

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**ÉTUDE DU RÔLE DES PROTÉINES S100A8 ET S100A9
DANS LA PHYSIOLOGIE DES NEUTROPHILES HUMAINS**

Par
Jean-Christophe Simard

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Virologie et Immunologie

JURY D'ÉVALUATION

Président du jury
et examinateur interne

M. Jacques Bernier, PhD
INRS-Institut Armand-Frappier

Examinateur externe

Mme. Caroline Gilbert, PhD
Centre de recherche du CHUL

Directeur de recherche

M. Denis Girard, PhD
INRS-Institut Armand-Frappier

Co-Directeur de recherche

M. Philippe A. Tessier, PhD
Centre de recherche du CHUL

Résumé

S100A8 et S100A9 sont des protéines pro-inflammatoires abondamment exprimées dans le cytosol des neutrophiles et des monocytes. Elles sont présentes physiologiquement sous formes d'homo et d'hétéro-dimères. De grandes concentrations extracellulaires de ces protéines ont été répertoriées lors d'épisode inflammatoire et corrèlent avec plusieurs pathologies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde, la fibrose kystique, la maladie de Crohn ainsi que la goutte. À ce jour, le rôle de ces protéines dans la physiologie des neutrophiles demeurent relativement obscur. De plus, les voies de signalisation impliquées dans le comportement des neutrophiles en réponse à ces protéines restent peu connues. La présente étude démontre que S100A9 est le composant actif du complexe S100A8/S100A9. Nous démontrons, dans un premier temps, que S100A9 induit l'exocytose des granules spécifiques, gélatinases et des vésicules sécrétaires du neutrophile. Nous démontrons également que S100A9 active les MAPK p38, ERK1/2 et JNK. De plus, il s'avère que la dégranulation du neutrophile induite par S100A9 est dépendante de l'activation des kinases p38 et JNK, mais pas ERK1/2.



jc dinard

Étudiant



SG

Directeur de recherche

Remerciements

Les deux dernières années de ma vie se sont écoulées à un rythme fou. Quand je pense à celles-ci, plusieurs anecdotes, mais surtout plusieurs personnes me viennent en tête. Ces personnes ont rendu mon expérience aux études graduées des plus agréables. Je garde évidemment de ma maîtrise plusieurs souvenirs mémorables.

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr. Denis Girard, ainsi que mon co-directeur de recherche, le Dr. Philippe Tessier, pour la confiance qu'ils m'ont accordée au début de ce projet. Je voudrais également les remercier pour leur encadrement, leurs encouragements, leurs conseils ainsi que pour les multiples discussions scientifiques animées que nous avons entretenues.

Un grand merci à mes collègues de laboratoire : Marie-Michelle Simon, David Garcês-Gonçalves, Francis Antoine, Sonia Chiasson avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. Un merci particulier à Jamila Ennaciri et François Binet qui ont pris beaucoup de leur temps pour répondre à plusieurs de mes questions et pour le temps qu'ils m'ont consacré lorsque fut le temps de m'initier aux différentes techniques de laboratoire.

Enfin, j'aimerais remercier ma famille et mes amis pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux de maîtrise et pour leurs encouragements.

Finalement, merci à mon amour, Anne-Julie, sans qui cette aventure de vie n'aurait jamais été aussi agréable. Merci pour tous ces moments passés en ta compagnie !

Table des matières

Résumé.....	iii
Remerciements.....	iv
Tables des matières	v
Liste des abréviations	vii
Liste des figures et tableaux	ix
Introduction	x
SECTION 1 : SYNTHÈSE	1
Chapitre 1 : Le neutrophile et l'inflammation	1
1.1 Le développement du neutrophile	1
1.2 Les fonctions du neutrophile	4
1.2.1 L'activation du neutrophile.....	4
1.2.2 L'adhésion	5
1.2.3 La transmigration	6
1.2.4 La dégranulation	8
1.2.5 La phagocytose	13
1.2.6 La flambée oxydative et la production de réactifs oxygénés.....	18
1.2.7 La production de cytokines.....	21
1.2.8 L'apoptose et la résolution de l'inflammation.....	23
1.3 L'inflammation aigüe et chronique	25
1.4 Les maladies associées aux neutrophiles.....	26
1.4.1 L'arthrite rhumatoïde	26
1.4.2 La goutte	28
1.4.3 La neutropénie	28
1.4.4 La granulomatose chronique.....	28
1.4.5 La déficience de l'adhésion leucocytaire.....	29
Chapitre 2 : Les protéines S100	30

2.1 Structure générale	30
2.2 Les protéines S100A8, S100A9 et S100A12	32
2.2.1 Provenance et mécanisme de sécrétion.....	34
2.2.2 Les récepteurs	35
2.2.3 Rôles intracellulaires.....	36
2.2.4 Rôles extracellulaires	37
2.2.5 Les maladies associées.....	40
2.2.6 Potentiel thérapeutique	45
Problématique, Hypothèse et Objectif de travail	47
SECTION 2 : Articles	48
Résumé de l'article en français	49
Discussion et conclusion.....	60
Liste des références	66

Liste des abréviations

CR	Récepteur du Complément
DAG	Diacylglycérol
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>
DC	Cellules Dendritiques
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
FcR	Récepteur Fc
fMLP	N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
G-CSF	Facteur de Stimulation des Granulocytes
GM-CSF	Facteur de Stimulation des Granulocytes et Macrophages
HSC	Cellules Souches Hématopoïétiques
MII	Maladie Inflammatoire de l'Intestin
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
IP3	Inositol-Triphosphates
ITAM	« <i>Immuno-Tyrosine Activating Motif</i> »
ITIM	« <i>Immuno-Tyrosine Inhibitory Motif</i> »
KDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharides
LT	Lymphocyte T
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
M-CSF	Facteur de Stimulation des Macrophages

MMP	<i>Matrix Metalloprotease</i>
MPO	Myélopéroxidase
MRP	<i>Myeloid-Related Protein</i>
NGAL	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NK	Natural Killer cells
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PI3K	Phosphoinositide-3-Kinase
PKC	Protéine Kinase C
PLCγ	Phospholipase C Gamma
PMA	Phorbol-Méristate-Acéate
PRR	Récepteur de Reconnaissance de Motifs
PS	Phosphatidyl-Sérine
PSGL-1	<i>P-selectine glycoprotein ligand 1</i>
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation End-product</i>
RE	Réticulum Endoplasmique
ROS	Espèce Réactive de l'Oxygène
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TLR	Récepteur Toll-Like
WASP	<i>Wiskot-Aldrich Syndrome Protein</i>

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

- Figure 1 :** Développement d'un neutrophile à partir de la moelle osseuse
- Figure 2 :** Transmigration des leucocytes à travers la barrière endothéiale
- Figure 3 :** Formation séquentielle des granules azurophiliques, spécifiques, gélatinases et des vésicules sécrétaires au cours du développement du neutrophile
- Figure 4 :** Famille des récepteur Fc pour les anticorps IgG
- Figure 5 :** Transduction de signal lors de la liaison de la portion Fc des IgG à leur récepteur
- Figure 6 :** Représentation de la NADPH oxydase d'un neutrophile
- Figure 7 :** Changements morphologiques des neutrophiles apoptotiques
- Figure 8 :** Comparaison d'une articulation normale avec une articulation rhumatoïde
- Figure 9 :** Représentation de la structure secondaire des protéines S100

Liste des tableaux

- Tableau I :** Molécules impliquées dans la transmigration leucocytaire
- Tableau II :** Constituants majeurs des différents granules du neutrophile
- Tableau III :** Cytokines qui sont exprimées et produites par le neutrophile ainsi que leurs effets sur l'immunité
- Tableau IV:** Nomenclature alternative des protéines MRP
- Tableau V:** Corrélation entre la présence de MRP et les maladies inflammatoires

Introduction

Le neutrophile est la cellule la plus abondante du système immunitaire, représentant plus de 60 % des leucocytes totaux circulant. Au cours de sa courte vie d'environ 24 heures, le neutrophile migre dans les tissus où il phagocyte et détruit les micro-organismes pathogènes en phagocytant et en libérant des réactifs oxygénés ainsi que le contenu de ses granules. Cette cellule meurt par la suite par apoptose avant d'être éliminée par les macrophages. Les protéines S100A8, S100A9 et S100A12 sont libérés dans le milieu extracellulaire entre autre par le neutrophile lors de son activation ou de sa mort par nécrose. Ces protéines sont connues de par leur concentration extrêmement élevée dans les pathologies inflammatoires chroniques comme la maladie de Crohn, l'arthrite rhumatoïde, la goutte ou la fibrose kystique. De plus, on sait maintenant qu'elles jouent un rôle de premier plan dans le comportement pro-inflammatoire du neutrophile et dans la pathogénèse et/ou l'exacerbation des pathologies inflammatoires. En plus d'induire la chimiotaxie des neutrophiles, les protéines S100A8 et S100A9 induisent une augmentation de l'expression et l'activation des $\beta 2$ -intégrines CD11b/CD18, favorisant l'adhésion des neutrophiles. S100A9 augmentent également la transmigration des neutrophiles à travers la barrière endothéliale. Le but de cette étude était d'approfondir nos connaissances sur l'effet des protéines S100A8 et S100A9 dans la physiologie des neutrophiles. Nous nous sommes attardés particulièrement à l'effet de ces protéines sur la dégranulation des neutrophiles, une fonction biologique de cette cellule qui est essentielle aux différentes phases de la réponse immunitaire. En plus de permettre aux neutrophiles d'acquérir plusieurs récepteurs et molécules d'adhésion, cette fonction est essentielle à la migration des phagocytes afin de dégrader la matrice extracellulaire des cellules endothéliales et les protéines des jonctions serrées. Enfin, nous avons également investigué le rôle des MAPK dans ce processus.

SECTION 1 : SYNTHÈSE

Chapitre 1 : Le neutrophile et l'inflammation

Le système immunitaire des mammifères est un assemblage complexe de molécules et de cellules spécialisées remplissant chacune des fonctions bien spécifiques. Il a évolué de manière à protéger l'organisme contre les multiples agents infectieux de l'environnement. Tout comme les cellules dendritiques (DC) et les monocytes/macrophages, les neutrophiles font partie des cellules régulant la réponse immunitaire innée. Cette dernière est définie comme la réponse non-spécifique d'un organisme à l'invasion d'un pathogène quelconque (Paul, 2008). En effet, l'immunité innée offre la première barrière immunitaire contre les pathogènes envahisseurs. Par contre, l'immunité innée n'offre aucune protection contre une réinfection envers ce même pathogène, comparativement à l'immunité acquise qui développe une mémoire dite immunologique. Les neutrophiles représentent la majeure partie des phagocytes se retrouvant au niveau de la circulation. Ces cellules, ayant un temps de demi-vie très court, entrent rapidement en apoptose si elles ne se trouvent pas stimulées par aucun signal. Dans ce chapitre, on introduit un portrait global des fonctions et des rôles essentiels que cette cellule joue dans la réponse immunitaire, plus spécifiquement dans l'élaboration de la réponse inflammatoire.

1.1 Le développement du neutrophile

Le neutrophile est la cellule immunitaire la plus abondante. Environ 10^{11} neutrophiles meurent et sont renouvelés chaque jour chez l'être humain. Lorsque les mécanismes d'apoptose du neutrophile prennent place, ces derniers sont phagocytés par les macrophages ou les CD. Cette réponse est physiologique et permet l'élimination des neutrophiles sans le déclenchement de la réponse inflammatoire. Ils sont rapidement remplacés par les neutrophiles matures ayant terminé leur développement dans la moelle osseuse.

La grande majorité des cellules produites dans la moelle osseuse sont des neutrophiles (**figure 1**). Tous les neutrophiles matures proviennent d'abord de la différenciation d'une cellule souche multipotente. Ces cellules multipotentes passeront par différents stades de différenciation avant de devenir des neutrophiles matures. L'identification des stades de différenciation est basée entre autre sur la grosseur de la cellule, la morphologie nucléaire et le contenu des granules (Bainton, Ullyot et al., 1971; Borregaard et Cowland, 1997; Witko-Sarsat, Rieu et al., 2000). Au cours de sa différenciation, le neutrophile acquiert diverses propriétés comme la possibilité de former des pseudopodes, d'ingérer des particules et d'avoir une motilité beaucoup plus grande (Lichtman et Weed, 1972). Dans l'ordre, nous avons les myéloblastes, les promyélocytes, les myélocytes, les métamyélocytes, les neutrophiles «band» et enfin, les neutrophiles matures (Witko-Sarsat, Rieu et al., 2000).

Les myéloblastes sont de petites ($10\mu\text{m}$) cellules multipotentes non-différenciées capables de proliférer vivement. Ils possèdent un très faible ratio cytoplasme/noyau et un gros noyau prédominant. Le cytoplasme des myéloblastes est presque complètement exempt de granules, mais contient une bonne quantité de mitochondries.

Les promyélocytes peuvent être reconnus par leur plus grande taille ($15\mu\text{m}$) et leur noyau à forme très arrondie. De plus, ces cellules possèdent une grande quantité de granules péroxidase-positives, c'est-à-dire beaucoup de granules azurophiliques. À ce stade de différenciation, plusieurs récepteurs de surface des neutrophiles matures commencent à apparaître comme le CR1, le CR3 (Ross, Jarowski et al., 1978) et le CD16, un marqueur typique des neutrophiles (Glasser et Fiederlein, 1987).

Les myélocytes sont plus petits que leur précurseur ($10\mu\text{m}$) et sont les derniers précurseurs de neutrophiles à subir la mitose. À ce stade, on observe également la formation des granules spécifiques et gélatinases. C'est à ce stade que cesse la formation des granules primaires ou azurophiliques. Quant à la forme du noyau, elle devient très irrégulière et le ratio cytoplasme/noyau augmente. Enfin,

l'appareil de golgi de ce type cellulaire est plus développé que les types précédents.

Les stades métamyélocytes, neutrophiles «band» et neutrophiles matures sont tous des stades dits non-mitotiques. Les neutrophiles acquièrent leurs caractéristiques finales comme une très grande quantité de granules mixtes. On compte environ deux fois plus de granules spécifiques que de granules azurophiliques. À ces stades, on peut observer la formation des vésicules sécrétaires. La forme caractéristique du noyau polylobé des neutrophiles commence à se former au stade métamyélocyte et se termine complètement au stade neutrophile segmenté ou mature.

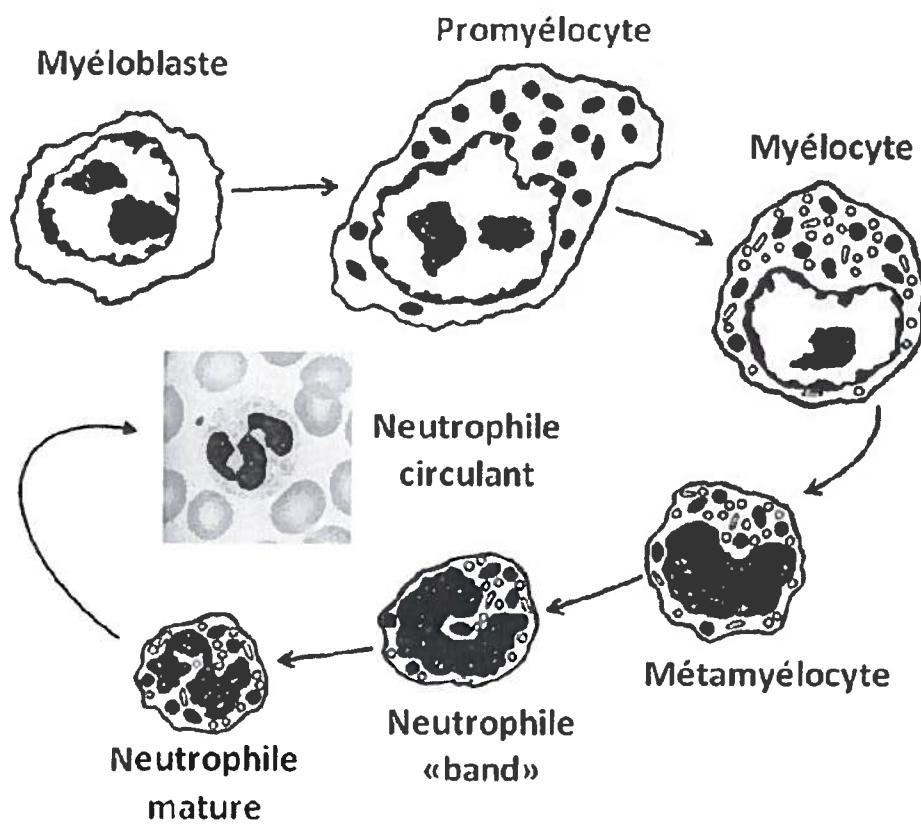


Figure 1 : Développement d'un neutrophile à partir de la moelle osseuse

Modifiée de (Bainton, Ulliyot et al., 1971)

1.2 Les fonctions du neutrophile

Dans un organisme où plusieurs milliards de cellules vivent, chacun des types cellulaires doit inévitablement remplir sa propre fonction. Les neutrophiles jouent principalement un rôle de destruction des pathogènes en phagocytant ces derniers. De plus, les neutrophiles détruisent les pathogènes en effectuant la dégranulation et la production de réactifs oxygénés, deux fonctions qui seront élaborées plus en détail ci-bas. Par le biais de la libération de médiateurs inflammatoires, le neutrophile régule activement les autres composantes du système immunitaire. Par exemple, la libération de plusieurs cytokines et chimiokines par les neutrophiles attire et active les lymphocytes Th17 (Pelletier, Maggi et al., 2009), qui régulent à leur tour plusieurs types cellulaires participant à la réponse immunitaire innée ou acquise. Carl Nathan offre une vue très représentative du rôle des neutrophiles dans l'immunité (Nathan, 2006).

1.2.1 L'activation du neutrophile

Les neutrophiles circulant dans le sang demeurent dans un état quiescent ou non-activé. Lors d'une infection ou d'un stress, les cellules des tissus peuvent être activées en présence de pathogènes. Ces dernières libèrent des médiateurs inflammatoires afin de signaler le danger à l'organisme. Plusieurs de ces molécules sont de puissants activateurs des neutrophiles comme par exemple l'IL-8 qui est un chimio-attractant. Les neutrophiles activés subissent alors d'importants changements morphologiques et physiologiques ce qui leur permet de mieux exercer leurs multiples fonctions dans l'immunité. Les neutrophiles activés ont notamment une forme beaucoup moins arrondie que les neutrophiles quiescents. De plus, les cellules activées expriment davantage certains récepteurs nécessaires à l'élimination des pathogènes comme les récepteurs du complément ou du fMLP via, entre autres, le phénomène de dégranulation qui sera élaboré plus en détail plus loin dans ce travail.

1.2.2 L’adhésion

L’adhésion des neutrophiles sur la paroi endothéiale nécessite des interactions moléculaires et débute d’abord par l’interaction des sélectines avec certains ligands glycosylés. En effet, l’inflammation engendrée par le pathogène au niveau des tissus induit la production de plusieurs cytokines inflammatoires qui activent les cellules endothéliales environnantes. Ces dernières se trouvent ainsi à augmenter le nombre de ligands glycosylés à leur surface comme E-selectine (Kansas, 1996) et la P-sélectine (McEver et Cummings, 1997). Ces sélectines interagissent avec la PSGL-1 et la L-Sélectine sur les leucocytes et permettent au neutrophile d’effectuer le phénomène de roulement et de ralentir au niveau de l’endothélium inflammé. Les sélectines ne sont pas les seules molécules de surface à permettre le ralentissement leucocytaire. Certaines intégrines participent activement dans le roulement comme certaines β_1 et β_2 intégrines (Dunne, Ballantyne et al., 2002; Salas, Shimaoka et al., 2004) à la surface des neutrophiles permettent des interactions avec ICAM-1 exprimé par les cellules endothéliales (Chesnutt, Smith et al., 2006).

Le ralentissement des neutrophiles à proximité des cellules endothéliales activées permet l’activation des neutrophiles. En effet, la présence de cytokines et de chimiokines près des sites inflammatoires induit l’activation du neutrophile qui se traduit en une activation rapide des intégrines de surface (Laudanna, Kim et al., 2002). L’activation du neutrophile permet la transmission d’un signal dit «inside-out» qui induit un changement de conformation des intégrines de surface, qui adopteront donc dans une conformation active (Kinashi, 2005). La proximité du neutrophile avec les cellules endothéliales permet à celui-ci d’adhérer fermement à la paroi via ses intégrines (Campbell, Qin et al., 1996; Campbell, Hedrick et al., 1998). L’activation des intégrines de surface est dépendante de la MAPK p38 (Simon, Hu et al., 2000). L’adhésion ferme des neutrophiles permettra, par la suite, leur migration à travers la paroi endothéliale vers le site inflammatoire par transmigration.

1.2.3 La transmigration

La transmigration débute par l'adhésion ferme des neutrophiles à l'endothélium vasculaire. De plus, la production de cytokines par les cellules endommagées et/ou activées (comme les macrophages) cause la dilatation locale des vaisseaux sanguins, augmentant ainsi l'apport sanguin et, par le fait même, le nombre de cellules immunitaires (Paul, 2008). La transmigration, ou diapédèse, est le processus par lequel le neutrophile quitte la circulation sanguine et migre vers un site d'infection. Cette étape demande aux leucocytes de passer à travers un espace extrêmement restreint. Or, ce processus demande aux neutrophiles un important réarrangement des protéines du cytosquelette. Ce processus n'est que partiellement connu, mais impliquerait la vinculine, l' α -actinine et la taline-1 (Carman et Springer, 2004). De plus, certaines molécules cytoplasmiques comme le complexe protéique ERM (ezrine, radixine et moésine) seraient également impliquées (Barreiro, Yanez-Mo et al., 2002). Le passage entre deux cellules endothéliales est appelé route paracellulaire. En plus des molécules régulant le cytosquelette, ce processus implique une quantité importante de molécules d'adhésion et de jonctions qui sont présentées dans le **tableau I** et la **figure 2**. La liaison des molécules d'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales peut induire un réarrangement des molécules jonctionnelles facilitant ainsi le passage (Shaw, Bamba et al., 2001).

Jusqu'à récemment, il était convenu que la diapédèse des leucocytes s'effectuait par la voie paracellulaire uniquement. Depuis une dizaine d'année, certains groupes de chercheurs ont démenti cette affirmation en démontrant que les neutrophiles pouvaient également traverser la barrière endothéliale en passant directement à travers les cellules endothéliales (Feng, Nagy et al., 1998; Engelhardt et Wolburg, 2004). Cependant, les mécanismes impliquant ce type de transmigration ne sont que très peu connus (**figure 2**).

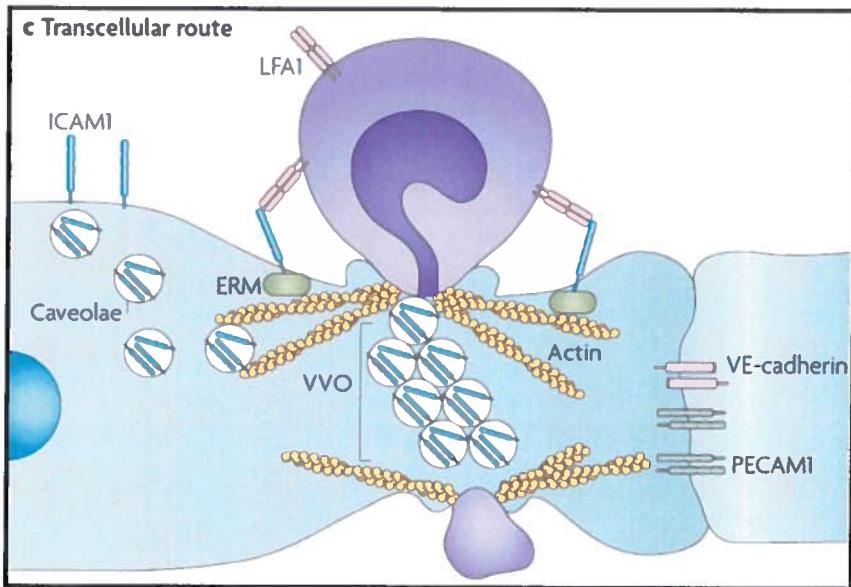
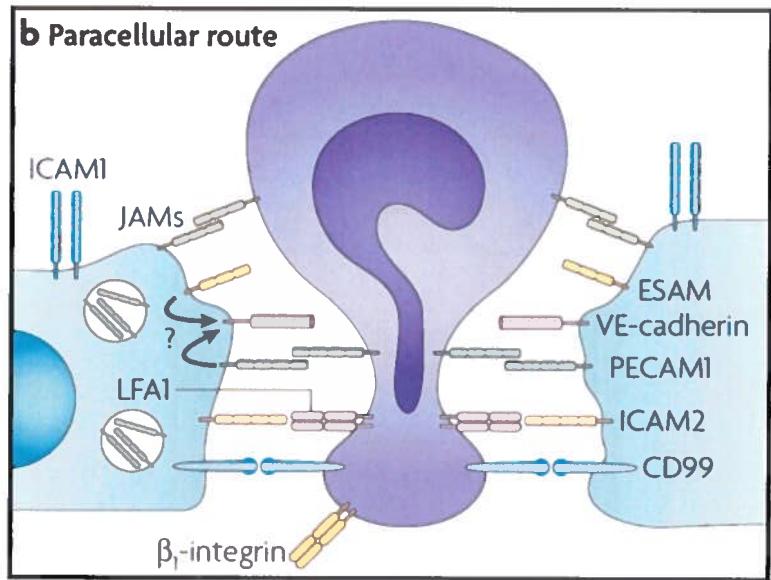


Figure 2 : Transmigration des leukocytes à travers la barrière endothéliale

Figure extraite de (Ley, Laudanna et al., 2007)

Tableau I : Molécules impliquées dans la transmigration leucocytaire

Molécules de jonction	Ligand des leucocytes
PECAM1	PECAM1
JAM-A	LFA-1
JAM-B	VLA4
JAM-C	MAC1
ICAM2	MAC1
CD99	CD99
CD99L2	Non-connu
ESAM	Non-connu

1.2.4 La dégranulation

La dégranulation est un processus par lequel le neutrophile libère le contenu de ses granules par exocytose. L'exocytose des granules se produit, entre autres, lors de l'activation du neutrophile par divers agents comme certaines cytokines pro-inflammatoires ou encore lors de la reconnaissance d'un pathogène par l'un des récepteurs de surface. Le neutrophile possède 4 types de granules contenant certaines protéines communes ou distinctes les unes des autres. Ils sont formés séquentiellement au cours des différentes étapes de différentiation du neutrophile (Bainton et Farquhar, 1966; Bainton, Ullyot et al., 1971) tel qu'illustré dans la **figure 3**.

