nrf2, oxidant stress, mice model, allergy

Abstract: Neutrophils form the first line of defense against infectious agents. However, their uncontrolled activation may exacerbate certain inflammatory conditions such as cutaneous allergies. Our team has previously shown that Nrf2 transcription factor known for its antioxidant role, regulates skin inflammation in contact hypersensitivity (CHS). Thus, our work was carried out to evaluate *in vitro* the involvement of Nrf2 pathway in neutrophil functions and to identify Nrf2 role in neutrophil recruitment and activation in CHS.

In vitro, we showed that the protein Nrf2 was highly expressed in bone marrow neutrophils. Nrf2 is functional in stimulated neutrophils: it activates the transcription of cytoprotective genes and downregulates that of inflammatory genes. Thus, pretreatment of neutrophils with an Nrf2 activator such as sulforaphane reduces the production of reactive oxygen species (ROS) in response to stimulation. In parallel, Nrf2 does not affect two key functions of neutrophil, phagocytosis and netosis.

Finally, Nrf2 is essential for optimal migration of neutrophils toward chemokines. In CHS induced by the dinitrochlorobenzene (DNCB), Nrf2 indirectly regulates the recruitment of neutrophils, through regulation of skin oxidant stress and inflammatory pathways that are involved in chemokines production, including CCL2, CCL4 and CCL11. In addition, Nrf2 induces the up-regulation of scavenger CD36 in macrophages and thus increases their ability to eliminate apoptotic neutrophils leading to the resolution of inflammation.

In conclusion, Nrf2 activation in neutrophils participates in the control of ROS production and migration. In addition, Nrf2 emerges as an important effector in the control of neutrophil recruitment and clearance during the skin inflammatory response to allergenic molecules. The demonstration of Nrf2 protective mechanisms leads us to suggest this protein as a new therapeutic target in the control of chronic skin inflammations.