Le début de la granulopoïèse (formation des granules) qui débutent au stade de promyélocytes est caractérisé par l'apparition de granules contenant une haute teneur en myélopéroxydase (MPO), une enzyme essentielle à la production de réactifs oxygénés (Klebanoff, 1999). Ces granules sont dits «primaires», mais porte également le nom de granules azurophiliques.

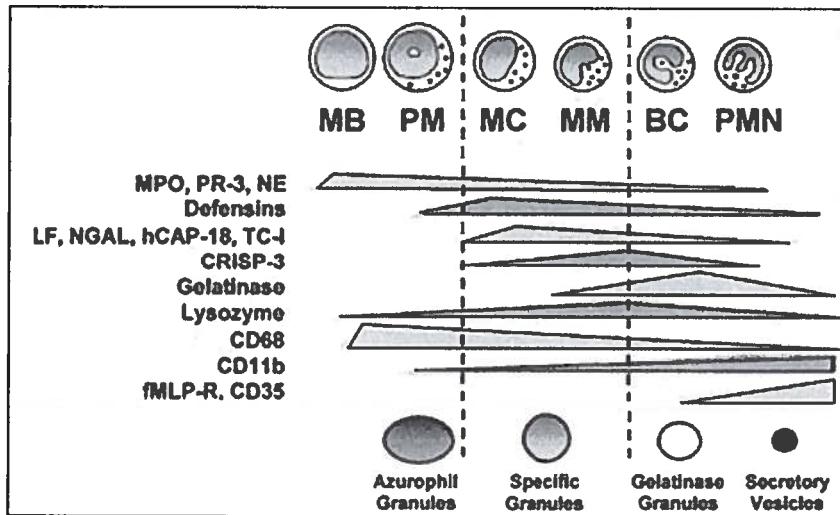


Figure 3: Formation séquentielle des granules azurophiliques, spécifiques, gélatinases et des vésicules sécrétaires au cours du développement du neutrophile

Inspirée de (Faurschou et Borregaard, 2003)

Certaines protéines contenues dans la membrane des granules permettent de les différencier des autres compartiments cellulaires comme, notamment, la granulophysine ou CD63, une protéine lysosomale membranaire (Cham, Gerrard et al., 1994). Cependant, contrairement aux lysosomes, les granules azurophiliques ne contiennent pas de «Lysosomes-Associated Membrane Proteins» (LAMP-1 et LAMP-2) (Cieutat, Lobel et al., 1998). Ces granules sont chargés d'hydrolases acides, de protéines antimicrobiennes et joueraient probablement un rôle important pour la dégradation des micro-organismes phagocytés par le neutrophile. L'exocytose de ces granules est extrêmement limitée dû à leur contenu qui peut être dommageable pour l'organisme (Sengelov, Kjeldsen et al., 1993). Le contenu et les marqueurs membranaires de ces granules sont énumérés dans le **tableau II**.

Tableau II. Constituants majeurs des différents granules du neutrophile

Granules azurophiliques (primaires)	Granules spécifiques (secondaires)	Granules gélatinases (tertiaires)	Vésicules sécrétaires
CD63	CD11b/CD18	CD11b/CD18	Phosphatase alkaline
CD68	CD15	CD66b	CD10
Preseniliné	CD66b	Récepteur-fMLP	CD11b/CD18
Stomatine	CD67	Leukolysine (MMP-25)	CD13
Cathepsine	Récepteur-fMLP	Acétyltransférase	CD14
Défensine	Récepteur-Fibronectine	Gélatinase (MMP-9)	CD16
Elastase	Récepteur-Laminine	Lysozyme	CD45
Lysozyme	Leukolysine (MMP-25)	Collégénase (MMP-8)	CD35 ou CRI
MPO	Stomatine	Cytochrome b ₅₅₈	Récepteur-C1q
Protéinase-3	Récepteur-TNF		Récepteur-fMLP
Bacterial/permeability-increasing protein (BPI)	Récepteur-vitronectine		Leukolysine
	Collégénase (MMP-8)		Albumine
	Gélatinase (MMP-9)		
	Histaminase		
	Lactoféline		
	Lysozyme		
	Cytochrome b ₅₅₈		
	NGAL		

La production de MPO cesse environ à la transition du stage promyélocyte à celui de myélocyte. De cette façon, les granules formés ultérieurement seront peroxydase-négatives, dû à l'absence de MPO dans ces dernières. Ainsi, les granules secondaires et tertiaires, également appelés spécifiques et gélatinases respectivement, sont formés au moment où la MPO cesse d'être produite. Les granules spécifiques, formés lors des stades myélocytes et métamyélocytes, sont caractérisés par une teneur élevée en lactoféline et une teneur relativement faible

en gélatinase (Borregaard, Sehested et al., 1995). Les granules gélatinases sont, quant à eux, plutôt formés lors des stades juvéniles et neutrophiles segmentés et sont caractérisés par un contenu riche en gélatinase et pauvre en lactoféline (Kjeldsen, Bainton et al., 1993). Ces deux derniers types de granules participent activement dans l'activité anti-microbienne des neutrophiles en mobilisant leur contenu au niveau du phagosome (Jesaitis, Buescher et al., 1990) ou au niveau du milieu extracellulaire (Borregaard, Heiple et al., 1983). En plus de la gélatinase (Kjeldsen, Bjerrum et al., 1992) et de la lactoféline (Masson, Heremans et al., 1969), les granules peroxydases-négatives possèdent un large spectre de peptides/protéines ayant une importance cruciale pour la dégradation de la matrice extracellulaire facilitant ainsi la migration des leucocytes (Berrick, Campbell et al., 1999; Owen et Campbell, 1999) comme par exemple la collagénase ou MMP-8 (Lazarus, Brown et al., 1968; Murphy, Reynolds et al., 1977) et la leukolysine (Pei, 1999; Kang, Yi et al., 2001). Ces enzymes jouent un rôle essentiel dans la dégradation de la matrice extracellulaire composée notamment de collagène, fibronectine, protéoglycan, laminine et de gélatine.

Enfin, les vésicules sécrétoires, qui sont formées par endocytose (Borregaard, Miller et al., 1987), représentent un réservoir de récepteurs associés à la membrane requis pour les phases précoce de la réponse inflammatoire. La mobilisation des vésicules sécrétoires est accompagnée d'une libération de L-selectine (Borregaard, Kjeldsen et al., 1994) ainsi que d'une augmentation des β 2-intégrines CD11b/CD18 (Sengelov, Kjeldsen et al., 1993) favorisant ainsi l'adhésion ferme du neutrophile sur l'endothélium. En plus d'augmenter l'adhésion, l'augmentation des récepteurs du complément 1 (Sengelov, Kjeldsen et al., 1994) et 3 ainsi que des récepteurs du fMLP (Sengelov, Boulay et al., 1994), des endotoxines (CD14) et des portions Fc des anticorps (CD16) (Detmers, Zhou et al., 1995) permettent au neutrophile d'acquérir les récepteurs nécessaires à la reconnaissance et à la destruction des pathogènes.

Quoique les voies signalétiques impliquées dans le processus de dégranulation soient complexes et seulement partiellement connues, la mobilisation hiérarchique

des granules décrite ci-haut peut être reproduite *in vitro* par l'élévation graduelle du calcium intracellulaire. Plusieurs agonistes ont montré la capacité d'induire une dégranulation par la liaison à leur récepteur respectif comme le CD11b/CD18, le fMLP et le PMA (Ng-Sikorski, Andersson et al., 1991; Laudanna, Constantin et al., 1994). L'activation du CD11b/CD18 induit une phosphorylation des protéines tyrosines kinases cytoplasmiques (Bertoni, Fumagalli et al., 1994) qui elles-mêmes phosphorylent et activent une gamme de protéines cytoplasmiques incluant les phospholipases C γ 2 et D (Hellberg, Molony et al., 1996) qui généreront à leur tour des inositol-triphosphates (IP3) ainsi que du diacylglycérol (DAG). Enfin, ces molécules modulent l'activation de la protéine kinase C (PKC) permettant l'influx de calcium intracellulaire nécessaire à la dégranulation. Évidemment, plusieurs autres voies signalétiques modulent les mécanismes de dégranulation comme les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) (Krump, Sanghera et al., 1997; Herlaar et Brown, 1999; Mocsai, Jakus et al., 2000).

Il est important de mentionner que la dégranulation s'effectue de manière naturelle par le neutrophile lors de la diapédèse vers les tissus. Le recrutement des neutrophiles implique une série d'événements exocytaires qui modifieront l'aspect et le comportement de la cellule comme l'augmentation du nombre de récepteurs à sa surface. Évidemment, la dégranulation est un processus contrôlé par la cellule de manière très spécifique. En fait, tous les granules ne seront pas libérés en même temps au niveau temporel et sont entièrement dépendants de l'agoniste activant le neutrophile (Sengelov, Kjeldsen et al., 1993; Sengelov, Follin et al., 1995). Les granules sont formés mais également libérés les un à la suite des autres. En général, les granules formés en premier sont les derniers à être libérés dans le milieu extracellulaire. Ainsi, les vésicules sécrétaires représentent les premiers granules à être libérés au niveau extracellulaire (Sengelov, Follin et al., 1995). Puis, viennent le tour des granules gélatinases et des granules spécifiques. Enfin, les granules azurophiliques sont le dernier type à être libérés. Le contenu riche en enzymes ayant un fort pouvoir dégradant explique en partie le fait que les granules azurophiliques ne sont déchargés que très faiblement et uniquement en réponse à un stimulus puissant puisque ces enzymes pourraient

avoir un effet destructeur sur l'organisme (Estensen, White et al., 1974; Faurschou, Sorensen et al., 2002). Enfin, la diversité du contenu des différents granules permet au neutrophile de cibler les micro-organismes de différentes façons. Mentionnons, par exemple, les défensines (Wimley, Selsted et al., 1994) et les lysozymes (Tanida, Ohno et al., 1992) qui agissent en perturbant la membrane bactérienne ou le «Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin» (NGAL) et la lactoféline (Oram et Reiter, 1968) qui interfèrent avec le métabolisme dépendant du fer des bactéries. Enfin, le cytochrome b_{558} et la MPO (Klebanoff, 1999) participent activement à la production de réactifs oxygénés. Bref, la dégranulation du neutrophile joue un rôle essentiel dans la migration de celui-ci ainsi que dans la destruction des micro-organismes envahisseurs.

1.2.5 La phagocytose

Les cellules ont évolué de manière à posséder une variété de stratégies afin d'internaliser des particules. Ces stratégies incluent la micropinocytose, l'endocytose également appelé macropinocytose ainsi que la phagocytose (Rabinovitch, 1995; Silverstein, 1995; Aderem et Underhill, 1999; May et Machesky, 2001). La micropinocytose et l'endocytose servent essentiellement à l'internalisation de petites particules et à l'échantillonnage de fluides du milieu extracellulaire. Ces deux types d'internalisation ne seront pas abordés dans le mémoire. La phagocytose, quant à elle, a été observée pour la première fois, il y a plus de 130 ans, par le scientifique Elie Metchnikoff (1880). Elle est définie comme l'internalisation de particules plus grandes ou égales à 0.5 μm . Ce processus est essentiel non seulement à l'homéostasie tissulaire (Lauber, Blumenthal et al., 2004; Ravichandran et Lorenz, 2007), mais également à l'internalisation et à la destruction des pathogènes (Nathan, 2006).

Le processus de phagocytose des phagocytes, comme le neutrophile, débutent par une étape de reconnaissance de la particule à ingérer suivie d'une étape d'attachement. Afin de discriminer les agents pathogènes du soi, les phagocytes

possèdent un certain nombre de récepteurs phagocytaires qui reconnaissent les motifs conservés à la surface des pathogènes et des cellules apoptotiques. La phagocytose se produit donc par la liaison d'un ligand aux récepteurs à la surface du phagocyte (Aderem et Underhill, 1999; May et Machesky, 2001). La reconnaissance et la phagocytose des pathogènes par le neutrophile sont grandement augmentées lorsque les cellules sont opsonisées à l'aide des immunoglobulines (IgG) ou des molécules du complément (iC3b). Ces opsonines sont reconnues par les récepteurs à la surface du neutrophile. Ainsi, on observe deux types de phagocytoses associées aux opsonines : la phagocytose dite dépendante des récepteurs Fc et la phagocytose dépendante des récepteurs du complément (CR1 ou CD35, CR3 ou CD11b/CD18 et le CR4 ou CD11c/CD18). La reconnaissance d'un pathogène par le neutrophile mène à la formation de structures appelés phagopodes permettant d'entourer peu à peu le pathogène. Une fois le pathogène entièrement englouti, il forme, avec la membrane qui l'entoure, une structure qu'on appelle phagosome (Swanson et Baer, 1995). Par la suite, certains granules cytoplasmiques appelés lysosomes ainsi que les granules azurophiliques fusionnent avec le phagosome, déchargeant ainsi leur contenu riche en éléments microbicides. On nomme cette vacuole phagolysosome. C'est grâce au contenu de ces granules que le pathogène sera détruit. Le processus phagocytaire est très complexe et que partiellement compris. Par contre, la prochaine section traitera en détail des événements cellulaires connus qui sont nécessaires à l'internalisation des particules par les neutrophiles en débutant par l'étape de reconnaissance de la particule par les récepteurs cellulaires Fc.

Plusieurs récepteurs Fc (FcR) sont présents à la surface du neutrophile (Revue dans permettant d'enclencher le processus phagocytaire (Nimmerjahn et Ravetch, 2008)). Les différents IgG humain, soient les IgG 1-4, se fixent avec une affinité très variable à chacun des récepteurs (Bruhns, Iannascoli et al., 2009).

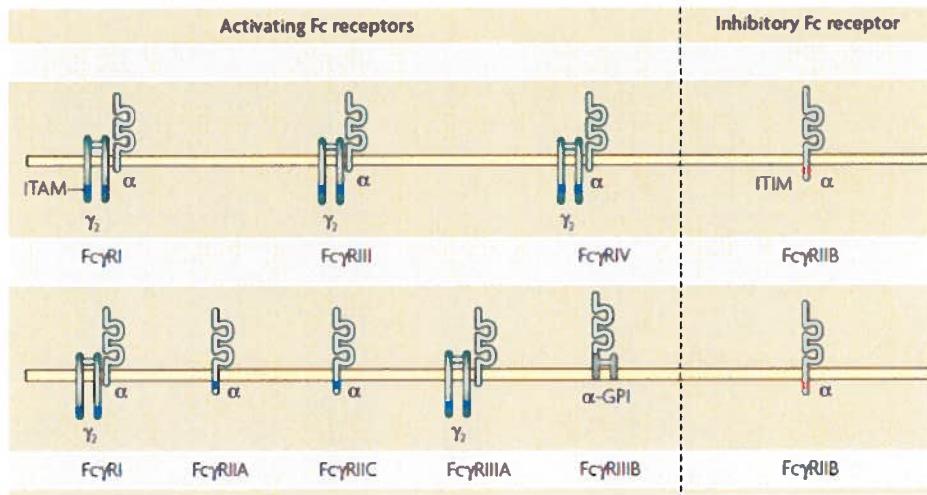


Figure 4: Famille des récepteur Fc pour les anticorps IgG

Inspirée de (Nimmerjahn et Ravetch, 2008)

Outre le CD16 qui possède une ancre GPI (Scallon, Scigliano et al., 1989) et le FcγRIIB qui possède un ITIM (Daeron, Jaeger et al., 2008), les récepteurs Fcγ possèdent une portion cytoplasmique ITAM (Reth, 1989) qui s'active par phosphorylation lors de la ligation de la portion Fc de l'IgG. Cette phosphorylation induite par les kinases de la famille des Src (Ghazizadeh, Bolen et al., 1994) comme les Hck, Lyn (Wang, Scholl et al., 1994) et également la protéine Syk (Kiener, Rankin et al., 1993) joue un rôle essentiel dans la transduction du signal et l'internalisation des particules puisque les macrophages déficients en Syk sont incapables d'internaliser des particules opsonisées aux IgG (Crowley, Costello et al., 1997). La phosphorylation des kinases Src induit le recrutement de protéines adaptatrices ainsi que le complexe protéique PI3K. La formation de PI(3,4,5)P₃ par la PI3K permet, entre autres, l'activation de la PLC γ et des MAPK ERK1/2 (Coxon, Rane et al., 2000). L'activation de la PLC γ entraîne une augmentation du calcium intracellulaire (Liao, Shin et al., 1992), un messager secondaire très important pour la signalisation en aval (Odin, Edberg et al., 1991). Ce messager intracellulaire joue un rôle essentiel dans la formation de la coupe phagocytaire (Sawyer, Sullivan et al., 1985). Il est important de mentionner que le niveau de calcium intracellulaire est essentiel uniquement pour

la phagocytose régie par les récepteurs Fc et non pour la phagocytose dépendante des CR (Della Bianca, Grzeskowiak et al., 1990).

D'autres molécules sont également impliquées dans le phénomène de phagocytose. Depuis 1977, nous savons que le réarrangement du cytosquelette d'actine est crucial dans la formation de phagopodes (Kaplan, 1977), un changement conformationnel de la membrane permettant l'internalisation des particules. L'internalisation de particules requiert donc l'activation et le recrutement des molécules régulatrices du cytosquelette d'actine de la cellule. Les molécules Rho GTPases Rac1, Rac2 ainsi que Cdc42 sont les plus importantes régulant la polymérisation de l'actine et sont connues pour être impliquées dans une panoplie de fonctions cellulaires (Tapon et Hall, 1997; Aspenstrom, 1999), dont la phagocytose puisque l'inhibition de l'une ou l'autre de ces protéines bloque l'assemblage d'actine et la formation du phagosome. L'importance de ces Rho GTPases s'applique encore uniquement à la phagocytose dépendante des FcR étant donné que la phagocytose régulée par les CR ne semble pas être dépendante de Rac1 et de Cdc42 (Caron et Hall, 1998). L'activation des GTPases par les Src kinases, entre autre, mène au recrutement de protéines effectrices en aval comme la «Wiskot-Aldrich Syndrome Protein» (WASP) (revue dans (Thrasher, 2002)). Cette protéine permet de faire un lien direct entre les Rho-GTPases et les protéines pouvant se lier à l'actine. De plus, cette protéine est essentielle à l'internalisation de particules chez les macrophages et les neutrophiles (Lorenzi, Brickell et al., 2000; Tsuboi et Meerloo, 2007). Le rôle de cette protéine est encore peu connu. Cependant, nous savons qu'elle est essentielle au recrutement d'un complexe protéique responsable de la nucléation et la polymérisation de l'actine, le complexe Arp2/3 qui est essentiel pour les deux types de phagocytoses (Machesky et Gould, 1999; Ten Klooster, Evers et al., 2006). Nous savons également que ce complexe est maintenu en conformation inactive jusqu'à l'activation de Cdc42 et de WASP qui survient lors de liaison de la portion Fc aux récepteurs (Prehoda, Scott et al., 2000). Certaines protéines associées aux microfilaments ont également des rôles importants à jouer pour la polymérisation de l'actine. La plupart de ces protéines sont des molécules pouvant lier directement

l'actine. Parmi celles-ci, on dénote la taline, l' α -actinin, la vinculine, la gelsoline, la coronine, la cofiline et la paxiliné (Greenberg, 1999; Garcia-Garcia et Rosales, 2002). Ces protéines régulent la dynamique de l'actine par différents mécanismes incluant la nucléation de l'actine, le «cross-linking», la stabilisation des filaments d'actine et enfin, l'ancrage de l'actine à la membrane (May et Machesky, 2001).

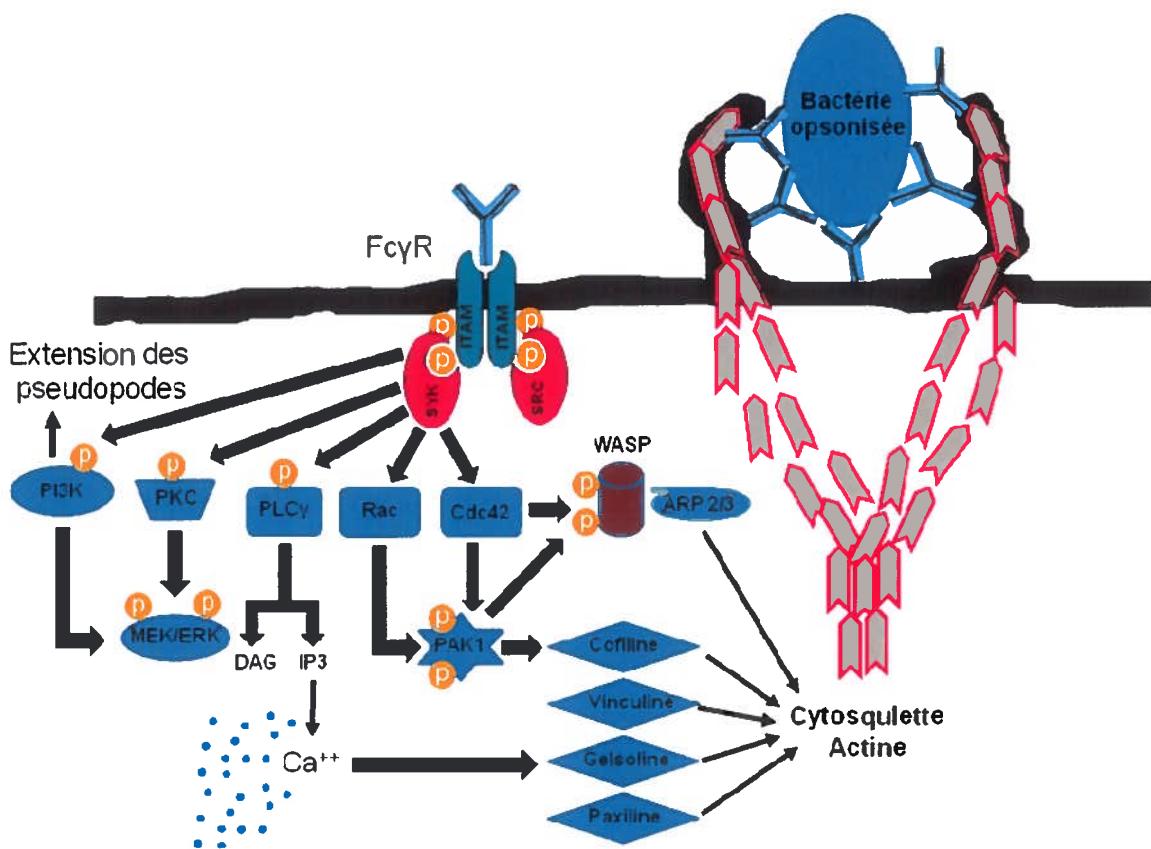


Figure 5: Transduction de signal lors de la liaison de la portion Fc des IgG à leur récepteur

La phagocytose dépendante des CR est beaucoup moins étudiée et donc également moins comprise. Cependant, tout comme la phagocytose dépendante des récepteurs Fc, elle débute par une phosphorylation des récepteurs (phosphorylation de la chaîne β de l'intégrine). Les événements de signalisation en amont sont très complexes principalement à cause du grand nombre d'interactions latérales (Cis) entre le récepteur et d'autres protéines membranaires. Par exemple, on a démontré que le CR3 s'associe avec le CD16 (Zhou, Todd et al., 1993). De plus, des études antérieures ont démontré un rôle important des intégrines CD11b/CD18 dans la phagocytose de particules non opsonisées (Thornton, Vetvicka et al., 1996) ou opsonisées aux IgG (Graham, Gresham et al., 1989; van Spriel, Leusen et al., 2001).

L'activation du neutrophile par les FcR engendre également une panoplie d'événements servant à élaborer une réponse immunitaire efficace contre les pathogènes. Par exemple, on note la production de plusieurs types de cytokines, le retard de l'apoptose et l'induction des mécanismes servant à la destruction des microbes comme la production de réactifs oxygénés, traité plus en détail dans la prochaine section (Nathan, 2006).

1.2.6 La flambée oxydative et la production de réactifs oxygénés

Lorsque stimulés de manières appropriées, les phagocytes professionnels, comme les neutrophiles et les macrophages, subissent d'importants changements physiques et biochimiques dont la consommation brusque d'oxygène qu'on a appelée flambée oxydative (Baldridge et Barer, 1931). En 1973, il fut démontré que la production d'anion superoxyde O_2^- était une conséquence directe de cette production d'oxygène brusque (Babior, Kipnes et al., 1973). Les neutrophiles représentent le phagocyte professionnel pouvant produire la plus grande quantité de réactifs oxygénés (H_2O_2 , HOCl et O_2^-). Ces molécules interagissent fortement avec les protéines, les lipides et les acides nucléiques des bactéries, rendant ces dernières non-fonctionnelles. La production des réactifs oxygénés s'effectue,

entre autres, par un complexe protéique désassemblé dans les cellules quiescentes : la NADPH oxydase (Roos, van Bruggen et al., 2003). Ce complexe protéique catalyse la réaction suivante :



Une dismutation subséquente par l'enzyme superoxyde dismutase peut également se produire selon la réaction suivante :



À partir de ces deux produits, la cellule peut produire une bonne quantité de réactifs oxygénés (ROS) comme des hydroxyles, des radicaux libres ou de l'ozone (Robinson, 2008).

La NADPH oxydase se compose d'éléments membranaires et d'éléments cytoplasmiques. Le flavocytochrome b₅₈₈ est l'élément membranaire composé d'un hétérodimère, formé des protéines gp91_{phox} et p22_{phox}. Lors de l'activation du phagocyte, les éléments cytosoliques (p67_{phox}, p47_{phox} et p40_{phox}) sont recrutés (**figure 6**) et assemblés à la membrane du phagosome (Nauseef, 2004). Tous les éléments sont essentiels au bon fonctionnement de ce complexe protéique puisqu'une mutation dans l'un ou l'autre des gènes codant pour ces protéines, entraîne des conséquences graves pour l'organisme; conséquences qui seront étudiées plus loin au cours de ce travail.

Les ROS ne sont pas les seuls agents oxydants responsables de la destruction de micro-organismes. Le neutrophile possède également la NO synthétase, l'enzyme responsable de la production d'oxyde nitrique (NO).

La NADPH oxydase n'est pas le seul complexe macromoléculaire à produire des réactifs oxygénés. En effet, la mitochondrie est également une source importante de ROS, quoique relativement faible pour les phagocytes possédant la NADPH oxydase (Lambert et Brand, 2009). La production des ROS provient principalement de la chaîne de transport des électrons lors de la respiration

cellulaire. Quoique faibles, ces sources de ROS ne sont cependant pas négligeables pour la physiologie cellulaire et, en particulier, celle du neutrophile. En effet, les agents oxydants produits par les neutrophiles ont une double fonction à jouer. En plus de représenter le moyen le plus efficace pour la destruction des pathogènes, les ROS participent activement à la signalisation cellulaire en tant que messager secondaire en régulant diverses voies. Ils servent premièrement de modulateurs de protéines kinases, de phosphatases, de récepteurs membranaires et de plusieurs facteurs de transcription comme le NF- κ B, régulant ainsi la production de cytokines et de chimiokines. Ces cytokines ont par la suite un effet très important sur tout l'organisme. De plus, les ROS modulent plusieurs autres fonctions des neutrophiles comme la phagocytose et l'apoptose (Fialkow, Wang et al., 2007).

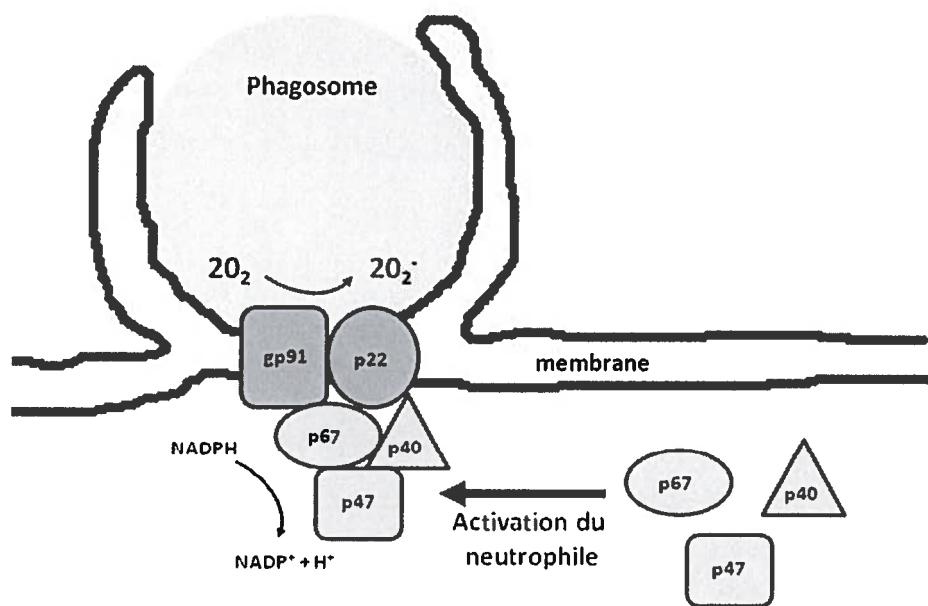


Figure 6: Représentation de la NADPH oxydase d'un neutrophile

1.2.7 La production de cytokines

Les cytokines sont de petites molécules solubles produites par les différentes cellules d'un organisme leur permettant de communiquer entre elles. Ces protéines ont de faibles poids moléculaires, généralement entre 8 et 15 KDa, et contrôlent plusieurs fonctions cellulaires comme les processus de croissance ou de survie, l'apport en cellules immunitaires et le processus inflammatoire en général (Paul, 2008). La capacité d'une cytokine à agir sur une cellule dépend principalement de la présence de son récepteur à la surface de la cellule. Le neutrophile représente une source importante de cytokines produites lors d'une infection bactérienne ou virale (Nathan, 2006). Par contre, il exprime peu de cytokines avant son activation. À la suite d'une stimulation appropriée, il exprimera plusieurs cytokines nécessaires à une bonne réponse immunitaire comme l'IL-1, l'IL-8, l'IL-12, l'INF- α ou le GM-CSF (Denkers, Del Rio et al., 2003).

Tableau III: Cytokines qui sont exprimées et produites par le neutrophiles ainsi que leurs effets sur l'immunité

Inspiré de (Ottonello, Cutolo et al., 2002), (Cassatella, 1999) et (Scapini, Lapinet-Vera et al., 2000)

Cytokines et chémokines	Effets sur l'immunité
IL-1 α/β	Fièvre, activation de macrophages et des neutrophiles Prolifération et activation des cellules B et NK. Augmente l'adhésion des neutrophiles et monocytes
IL-3	Facteur de croissance hématopoïétique, effet sur les cellules vasculaires
IL-4	Activation, Prolifération et différenciation des B et T. Effets pro et anti-inflammatoires. Augmente phagocytose des neutrophiles, retarde l'apoptose
IL-6	Prolifération et différenciation des B, T et Th17. Fièvre
IL-8	Activation, adhésion et chimio-attraction des neutrophiles

IL-10	Cytokines de type Th2. Rôle d'inhibition de synthèse de certaines cytokines des macrophages, LT et mastocytes
IL-12	Cytokines de type Th1. Prolifération des T et NK. Induit synthèse d'autres cytokines pro-inflammatoires comme INF-γ et TNF-α
TNF-α	Prolifération des B et T, activation de plusieurs types cellulaires dont le neutrophile, impliqué dans l'angiogénèse, effets pro-apoptotiques
INF-α	Impliqué dans la réponse anti-virale, augmente l'expression des CMH 1
GRO-α	Chimio-attractant des neutrophiles, LT et fibroblastes.
GM-CSF	Induit la prolifération et développement des granulocytes et macrophages, retardé l'apoptose des neutrophiles et macrophages, activation des neutrophiles et macrophages
G-CSF	Induit la prolifération et développement des granulocytes
M-CSF	Induit la prolifération et développement des macrophages et granulocytes.
MIP-1α/β	Chimio-attractant puissant des neutrophiles, monocytes, macrophages, DCs, NKs, LTs et basophiles. Cytokines de type Th1
IP-10	Chimio-attractant des LTs, NKs et monocytes/macrophages.

Comme le neutrophile est la première cellule immunitaire à migrer aux sites d'infections, la production de cytokines par cette cellule demeure d'autant plus importante pour l'initiation de la réponse inflammatoire. En effet, l'induction du TNF, par exemple, via la reconnaissance de bactéries par le neutrophile mène à une augmentation de la température corporelle (fièvre) ainsi qu'un effet important sur les neutrophiles et les macrophages (Nathan, 2006; Paul, 2008). Nous pourrions également mentionner la production de G-CSF, M-CSF ou GM-CSF par les neutrophiles qui permet un développement accru des autres cellules immunitaires au niveau de la moelle osseuse. Un sommaire des cytokines produites par le neutrophile est représenté dans le **tableau III**.

1.2.8 L'apoptose et la résolution de l'inflammation

Les principes d'équilibres cellulaires et homéostatiques qui règnent dans un organisme aussi complexe que le nôtre reposent, entre autres, sur l'équilibre qui existe entre l'arrivée des neutrophiles de la moelle osseuse et la disparition de ceux qui meurent par apoptose. À la fin de leur développement, les neutrophiles matures quittent la moelle osseuse avant de se rendre dans la circulation sanguine en attente de signaux d'activation. Les neutrophiles ne recevant pas de signaux pouvant retarder leur mort vont entrer spontanément en apoptose après 24 ou 48 heures. Comme nous l'avons mentionné précédemment, plusieurs signaux peuvent permettre de rallonger le temps de vie des neutrophiles. Le retard d'apoptose du neutrophile lui permet de remplir pleinement ses fonctions afin de mener ultimement à la résolution de l'inflammation et l'élimination complète du pathogène (Kennedy et DeLeo, 2009). Une fois le micro-organisme éliminé, les neutrophiles, qui ont migrés au niveau des tissus, meurent par apoptose et sont rapidement éliminés par les macrophages qui ont une durée de vie beaucoup plus longue (Savill, Wyllie et al., 1989).

Contrairement aux autres cellules, les neutrophiles ne forment pas de corps apoptotiques qui caractérisent généralement une cellule en apoptose (Lauber, Blumenthal et al., 2004). Cependant, plusieurs changements morphologiques auront lieu durant ce processus. Au lieu de ces corps, la cellule se contractera sur elle-même en perdant une bonne quantité de son volume. De plus, son noyau polylobé disparaîtra pour faire place à un noyau pyknotique. Il y aura également condensation et fragmentation de l'ADN. Ce réarrangement du noyau requiert une réorganisation majeure du cytosquelette. En effet, tout au long du processus d'apoptose, les neutrophiles réorganisent leur cytosquelette en clivant, entre autres, plusieurs protéines (Hart, Ross et al., 2000). C'est le cas notamment de la gelsoline (Kothakota, Azuma et al., 1997), de la vimentine et de la lamine-B1 (Moisan et Girard, 2006). Ensuite, plusieurs récepteurs membranaires sont clivés de la surface de la cellule comme par exemple le CD16. Le niveau d'expression

de ce récepteur est d'ailleurs un excellent moyen de différencier les cellules des cellules apoptotiques. Le clivage de récepteurs et de composantes du cytosquelette est dépendant de l'activité protéolytique des caspases qui sont activées lors du processus d'apoptose (Nunez, Benedict et al., 1998). Ces dernières sont essentielles au processus apoptotique régulant la majorité des actions (Boatright et Salvesen, 2003). Enfin, il y a un «flip-flop» des phosphatidylsérines qui sont généralement exprimées sur la surface intérieure de la membrane plasmique et qui se retrouvent sur la face extérieure lors de l'apoptose (Homburg, de Haas et al., 1995). La reconnaissance de ces phosphatidylsérines par les macrophages entraîne la phagocytose des neutrophiles.

La résolution de l'inflammation est associée à l'élimination complète du pathogène. L'absence de celui-ci entraîne un arrêt de la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules des tissus ainsi que les cellules immunitaires. L'absence de ces cytokines et chimiokines mène ainsi à la mort des neutrophiles résiduels, et par conséquent, empêche l'arrivée de cellules immunitaires supplémentaires (Nathan, 2002).

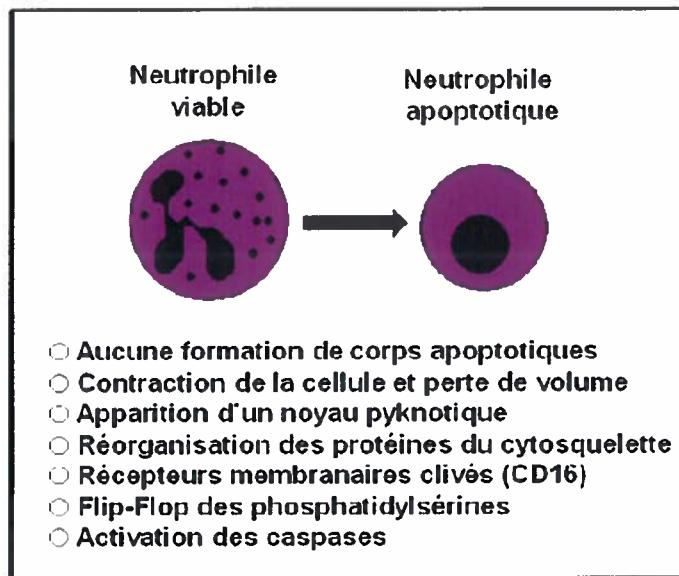


Figure 7: Changements morphologiques des neutrophiles apoptotiques

1.3 L'inflammation aigüe et chronique

La reconnaissance d'un pathogène par les cellules de l'immunité innée déclenche une réponse de défense du système immunitaire (Medzhitov et Janeway, 2000). La reconnaissance des pathogènes survient lorsque des PAMP (Matzinger, 2002) se lient à des molécules de surface comme les TLR (Medzhitov et Janeway, 2000). Ceci entraîne une libération de plusieurs cytokines et chimiokines initiant un procédé appelé inflammation. L'inflammation dite aigüe représente une réponse normale et restreinte qui est généralement bénéfique pour un organisme, menant ultimement à l'élimination du pathogène. Le processus inflammatoire permet le recrutement de cellules immunitaires et de molécules solubles de la circulation sanguine vers le tissu infecté où elles sont nécessaires à l'élimination du pathogène (Muller, 2002). Le recrutement des phagocytes est augmenté notamment par l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins environnants ainsi que par certains changements morphologiques à la surface des cellules endothéliales activées. Ainsi, l'accumulation de fluide et de cellules immunitaires entraînent collectivement l'apparition des symptômes inflammatoires, soit la rougeur, la chaleur, l'œdème et la douleur (Paul, 2008). Ces symptômes reflètent l'effet de certains médiateurs inflammatoires comme l'histamine, l'IL-1 β , le PGE-2 et le TNF- α qui induisent aussi indirectement une augmentation de la température.

Par contre, la stimulation soutenue par plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1 (Horai, Saijo et al., 2000) déclenche la dégranulation et une flambée oxydative qui peuvent parfois mener à d'importants dommages tissulaires (Nathan, 1987; Weiss, 1989). Lorsque l'inflammation est soutenue et que les cellules immunitaires continuent de s'accumuler au site, on parle alors d'inflammation chronique. Ce type d'inflammation est évidemment non désirable pour l'organisme causant parfois des dégâts colossaux. Les causes exactes des pathologies inflammatoires chroniques sont plus ou moins connues. Par contre, on sait que l'inflammation est amplifiée à la suite du recrutement des composantes humorales et cellulaires de l'immunité (Paul, 2008). De plus, l'inflammation

chronique implique généralement la production d'auto-anticorps dirigés contre un antigène du soi (Paul, 2008). Certaines études ont par ailleurs établi une corrélation entre l'inflammation chronique et le développement de cancers (Coussens et Werb, 2002).

1.4 Les maladies associées aux neutrophiles

Dans une réponse immunitaire normale, il y a destruction du pathogène puis élimination complète des cellules immunitaires résiduelles du tissu. Par contre, dans les maladies auto-immunes, les auto-antigènes, contre lesquels est dirigée la réponse, ne peuvent pas être facilement éliminés. Les neutrophiles ont souvent un rôle important à jouer dans le développement ou encore dans l'exacerbation de la maladie. Ainsi, presque tous défauts menant à une dysfonction quelconque des neutrophiles entraînent indubitablement une conséquence grave dans l'immunité innée (Lekstrom-Himes et Gallin, 2000). La prochaine section traitera brièvement de certaines maladies associées à l'altération des fonctions du neutrophile et de certains désordres immunologiques dans lequel le neutrophile joue un rôle clé. Notamment, mentionnons les pathologies associées à l'hyperréactivité des neutrophiles comme l'arthrite rhumatoïde ou la goutte ainsi que celles associées à la défaillance de certaines composantes du neutrophile comme la neutropénie, la granulomatose chronique ou la déficience de l'adhésion leucocytaire.

1.4.1 L'arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde est une pathologie inflammatoire systémique qu'on associe généralement à une accumulation de cellules immunitaires aux jonctions des articulations, plus particulièrement au niveau des liquides synoviaux (Paul, 2008). La cause de cette maladie chronique, qui touche plus de 1 % de la population mondiale, demeure obscure. Nous savons cependant que les articulations de

patients atteints d'arthrite se gonflent de liquide synovial. L'articulation est alors envahie par plusieurs millions de cellules auto-réactives comme les lymphocytes et les macrophages (Cush, Weinblatt et al., 2008). Le neutrophile joue également un rôle de premier plan dans cette pathologie par la libération du contenu de ses granules ainsi que par la production de ROS à la suite de l'ingestion de complexes immuns (Feldmann, 2002). Après un certain temps, la membrane qui entoure cette articulation s'épaissit et forme alors une structure appelée pannus. La formation du pannus entraîne alors l'érosion des cartilages par le biais de la réaction inflammatoire engendrée par les cellules immunitaires présentes. Ultimement, le mouvement de l'articulation se retrouve extrêmement limité et est généralement accompagné par une douleur intense (Cush, Weinblatt et al., 2008).

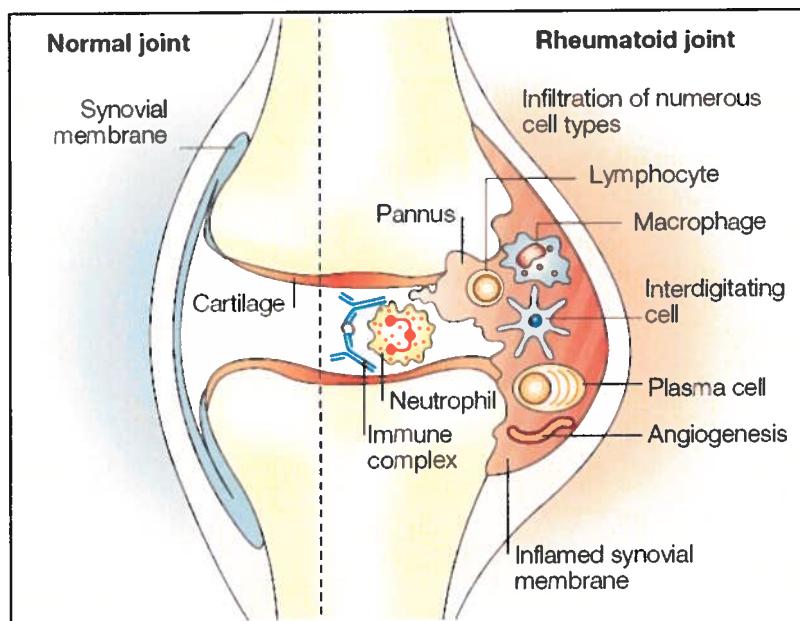


Figure 8: Comparaison d'une articulation normale avec une articulation rhumatoïde

Tirée de (Feldmann, 2002)

1.4.2 La goutte

La goutte est une maladie arthritique où l'urate, généralement excrété de l'organisme, se dépose plutôt sous forme de cristaux d'urate. Tout comme l'arthrite, la goutte se caractérise par des douleurs intenses au niveau des articulations où les cristaux s'accumulent. Les neutrophiles présents près des cristaux tentent de phagocytter ces derniers puis s'activent en générant des quantités importantes de cytokines pro-inflammatoires et de ROS. Encore ici, la production des ces médiateurs provoque des effets indésirables au niveau des cartilages et une destruction osseuse.

1.4.3 La neutropénie

Un défaut dans le cycle de vie des neutrophiles compromet inévitablement la défense de l'hôte (Dale, Guerry et al., 1979). La neutropénie sévère est caractérisée par un compte absolu en neutrophile inférieur à 500 000 cellules/mL (Welte et Dale, 1996). Cette pathologie est due à la défaillance des cellules myéloïdes à se différencier du stade promyélocyte à myélocyte. Les symptômes classiques de cette pathologie sont une suppression de l'inflammation et une susceptibilité accrue aux infections sévères et récurrentes (Bernini, 1996; Welte et Boxer, 1997). La neutropénie congénitale est d'ailleurs la seule pathologie associée uniquement à la défaillance d'un seul type cellulaire, soit le neutrophile.

1.4.4 La granulomatose chronique

La réponse des neutrophiles lors d'une infection nécessite la reconnaissance, la phagocytose et la destruction du pathogène via la production de réactifs oxygénés. Les patients ayant une défaillance au niveau de la NADPH oxydase ne produisent plus de réactifs oxygénés nécessaires à la destruction des pathogènes (Baehner et

Nathan, 1967). Une mutation dans l'une ou l'autre des composantes de la NADPH entraîne une incapacité presque complète à générer des ROS (Curnutte, Scott et al., 1989). Cette défaillance se traduit par des infections récurrentes des ganglions lymphatiques et de la peau accompagnées de lésions granulomateuses (Berendes, Bridges et al., 1957). Ces lésions caractéristiques ont ensuite permis de nommer cette pathologie CGD (Curnutte et al. 1974) pour maladie granulomateuse chronique.

1.4.5 La déficience de l'adhésion leucocytaire

La déficience de l'adhésion leucocytaire (LAD) est une pathologie héréditaire rare qui peut être associée aux neutrophiles ou à d'autres types de leucocytes. Elle est caractérisée par une défaillance de la migration leucocytaire aux sites d'infection qui se traduit par des infections accrues et persistantes (Crowley, Curnutte et al., 1980). Cette défaillance s'explique par une absence de l'attachement des neutrophiles à la paroi endothéliale (Brown, 1997) due à l'absence de molécules de surface ou à une perte de fonction de ces molécules (Larson et Springer, 1990). La molécule de surface généralement absente est la $\beta 2$ intégrine (Etzioni, Doerschuk et al., 1999). L'absence de ces intégrines se traduit entre autre par l'incapacité des neutrophiles à adhérer fermement à l'endothélium et à phagocytter correctement puisque les $\beta 2$ intégrines (CR3) sont essentielles à la phagocytose modulée par le complément. On observe des niveaux d'expression en intégrines très variés d'un patient à l'autre. La sévérité de la maladie dépend essentiellement du niveau d'expression de ces intégrines. Il existe également un deuxième type de déficience leucocytaire associée à l'adhésion : celle où les cellules immunitaires sont déficientes en modifications sialyl-Lewis (Phillips, Schwartz et al., 1995). Ces modifications à la surface des cellules permettent aux neutrophiles d'interagir avec la paroi endothéliale afin de ralentir autour des sites inflammatoires (Marquardt, Brune et al., 1999). Enfin, le LAD de type III est provoqué par un défaut dans la transduction de signaux.

Chapitre 2 : Les protéines S100

2.1 Structure générale

Les protéines S100 sont connues depuis plus de 50 ans. Le premier membre de la famille des S100 a été découvert pour la première fois en 1965 par un groupe de chercheurs étudiant les fluides de cerveau bovin (Moore, 1965). On a alors nommé ces protéines S100 à cause de leur solubilité dans une solution de 100 % de sulfate d'ammonium. Ces dernières sont exprimées de façon non-ubiquitaires, mais sont généralement conservées dans l'évolution des vertébrés. L'analyse de leur séquence a permis de constater que ces protéines possédaient deux domaines de types «EF hand» ayant la capacité de lier le calcium (Isobe, Tsugita et al., 1978; Isobe et Okuyama, 1981). Chacun des domaines EF hand est formé d'une région de liaison au calcium, flanquée par deux hélices- α . Les deux domaines EF hand sont attachés par une région charnière. La queue C-terminale et la région charnière possèdent une moins grande homologie entre les protéines S100, leur conférant ainsi chacune une identité et des fonctions propres (Donato, 2001). Les sites de liaison du calcium sont réarrangés différemment et possèdent donc des affinités différentes pour le calcium (Donato, 1986). La plupart des protéines S100 lient également d'autres ions divalents comme le zinc et le cuivre (Schafer, Fritschy et al., 2000). La structure secondaire d'une protéine S100 est schématisée dans la **figure 9**.

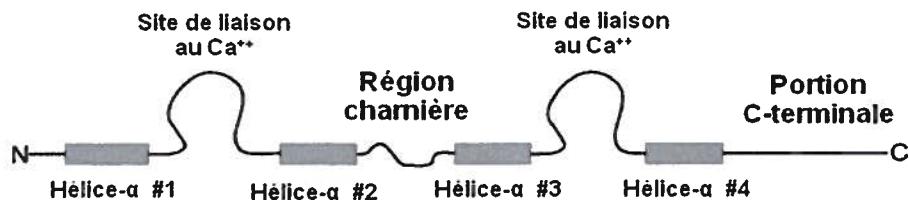


Figure 9: Représentation de la structure secondaire des protéines S100

Tirée de (Eckert, Broome et al., 2004)

Les protéines S100 possèdent un faible poids moléculaire, soit entre 8 et 14 KDa. Chez l'humain, la plupart des gènes de ces protéines sont localisés sur le chromosome 1 (B.W. Schäfer, 1993; Engelkamp, Schafer et al., 1993). Quelques exceptions existent cependant. C'est le cas du gène S100B qui est plutôt localisé sur le chromosome 21 (Allore, O'Hanlon et al., 1988).

On retrouve généralement (et même presque exclusivement) les protéines S100 sous formes d'homodimères retenus ensemble par des liens non-covalents. Plusieurs analyses de résonance magnétique nucléaire et de cristallographie à rayon X ont permis d'obtenir des informations sur les structures tridimensionnelles des protéines S100 (Kilby, Van Eldik et al., 1996; Brodersen, Etzerodt et al., 1998; Drohat, Baldissari et al., 1998; Matsumura, Shiba et al., 1998; Ishikawa, Nakagawa et al., 2000; Moroz, Antson et al., 2000; Rety, Osterloh et al., 2000). Certaines protéines S100 forment également des hétérodimères (Yang, O'Hanlon et al., 1999; Deloulme, Assard et al., 2000; Tarabykina, Krajewska et al., 2000; Wang, Rudland et al., 2000). C'est le cas notamment des protéines S100A8 et S100A9 (Propper, Huang et al., 1999), sur lesquelles porteront la prochaine partie de ce travail. Il existe également plusieurs indices expérimentaux qui démontrent la présence de polymères de S100A8, S100A9 et S100A12 (Kerkhoff, Klemp et al., 1999; Moroz, Antson et al., 2002; Leukert, Vogl et al., 2006).

D'autres études conformationnelles suggèrent que la dimérisation des protéines S100 est très importante pour les fonctions que remplissent ces dernières. En effet, la dimérisation qui s'effectue en présence de calcium induit un changement de conformation de sorte que l'hélice III se réarrange perpendiculairement avec l'hélice IV. Par conséquent, le nouveau dimère de protéines S100 acquiert de nouvelles capacités de liaison avec certaines protéines intracellulaires, suggérant ainsi un nouveau rôle à la suite de la dimérisation (Ikura, Clore et al., 1992; Meador, Means et al., 1992; Ivanenkov, Jamieson et al., 1995; Landar, Rustandi et al., 1998). Plusieurs protéines ligands des protéines S100 sont connues et revues par (Donato, 1999; Donato, 2003).

2.2 Les protéines S100A8, S100A9 et S100A12

La famille des protéines S100 regroupe 22 membres. Les protéines S100A8, S100A9 et S100A12 forment, entre-elles, une sous-famille qu'on nomme «Myeloid-Related Proteins» (MRP) à cause de leur expression presque uniquement restreinte à la lignée myéloïde, soit les monocytes/macrophages et les neutrophiles (Edgeworth, Gorman et al., 1991; Ilg, Troxler et al., 1996). Cependant, leur expression est inductible dans quelques autres types cellulaires comme certaines cellules épithéliales, endothéliales et fibroblastes (Brandtzaeg, Dale et al., 1987; Tobe, Murakami et al., 1989; Koike, Harada et al., 1992; Yen, Harrison et al., 1997).

S100A8, S100A9 et S100A12 ont été répertoriées par plusieurs équipes dans différents contextes et sont par conséquent, connues sous plusieurs noms. Les nomenclatures alternatives employées dans la littérature pour ces protéines sont énumérées dans le **tableau IV**. S100A8 et S100A9 peuvent former des homo ou des hétérodimères, alors que S100A12 n'interagit pas avec ces deux dernières (Vogl, Propper et al., 1999).

On connaît maintenant les MRP depuis plus de 30 ans. Elles sont connues principalement à cause de leur présence en très fortes concentrations dans les pathologies inflammatoires chroniques comme l'arthrite rhumatoïde (Frosch, Strey et al., 2000) et la maladie de Crohn (Lugering, Stoll et al., 1995) ou la fibrose kystique (Barthe, Figarella et al., 1991). Des concentrations très élevées de MRP ont également été répertoriées dans plusieurs cas d'infections bactériennes (Pechkovsky, Zalutskaya et al., 2000) ou virales ainsi que dans les cas de cancers. De plus, les niveaux élevés de ces protéines corrèlent grandement avec les cas d'inflammation chronique. En fait, la présence de ces protéines dans le sérum de patients atteints d'une de ces pathologies est devenue un outil diagnostic très

efficace dans la détection d'inflammation chronique. On croyait d'abord que S100A8, S100A9 et S100A12 étaient un symptôme de l'inflammation chronique plutôt que de contribuer activement au développement de celle-ci. Cependant, plusieurs études récentes suggèrent qu'elles rempliraient un tout autre rôle dans la réponse immunitaire à laquelle elles contribueraient grandement en agissant via leur activité ressemblant aux cytokines. De plus, ces protéines ont récemment été classées comme des motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP) pour plusieurs raisons qui seront élaborées plus en détails dans les prochaines sections (Ehrchen, Sunderkotter et al., 2009; Srikrishna et Freeze, 2009)

Tableau IV: Nomenclature alternative des protéines MRP

Selon (Anceriz, Raquil et al., 2007)

Protéines S100	Autres noms
S100A8	MRP8, Calgranuline A, CAGA, CGLA, CGAg, p8, MAC387, 60B8Ag, L1Ag light chain, MIF, NIF
S100A9	MRP14, Calgranuline B, CAGB, CGLB, CFAg, p14, MAC387, 60B8Ag, L1Ag heavy chain, MIF, NIF
S100A12	MRP6, Calgranuline C, CAAF1, CGRP, p6, ENRAGE, corn assiciated antigen
S100A8/S100A9	Calprotectine

2.2.1 Provenance et mécanisme de sécrétion

La concentration sérique en MRP d'un individu sain est d'environ 0.1 µg/mL. Cependant, des concentrations beaucoup plus élevées, allant jusqu'à plusieurs milligrammes par millilitre sont observables chez des patients ayant un nombre anormalement élevé de neutrophiles ou présentant une suractivité de ceux-ci. Plusieurs agents sont connus pour induire la sécrétion de MRP comme le LPS (Kido, Kido et al., 2003), le TNF- α , l'IL-1 β (Suryono, Kido et al., 2003) et les cristaux d'urate (Ryckman, Gilbert et al., 2004).

Les protéines qui sont sécrétées par les phagocytes sont généralement contenues dans des vésicules ou granules. Ces protéines possèdent un peptide signal qui leur permet d'être introduites dans le réticulum endoplasmique (RE) avant d'être exportées vers le Golgi. Par la reconnaissance de certains signaux, ces protéines quittent le Golgi dans des vésicules puis sont transportées vers la membrane plasmique avec laquelle elles fusionneront, libérant ainsi leur contenu dans le milieu extracellulaire. On nomme cette voie de sécrétion la voie classique. Cependant, plusieurs protéines, dont les protéines S100A8, S100A9 et S100A12, ne possèdent pas de peptide signal, suggérant ainsi qu'elles sont sécrétées par un mécanisme alternatif, comme les autres membres de la famille DAMP.

S100A8 et S100A9 représentent une portion colossale des protéines cytoplasmiques des neutrophiles, soit plus de 30 %. Comme ces protéines ne possèdent pas de peptide signal, elles se retrouvent dans le cytoplasme et ne sont pas sécrétées par la voie classique. Cette caractéristique est partagée par plusieurs protéines comme HMGB1, l'annexin-1 ou l'IL1 α/β (Corradi, Bajetto et al., 1993; Ryckman, Gilbert et al., 2004; Alleva, Budd et al., 2008). Comme ces protéines ne sont pas sécrétées par la voie classique, elles doivent transloquer à la membrane plasmique pour se retrouver dans le milieu extracellulaire. Par contre, ce mécanisme demeure relativement peu connu. Quelques hypothèses ont été émises afin de tenter d'expliquer le mécanisme. Il a notamment été suggéré que ce processus soit dépendant de la tubuline puisque l'utilisation de la colchicine

bloque la sécrétion des MRP (Rammes, Roth et al., 1997; Ryckman, Gilbert et al., 2004). De plus, nous savons que l'activation du neutrophile par certains agonistes induit la translocation de S100A8/A9 du cytosol vers la membrane plasmique par un processus impliquant le calcium (Lemarchand, Vaglio et al., 1992; Roth, Burwinkel et al., 1993). Cette translocation serait également régulée par la PKC ainsi que par des étapes de phosphorylation (Bengis-Garber et Gruener, 1993; Guignard, Mauel et al., 1996; van den Bos, Roth et al., 1996). Tout comme S100A8 et S100A9, S100A12 est également sécrétée par les neutrophiles, mais en réponse à des stimuli différents (P.A Tessier, non publié).

2.2.2 Les récepteurs

Les protéines S100A8/A9 qui sont sécrétées lors de l'activation des neutrophiles se lient avec une grande affinité avec les sulfates héparinés ainsi qu'avec les N-glycans carboxylés (Srikrishna, Panneerselvam et al., 2001; Srikrishna, Toomre et al., 2001; Robinson, Tessier et al., 2002). La nature du ou des récepteur(s) des MRP demeure relativement controversée. De plus, plusieurs sites de liaison à la calprotectine ont été identifiés sur les lignées cellulaires THP-1, Raji et Molt-4, sans avoir toutefois permettre d'identifier le récepteur (Koike, Kondo et al., 1998). S100A12, mais pas S100A8 ni S100A9, a été identifié comme un ligand du récepteur RAGE. Dans cette étude, on démontre l'activation par ces protéines des cellules endothéliales, des macrophages ainsi que des lymphocytes (Hofmann, Drury et al., 1999). Par ailleurs, la liaison directe entre S100A8/A9 avec le CD36, un récepteur responsable de l'internalisation d'acide gras par pinocytose, a été observée (Kerkhoff, Sorg et al., 2001). Il est cependant important de préciser qu'uniquement les monocytes et les cellules endothéliales possèdent ce récepteur suggérant l'existence d'un ou plusieurs autres récepteurs (Kerkhoff, Sorg et al., 2001). Encore plus récemment, S100A8 et S100A9 ont été identifiées comme des activateurs potentiels des récepteurs TLR4 (Vogl, Tenbrock et al., 2007). Les

conclusions et la reproductibilité de cette étude demeurent par contre matière à débat.

2.2.3 Rôles intracellulaires

En présence de calcium ou de certains ions divalents, S100A8 et S100A9 s'associent en formant des liens non-covalents. S100A8 et S100A9 possèdent 2 sites de fixation di calcium, un de faible et l'autre de haute affinité. Plusieurs études suggèrent donc que, par cette propriété, les MRP possèderaient la capacité de réguler le flux de calcium ainsi que les fonctions régulées par celui-ci. Plusieurs autres activités des protéines S100A8, S100A9 et S100A12 ont été répertoriées au cours des dernières années. Parmi celles-ci, on dénote un effet de S100A9 sur la polymérisation des microtubules (Vogl, Ludwig et al., 2004). L'effet sur le réarrangement du cytosquelette suggère un rôle important de cette protéine dans la migration trans-endothéliale des phagocytes. De plus, il semblerait que S100A9 soit phosphorylée par la MAPK p38, modifiant ainsi ses propriétés (Lominadze, Rane et al., 2005).

La calprotectine (S100A8/A9) possède une grande affinité pour certains acides gras (Siegenthaler, Roulin et al., 1997) comme l'acide arachidonique (Kerkhoff, Klempt et al., 1999; Kerkhoff, Vogl et al., 1999) et que cette affinité serait diminuée en présence de zinc. Comme le zinc est peu présent à l'intérieur des cellules, mais présent dans le milieu extracellulaire, on suggère que S100A8/A9 serait impliquée dans le transport extracellulaire de cet acide gras participant ainsi à la propagation de l'inflammation. En effet, l'internalisation d'acide arachidonique, qui est un médiateur lipidique menant à la production de LTB4 par exemple, par les cellules environnantes, participe activement au processus inflammatoire. L'association de la calprotectine avec l'acide arachidonique pourrait avoir une autre utilité puisqu'une équipe a démontré que S100A8/A9 transférait l'acide arachidonique à la NADPH oxidase pour l'activer (Bouzidi et

Doussiere, 2004). L'augmentation de l'activité impliquerait une interaction avec p67^{phox} et Rac-2 (Kerkhoff, Nacken et al., 2005). Par contre, dans une autre étude récente, un groupe de chercheurs démontre que S100A8 et S100A9 inhibent les mécanismes oxydatifs du neutrophile (Sroussi, Lu et al., 2010).

2.2.4 Rôles extracellulaires

Il est maintenant établit depuis plusieurs années que les MRP sont microbicides lorsque présentes à une concentration élevée. La calprotectine inhibe la croissance de *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, à des concentrations de 64 à 256 µg/mL et de *Candida spp.* ainsi que *Cryptococcus neoformans* à des concentrations plus faibles de l'ordre 4-128 µg/mL (Steinbakk, Naess-Andresen et al., 1990; Brandtzaeg, Gabrielsen et al., 1995; Santhanagopalan, Hahn et al., 1995; Sohnle, Hahn et al., 1996; Mambula, Simons et al., 2000). Il est important de mentionner que cette action bactériostatique ou bactéricide ne nécessite aucun contact avec le pathogène. Cette propriété viendrait plutôt du fait que les MRP chélagent les ions divalents comme le zinc ou le magnésium, privant ainsi les micro-organismes de ces éléments essentiels à leur croissance (Santhanagopalan, Hahn et al., 1995; Sohnle, Hunter et al., 2000).

Jusqu'à tout récemment, l'accumulation des MRP au niveau des sites inflammatoires chroniques représentait un symptôme de l'inflammation. Ces protéines sont d'ailleurs utilisées comme des marqueurs de pathologies inflammatoires. Cependant, il nous apparaît de plus en plus évident qu'elles exercent un rôle de premier plan dans le développement même des épisodes inflammatoires chroniques. En effet, S100A8, S100A9, S100A8/A9 et S100A12 contribuent activement à différents niveaux dans l'inflammation. Premièrement, la S100A12 serait chimiotactique pour les monocytes et les neutrophiles en plus d'induire la sortie des phagocytes de la moelle osseuse (Miranda, Tao et al., 2001; Yang, Tao et al., 2001; Rouleau, Vandal et al., 2003). S100A8, S100A9 ainsi que le complexe formé des deux protéines sont chimiotactiques pour les neutrophiles

humains (Ryckman, Vandal et al., 2003) alors qu'uniquement la S100A8 murine est chimiotactique chez la souris (Lackmann, Rajasekariah et al., 1993). La région charnière a d'ailleurs été identifiée comme étant la portion importante dans cette activité (Cornish, Devery et al., 1996). Ensuite, l'ajout de S100A8, S100A8/A9 et S100A9, dans le modèle de la poche d'air murine, entraîne une accumulation de cellules myéloïdes (Rouleau, Vandal et al., 2003; Ryckman, Vandal et al., 2003). De plus, quelques indices expérimentaux suggèrent que la S100A8 pourrait être oxydée (Harrison, Raftery et al., 1999), modifiant ainsi ses activités pro-inflammatoires (Lim, Raftery et al., 2009).

L'activité des MRP sur la migration des phagocytes ne s'arrête pas à la chimiотaxie puisque ces dernières influencent également l'adhésion cellulaire. En effet, la sécrétion de MRP à la surface de l'endothélium par les monocytes et les neutrophiles (Eue, Pietz et al., 2000) influence non seulement l'endothélium, mais également les phagocytes. Il s'avère que la calprotectine active la sécrétion d'IL-8 et induit l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 des cellules endothéliales (Viemann, Strey et al., 2005), augmentant ainsi les interactions entre l'endothélium et le phagocyte. De plus, S100A9 a été démontrée comme un puissant activateur des β 2 intégrines CD11b/CD18 à la surface des neutrophiles (Newton et Hogg, 1998), permettant l'adhésion ferme du phagocyte aux sites inflammatoires. S100A9 stimule également l'adhésion des neutrophiles sur des matrices de fibronectine ou de vitronectine (Anceriz, Raquil et al., 2007). Les sélectines, responsables du roulement des phagocytes sur l'endothélium, sont également affectées par les MRP puisque ces dernières induisent l'augmentation de l'expression de CD62L à la surface des neutrophiles (Ryckman, Vandal et al., 2003; Vandal, Rouleau et al., 2003). L'importance cruciale de ces protéines dans la migration leucocytaire est supportée par le fait qu'un traitement avec des anticorps neutralisants contre S100A8, S100A9 et S100A8/A9 bloque la migration des leucocytes en réponse aux LPS ou aux cristaux d'urate (Vandal, Rouleau et al., 2003; Ryckman, Gilbert et al., 2004). Enfin, la liaison de S100A12 avec RAGE transmet un signal aux cellules endothéliales (Schmidt, Yan et al., 2001) qui résulte en une expression accrue des molécules d'adhésion ICAM-1 et

VCAM-1 (Hofmann, Drury et al., 1999) ainsi que plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1 β via la translocation du facteur de transcription NF- κ B. La sécrétion de ces cytokines, en plus de l'IL-8, suggère fortement que les MRP influencent le cours du processus inflammatoire en amplifiant la réponse initiale (Ehrchen, Sunderkotter et al., 2009).

Des résultats précédents du laboratoire ont également démontré que la S100A9 augmentait la migration des neutrophiles à travers l'endothélium en réponse à l'IL-8, démontrant un rôle pour cette protéine dans la transmigration des phagocytes (Anceriz, Raquil et al., 2007). Le groupe de Eue et *al.* a corroboré ces résultats en démontrant que la S100A9 augmente la migration des monocytes à travers la barrière endothéliale (Eue, Pietz et al., 2000). Les MRP semblent donc jouer un rôle non négligeable dans la transmigration des phagocytes.

Plusieurs études se sont concentrées sur l'effet que pourrait avoir les MRP sur les cellules cancéreuses. On retrouve d'ailleurs plusieurs résultats démontrant des effets pro-apoptotiques de ces protéines sur certaines lignées cancéreuses. La calprotectine inhibe d'ailleurs la croissance et induit la mort de plusieurs types cellulaires murins comme les carcinomes, hépatomes, fibrosarcomes, adénosarcomes et cellules leucémiques (Yui, Mikami et al., 1995). La même équipe a par la suite montré que le complexe S100A8/A9 induisait l'apoptose des fibroblastes qui jouent un rôle important dans la reconstruction des tissus endommagés (Yui, Mikami et al., 1997). Cette observation vient cependant à l'encontre des résultats d'un autre groupe qui démontre que S100A9 stimule la prolifération des fibroblastes (Shibata, Ito et al., 2005). La chélation des ions essentiels à l'homéostasie cellulaire pourrait être impliquée encore dans ce processus apoptotique puisque l'activité pro-apoptotique peut parfois être renversée par l'ajout d'ions divalents comme le zinc (Yui, Mikami et al., 1997; Yui, Nakatani et al., 2002; Nakatani, Yamazaki et al., 2005).

2.2.5 Les maladies associées

Des concentrations élevées (plus de 1 μ g/mL) de MRP sont retrouvées dans le sérum des patients souffrant de multiples désordres inflammatoires chroniques. Des concentrations encore plus élevées sont retrouvées dans les fluides synoviaux de patients atteints d'arthrite rhumatoïde ou de la goutte.

L'arthrite rhumatoïde représente l'exemple classique des pathologies inflammatoires chroniques impliquant les MRP. Comme il a été mentionné précédemment, cette pathologie implique des épisodes inflammatoires aigus et chroniques de la membrane synoviale, dus à l'accumulation des cellules immunitaires et de complexes immuns aux niveaux des articulations. Le synovium inflammé mène progressivement à la destruction et à l'érosion des cartilages (Lee et Weinblatt, 2001). Les phagocytes, s'accumulant aux sites, produisent de grandes quantités de molécules dans le milieu extracellulaire, incluant les protéines S100A8, S100A9 et S100A12 (Perera, McNeil et al.). En fait, on retrouve de façon prédominante S100A8 et S100A9 sur la membrane synoviale (Odink, Cerletti et al., 1987), avec une très forte expression au niveau de la jonction du cartilage et du pannus (Youssef, Roth et al., 1999), le site de destruction principal des cartilages et de l'érosion des os. De plus, on dénote une association entre les niveaux de calprotectine et les anticorps dirigés contre les peptides citrulinés ainsi que contre les complexes immuns IgM et IgA (Hammer, Odegard et al., 2007). La corrélation entre la haute teneur en MRP et l'inflammation chronique est si grande que ces protéines ont été proposées comme étant des marqueurs de premiers plans (encore meilleur que la protéine C-réactive) en ce qui concerne l'inflammation synoviale (Berntzen, Munthe et al., 1989; Brun, Jonsson et al., 1994). Enfin, une étude récente a démontré une association entre les calgranulines et le facteur soluble RAGE, un marqueur clinique connu permettant de suivre l'évolution de l'arthrite rhumatoïde (Chen, Yan et al., 2009).

Il existe aussi une corrélation entre la présence de MRP et d'autres pathologies arthritiques connues comme la goutte (Ryckman, McColl et al., 2003), l'arthrite idiopathique juvénile (Frosch, Vogl et al., 2003), l'arthrite psoriasique (Kane, Roth et al., 2003) ou le syndrome de Sjögren (Brun, Cuida et al., 1994).

Les maladies inflammatoires de l'intestin (MII), qui regroupent principalement la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, sont des désordres chroniques inflammatoires du tractus gastro-intestinal. Plusieurs indices expérimentaux supportent l'hypothèse que les MII sont causées par une réponse immunitaire mal régulée contre la flore intestinale dans des individus génétiquement prédisposés (Cho, 2008). De façon générale, les patients souffrant de ces maladies sont sujets à de fréquentes rechutes résultant en des diarrhées sanguinolentes ainsi que des douleurs intenses à l'abdomen. La migration des phagocytes joue un rôle particulièrement important dans les maladies inflammatoires de l'intestin. En effet, l'infiltration accrue des neutrophiles par la route paracellulaire est associée à la destruction des jonctions épithéliales serrées. Certaines protéines jouant des rôles importants pour la migration des neutrophiles (Huber, Balda et al., 2000), comme l'occludine, sont d'ailleurs réprimées dans les MII (Kucharzik, Walsh et al., 2001). De plus, on retrouve de hautes concentrations de S100A8/A9 dans les cas de maladie de Crohn ainsi que dans les cas de cancer du colon (Schmid, Luger et al., 1995; Summerton, Longlands et al., 2002). La présence de S100A8 et S100A9 est directement proportionnelle à l'infiltration des neutrophiles au niveau de la muqueuse intestinale (Roseth, Schmidt et al., 1999). On a également observé que S100A8/A9 réduit le niveau d'expression des protéines de jonctions serrées sur les cellules endothéliales (Viemann, Strey et al., 2005). Enfin, l'évolution de la maladie corrèle avec la concentration croissante de S100A8/A9 (Roseth, Fagerhol et al., 1992).

L'hypercalprotectinémie ou l'hyperzinquémie est un syndrome extrêmement rare (seulement 6 cas dans le monde ont été répertoriés) caractérisé par la présence anormalement élevée de S100A8/A9 (Sampson, Fagerhol et al., 2002). Les concentrations sériques peuvent atteindre les 6 g/L de sang, ce qui correspond à 10 000 fois la concentration normale. Tous les patients présentent des symptômes communs et souffrent d'infections récurrentes, d'hépatosplénomégalie, d'anémie, d'arthrite et possèdent des concentrations élevées en protéines C-réactive (Sampson, Fagerhol et al., 2002). De plus, la plupart de ces patients éprouvent de sérieux retards de croissance. Il semblerait également que ce syndrome soit héréditaire (Smith, Zeller et al., 1976; Failla, van de Veerdonk et al., 1982), l'un des 6 patients atteints étant le fils dont la mère souffre aussi d'arthrite sévère (Saito, Saito et al., 2002). La présence accrue de MRP dans cette pathologie expliquerait en grande partie les symptômes dont les patients souffrent. En effet, la présence de MRP résulterait en une activation et une migration plus prononcées des monocytes et des neutrophiles en plus de promouvoir la formation de granulocytes de la moelle osseuse ainsi que la déplétion des erythrocytes expliquant les symptômes anémiques (Rouleau, Vandal et al., 2003; Vandal, Rouleau et al., 2003). Des analyses génétiques de ces patients n'ont révélé aucune anomalie dans les promoteurs des gènes codant pour S100A8 et S100A9 suggérant qu'un défaut dans la sécrétion et la production des MRP pourrait avoir lieu (Sampson, Fagerhol et al., 2002).

On a répertorié plusieurs autres pathologies associées à la présence accrue des MRP. On peut mentionner la fibrose kystique, l'Alzheimer et une panoplie d'autres défaillances génétiques ou infections bactériennes. Le **tableau V** énumère les maladies ou pathologies associées à la présence accrue des MRP.

Tableau V: Corrélation entre la présence de MRP et les maladies inflammatoires

Inspiré de (Anceriz, Raquil et al., 2007) et (Ehrchen, Sunderkotter et al., 2009)

Pathologies	Références
Fibrose Kystique	(Hayward, Glass et al., 1987; Barthe, Figarella et al., 1991; Roth, Teigelkamp et al., 1992; Renaud, Merten et al., 1994; Clohessy et Golden, 1996; Golden, Clohessy et al., 1996; Foell, Seeliger et al., 2003; Tirkos, Newbigging et al., 2006)
Arthrite rhumatoïde	(Perera, McNeil et al.; Odink, Cerletti et al., 1987; Zwadlo, Bruggen et al., 1988; Berntzen, Olmez et al., 1991; Brun, Haga et al., 1992; Brun, Jonsson et al., 1994; Youssef, Roth et al., 1999; Hofmann, Drury et al., 2002; Madland, Hordvik et al., 2002; Foell, Kane et al., 2003; Liao, Wu et al., 2004)
Arthrite psoriasique	(Foell, Kane et al., 2003; Kane, Roth et al., 2003; Batliwalla, Li et al., 2005)
Arthrite idiopathique juvénile	(Berntzen, Fagerhol et al., 1991; Frosch, Streij et al., 2000; Frosch, Vogl et al., 2003; Wulffraat, Haas et al., 2003; Foell, Frosch et al., 2004; Foell et Roth, 2004; Frosch et Roth, 2008)
Goutte	(Rouleau, Vandal et al., 2003; Ryckman, McColl et al., 2003)
Psoriasis	(Mirmohammadsadegh, Tschakarjan et al., 2000; Thorey, Roth et al., 2001; Semprini, Capon et al., 2002; Broome, Ryan et al., 2003; Marionnet, Bernerd et al., 2003; Eckert, Broome et al., 2004)
Maladie inflammatoire de l'intestin	(Roseth, Fagerhol et al., 1992; Rugtveit, Brandtzaeg et al., 1994; Lugering, Stoll et al., 1995; Lugering, Stoll et al., 1995; Schmid, Lugering et al., 1995; Tibble, Sigthorsson et al., 2001; Aadland et Fagerhol, 2002; Summerton, Longlands et al., 2002; Foell, Kucharzik et al., 2003; Benoit, Toksoy et al., 2006; Wolk, Witte et al., 2006; Foell, Wittkowski et al., 2008)
Alzheimer	(Shepherd, Goyette et al., 2006)

Malaria	(Schluesener, Kremsner et al., 1998)
Lupus systémique érythémateux	(Haga, Brun et al., 1993; Kuhn, Sonntag et al., 2002; Frosch, Vogl et al., 2004; Kaner, Bernimoulin et al., 2006)
Maladie de Kawasaki	(Foell, Ichida et al., 2003; Ye, Foell et al., 2004)
Syndrôme de Sjögren	(Cuida, Brun et al., 1996; Sweet, Denbury et al., 2001)
Cancer	(Brun, Ulvestad et al., 1994; Cuida, Brun et al., 1996; Arai, Mizuno et al., 1999; Stulik, Osterreicher et al., 1999; Arai, Yamada et al., 2000; Arai, Teratani et al., 2001; Gebhardt, Breitenbach et al., 2002; Hsieh, Schafer et al., 2003; Ott, Lindner et al., 2003; Arai, Teratani et al., 2004; Emberley, Murphy et al., 2004; Cross, Hamdy et al., 2005; Ito, Arai et al., 2005; Hermani, De Servi et al., 2006; Hummerich, Muller et al., 2006; Muller, Haug et al., 2008; Turovskaya, Foell et al., 2008)
Virus Immunodéficience humaine (VIH)	(Muller, Froland et al., 1994; Gebhardt, Nemeth et al., 2006)
Tuberculose	(Pechkovsky, Zalutskaya et al., 2000)
Arthérosclérose	(McCormick, Rahimi et al., 2005; Miyamoto, Ueda et al., 2008)
Diabète de type II	(Bouma, Lam-Tse et al., 2004; Kosaki, Hasegawa et al., 2004)
Scepticémie	(Payen, Lukaszewicz et al., 2008)
Pancréatite	(Carroccio, Rocco et al., 2006; Pezzilli, Barassi et al., 2007)
Hypercalprotétinémie	(Sampson, Fagerhol et al., 2002; Isidor, Poignant et al., 2009)

2.2.6 Potentiel thérapeutique

Les concentrations élevées de MRP dans les pathologies mentionnées ci-haut suggèrent fortement que ces protéines pourraient avoir des rôles pro-inflammatoires non désirables pour l'organisme. Le traitement avec des anticorps neutralisant ces protéines devrait donc s'avérer efficace pour traiter l'inflammation chronique. Il a d'ailleurs déjà été démontré dans un modèle murin qu'une neutralisation avec des anticorps anti-S100A8 et anti-S100A9 réduisait la migration des neutrophiles au niveau des alvéoles dans un modèle de pneumonie (Raquil, Ainceriz et al., 2008). Il n'en demeure pas moins que les concentrations extrêmement élevées de MRP nécessiteraient des quantités encore plus importantes d'anticorps monoclonaux neutralisants, ce qui aurait pour effet d'accroître les complexes immuns provoquant possiblement des dommages à certains organes. Il serait également impossible de bloquer le récepteur des MRP puisque ces protéines se lient à plusieurs cibles. Certains traitements expérimentaux ont cependant tenté de contrer les effets pro-inflammatoires de S100A8/A9. Par exemple, un traitement avec la cyclosporine A, un immunosuppresseur puissant, a montré la capacité de corriger, pendant un certain temps, tous les symptômes cliniques de l'hypercalprotectinémie (Sugiura, Goto et al., 2006). Un autre traitement utilisant un immunosuppresseur, le tacrolimus, a été employé afin de tenter de remédier aux mêmes symptômes. Dans cette étude, une atténuation de la gravité de la maladie a été observée dans les premières semaines de traitement (Isidor, Poignant et al., 2009). Malheureusement, l'anémie ainsi que l'inflammation chronique sont réapparues quelques semaines plus tard. Les auteurs suggèrent que la présence des S100A8/A9 soit très néfaste pour la maladie (Sampson, Fagerhol et al., 2002). L'inhibition de la sécrétion même des MRP dans le milieu extracellulaire procurerait possiblement un net avantage aux traitements déjà existants. En effet, des traitements expérimentaux proposent d'inhiber la sécrétion des MRP à l'aide de la colchicine, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules. Cet inhibiteur pourrait possiblement s'avérer

efficace puisque S100A8/A9 est sécrétée par un mécanisme dépendant des microtubules (Ryckman, Gilbert et al., 2004).

Problématique, Hypothèse et Objectif de travail

Basé sur la revue de la littérature, il avait été suggéré à plusieurs reprises que les protéines S100 pourraient avoir une implication majeure dans la migration des phagocytes, en particulier dans la migration des neutrophiles. En effet, les protéines S100A8, S100A9 et S100A12 sont chimiotactiques pour le neutrophile. De plus, il a été démontré que la protéine S100A9 induisait l'adhésion de ce type cellulaire sur matrice de fibrinogène via notamment l'augmentation de l'expression et de l'activation des $\beta 2$ -intégrines CD11b/CD18. Finalement, des résultats antérieurs effectués dans le laboratoire du Dr. Tessier nous indiquaient que l'ajout de protéines S100A9 dans la surface supérieur d'un puit dans un modèle de migration cellulaire (chambre de Boyden) augmentait le passage des neutrophiles à travers une barrière endothéliale. Ces résultats nous suggéraient donc fortement un effet de la protéine S100A9 au niveau de la transmigration des neutrophiles. Comme la dégranulation du neutrophile est associée à la migration des leucocytes, via une dégradation de la matrice extracellulaire des cellules endothéliales, et qu'une partie des intégrines CD11b/CD18 sont contenues dans les granules des neutrophiles, nous avons émis l'hypothèse : S100A9 pourrait induire la dégranulation des neutrophiles favorisant ainsi la dégradation de la matrice extracellulaire endothéliale et, par le fait même, la migration des neutrophiles. L'objectif de cette étude était donc de déterminer en partie les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la migration des neutrophiles par la protéine S100A9 via l'étude du processus de dégranulation.

SECTION 2 : Articles

Résumé de l'article en français

Titre : Induction de la dégranulation du neutrophile humain par la protéine S100A9 par un mécanisme dépendant des MAPK

S100A9 est une protéine pro-inflammatoire exprimée abondamment dans le cytosol des neutrophiles et des monocytes. Les hautes concentrations de S100A9 corrèlent avec les maladies inflammatoires chroniques comme l'arthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn, ainsi qu'avec la diapédèse des phagocytes. Cette étude a vérifié l'hypothèse que S100A9 induit la dégranulation des neutrophiles humains. Nous avons trouvé que S100A9 augmente les niveaux d'expression du CD35 et du CD66b, deux protéines contenues dans les vésicules sécrétaires et dans les granules spécifiques/gélatinases respectivement. De plus, la gélatinase et l'albumine, contenues respectivement dans les granules spécifiques/gélatinases et dans les vésicules sécrétaires, ont été détectées dans le surnageant de neutrophiles stimulé avec S100A9. Par contre, la stimulation avec S100A9 n'a eu aucun effet sur le niveau d'expression du CD63 ou sur la sécrétion de MPO, deux protéines contenues dans les granules azurophiliques. S100A9 a induit la phosphorylation des MAPK, ERK1/2, p38 et JNK. L'inhibition de p38 et de JNK, mais pas de ERK1/2, avec des inhibiteurs spécifiques (SB203580, JNKII et PD98059 respectivement), a bloqué la dégranulation du neutrophile induite par S100A9. Mis ensemble, ces résultats supportent notre hypothèse et démontrent clairement que S100A9 induit la dégranulation des vésicules sécrétaires et des granules spécifiques/gélatinases, mais pas des granules azurophiliques par un processus dépendant de p38 et JNK. Ces résultats supportent également sa classification de DAMP.

Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism

Jean-Christophe Simard,* Denis Girard,*[†] and Philippe A. Tessier[†]

*Laboratoire de Recherche en Inflammation et Physiologie des Granulocytes, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada; and [†]Centre de Recherche en Infectiologie, Centre Hospitalier de l'Université Laval, and Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, Canada

RECEIVED OCTOBER 14, 2009; REVISED DECEMBER 21, 2009; ACCEPTED DECEMBER 22, 2009. DOI: 10.1189/jlb.1009676

ABSTRACT

S100A9 is a proinflammatory protein, expressed abundantly in the cytosol of neutrophils and monocytes. High extracellular S100A9 concentrations have been correlated with chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and Crohn's disease, as well as with phagocyte extravasation. This study tested the hypothesis that S100A9 induces degranulation in human neutrophils. S100A9 was found to up-regulate the surface expression of CD35 and CD66b, proteins contained in secretory vesicles and specific/gelatinase granules, respectively. In addition, gelatinase and albumin, stored, respectively, in specific/gelatinase granules and secretory vesicles, were detected in the supernatants of neutrophils stimulated with S100A9. In contrast, stimulation with S100A9 had no effect on CD63 expression or MPO secretion, two proteins contained in azurophilic granules. S100A9 induced the phosphorylation of the MAPKs, ERK1/2, p38, and JNK. Inhibition of p38 and JNK but not ERK1/2, with specific inhibitors (SB203580, JNKKI, and PD98059, respectively), blocked neutrophil degranulation induced by S100A9. Taken together, these results support the hypothesis and clearly indicate that S100A9 induces the degranulation of secretory and specific/gelatinase granules but not of azurophilic granules in a process involving p38 and JNK and further support its classification as a DAMP. *J. Leukoc. Biol.* 87: 905–914; 2010.

Introduction

The innate immune system is the first line of defense against infections. Cells constituting the innate immune system recognize pathogen-associated molecular patterns through receptors such as TLRs and mannose receptors. In addition,

damaged cells send signals to the immune system by releasing intracellular proteins, called alarmins [1] or DAMPs. These preformed molecules are released upon cell activation or damage and activate the innate and adaptive immune systems. IL-1, thioredoxin, galectins, and HMGB1 are examples of DAMPs.

Recently, S100A8, S100A9, and S100A12 have come to light as potent neutrophil activators. S100A8, S100A9, and S100A12 form a subfamily of the calcium-binding S100 protein family, called MRPs [2], mainly as a result of their restricted expression to cells of myeloid origin [3, 4]. They are expressed in the cytosol of phagocytes, where they are presumed to participate in intracellular calcium regulation as well as NAPDH oxidase activation. Neutrophils and monocytes are rich in MRPs, although activated epithelial and endothelial cells also express these proteins [5, 6]. They form homodimers and a heterodimer, called calprotectin (S100A8/A9) [7]. S100A9, S100A8, and S100A12 are found at high concentrations in the serum and at inflammatory sites of patients suffering from multiple inflammatory diseases, such as Crohn's disease [8], rheumatoid arthritis [9], and cystic fibrosis [10], to name a few, indicating that they are secreted or released by damaged cells.

Once released to the extracellular milieu, MRPs are chemoattractant for neutrophils, induce their adhesion to endothelium, and increase their transendothelial migration by activating the $\beta 2$ -integrins Mac-1 (CD18) [11–14]. Recent studies also showed a potent destructive role for S100A8 and S100A9 in a mouse model of arthritis [15, 16]. In these studies, mice deficient in S100A9 showed reduced cartilage destruction compared with wild-type mice. Furthermore, addition of anti-S100A9 and anti-S100A8/A9, but not anti-S100A8 antibodies, reduced human monocyte migration across endothelial cells *in vitro* [17]. In summary, S100A9 seems to be a predominant component in inflammation. S100A8, S100A9, and S100A12 are therefore intracellular proteins released during inflamma-

Abbreviations: CR=complement receptor, DAMP=damage-associated molecular pattern, HMGB1=high-mobility group box 1, Mac-1=membrane-activated complex 1, MFI=mean fluorescence intensity, MMP-9=matrix metalloproteinase 9, MPO=myeloperoxidase, MRP=myeloid-related protein, RAGE=receptor for advanced glycation end-products, SAPK=stress-activated protein kinase, TREM-1=triggering receptor expressed on myeloid cell 1

1. Correspondence: Laboratoire de Recherche en Inflammation et Physiologie des Granulocytes, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7. E-mail: denis.girard@iaf.inrs.ca

tory episodes with cytokine-like activities and as such, have been proposed as DAMPs.

Neutrophils are the first immune cells to reach an infection site and constitute the first line of defense against microbial invaders. To reach the inflammatory site, neutrophils must migrate across endothelial cells and the surrounding tissue. This migration necessitates the secretion of tissue-degrading enzymes such as gelatinase and elastase. Once at the inflammatory sites, neutrophils phagocytose the microorganisms and release copious amounts of oxygen radicals, enzymes, and antimicrobial peptides. Most of these proteins are preformed and stored in granules, which are exported rapidly to the cell surface in a process referred to as degranulation.

Neutrophils possess four types of granules containing overlapping sets of proteins. These granules are characterized by the presence of specific proteins in the granule membranes and lumen. Azurophilic granules contain high amounts of lysosomal enzymes [18] and are characterized by the presence of granulophysin (CD63) in their membranes [19]. Gelatinase granules, more easily exocytosed, are the main reservoir of tissue-degrading enzymes, such as metalloproteinases, and specific granules are rich in antimicrobial peptides and thus, participate in the antimicrobial activity of neutrophils [20–22]. The membrane of these two granules contains specific markers such as CD66, CD15, or CD67. Finally, secretory vesicles, presumed to be formed by endocytosis [23], constitute the main reservoir of plasma proteins and membrane-associated receptors essential for neutrophil inflammatory response and are released easily in response to inflammatory molecules [24, 25]. Neutrophil degranulation occurs in part after activation of pathogen recognition receptors such as TLRs. In addition, proinflammatory cytokines such as IL-8, fMLP, and TNF- α induce neutrophil degranulation [20, 26–28].

In this study, we report a new role for S100A9 in leukocyte migration and function. We prove for the first time that S100A9, but not S100A8 or S100A12, induces neutrophil degranulation. More specifically, S100A9 induced the release of the secretory vesicles, the specific/gelatinase granules, but not azurophilic granules. This degranulation was found to be dependent on p38 and JNK but not ERK1/2 kinases. These findings suggest a crucial role of S100A9 in neutrophil physiology and support its classification as a DAMP.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Human rS100A8, rS100A9, and rS100A12 were produced as described previously [29] and found to contain <1 pg endotoxin/ μ g protein, as we reported previously [30]. PD98059, SB203580, BAPTA, EGTA, TNF- α , and mAb anti-albumin (clone HSA-11) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). GM-CSF and IL-4 were obtained from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA). Antiphospho-specific JNK1/2/SAPK G9 (pTpY^{183/187}), Erk-1/2 (pTpY^{185/187}), and p38 (pTpY^{180/182}) were obtained from BioSource (Camarillo, CA, USA). mAb against total p38 (sc-535) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), rabbit poly-

clonal antibody against Erk-1/2 was obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA), and rabbit polyclonal anti-SAPK/JNK was obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). mAb against CD35 (clone E11) and CD63 (clone H5C6) were purchased from BD PharMingen (San Diego, CA, USA). The anti-CD66b mAb (clone 80H3) was obtained from AbD Serotec (Raleigh, NC, USA). Rabbit polyclonal antibody against MMP-9 and mouse mAb against MPO (clone 2C7) were obtained from Abcam (Cambridge, MA, USA). JNK inhibitor II, p38 MAPK inhibitor III, and U0126 inhibitor were purchased from Calbiochem/Merck KGaA (Darmstadt, Germany). All other reagents were obtained from Sigma-Aldrich.

Neutrophil isolation

Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation, followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Inc., Quebec, Canada) as described previously [31]. Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to institutionally approved procedures. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion and found to be consistently >98%. Cell purity (>98%) was verified by cytology from cytocentrifuged preparations colored by Wright-Giemsa staining (Fisher Scientific, Ottawa, Canada). Cell viability was evaluated systematically before and after each treatment. Neutrophils were then resuspended [10×10^6 cells/mL in RPMI-HEPES (25 mM), penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 μ g/mL)] for all experiments.

Flow cytometry

Cell surface expression of CD35, CD63, and CD66b was monitored for assessing degranulation of secretory, azurophilic, and specific granules, respectively, by flow cytometry, as published previously [32], with a few modifications. Briefly, nonspecific binding of the antibodies was prevented by incubating the cells with PBS + 20% decomplemented autologous serum for 30 min on ice. After several washes with PBS, primary antibodies or an IgG₁ isotype control antibody were added at a concentration of 1 μ g/ml in PBS for 30 min on ice. Cells were washed twice in PBS and incubated with 1 μ g/ml FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody for 30 min on ice. After three washes, cells were resuspended in PBS, and analysis was performed with a FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). In some experiments, cells were preincubated for 30 min at 37°C with the inhibitors SB203580 (2 μ M), p38 MAPK inhibitor III (500 nM), PD98059 (10 μ M), JNKII (10 μ M), U0126 (5 μ M), BAPTA (30 μ M), or EGTA (1 mM).

Western blot analysis

Neutrophils [10×10^6 cells/mL in RPMI-HEPES (25 mM), penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 μ g/mL)] were stimulated with fMLP (10⁻⁶ M), S100A9 (40 μ g/mL), GM-CSF (65 ng/mL), IL-4 (250 ng/mL), or their diluents HBSS for 1–60 min at 37°C. In some experiments, cells were preincubated for 30 min at 37°C with the inhibitors SB203580 (2 μ M), p38 MAPK inhibitor III (500 nM), PD98059 (10 μ M), or JNKII (10 μ M). At the end of the incubation period, the cells were lysed in 4× Laemmli's sample buffer (0.25 M Tris-HCl, pH 6.8, 8% SDS, 40% glycerol, and 20% 2 β -ME), and aliquots corresponding to 1×10^6 cells were loaded onto 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose (p38 and Erk-1/2) or polyvinylidene difluoride membranes (JNK). For detection of MMP-9, MPO, and albumin, cells were preincubated with or without inhibitors and were stimulated for 1 h at the concentration mentioned above. Cells were then centrifuged at 13,000 RPM for 10 min at 4°C. Pellets were discarded, and supernatants equivalent to 1×10^6 cells for MMP-9 and albumin or 20×10^6 cells for MPO were separated on a 7.5% SDS-PAGE gel before being transferred to nitrocellulose membranes, which were blocked for 1 h at room temperature in TBS-Tween containing 5% non-fat dry milk (Carnation, Don Mills, Ontario, Canada). After washing, the antiphospho-specific p38, Erk-1/2, or JNK antibody was added at a final dilution of 1:1000 in TBS-Tween 0.15%. The antibody directed

against total p38, Erk1/2, or JNK was added at a final concentration of 1:400 in TBS-Tween 0.15%. A dilution of 1:2000 was used for antibodies MMP-9/gelatinase and albumin. Antibodies against MPO were used at 1:500 in TBS-Tween 0.15%. The membranes were kept overnight at 4°C, then washed with TBS-Tween, and incubated for 1 h at room temperature with a goat anti-rabbit IgG HRP secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA), diluted 1:20,000 in TBS-Tween + 5% nonfat dry milk, or a goat anti-mouse IgG HRP secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories), diluted 1:20,000 in TBS-Tween + 5% nonfat dry milk, followed by several washes. Protein expression was revealed using an enhanced chemiluminescence Western blot analysis detection system (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

Zymography assay

Neutrophils were stimulated as described previously [26] and then centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4°C, and the pellets were discarded. The supernatants (5 µl corresponding to 50,000 cells) were mixed with a nonreducing buffer (40% glycerol, Tris-HCl 1 M, pH 6.8, SDS 8%) and separated on 10% acrylamide gels containing 0.2% gelatin. Gels were washed twice for 30 min with 2.5% Triton X-100 and incubated overnight in digestion buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM). The gels were then stained with Coomassie blue 0.1% and destained.

Statistical analysis

Experimental data are expressed as means ± SEM. Repeated measures ANOVA (Dunnett multicomparison test) were performed using GraphPad Prism, Version 5.01. Differences were considered statistically significant as follows: *, P ≤ 0.05; **, P ≤ 0.01; and ***, P ≤ 0.005, versus buffer or appropriated diluent. All densitometric analyses were performed with a Fluor S Multilmager, Quantity One, Version 4.6.6 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

RESULTS

S100A9 up-regulates cell surface expression of granule markers

S100A9, S100A8, and S100A12 are highly regulated in inflammatory pathologies [8–10, 33–36]. We and others [12, 13, 30] have demonstrated major roles for these proteins in neutrophil adhesion, migration, and chemotaxis. In addition, recent data from our laboratory indicate that S100A9 increases neutrophil migration across endothelial cells in response to IL-8. As neutrophil migration is associated with degranulation, these results suggested a potential role for S100A9 in inducing the release of soluble factors by neutrophils. Secretion of proteins by neutrophils often requires degranulation [18, 37]. We therefore determined whether S100A9 increased cell surface expression of CD35, CD66b, and CD63 as markers of secretory, specific/gelatinase, and azurophilic granules, respectively. Cell surface expression was monitored by flow cytometry. As shown in Figure 1, S100A9 induced cell surface expression of CD35 and CD66b but not CD63. In contrast, fMLP induced CD35, CD66b, and CD63 expression significantly (the latter, after 5 min of stimulation). S100A9 induced CD35 up-regulation at concentrations as low as 1 µg/ml (data not shown). However,

maximal up-regulation was observed at concentrations of 10–40 µg/ml, similar to those observed in rheumatoid or gout synovial fluids [38]. rS100A8 and rS100A12 (purified using the same method) have no effect, thereby demonstrating that the activity of S100A9 was not a result of a contamination of the protein preparation (Fig. 1C).

We next investigated the possibility that S100A9 induced transient expression of CD63 by performing time-course experiments. Maximal response to S100A9 stimulation was observed at 30 min for CD35 (Fig. 2A) and 60 min for CD66b (Fig. 2B). Again, no effect on cell surface expression of CD63 was observed following stimulation with S100A9 (Fig. 2C), even after 2 h of stimulation (data not shown). In contrast, fMLP induced rapid and transient expression of CD63. These experiments suggested that S100A9 induces the release of secretory and specific or gelatinase granules.

S100A9 induces the release of gelatinase B

Gelatinase B (MMP-9) is a main component of specific and gelatinase granules known to be actively involved in leukocyte migration and tissue remodeling [39–41]. As we demonstrated that S100A9 increased cell surface expression of CD66b (contained in gelatinase granules), we next investigated whether S100A9 could induce the release and activation of MMP-9 by zymography. As illustrated in Figure 3, S100A9 induced the release of enzymatically active MMP-9. Although this secretion was delayed compared with TNF-α (detected after 30 min instead of 15 min), it closely correlated with the kinetics of CD66b surface expression. Interestingly, the intensity of the response was similar for S100A9 and TNF-α. As expected, S100A8 and S100A12 did not induce the release and activation of MMP-9 as assessed by zymography (Fig. 3C).

S100A9 induces neutrophil degranulation by a MAPK-dependent mechanism

MAPKs are known to be actively involved in the inflammatory process and to participate in many neutrophil functions, including cell adhesion, chemotaxis, apoptosis, production of cytokines and chemokines, and degranulation [42–47]. We thus investigated the activation of p38, Erk-1/2, and JNK MAPKs in S100A9-induced neutrophils by examining phosphorylation of these signaling molecules. As illustrated in Figure 4, S100A9 induced the phosphorylation of the three MAPKs. This phosphorylation was reversed by pretreatment with the MAPK inhibitors SB203580 (p38 inhibitor, Fig. 4A), PD98059 (MEK-Erk1/2 inhibitor, Fig. 4B), and JNKII (JNK inhibitor, Fig. 4C).

Knowing that S100A9 induced degranulation and MAPK activation, we next examined the involvement of MAPKs in S100A9-induced degranulation. Cells were preincubated in the presence or absence of MAPK inhibitors for 30 min and then stimulated with or without S100A9. Only cell surface expression of CD35 and CD66b was studied, as we demonstrated previously, CD63 is not modulated by S100A9 (Fig. 2C). The MEK-Erk1/2 PD98059 and U0126 inhibitors have no effect on the ability of S100A9 to induce cell surface ex-

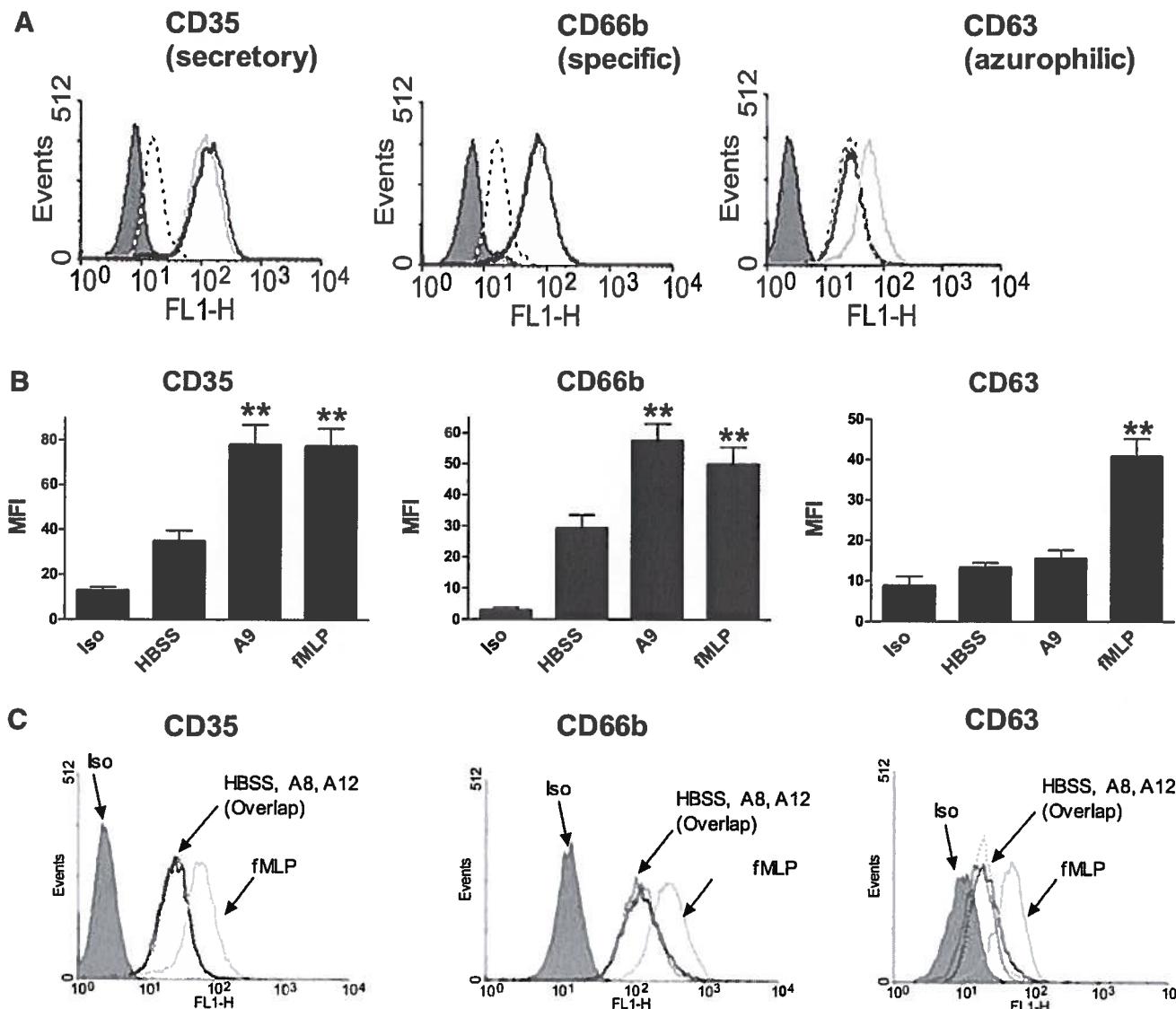


Figure 1. S100A9 induces degranulation of specific/gelatinase and secretory but not azurophilic granules in human neutrophils. (A) Release of subset types of granules was tested by flow cytometry following cell surface expression of CD35, CD66b, and CD63, as described in Materials and Methods. Cells were incubated in the presence of HBSS (control), 40 µg/mL S100A9 (A9) for 30 min, or fMLP (10^{-6} M) for 5 min. Legend is as follow: Isotypic antibody (solid), control (dotted), S100A9 (open), and fMLP (gray). Results are from one representative experiment of three others. FL1-H, Fluorescence 1-height. (B) Data represent the mean \pm SEM of at least three experiments done on cells from different donors. (C) S100A8 and S100A12 did not induce cell surface expression of CD35, CD66b, and CD63, as assessed by flow cytometry. Results are from one representative experiment of three others. Iso, Isotype.

pression of both markers (Fig. 5). In contrast, the p38 (SB203580) and JNK (JNKII) inhibitors significantly inhibited the S100A9-induced expression of CD35 and CD66b by ~80%, indicating an important role for these kinases in S100A9-induced neutrophil degranulation. p38 MAPK inhibitor III was also tested in parallel with SB203580. Both inhibitors blocked equally the effect of S100A9 on CD35 and CD66b expression (data not shown). In addition, using BAPTA and EGTA, we have determined the role of intracellular and extracellular calcium in S100A9-induced CD35

and CD66b cell surface expression and found that only intracellular calcium is involved (Fig. 5, C and D).

S100A9 induces the release of albumin and MMP-9 (gelatinase B)

To support these findings further, the release of albumin and MMP-9 in S100A9-induced supernatants was investigated next, as representative proteins contained in secretory (CD35) and specific and gelatinase (CD66b) granules, respectively [18, 37]. As shown in Figure 6, supernatant of neutrophils stimulated

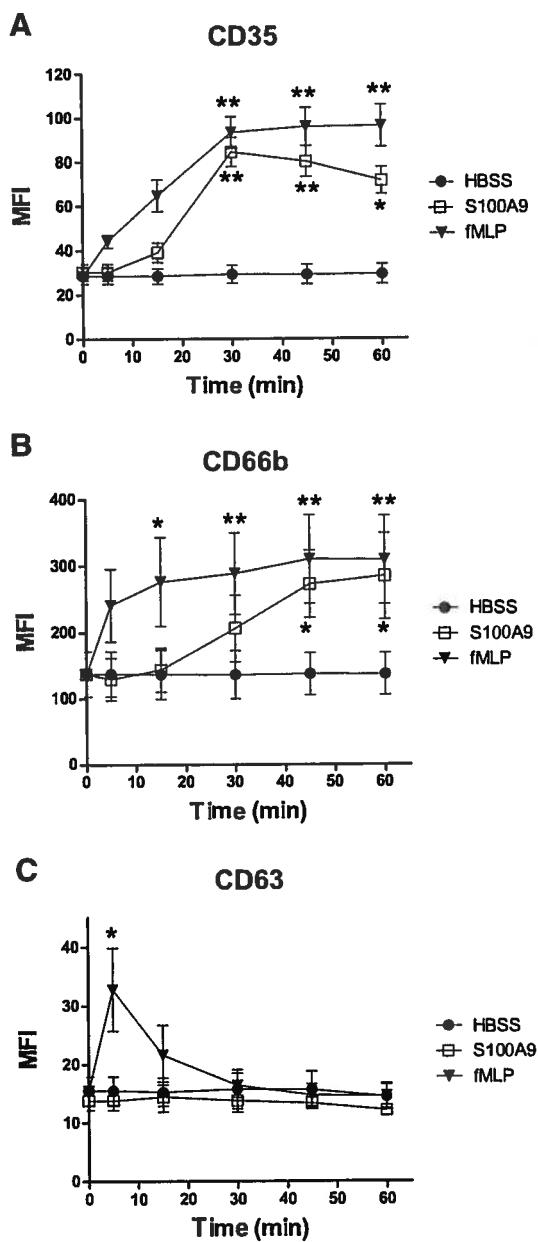


Figure 2. Occurrence of different granule markers of human neutrophils. Neutrophils were stimulated with 40 µg/mL S100A9 and were then tested at various times for cell surface expression of (A) CD35, (B) CD66b, and (C) CD63. MFI of cells was quantified by flow cytometry. Data represent the mean ± SEM of at least three different experiments.

with S100A9 contained elevated levels of albumin and MMP-9, as assessed by immunoblotting. As expected, inhibition of Erk-1/2 with PD98059 had no effect on the secretion of these proteins by S100A9-stimulated neutrophils. In contrast, pretreatment with p38 and JNK inhibitors markedly decreased the level of protein expression of albumin and MMP-9 (Fig. 6). Treatment with the JNKII inhibitor alone was found to increase the basal level of MMP-9, an observation reported previ-

ously [26]. Taken together, these results demonstrate that S100A9 induces the release of two granule proteins in the external milieu via p38 and JNK activation, corroborating the observed, increased cell surface expression of CD35 and CD66b (Fig. 5).

DISCUSSION

In this study, S100A9, but not S100A8 or S100A12, was found to induce degranulation in human neutrophils. This was demonstrated by the fact that S100A9 increased the cell surface expression of CD35 and CD66b, two markers of secretory and specific/gelatinase granules, respectively. Also, the expression of albumin and MMP-9, known to be localized in secretory and specific/gelatinase granules, was increased in the supernatant of S100A9-induced neutrophils. Moreover, zymography experiments clearly indicated that MMP-9 preserved its enzymatic activity. In addition to the identification of this novel property for S100A9 in general neutrophil cell physiology, we provide the first evidence that this occurs by a MAPK-dependent mechanism.

Over the years, several studies showed potent proinflammatory roles for MRPs. For example, S100A8, S100A9, and S100A12 were shown to be chemotactic for neutrophils and to induce their release from the bone marrow [12, 13, 30]. Newton and Hogg [14] also demonstrated the activation of the β2 integrin Mac-1 (CD18) after exposure to S100A9, suggesting a role for this protein in neutrophil adhesion and migration. In that study, S100A8 negatively regulated S100A9 activity on neutrophil adhesion to fibrinogen, showing an anti-inflammatory role of S100A8 [14]. Similarly, murine S100A8, also known as CP-10, although chemotactic for neutrophils, exhibits anti-inflammatory properties when oxidized [48]. In addition, recent results demonstrated that S100A9, but not S100A8 or S100A12, stimulates neutrophil adhesion to fibronectin and vitronectin [49]. S100A12, on the other hand, induces IL-2 and TNF-α secretion from macrophages and lymphocytes [50]. Taken together, these data suggest that S100A8, S100A9, and S100A12 are proinflammatory cytokines with multiple activities on cells of innate and adaptive immunity. However, their respective functions still need further analysis. Of interest, in vivo experiments, S100A8 homodimers, S100A9 homodimers, and S100A8/A9 heterodimers are routinely found to be released separately [11, 13]. Interestingly, we find consistently that S100A9 is a more potent activator of neutrophils than S100A8 or S100A8/A9. This fact is corroborated by a study from Nancy Hogg and R. A. Newton [14] reporting that S100A8 negatively regulates S100A9 activity by forming the heterodimer S100A8/A9.

In this study, we demonstrate that S100A9, but not S100A8 or S100A12, induces neutrophil degranulation. During inflammation, neutrophils leave the blood to migrate to the tissue, where they phagocytose microbial invaders and release reactive oxygen species, antimicrobial peptides, and enzymes. During their migration, neutrophils encounter various cytokines that will cause the release of their granules [37]. Neutrophil degranulation is indeed important for the release of tissue-degrading enzymes such as elastase and gelatinase, which will

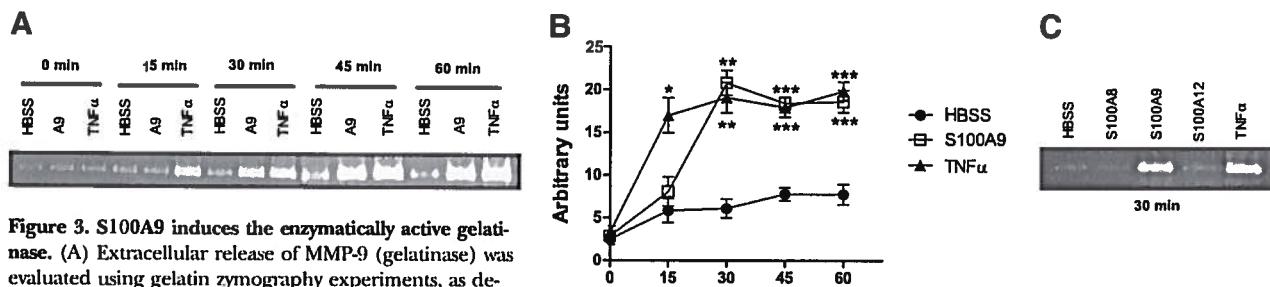


Figure 3. S100A9 induces the enzymatically active gelatinase. (A) Extracellular release of MMP-9 (gelatinase) was evaluated using gelatin zymography experiments, as described in Materials and Methods. Data are from one experiment representative of three others. (B) Densitometric analysis of gelatinase activity observed in the gels. The data are arbitrary units obtained by quantitative analysis of negatively stained bands through computerized image analysis. (C) S100A8 and S100A12 did not induce the release and activity of MMP-9. Data represent the mean \pm SEM of four experiments performed on cells from different donors.

ease the migration of leukocytes across the endothelium and into the surrounding tissue. Neutrophils possess various kinds of granules released sequentially during inflammation [18]. We demonstrated that stimulation with S100A9 induces the release of secretory vesicles and specific/gelatinase granules. Secretory vesicles represent the main reservoir of multiple cell surface receptors including $\beta 2$ -integrin Mac-1, CR1, fMLP receptor, and the LPS/lipoteichoic acid receptor (CD14), to name a few [24, 25, 51, 52]. These endocytic vesicles are mobilized in response to various stimuli at the earliest phase of the inflammatory response [23, 27]. By stimulating the release of secretory vesicles, S100A9 increases cell surface expression of the $\beta 2$ -integrin Mac-1, thus leading to enhanced adhesion to the endothelium. These results corroborate previous data obtained by our laboratory and others, demonstrating increased adhesion of neutrophils following stimulation with

S100A9 [12–14]. Increasing levels of CRs on cell surface following stimulation with S100A9 also suggest that it could assist neutrophil phagocytosis, another important function of neutrophils for the control of infections [53]. However, the role of S100A9 in neutrophil phagocytosis remains to be properly elucidated.

By inducing the release of specific/gelatinase granules, S100A9 also promotes the secretion of enzymes playing an important role in tissue remodeling, destruction of cartilage, and leukocyte transmigration. For instance, gelatinase causes degradation of extracellular matrix by cleaving collagen, elastin, fibronectin, and laminin, to name a few [54]. Increased expressions of MMPs have been documented in fibroses and pulmonary diseases, conditions often associated with the presence of S100 proteins [10, 33, 35, 39, 55–57]. MMPs also need to be activated to fulfill their functions [41]. Our results show that

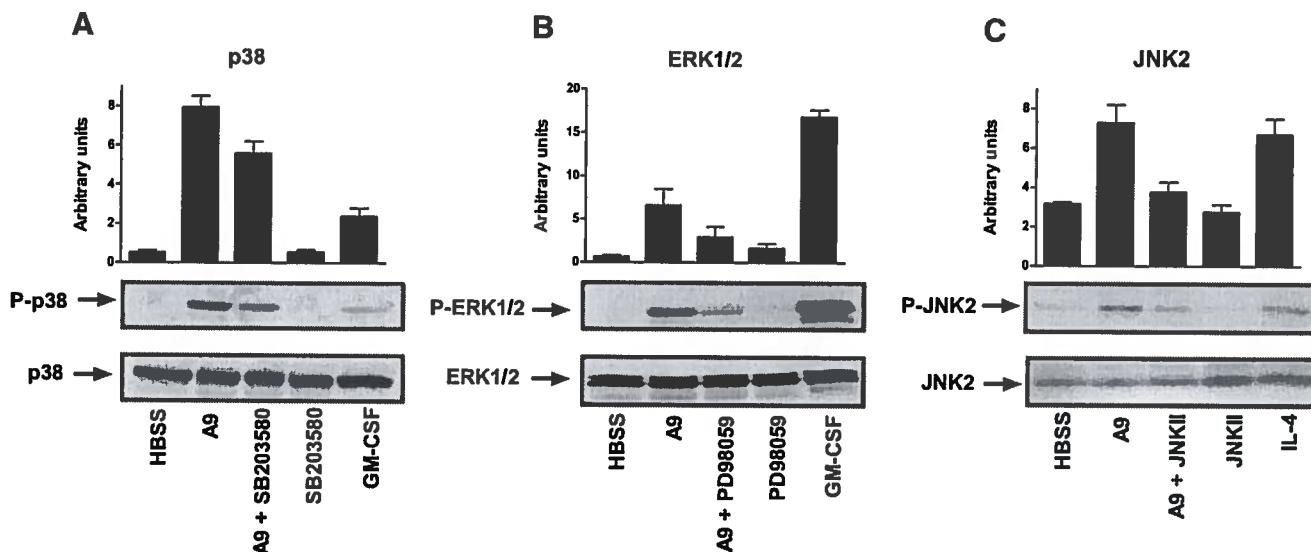


Figure 4. S100A9 induces the phosphorylation and activation of MAPKs. Phosphorylation of p38 (P-p38; A), ERK1/2 (P-ERK1/2; B), and JNK (P-JNK2; C) was assessed by immunoblotting using a specific antibody as described in Materials and Methods. Cells (1×10^6) were incubated with 40 μ g/mL S100A9 for 30 min or 1 min with 65 ng/mL GM-CSF. For some samples, a 30-min pretreatment with specific inhibitors of the MAPK (SB203580 10 μ M, PD98059 10 μ M, or JNKII 10 μ M) was performed. Shown here is one representative experiment out of three. Densitometric analyses were performed on all three experiments.

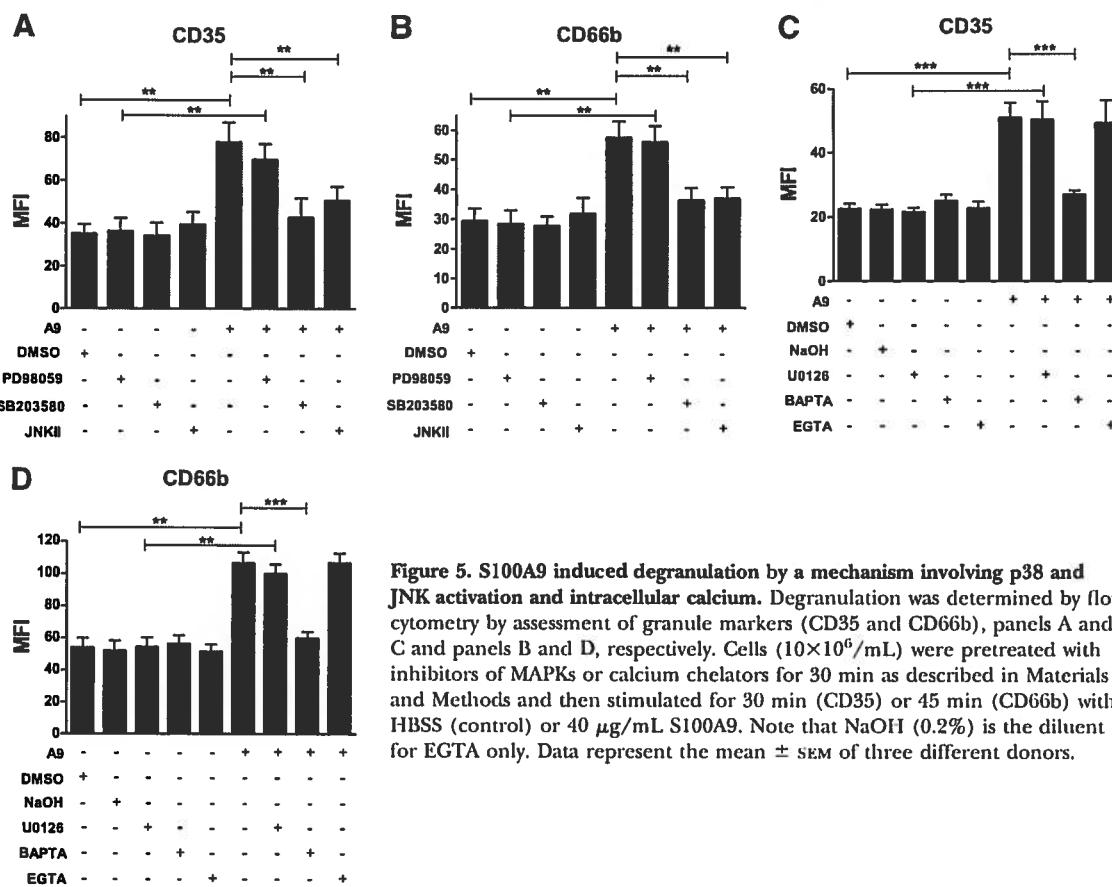


Figure 5. S100A9 induced degranulation by a mechanism involving p38 and JNK activation and intracellular calcium. Degranulation was determined by flow cytometry by assessment of granule markers (CD35 and CD66b), panels A and C and panels B and D, respectively. Cells (10×10^6 /mL) were pretreated with inhibitors of MAPKs or calcium chelators for 30 min as described in Materials and Methods and then stimulated for 30 min (CD35) or 45 min (CD66b) with HBSS (control) or 40 μ g/mL S100A9. Note that NaOH (0.2%) is the diluent for EGTA only. Data represent the mean \pm SEM of three different donors.

S100A9 induces not only the release of MMP-9 but also its activation (based on the zymography experiments). S100A8/A9 was shown recently to play an active role in the destruction of cartilage by increasing metalloproteinases [15, 16]. Furthermore, Viemann et al. [58] suggested that S100A8/A9 could induce the degradation of endothelial cell tight junctions, thereby increasing monocyte migration through the endothelium. Results presented here concur with these studies and give a better view about the mechanism of action of S100A9. Indeed, induction of degranulation through S100A9 stimulation could likely lead to erosion of cartilage and synovium. This hints that S100A9 could represent an interesting drug target for the control of inflammation in autoimmune diseases.

Azurophilic granules contain high amounts of microbicidal proteins such as defensins, presenilin, stomatin, and MPO [59, 60]. Granulophysin (CD63) is a platelet lysosomal membrane protein, commonly used as a marker of azurophilic granules [19, 61], which are secreted only following intense stimulation of neutrophils [27, 28]. In fact, exocytosis of azurophilic granules after a stimulation with PMA or fMLP (two potent leukocyte activators) is limited in time and only occurs to a minimal extent [62]. These observations explain the rapid and transient expression of CD63 at the surface of neutrophils after 5 min of stimulation with fMLP but not S100A9. Calcium mobilization is a crucial secondary signal responsible for granule

exocytosis, including azurophilic granules [63]. Interestingly, Sengelov et al. [27] showed that neutrophil degranulation varied according to the nature of the agonist and its capacity to induce a calcium burst. In the present study, stimulation with S100A9 was not potent enough to induce the release of azurophilic granules. This is in agreement with the weak calcium mobilization induced by S100A9 in neutrophils [11]. Of note, S100A9-induced secretory and specific/gelatinase granule release was inhibited by the intracellular calcium chelator BAPTA but not by the extracellular EGTA chelator (Fig. 5).

Increasing evidence suggests that cells release intracellular proteins to alert the innate and adaptive immune systems. These intracellular proteins, termed alarmins or DAMPs, are released upon cell necrosis or following cellular activation. They are presumed to play an important role in infection and autoinflammatory diseases. IL-1, HMGB1, and heat shock proteins are good examples of DAMPs. Several observations support S100A8, S100A9, and S100A12 as DAMPs. For example, although MRPs are cytoplasmic proteins, their presence in high concentrations in inflammatory pathologies has been noted. S100A8/A9 is found on the endothelium near sites of extravasations, in the serum and synovial fluids of rheumatoid arthritis patients [9, 38], as well as in the feces and serum of patients with inflammatory bowel disease. However, the mechanism of secretion of S100A8/A9 remains unclear. S100A8/A9

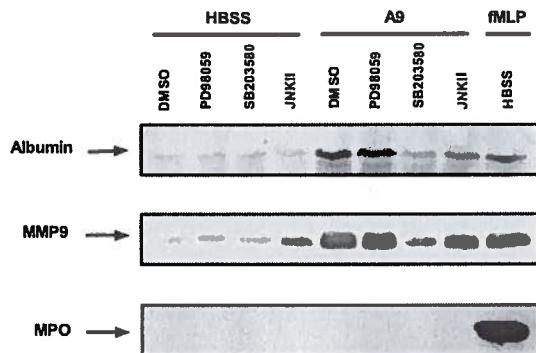


Figure 6. S100A9 induces the release of albumin, gelatinase (MMP-9), but not MPO by a p38/JNK-dependent mechanism. Degranulation was confirmed by assessment of secretory (albumin), azurophilic (MPO), and specific/gelatinase (MMP-9) markers in the medium. Cells (10×10^6 /mL) were pretreated with inhibitors of MAPKs for 30 min as described in Materials and Methods and then stimulated for 45 min with HBSS (control), 40 μ g/mL S100A9, or fMLP (1×10^{-6} M), and supernatant was used for immunoblotting experiments. Shown here is one representative experiment out of three.

is known to be secreted by neutrophils interacting with endothelial cells and thus, presumed to play a role in leukocyte migration [64, 65]. In addition, it is secreted by neutrophils stimulated with monosodium urate crystals and *Porphyromonas gingivalis*, as well as PMA-stimulated monocytes [66–68]. Although its secretion pathway remains largely unexplored, it appears to necessitate tubulin polymerization [66]. Necrotic neutrophils have also been shown to release S100A8/A9 [69]. These modes of release are characteristics of DAMPs.

Several receptors appear to mediate the effects of DAMPs, including TLRs, RAGE, and TREM-1 [1, 70]. Interestingly, although the identity of the receptor for S100A9 is open for debate, RAGE and TLRs have been suggested as potential candidates. RAGE has been identified as a receptor for S100A12 [71] but not S100A9 [65]. S100A8/A9 has also been reported to bind to the scavenger receptor (CD36) on macrophages [72]. More recently, S100A8 was shown to be an endogenous activator of the TLR4 [73]. Interestingly, signal transduction induced by these receptors, as well as with the DAMP receptor TREM-1, involves MAPKs [47, 74, 75], which have been linked to many aspects of the inflammatory response, such as adhesion, chemotaxis, and degranulation [43, 44, 46]. MAPKs are also activated by numerous inflammatory cytokines and peptides such as fMLP, platelet factor 4, and TNF- α in human neutrophils [76–78]. Stimulation with S100A8/A9 has been linked to activation of NF- κ B and MAPK in cancer cells [79, 80]. In the present study, we demonstrate activation of p38, ERK1/2, and JNK2 in human neutrophils in response to S100A9. In addition, we show the involvement of p38 and JNK, but not ERK1/2, in neutrophil degranulation induced by S100A9, further supporting the involvement of S100A9 as a DAMP. Despite the fact that we showed an important role of p38 and JNK in neutrophil S100A9-induced degranulation,

activation of ERK1/2 suggests an involvement of this kinase in other neutrophil functions.

In conclusion, we propose that S100A9, present at the inflammatory site, activates neutrophil degranulation, leading to the release of tissue-degrading enzymes and the up-regulation of several cell surface receptors. S100A9 would thus enhance neutrophil function during infections and could contribute to amplify the tissue destruction associated with neutrophil activation in several autoimmune diseases.

AUTHORSHIP

Conception and design: P. A. T., D. G., and J-C. S. Performed research: J-C. S. Analysis and interpretation of data: P. A. T., D. G., and J-C. S. P. A. T., D. G., and J-C. S. wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors received financial support from the Canadian Institutes of Health Research, no. FRN 84226. P. A. T. holds a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. We thank Patrick J. Devine for critical reading of this manuscript.

REFERENCES

- Srikrishna, G., Freeze, H. H. (2009) Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia* 11, 615–628.
- Schafer, B. W., Heizmann, C. W. (1996) The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem. Sci.* 21, 134–140.
- Hessien, P. A., Edgeworth, J., Hogg, N. (1993) MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 53, 197–204.
- Zwadio, G., Bruggen, J., Gerhards, G., Schlegel, R., Sorg, C. (1988) Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues. *Clin. Exp. Immunol.* 72, 510–515.
- Brandzaeg, P., Dale, I., Gabrielsen, T. O. (1992) The leucocyte protein L1 (calprotectin): usefulness as an immunohistochemical marker antigen and putative biological function. *Histopathology* 21, 191–196.
- Yen, T., Harrison, C. A., Deverey, J. M., Leong, S., Iismaa, S. E., Yoshimura, T., Geczy, C. L. (1997) Induction of the S100 chemotactic protein, CP-10, in murine microvascular endothelial cells by proinflammatory stimuli. *Blood* 90, 4812–4821.
- Teigkamp, S., Bhardwaj, R. S., Roth, J., Meinardus-Hager, G., Karas, M., Sorg, C. (1991) Calcium-dependent complex assembly of the myeloid differentiation proteins MRP-8 and MRP-14. *J. Biol. Chem.* 266, 13462–13467.
- Lugering, N., Stoll, R., Kucharzik, T., Schmid, K. W., Rohrmann, G., Burmeister, G., Sorg, C., Domschke, W. (1995) Immunohistochemical distribution and serum levels of the Ca(2+)-binding proteins MRP8, MRP14 and their heterodimeric form MRP8/14 in Crohn's disease. *Digestion* 56, 406–414.
- Foell, D., Roth, J. (2004) Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis Rheum.* 50, 3762–3771.
- Golden, B. E., Clohessy, P. A., Russell, G., Fagerhol, M. K. (1996) Calprotectin as a marker of inflammation in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* 74, 136–139.
- Ryckman, C., McColl, S. R., Vandal, K., de Medicis, R., Lussier, A., Pouelle, P. E., Tessier, P. A. (2003) Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 2310–2320.
- Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M., Tessier, P. A. (2003) Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J. Immunol.* 170, 3233–3242.
- Vandal, K., Rouleau, P., Boivin, A., Ryckman, C., Talbot, M., Tessier, P. A. (2003) Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 171, 2602–2609.

14. Newton, R. A., Hogg, N. (1998) The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the β 2 integrin Mac-1 on neutrophils. *J. Immunol.* **160**, 1427–1435.
15. Van Lent, P. L., Grevers, L., Blom, A. B., Sloetjes, A., Mort, J. S., Vogl, T., Nacken, W., van den Berg, W. B., Roth, J. (2008) Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 1750–1758.
16. Van Lent, P. L., Grevers, L. C., Blom, A. B., Arntz, O. J., van de Loo, F. A., van der Kraan, P., Abdollahi-Roodsaz, S., Srikrishna, G., Freeze, H., Sloetjes, A., Nacken, W., Vogl, T., Roth, J., van den Berg, W. B. (2008) Stimulation of chondrocyte-mediated cartilage destruction by S100A8 in experimental murine arthritis. *Arthritis Rheum.* **58**, 3776–3787.
17. Euc, I., Pietz, B., Storck, J., Klempf, M., Sorg, C. (2000) Transendothelial migration of 27E10+ human monocytes. *Int. Immunol.* **12**, 1593–1604.
18. Faurschou, M., Borregaard, N. (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* **5**, 1317–1327.
19. Cham, B. P., Gerrard, J. M., Bainton, D. F. (1994) Granulophysin is located in the membrane of azurophilic granules in human neutrophils and mobilizes to the plasma membrane following cell stimulation. *Am. J. Pathol.* **144**, 1369–1380.
20. Kjeldsen, L., Bjerrum, O. W., Askjaer, J., Borregaard, N. (1992) Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules. *Biochem. J.* **287**, 603–610.
21. Sengelov, H., Follin, P., Kjeldsen, L., Lollikie, K., Dahlgren, C., Borregaard, N. (1995) Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J. Immunol.* **154**, 4157–4165.
22. Mollinedo, F., Nakajima, M., Llorente, A., Barbosa, E., Callejo, S., Gajate, C., Fabra, A. (1997) Major co-localization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils. *Biochem. J.* **327**, 917–923.
23. Borregaard, N., Miller, L. J., Springer, T. A. (1987) Chemoattractant-regulated mobilization of a novel intracellular compartment in human neutrophils. *Science* **237**, 1204–1206.
24. Sengelov, H., Kjeldsen, L., Diamond, M. S., Springer, T. A., Borregaard, N. (1993) Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (α m β 2) in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **92**, 1467–1476.
25. Sengelov, H., Kjeldsen, L., Kroze, W., Berger, M., Borregaard, N. (1994) Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. *J. Immunol.* **153**, 804–810.
26. Binet, F., Girard, D. (2008) Novel human neutrophil agonistic properties of arsenite trioxide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and/or c-jun NH2-terminal MAPK but not extracellular signal-regulated kinases 1/2. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 1613–1622.
27. Sengelov, H., Kjeldsen, L., Borregaard, N. (1993) Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J. Immunol.* **150**, 1535–1543.
28. Faurschou, M., Sorensen, O. E., Johnsen, A. H., Askjaer, J., Borregaard, N. (2002) Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. *Biochim. Biophys. Acta* **1591**, 29–35.
29. Ryckman, C., Robichaud, G. A., Roy, J., Cantin, R., Tremblay, M. J., Tessier, P. A. (2002) HIV-1 transcription and virus production are both accentuated by the proinflammatory myeloid-related proteins in human CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol.* **169**, 3307–3313.
30. Rouleau, P., Vandal, K., Ryckman, C., Poubelle, P. E., Boivin, A., Talbot, M., Tessier, P. A. (2003) The calcium-binding protein S100A12 induces neutrophil adhesion, migration, and release from bone marrow in mouse at concentrations similar to those found in human inflammatory arthritis. *Clin. Immunol.* **107**, 46–54.
31. Girard, D., Paquet, M. E., Paquin, R., Beaulieu, A. D. (1996) Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood* **88**, 3176–3184.
32. Jog, N. R., Rane, M. J., Lominadze, G., Luerman, G. C., Ward, R. A., McLeish, K. R. (2007) The actin cytoskeleton regulates exocytosis of all neutrophil granule subsets. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, C1690–C1700.
33. Clohessy, P. A., Golden, B. E. (1996) Elevated plasma levels of L1L and L1H in CF patients. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 310S.
34. Foell, D., Kane, D., Bresnihan, B., Vogl, T., Nacken, W., Sorg, C., Fitzgerald, O., Roth, J. (2003) Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **42**, 1383–1389.
35. Foell, D., Seeliger, S., Vogl, T., Koch, H. G., Maschek, H., Harms, E., Sorg, C., Roth, J. (2003) Expression of S100A12 (EN-RAGE) in cystic fibrosis. *Thorax* **58**, 613–617.
36. Foell, D., Wittkowski, H., Hammerschmidt, I., Wulfraat, N., Schmeling, H., Frosch, M., Horneff, G., Kuis, W., Sorg, C., Roth, J. (2004) Monitoring neutrophil activation in juvenile rheumatoid arthritis by S100A12 serum concentrations. *Arthritis Rheum.* **50**, 1286–1295.
37. Borregaard, N., Sorensen, O. E., Theilgaard-Monch, K. (2007) Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* **28**, 340–345.
38. Frosch, M., Strey, A., Vogl, T., Wulfraat, N. M., Kuis, W., Sunderkotter, C., Harms, E., Sorg, C., Roth, J. (2000) Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **43**, 628–637.
39. Atkinson, J. J., Senior, R. M. (2003) Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **28**, 12–24.
40. Gaggar, A., Shayakhmetov, D., Lieber, A. (2007) Identifying functional adenovirus-host interactions using tandem mass spectrometry. *Methods Mol. Med.* **131**, 141–155.
41. Sternlicht, M. D., Werb, Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 463–516.
42. Duan, W., Wong, W. S. (2006) Targeting mitogen-activated protein kinases for asthma. *Curr. Drug Targets* **7**, 691–698.
43. Hierlaar, E., Brown, Z. (1999) p38 MAPK signaling cascades in inflammatory disease. *Mol. Med. Today* **5**, 439–447.
44. Kasper, B., Brandt, E., Ernst, M., Petersen, F. (2006) Neutrophil adhesion to endothelial cells induced by platelet factor 4 requires sequential activation of Ras, Syk, and JNK MAP kinases. *Blood* **107**, 1768–1775.
45. Krump, E., Sanghera, J. S., Pelech, S. L., Furuya, W., Grinstein, S. (1997) Chemotactic peptide N-formyl-Met-Leu-Phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **272**, 937–944.
46. Mocsai, A., Jakus, Z., Vantis, T., Berton, G., Lowell, C. A., Ligeti, E. (2000) Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J. Immunol.* **164**, 4321–4331.
47. Rane, M. J., Carrithers, S. L., Arthur, J. M., Klein, J. B., McLeish, K. R. (1997) Formyl peptide receptors are coupled to multiple mitogen-activated protein kinase cascades by distinct signal transduction pathways: role in activation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase. *J. Immunol.* **159**, 5070–5078.
48. Harrison, C. A., Raftery, M. J., Walsh, J., Alewood, P., Iismaa, S. E., Thivierge, S., Geczy, C. L. (1999) Oxidation regulates the inflammatory properties of the murine S100 protein S100A8. *J. Biol. Chem.* **274**, 8561–8569.
49. Anceriz, N., Vandal, K., Tessier, P. A. (2007) S100A9 mediates neutrophil adhesion to fibronectin through activation of β 2 integrins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 84–89.
50. Hofmann, M. A., Drury, S., Fu, C. F., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, N., Bierhaus, A., Nawroth, P., Slattery, T., Beach, D., McClary, J., Nagashima, M., Morsig, J., Stern, D., Schmidt, A. M. (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* **97**, 889–901.
51. Detmers, P. A., Zhou, D., Powell, D., Lichenstein, H., Kelley, M., Pirovko, R. (1995) Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc γ RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase. *J. Immunol.* **155**, 2085–2095.
52. Sengelov, H., Boulay, F., Kjeldsen, L., Borregaard, N. (1994) Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem. J.* **299**, 473–479.
53. Nathan, C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 173–182.
54. O'Reilly, P. J., Gaggar, A., Blalock, J. E. (2008) Interfering with extracellular matrix degradation to blunt inflammation. *Curr. Opin. Pharmacol.* **8**, 242–248.
55. Barthe, C., Figarella, C., Carrere, J., Guy-Crotte, O. (1991) Identification of "cystic fibrosis protein" as a complex of two calcium-binding proteins present in human cells of myeloid origin. *Biochim. Biophys. Acta* **1096**, 175–177.
56. Henry, M. T., McMahon, K., Mackarel, A. J., Prikk, K., Sorsa, T., Maisi, P., Sepp, R., Fitzgerald, M. X., O'Connor, C. M. (2002) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in sarcoidosis and IPF. *Eur. Respir. J.* **20**, 1220–1227.
57. Suga, M., Iyonaga, K., Okamoto, T., Gushima, Y., Miyakawa, H., Akaike, T., Ando, M. (2000) Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**, 1949–1956.
58. Viemann, D., Strey, A., Janning, A., Jurk, K., Klimmek, K., Vogl, T., Hirano, K., Ichida, F., Foell, D., Kehrel, B., Gerke, V., Sorg, C., Roth, J. (2005) Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. *Blood* **105**, 2955–2962.
59. Bainton, D. F., Ulliyot, J. L., Farquhar, M. G. (1971) The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J. Exp. Med.* **134**, 907–934.
60. Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarcik, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F., Lehrer, R. I. (1985) Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **76**, 1427–1435.
61. Nishibori, M., Cham, B., McNicol, A., Shalev, A., Jain, N., Gerrard, J. M. (1993) The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin. *J. Clin. Invest.* **91**, 1775–1782.
62. Estensen, R. D., White, J. G., Holmes, B. (1974) Specific degranulation of human polymorphonuclear leukocytes. *Nature* **248**, 347–348.
63. Pozzan, T., Lew, D. P., Wollheim, C. B., Tsien, R. Y. (1983) Is cytosolic ionized calcium regulating neutrophil activation? *Science* **221**, 1413–1415.
64. Hogg, N., Allen, C., Edgeworth, J. (1989) Monoclonal antibody 5.5 reacts with p8,14, a myeloid molecule associated with some vascular endothelium. *Eur. J. Immunol.* **19**, 1053–1061.

65. Robinson, M. J., Tessier, P., Poulsom, R., Hogg, N. (2002) The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 3658–3665.
66. Rammes, A., Roth, J., Goebeler, M., Klempt, M., Hartmann, M., Sorg, C. (1997) Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 9496–9502.
67. Ryckman, C., Gilbert, C., De Medicis, R., Lussier, A., Vandal, K., Tessier, P. A. (2004) Monosodium urate monohydrate crystals induce the release of the proinflammatory protein S100A8/A9 from neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 433–440.
68. Kido, J., Kido, R., Suryono, Kataoka, M., Fagerhol, M. K., Nagata, T. (2003) Calprotectin release from human neutrophils is induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide via the CD-14-Toll-like receptor-nuclear factor κ B pathway. *J. Periodontal Res.* **38**, 557–563.
69. Vaganasi, A., Panyutich, A., Miyasaki, K. T., Murthy, R. K. (2001) Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 130–134.
70. Bouchon, A., Facchetti, F., Weigand, M. A., Colonna, M. (2001) TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* **410**, 1103–1107.
71. Hofmann, M. A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kamibham, N., Bierhaus, A., Nawroth, P., Neurath, M. F., Slattery, T., Beach, D., McClary, J., Nagashima, M., Morser, J., Stern, D., Schmidt, A. M. (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* **97**, 889–901.
72. Kerkhoff, C., Sorg, C., Tandon, N. N., Nacken, W. (2001) Interaction of S100A8/S100A9-arachidonic acid complexes with the scavenger receptor CD36 may facilitate fatty acid uptake by endothelial cells. *Biochemistry* **40**, 241–248.
73. Vogl, T., Tenbrock, K., Ludwig, S., Leukert, N., Ehrhardt, C., van Zoelen, M. A., Nacken, W., Foell, D., van der Poll, T., Sorg, C., Roth, J. (2007) Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat. Med.* **13**, 1042–1049.
74. O'Neill, L. A. (2002) Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/Toll-like receptor superfamily. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **270**, 47–61.
75. Origlia, N., Righi, M., Capsoni, S., Cattaneo, A., Fang, F., Stern, D. M., Chen, J. X., Schmidt, A. M., Arancio, O., Yan, S. D., Domenici, L. (2008) Receptor for advanced glycation end product-dependent activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to amyloid- β -mediated cortical synaptic dysfunction. *J. Neurosci.* **28**, 3521–3530.
76. Heit, B., Liu, L., Colarusso, P., Puri, K. D., Kubes, P. (2008) PI3K accelerates, but is not required for, neutrophil chemotaxis to fMLP. *J. Cell Sci.* **121**, 205–214.
77. Nick, J. A., Avdi, N. J., Young, S. K., Knall, C., Gerwins, P., Johnson, G. L., Worthen, G. S. (1997) Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and fMLP. *J. Clin. Invest.* **99**, 975–986.
78. Rafiee, P., Lee, J. K., Leung, C. C., Raffin, T. A. (1995) TNF- α induces tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in adherent human neutrophils. *J. Immunol.* **154**, 4785–4792.
79. Ghavami, S., Raschedi, I., Dattilo, B. M., Eshraghi, M., Chazin, W. J., Hashemi, M., Wesselborg, S., Kerkhoff, C., Los, M. (2008) S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 1484–1492.
80. Hermani, A., De Servi, B., Medunjanin, S., Tessier, P. A., Mayer, D. (2006) S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF- κ B signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells. *Exp. Cell Res.* **312**, 184–197.

KEYWORDS:

Inflammation · granules · flow cytometry · zymography

Discussion et conclusion

Dans cette étude, nous avons observé que la protéine S100A9 induit la dégranulation du neutrophile humain. Ce résultat a été démontré par le fait que cette protéine induit une augmentation du niveau d'expression du CD35 et du CD66b, des marqueurs des vésicules sécrétoires et des granules spécifiques/gélatinases, respectivement. Par contre, S100A9 n'a eu aucun effet sur l'expression du marqueur de granules azurophiliques, le CD63. De plus, les protéines S100A8 et S100A12 n'ont induit aucune variation dans l'expression de l'un ou l'autre de ces marqueurs, démontrant une activité spécifique de la protéine S100A9. Dans un deuxième temps, nous avons démontré que l'albumine et la MMP-9, deux protéines localisées dans les vésicules sécrétoires et dans les granules spécifiques/gélatinases, respectivement, se retrouvent dans le surnageant de neutrophiles stimulés avec S100A9. Il s'avère également que la MMP-9 conserve son activité enzymatique. Enfin, S100A9 active les MAPK p38, ERK1/2 et JNK. De plus, la dégranulation induite par S100A9 dépend de l'activation de p38 et de JNK, mais pas de ERK1/2. Ces études suggèrent un nouveau rôle pour S100A9 dans la physiologie des neutrophiles humains.

Pendant quelques années, les protéines S100A8, S100A8/A9, S100A9 et S100A12 ont longtemps été considérées comme des marqueurs de l'inflammation plutôt que des protéines ayant des rôles clés à jouer dans ce processus. Au fil des ans, plusieurs études ont démontré l'importance de ces protéines dans les processus pro-inflammatoires notamment au niveau de plusieurs fonctions des neutrophiles. En effet, les protéines S100A8, S100A9 et S100A12 sont chimiотactiques pour les neutrophiles en plus d'induire leur libération de la moelle osseuse (Rouleau, Vandal et al., 2003; Ryckman, Vandal et al., 2003; Vandal, Rouleau et al., 2003). De façon similaire, la protéine S100A8 murine est également chimiотactique pour les neutrophiles (Harrison, Raftery et al., 1999). Dans la présente étude, nous démontrons un rôle important de la protéine S100A9 sur la dégranulation du neutrophile humain. S100A9 a induit l'exocytose des

vésicules sécrétaires, un réservoir de récepteurs nécessaires aux phases précoces de la réponse inflammatoire du neutrophile. En effet, ces vésicules contiennent des molécules favorisant l'adhésion cellulaire comme les β 2-intégrines CD11b/CD18 qui sont exprimées à la surface de la cellule à la suite d'une stimulation avec S100A9 (Ryckman, Vandal et al., 2003). Nos résultats suggèrent fortement que le phénomène de dégranulation induit par S100A9 soit responsable de l'augmentation de l'expression de ces β 2-intégrines due à la présence de ces molécules d'adhésion au niveau des granules. En plus d'augmenter l'adhésion des neutrophiles sur une matrice de fibronectine et de vitronectine (Aceriz, Vandal et al., 2007), S100A9 augmente également la transmigration des neutrophiles en activant les β 2-intégrines (Newton et Hogg, 1998; Vandal, Rouleau et al., 2003). De plus, l'addition d'anticorps neutralisant anti-S100A9 et anti-S100A8/A9 a réduit la migration des monocytes à travers une barrière endothéliale *in vitro* (Eue, Pietz et al., 2000), suggérant un rôle clé de ces protéines dans la migration de ce type cellulaire.

Les neutrophiles possèdent une très courte durée de vie. Pendant les 24 à 48 heures de vie, les neutrophiles sont recrutés dans les tissus où ils phagocytent et détruisent les micro-organismes pathogènes, via une production de ROS et la libération de composants cytotoxiques, avant de mourir par apoptose et être phagocytés par les macrophages (Savill, Henson et al., 1989; Savill, Wyllie et al., 1989). La dégranulation du neutrophile est une fonction importante pour la libération d'enzymes au pouvoir dégradant comme la gélatinase et l'élastase, qui facilitent la migration des leucocytes à travers la barrière endothéliale et les tissus environnants. De plus, cette fonction leur permet d'acquérir des molécules et des récepteurs permettant une migration plus efficace, comme l'acquisition de β 2-intégrines. Compte tenu de l'importance des β 2-intégrines et de la dégranulation dans la migration des phagocytes, nos résultats corroborent les études précédentes suggérant une implication majeure de la protéine S100A9 dans la migration des phagocytes et permettent de comprendre les mécanismes d'action des protéines S100 (Newton et Hogg, 1998; Rouleau, Vandal et al., 2003; Ryckman, Vandal et

al., 2003; Vandal, Rouleau et al., 2003). Néanmoins, le rôle exact de S100A8 et S100A9 dans la migration des phagocytes reste encore à être élucidé.

Nos résultats montrent que S100A9 induit une augmentation de la libération de la MMP-9 enzymatiquement active. La MMP-9 ayant comme cible les protéines de la matrice extracellulaire, ce résultat suggère que la modulation des niveaux de MMP par S100A9 contribue aux effets de cette protéine observés sur la transmigration des neutrophiles et des monocytes. De surcroît, il est connu que les MMP ont des rôles importants à jouer dans le remodelage et la guérison des tissus (Sternlicht et Werb, 2001; Atkinson et Senior, 2003; O'Reilly, Gaggar et al., 2008). Par ailleurs, il est également documenté que ces protéines contribuent à la pathogénèse de l'arthrite où elles favorisent les dommages articulaires et l'infiltration des cartilages par les fibroblastes synoviaux (Jain, Miller et al., 2009). De plus, on observe une réduction de la destruction des cartilages dans le modèle murin d'arthrite induit avec un antigène chez les souris S100A9 knock-out. Ces souris ont également une teneur beaucoup plus faible en MMP-3, MMP-9 et MMP-13 (van Lent, Grevers et al., 2008), corroborant le rôle de S100A9 dans la libération de MMP. Quoique nous n'ayons pas démontré qu'il y avait libération des autres MMP, la libération de MMP-9 suggère que d'autres MMP pourrait être sécrétées dans le milieu extracellulaire. Par contre, d'autres équipes ont montré que les protéines S100 peuvent inactiver les MMP en chélatant les ions Zn²⁺ du site actif de l'enzyme (Goyette, Yan et al., 2009).

Le rôle des protéines S100 dans la migration des phagocytes suggèrent fortement que la libération de ces protéines lors du processus inflammatoire soit bénéfique pour l'organisme à court terme, soit lors de la réponse inflammatoire aigüe. En effet, plusieurs indices récents suggèrent que les cellules libèrent les MRP afin d'alerter le système immunitaire inné et adaptatif. Les MRP et d'autres protéines intracellulaires ayant des activités «cytokine-like» sont appelées alarmines ou DAMP (Srikrishna et Freeze, 2009) et ont possiblement un rôle à jouer dans le contrôle des infections. Plusieurs indices permettent de classer les MRP dans cette catégorie avec l'IL-1 β et l'HMGB-1. Par exemple, on les retrouve dans le cytosol

des neutrophiles et des monocytes/macrophages. De plus, elles ne possèdent pas de peptide signal responsable de la sécrétion via la voie classique du Golgi (Rammes, Roth et al., 1997) et on les retrouve à des concentrations très élevées dans les pathologies inflammatoires (Foell et Roth, 2004). Nos résultats corroborent les études antérieures classifiant les MRP dans la famille des DAMP.

Par contre, comme nous l'avons mentionné précédemment, certaines études mentionnent également que les protéines S100 joueraient un rôle de premier plan dans la pathogénèse des maladies inflammatoires chroniques, suggérant un rôle néfaste de ces protéines lors d'inflammation chronique. En effet, le système immunitaire s'avère être constamment stimulé par la libération de cytokines pro-inflammatoires, l'accumulation de MRP ou par la présence de complexes immuns par exemple. Le rôle exact de ces protéines, à savoir si elles sont responsables des premières étapes de l'inflammation chronique, restent encore à être approfondi.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, plusieurs récepteurs sont contenus au niveau des granules du neutrophile. Par exemple, le récepteur du fMLP, les récepteurs du complément ou le FcR CD16 se situent dans les vésicules sécrétoires (Borregaard, Sorensen et al., 2007). Une augmentation des niveaux d'expression de ces récepteurs nécessaires à la reconnaissance de micro-organismes opsonisés ou non suggère que S100A9 pourrait également moduler la phagocytose des neutrophiles d'autant plus qu'il a été démontré à plusieurs reprises que les β 2-intégrines participent activement à la phagocytose dépendante des FcR et des CR (Brown, Bohnsack et al., 1988; Graham, Gresham et al., 1989; Rosales et Brown, 1991; van Spriel, Leusen et al., 2001), une autre fonction importante des neutrophiles pour le contrôle des infections. L'activation des MAPK par S100A9 et particulièrement de ERK1/2 supporte l'idée que S100A9 puisse moduler la phagocytose étant donné l'implication de cette voie dans le processus phagocytaire (Garcia-Garcia et Rosales, 2002) (Garcia-Garcia, Rosales et al., 2002) (Coxon, Rane et al., 2000). Toutefois, l'implication de S100A9 dans la phagocytose et l'activation des MAPK par cette protéine demeure toutefois à être confirmées.

La littérature rapporte, à plusieurs niveaux, des rôles parfois contradictoires pour les MRP. Par exemple, il a été rapporté dans un premier temps que S100A9 active les β 2-intégrines CD11b/CD18 sans toutefois affecter l'expression de cette intégrine ou de CD62L (Newton et Hogg, 1998). Il avait alors été suggéré que la protéine S100A8 agirait en tant que régulateur de la fonction de S100A9. On a par la suite rapporté que S100A8, S100A8/A9 et S100A9 augmentaient les niveaux d'expression de CD11b/CD18 et de CD62L en plus d'agir comme chimio-attractant des neutrophiles humains (Ryckman, Vandal et al., 2003). Il est important de mentionner que les protéines S100 sont sensibles à leur environnement et donc susceptibles d'être modifiées par la suite de façon post-traductionnelle par phosphorylation, méthylation, acétylation et oxydation (Goyette et Geczy; Lim, Raftery et al.; Lim, Raftery et al., 2009). Cette propriété des protéines S100 rend leur étude d'autant plus difficile puisque ces modifications altèrent probablement leur capacité à lier les ions divalents, l'interaction avec d'autres protéines, la translocation dans des compartiments cellulaires ainsi que leurs fonctions extracellulaires (Zimmer, Wright Sadosky et al., 2003; Andrassy, Igwe et al., 2006; Orre, Pernemalm et al., 2007). La protéine S100A8 semble être la composante régulatrice du complexe S100A8/A9; une hypothèse qui a été soulevée pour la première fois par le groupe de Newton et al. (Newton et Hogg, 1998). S100A8 serait beaucoup plus sensible à l'oxydation ou à d'autres modifications expliquant en partie les résultats divergents à son sujet dans la littérature (Lim, Raftery et al., 2009). Ainsi, S100A8, une fois oxydée, deviendrait anti-inflammatoire. Ces études suggèrent donc un rôle important des ROS et des NOS dans la régulation de l'activité de S100A8 sur le recrutement des leucocytes (Sroussi, Berline et al., 2007). Il serait donc très pertinent d'évaluer la capacité des MRP à induire une production de ROS, ce qui changerait probablement leurs fonctions ultérieurement. Des études antérieures suggèrent fortement que S100A9 s'associe à la NADPH oxidase via une interaction avec l'acide arachidonique (Kerkhoff, Sorg et al., 2001) et que cette association active la NADPH (Kerkhoff, Nacken et al., 2005). Par contre, une étude récente présente

des résultats contraires et démontre que S100A8, S100A8/A9 et S100A9 inhibent le processus oxydatif du neutrophile (Sroussi, Lu et al., 2010).

En conclusion, nous proposons un nouveau rôle pour la protéine S100A9 dans la physiologie des neutrophiles ainsi que dans son comportement pro-inflammatoire. Comme S100A9 induit la libération d'enzymes aux pouvoirs dégradant et la hausse des niveaux d'expression de plusieurs récepteurs, nous suggérons un rôle de premier plan pour cette protéine dans le recrutement des cellules immunitaires aux sites inflammatoires en agissant comme DAMP tout en favorisant la réponse immunitaire des neutrophiles lors d'infections ou la destruction des tissus lors d'inflammation chronique. Nos résultats suggèrent également l'implication de S100A9 dans d'autres fonctions des neutrophiles.

Liste des références

- Aadland, E. and M. K. Fagerhol (2002). "Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract." *Eur J Gastroenterol Hepatol* **14**(8): 823-825.
- Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." *Annu Rev Immunol* **17**: 593-623.
- Alleva, L. M., A. C. Budd, et al. (2008). "Systemic release of high mobility group box 1 protein during severe murine influenza." *J Immunol* **181**(2): 1454-1459.
- Allore, R., D. O'Hanlon, et al. (1988). "Gene encoding the beta subunit of S100 protein is on chromosome 21: implications for Down syndrome." *Science* **239**(4845): 1311-1313.
- Anceriz, N., M. A. Raquil, et al., Eds. (2007). The proinflammatory functions of S100A8, S100A9 and S100A12. Pointe-Claire, Research Signpost.
- Anceriz, N., K. Vandal, et al. (2007). "S100A9 mediates neutrophil adhesion to fibronectin through activation of beta2 integrins." *Biochem Biophys Res Commun* **354**(1): 84-89.
- Andrassy, M., J. Igwe, et al. (2006). "Posttranslationally modified proteins as mediators of sustained intestinal inflammation." *Am J Pathol* **169**(4): 1223-1237.
- Arai, K., K. Mizuno, et al. (1999). "Immunohistochemical evaluation of MRP-14 expression in epithelioid granuloma using monoclonal antibody 60B8." *J Investig Allergol Clin Immunol* **9**(1): 21-26.
- Arai, K., T. Teratani, et al. (2004). "S100A9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast: S100A9 expression in adenocarcinoma is closely associated with poor tumour differentiation." *Eur J Cancer* **40**(8): 1179-1187.
- Arai, K., T. Teratani, et al. (2001). "Immunohistochemical investigation of S100A9 expression in pulmonary adenocarcinoma: S100A9 expression is associated with tumor differentiation." *Oncol Rep* **8**(3): 591-596.
- Arai, K., T. Yamada, et al. (2000). "Immunohistochemical investigation of migration inhibitory factor-related protein (MRP)-14 expression in hepatocellular carcinoma." *Med Oncol* **17**(3): 183-188.
- Aspenstrom, P. (1999). "The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton." *Exp Cell Res* **246**(1): 20-25.

Atkinson, J. J. and R. M. Senior (2003). "Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling." Am J Respir Cell Mol Biol **28**(1): 12-24.

B.W. Schäfer, R. w., D. Engelkamp, M.G. Mattei, C.W. Heizmann (1993). "Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21:rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family." Genomics **25**: 638-643.

Babior, B. M., R. S. Kipnes, et al. (1973). "Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent." J Clin Invest **52**(3): 741-744.

Baehner, R. L. and D. G. Nathan (1967). "Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease." Science **155**(764): 835-836.

Bainton, D. F. and M. G. Farquhar (1966). "Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. Two types derived from opposite faces of the Golgi complex in developing granulocytes." J Cell Biol **28**(2): 277-301.

Bainton, D. F., J. L. Ulliyot, et al. (1971). "The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow." J Exp Med **134**(4): 907-934.

Baldridge, C. W. and A. Barer (1931). "Studies on the Relationship between Oxygen Consumption and Nitrogen Metabolism. I. In Pernicious Anemia." J Clin Invest **10**(3): 529-543.

Barreiro, O., M. Yanez-Mo, et al. (2002). "Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes." J Cell Biol **157**(7): 1233-1245.

Barrick, B., E. J. Campbell, et al. (1999). "Leukocyte proteinases in wound healing: roles in physiologic and pathologic processes." Wound Repair Regen **7**(6): 410-422.

Barthe, C., C. Figarella, et al. (1991). "Identification of 'cystic fibrosis protein' as a complex of two calcium-binding proteins present in human cells of myeloid origin." Biochim Biophys Acta **1096**(2): 175-177.

Batliwalla, F. M., W. Li, et al. (2005). "Microarray analyses of peripheral blood cells identifies unique gene expression signature in psoriatic arthritis." Mol Med **11**(1-12): 21-29.

Bengis-Garber, C. and N. Gruener (1993). "Calcium-binding myeloid protein (P8,14) is phosphorylated in fMet-Leu-Phe-stimulated neutrophils." J Leukoc Biol **54**(2): 114-118.

Benoit, S., A. Toksoy, et al. (2006). "Elevated serum levels of calcium-binding S100 proteins A8 and A9 reflect disease activity and abnormal differentiation of keratinocytes in psoriasis." Br J Dermatol **155**(1): 62-66.

Berendes, H., R. A. Bridges, et al. (1957). "A fatal granulomatous of childhood: the clinical study of a new syndrome." Minn Med **40**(5): 309-312.

Bernini, J. C. (1996). "Diagnosis and management of chronic neutropenia during childhood." Pediatr Clin North Am **43**(3): 773-792.

Berntzen, H. B., M. K. Fagerhol, et al. (1991). "The L1 protein as a new indicator of inflammatory activity in patients with juvenile rheumatoid arthritis." J Rheumatol **18**(1): 133-138.

Berntzen, H. B., E. Munthe, et al. (1989). "A longitudinal study of the leukocyte protein L1 as an indicator of disease activity in patients with rheumatoid arthritis." J Rheumatol **16**(11): 1416-1420.

Berntzen, H. B., U. Olmez, et al. (1991). "The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis." Scand J Rheumatol **20**(2): 74-82.

Bertoni, G., L. Fumagalli, et al. (1994). "Beta 2 integrin-dependent protein tyrosine phosphorylation and activation of the FGR protein tyrosine kinase in human neutrophils." J Cell Biol **126**(4): 1111-1121.

Boatright, K. M. and G. S. Salvesen (2003). "Mechanisms of caspase activation." Curr Opin Cell Biol **15**(6): 725-731.

Borregaard, N. and J. B. Cowland (1997). "Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte." Blood **89**(10): 3503-3521.

Borregaard, N., J. M. Heiple, et al. (1983). "Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation." J Cell Biol **97**(1): 52-61.

Borregaard, N., L. Kjeldsen, et al. (1994). "Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators." J Leukoc Biol **56**(1): 80-87.

Borregaard, N., L. J. Miller, et al. (1987). "Chemoattractant-regulated mobilization of a novel intracellular compartment in human neutrophils." Science **237**(4819): 1204-1206.

Borregaard, N., M. Sehested, et al. (1995). "Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation." Blood **85**(3): 812-817.

Borregaard, N., O. E. Sorensen, et al. (2007). "Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins." Trends Immunol **28**(8): 340-345.

Bouma, G., W. K. Lam-Tse, et al. (2004). "Increased serum levels of MRP-8/14 in type 1 diabetes induce an increased expression of CD11b and an enhanced adhesion of circulating monocytes to fibronectin." Diabetes **53**(8): 1979-1986.

Bouzidi, F. and J. Doussiere (2004). "Binding of arachidonic acid to myeloid-related proteins (S100A8/A9) enhances phagocytic NADPH oxidase activation." Biochem Biophys Res Commun **325**(3): 1060-1065.

Brandtzaeg, P., I. Dale, et al. (1987). "Distribution of a formalin-resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. II. Normal and aberrant occurrence in various epithelia." Am J Clin Pathol **87**(6): 700-707.

Brandtzaeg, P., T. O. Gabrielsen, et al. (1995). "The leucocyte protein L1 (calprotectin): a putative nonspecific defence factor at epithelial surfaces." Adv Exp Med Biol **371A**: 201-206.

Brodersen, D. E., M. Etzerodt, et al. (1998). "EF-hands at atomic resolution: the structure of human psoriasin (S100A7) solved by MAD phasing." Structure **6**(4): 477-489.

Broome, A. M., D. Ryan, et al. (2003). "S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis." J Histochem Cytochem **51**(5): 675-685.

Brown, E. (1997). "Neutrophil adhesion and the therapy of inflammation." Semin Hematol **34**(4): 319-326.

Brown, E. J., J. F. Bohnsack, et al. (1988). "Mechanism of inhibition of immunoglobulin G-mediated phagocytosis by monoclonal antibodies that recognize the Mac-1 antigen." J Clin Invest **81**(2): 365-375.

Bruhns, P., B. Iannascoli, et al. (2009). "Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses." Blood **113**(16): 3716-3725.

Brun, J. G., M. Cuida, et al. (1994). "Sjogren's syndrome in inflammatory rheumatic diseases: analysis of the leukocyte protein calprotectin in plasma and saliva." Scand J Rheumatol **23**(3): 114-118.

Brun, J. G., H. J. Haga, et al. (1992). "Calprotectin in patients with rheumatoid arthritis: relation to clinical and laboratory variables of disease activity." J Rheumatol **19**(6): 859-862.

Brun, J. G., R. Jonsson, et al. (1994). "Measurement of plasma calprotectin as an indicator of arthritis and disease activity in patients with inflammatory rheumatic diseases." J Rheumatol **21**(4): 733-738.

Brun, J. G., E. Ulvestad, et al. (1994). "Effects of human calprotectin (L1) on in vitro immunoglobulin synthesis." Scand J Immunol **40**(6): 675-680.

Campbell, J. J., J. Hedrick, et al. (1998). "Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions." Science **279**(5349): 381-384.

Campbell, J. J., S. Qin, et al. (1996). "Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells." J Cell Biol **134**(1): 255-266.

Carman, C. V. and T. A. Springer (2004). "A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them." J Cell Biol **167**(2): 377-388.

Caron, E. and A. Hall (1998). "Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases." Science **282**(5394): 1717-1721.

Carroccio, A., P. Rocco, et al. (2006). "Plasma calprotectin levels in patients suffering from acute pancreatitis." Dig Dis Sci **51**(10): 1749-1753.

Cassatella, M. A. (1999). "Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound." Adv Immunol **73**: 369-509.

Cham, B. P., J. M. Gerrard, et al. (1994). "Granulophysin is located in the membrane of azurophilic granules in human neutrophils and mobilizes to the plasma membrane following cell stimulation." Am J Pathol **144**(6): 1369-1380.

Chen, Y. S., W. Yan, et al. (2009). "Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and of S100 proteins are associated with inflammatory, autoantibody, and classical risk markers of joint and vascular damage in rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **11**(2): R39.

Chesnutt, B. C., D. F. Smith, et al. (2006). "Induction of LFA-1-dependent neutrophil rolling on ICAM-1 by engagement of E-selectin." Microcirculation **13**(2): 99-109.

Cho, J. H. (2008). "The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease." Nat Rev Immunol **8**(6): 458-466.

Cieutat, A. M., P. Lobel, et al. (1998). "Azurophilic granules of human neutrophilic leukocytes are deficient in lysosome-associated membrane proteins but retain the mannose 6-phosphate recognition marker." Blood **91**(3): 1044-1058.

Clohessy, P. A. and B. E. Golden (1996). "Elevated plasma levels of L1L and L1H in CF patients." Biochem Soc Trans **24**(2): 310S.

Cornish, C. J., J. M. Devery, et al. (1996). "S100 protein CP-10 stimulates myeloid cell chemotaxis without activation." J Cell Physiol **166**(2): 427-437.

Corradi, A., A. Bajetto, et al. (1993). "Production and secretion of interleukin 1 receptor antagonist in monocytes and keratinocytes." Cytotechnology **11 Suppl 1**: S50-52.

Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-867.

Coxon, P. Y., M. J. Rane, et al. (2000). "Differential mitogen-activated protein kinase stimulation by Fc gamma receptor IIa and Fc gamma receptor IIIb determines the activation phenotype of human neutrophils." J Immunol **164**(12): 6530-6537.

Cross, S. S., F. C. Hamdy, et al. (2005). "Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers." Histopathology **46**(3): 256-269.

Crowley, C. A., J. T. Curnutte, et al. (1980). "An inherited abnormality of neutrophil adhesion. Its genetic transmission and its association with a missing protein." N Engl J Med **302**(21): 1163-1168.

Crowley, M. T., P. S. Costello, et al. (1997). "A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcgamma receptors on macrophages." J Exp Med **186**(7): 1027-1039.

Cuida, M., J. G. Brun, et al. (1996). "Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrates in Sjogren's syndrome, rheumatoid arthritis and osteoarthritis with special reference to calprotectin-producing cells." APMIS **104**(12): 881-890.

Curnutte, J. T., P. J. Scott, et al. (1989). "Cytosolic components of the respiratory burst oxidase: resolution of four components, two of which are missing in complementing types of chronic granulomatous disease." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(3): 825-829.

Cush, J. J., M. E. Weinblatt, et al. (2008). Rheumatoid Arthritis: Early Diagnosis and Treatment. P. Communication. West Islip. 1.

Daeron, M., S. Jaeger, et al. (2008). "Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future." Immunol Rev **224**: 11-43.

Dale, D. C., D. t. Guerry, et al. (1979). "Chronic neutropenia." Medicine (Baltimore) **58**(2): 128-144.

Della Bianca, V., M. Grzeskowiak, et al. (1990). "Studies on molecular regulation of phagocytosis and activation of the NADPH oxidase in neutrophils. IgG- and C3b-mediated ingestion and associated respiratory burst independent of phospholipid turnover and Ca²⁺ transients." J Immunol **144**(4): 1411-1417.

Deloulme, J. C., N. Assard, et al. (2000). "S100A6 and S100A11 are specific targets of the calcium- and zinc-binding S100B protein in vivo." J Biol Chem **275**(45): 35302-35310.

Denkers, E. Y., L. Del Rio, et al. (2003). "Neutrophil production of IL-12 and other cytokines during microbial infection." Chem Immunol Allergy **83**: 95-114.

Detmers, P. A., D. Zhou, et al. (1995). "Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase." J Immunol **155**(4): 2085-2095.

Donato, R. (1986). "S-100 proteins." Cell Calcium **7**(3): 123-145.

Donato, R. (1999). "Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type." Biochim Biophys Acta **1450**(3): 191-231.

Donato, R. (2001). "S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles." Int J Biochem Cell Biol **33**(7): 637-668.

Donato, R. (2003). "Intracellular and extracellular roles of S100 proteins." Microsc Res Tech **60**(6): 540-551.

Drohat, A. C., D. M. Baldissari, et al. (1998). "Solution structure of calcium-bound rat S100B(betabeta) as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy." Biochemistry **37**(9): 2729-2740.

- Dunne, J. L., C. M. Ballantyne, et al. (2002). "Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1." Blood **99**(1): 336-341.
- Eckert, R. L., A. M. Broome, et al. (2004). "S100 proteins in the epidermis." J Invest Dermatol **123**(1): 23-33.
- Edgeworth, J., M. Gorman, et al. (1991). "Identification of p8,14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells." J Biol Chem **266**(12): 7706-7713.
- Ehrchen, J. M., C. Sunderkotter, et al. (2009). "The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer." J Leukoc Biol **86**(3): 557-566.
- Emberley, E. D., L. C. Murphy, et al. (2004). "S100 proteins and their influence on pro-survival pathways in cancer." Biochem Cell Biol **82**(4): 508-515.
- Engelhardt, B. and H. Wolburg (2004). "Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?" Eur J Immunol **34**(11): 2955-2963.
- Engelkamp, D., B. W. Schafer, et al. (1993). "Six S100 genes are clustered on human chromosome 1q21: identification of two genes coding for the two previously unreported calcium-binding proteins S100D and S100E." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6547-6551.
- Estensen, R. D., J. G. White, et al. (1974). "Specific degranulation of human polymorphonuclear leukocytes." Nature **248**(446): 347-348.
- Etzioni, A., C. M. Doerschuk, et al. (1999). "Of man and mouse: leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies." Blood **94**(10): 3281-3288.
- Eue, I., B. Pietz, et al. (2000). "Transendothelial migration of 27E10+ human monocytes." Int Immunol **12**(11): 1593-1604.
- Failla, M. L., M. van de Veerdonk, et al. (1982). "Characterization of zinc-binding proteins of plasma in familial hyperzinemia." J Lab Clin Med **100**(6): 943-952.
- Faurschou, M. and N. Borregaard (2003). "Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation." Microbes Infect **5**(14): 1317-1327.

Faurschou, M., O. E. Sorensen, et al. (2002). "Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties." Biochim Biophys Acta **1591**(1-3): 29-35.

Feldmann, M. (2002). "Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis." Nat Rev Immunol **2**(5): 364-371.

Feng, D., J. A. Nagy, et al. (1998). "Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP." J Exp Med **187**(6): 903-915.

Fialkow, L., Y. Wang, et al. (2007). "Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function." Free Radic Biol Med **42**(2): 153-164.

Foell, D., M. Frosch, et al. (2004). "Methotrexate treatment in juvenile idiopathic arthritis: when is the right time to stop?" Ann Rheum Dis **63**(2): 206-208.

Foell, D., F. Ichida, et al. (2003). "S100A12 (EN-RAGE) in monitoring Kawasaki disease." Lancet **361**(9365): 1270-1272.

Foell, D., D. Kane, et al. (2003). "Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis." Rheumatology (Oxford) **42**(11): 1383-1389.

Foell, D., T. Kucharzik, et al. (2003). "Neutrophil derived human S100A12 (EN-RAGE) is strongly expressed during chronic active inflammatory bowel disease." Gut **52**(6): 847-853.

Foell, D. and J. Roth (2004). "Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease." Arthritis Rheum **50**(12): 3762-3771.

Foell, D., S. Seeliger, et al. (2003). "Expression of S100A12 (EN-RAGE) in cystic fibrosis." Thorax **58**(7): 613-617.

Foell, D., H. Wittkowski, et al. (2008). "Phagocyte-specific S100 proteins are released from affected mucosa and promote immune responses during inflammatory bowel disease." J Pathol **216**(2): 183-192.

Frosch, M. and J. Roth (2008). "New insights in systemic juvenile idiopathic arthritis--from pathophysiology to treatment." Rheumatology (Oxford) **47**(2): 121-125.

Frosch, M., A. Strey, et al. (2000). "Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**(3): 628-637.

Frosch, M., T. Vogl, et al. (2003). "Expression of myeloid-related proteins 8 and 14 in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **48**(9): 2622-2626.

Frosch, M., T. Vogl, et al. (2004). "Expression of MRP8 and MRP14 by macrophages is a marker for severe forms of glomerulonephritis." J Leukoc Biol **75**(2): 198-206.

Garcia-Garcia, E. and C. Rosales (2002). "Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis." J Leukoc Biol **72**(6): 1092-1108.

Garcia-Garcia, E., R. Rosales, et al. (2002). "Phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase are recruited for Fc receptor-mediated phagocytosis during monocyte-to-macrophage differentiation." J Leukoc Biol **72**(1): 107-114.

Gebhardt, C., U. Breitenbach, et al. (2002). "Calgranulins S100A8 and S100A9 are negatively regulated by glucocorticoids in a c-Fos-dependent manner and overexpressed throughout skin carcinogenesis." Oncogene **21**(27): 4266-4276.

Gebhardt, C., J. Nemeth, et al. (2006). "S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer." Biochem Pharmacol **72**(11): 1622-1631.

Ghazizadeh, S., J. B. Bolen, et al. (1994). "Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells." J Biol Chem **269**(12): 8878-8884.

Glasser, L. and R. L. Fiederlein (1987). "Functional differentiation of normal human neutrophils." Blood **69**(3): 937-944.

Golden, B. E., P. A. Clohessy, et al. (1996). "Calprotectin as a marker of inflammation in cystic fibrosis." Arch Dis Child **74**(2): 136-139.

Goyette, J. and C. L. Geczy "Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function." Amino Acids.

Goyette, J., W. X. Yan, et al. (2009). "Pleiotropic roles of S100A12 in coronary atherosclerotic plaque formation and rupture." J Immunol **183**(1): 593-603.

Graham, I. L., H. D. Gresham, et al. (1989). "An immobile subset of plasma membrane CD11b/CD18 (Mac-1) is involved in phagocytosis of targets recognized by multiple receptors." J Immunol **142**(7): 2352-2358.

Greenberg, S. (1999). "Modular components of phagocytosis." J Leukoc Biol **66**(5): 712-717.

Guignard, F., J. Mauel, et al. (1996). "Phosphorylation of myeloid-related proteins MRP-14 and MRP-8 during human neutrophil activation." Eur J Biochem **241**(1): 265-271.

Haga, H. J., J. G. Brun, et al. (1993). "Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity." Lupus **2**(1): 47-50.

Hammer, H. B., S. Odegard, et al. (2007). "Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **66**(8): 1093-1097.

Harrison, C. A., M. J. Raftery, et al. (1999). "Oxidation regulates the inflammatory properties of the murine S100 protein S100A8." J Biol Chem **274**(13): 8561-8569.

Hart, S. P., J. A. Ross, et al. (2000). "Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: implications for functional downregulation and recognition by phagocytes." Cell Death Differ **7**(5): 493-503.

Hayward, C., S. Glass, et al. (1987). "Serum concentrations of a granulocyte-derived calcium-binding protein in cystic fibrosis patients and heterozygotes." Clin Chim Acta **170**(1): 45-55.

Hellberg, C., L. Molony, et al. (1996). "Ca²⁺ signalling mechanisms of the beta 2 integrin on neutrophils: involvement of phospholipase C gamma 2 and Ins(1,4,5)P3." Biochem J **317** (Pt 2): 403-409.

Herlaar, E. and Z. Brown (1999). "p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease." Mol Med Today **5**(10): 439-447.

Hermani, A., B. De Servi, et al. (2006). "S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells." Exp Cell Res **312**(2): 184-197.

Hofmann, M. A., S. Drury, et al. (1999). "RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides." Cell **97**(7): 889-901.

Hofmann, M. A., S. Drury, et al. (2002). "RAGE and arthritis: the G82S polymorphism amplifies the inflammatory response." Genes Immun **3**(3): 123-135.

Homburg, C. H., M. de Haas, et al. (1995). "Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro." Blood **85**(2): 532-540.

Horai, R., S. Saijo, et al. (2000). "Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice." J Exp Med **191**(2): 313-320.

Hsieh, H. L., B. W. Schafer, et al. (2003). "Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays." Biochem Biophys Res Commun **307**(2): 375-381.

Huber, D., M. S. Balda, et al. (2000). "Occludin modulates transepithelial migration of neutrophils." J Biol Chem **275**(8): 5773-5778.

Hummerich, L., R. Muller, et al. (2006). "Identification of novel tumour-associated genes differentially expressed in the process of squamous cell cancer development." Oncogene **25**(1): 111-121.

Ikura, M., G. M. Clore, et al. (1992). "Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR." Science **256**(5057): 632-638.

Ilg, E. C., H. Troxler, et al. (1996). "Amino acid sequence determination of human S100A12 (P6, calgranulin C, CGRP, CAAF1) by tandem mass spectrometry." Biochem Biophys Res Commun **225**(1): 146-150.

Ishikawa, K., A. Nakagawa, et al. (2000). "The structure of human MRP8, a member of the S100 calcium-binding protein family, by MAD phasing at 1.9 Å resolution." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **56**(Pt 5): 559-566.

Isidor, B., S. Poignant, et al. (2009). "Hyperzincemia and hypercalprotectinemia: unsuccessful treatment with tacrolimus." Acta Paediatr **98**(2): 410-412.

Isobe, T. and T. Okuyama (1981). "The amino acid sequence of the tryptophan-containing subunit (alpha-subunit) of bovine brain S-100 protein." J Neurochem **37**(2): 522-524.

Isobe, T., A. Tsugita, et al. (1978). "The amino acid sequence and the subunit structure of bovine brain S-100 protein (PAP I-b)." J Neurochem **30**(4): 921-923.

Ito, Y., K. Arai, et al. (2005). "S100A9 expression is significantly linked to dedifferentiation of thyroid carcinoma." Pathol Res Pract **201**(8-9): 551-556.

Ivanenkov, V. V., G. A. Jamieson, Jr., et al. (1995). "Characterization of S-100b binding epitopes. Identification of a novel target, the actin capping protein, CapZ." J Biol Chem **270**(24): 14651-14658.

Jain, A., M. C. Miller, et al. (2009). "Invasive potential of human rheumatoid tenosynovial cells is in part MT1-MMP dependent." J Hand Surg Am **34**(7): 1282-1290.

Jesaitis, A. J., E. S. Buescher, et al. (1990). "Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes." J Clin Invest **85**(3): 821-835.

Kane, D., J. Roth, et al. (2003). "Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis." Arthritis Rheum **48**(6): 1676-1685.

Kaner, D., J. P. Bernimoulin, et al. (2006). "Gingival crevicular fluid levels of calprotectin and myeloperoxidase during therapy for generalized aggressive periodontitis." J Periodontal Res **41**(2): 132-139.

Kang, T., J. Yi, et al. (2001). "Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils." J Biol Chem **276**(24): 21960-21968.

Kansas, G. S. (1996). "Selectins and their ligands: current concepts and controversies." Blood **88**(9): 3259-3287.

Kaplan, G. (1977). "Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages." Scand J Immunol **6**(8): 797-807.

Kennedy, A. D. and F. R. DeLeo (2009). "Neutrophil apoptosis and the resolution of infection." Immunol Res **43**(1-3): 25-61.

Kerkhoff, C., M. Klempf, et al. (1999). "The two calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, are involved in the metabolism of arachidonic acid in human neutrophils." J Biol Chem **274**(46): 32672-32679.

Kerkhoff, C., W. Nacken, et al. (2005). "The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2." FASEB J **19**(3): 467-469.

Kerkhoff, C., C. Sorg, et al. (2001). "Interaction of S100A8/S100A9-arachidonic acid complexes with the scavenger receptor CD36 may facilitate fatty acid uptake by endothelial cells." Biochemistry **40**(1): 241-248.

Kerkhoff, C., T. Vogl, et al. (1999). "Zinc binding reverses the calcium-induced arachidonic acid-binding capacity of the S100A8/A9 protein complex." FEBS Lett **460**(1): 134-138.

Kido, J., R. Kido, et al. (2003). "Calprotectin release from human neutrophils is induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide via the CD-14-Toll-like receptor-nuclear factor kappaB pathway." *J Periodontal Res* **38**(6): 557-563.

Kiener, P. A., B. M. Rankin, et al. (1993). "Cross-linking of Fc gamma receptor I (Fc gamma RI) and receptor II (Fc gamma RII) on monocytic cells activates a signal transduction pathway common to both Fc receptors that involves the stimulation of p72 Syk protein tyrosine kinase." *J Biol Chem* **268**(32): 24442-24448.

Kilby, P. M., L. J. Van Eldik, et al. (1996). "The solution structure of the bovine S100B protein dimer in the calcium-free state." *Structure* **4**(9): 1041-1052.

Kinashi, T. (2005). "Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes." *Nat Rev Immunol* **5**(7): 546-559.

Kjeldsen, L., D. F. Bainton, et al. (1993). "Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation." *Blood* **82**(10): 3183-3191.

Kjeldsen, L., O. W. Bjerrum, et al. (1992). "Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules." *Biochem J* **287** (Pt 2): 603-610.

Klebanoff, S. J. (1999). "Myeloperoxidase." *Proc Assoc Am Physicians* **111**(5): 383-389.

Koike, T., N. Harada, et al. (1992). "Regulation of myeloid-specific calcium binding protein synthesis by cytosolic protein kinase C." *J Biochem* **112**(5): 624-630.

Koike, T., K. Kondo, et al. (1998). "Intracellular localization of migration inhibitory factor-related protein (MRP) and detection of cell surface MRP binding sites on human leukemia cell lines." *J Biochem* **123**(6): 1079-1087.

Kosaki, A., T. Hasegawa, et al. (2004). "Increased plasma S100A12 (EN-RAGE) levels in patients with type 2 diabetes." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(11): 5423-5428.

Kothakota, S., T. Azuma, et al. (1997). "Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis." *Science* **278**(5336): 294-298.

Krump, E., J. S. Sanghera, et al. (1997). "Chemotactic peptide N-formyl-met-leu-phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils." J Biol Chem **272**(2): 937-944.

Kucharzik, T., S. V. Walsh, et al. (2001). "Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins." Am J Pathol **159**(6): 2001-2009.

Kuhn, A., M. Sonntag, et al. (2002). "Upregulation of epidermal surface molecule expression in primary and ultraviolet-induced lesions of lupus erythematosus tumidus." Br J Dermatol **146**(5): 801-809.

Lackmann, M., P. Rajasekariah, et al. (1993). "Identification of a chemotactic domain of the pro-inflammatory S100 protein CP-10." J Immunol **150**(7): 2981-2991.

Lambert, A. J. and M. D. Brand (2009). "Reactive oxygen species production by mitochondria." Methods Mol Biol **554**: 165-181.

Landar, A., R. R. Rustandi, et al. (1998). "S100A1 utilizes different mechanisms for interacting with calcium-dependent and calcium-independent target proteins." Biochemistry **37**(50): 17429-17438.

Larson, R. S. and T. A. Springer (1990). "Structure and function of leukocyte integrins." Immunol Rev **114**: 181-217.

Lauber, K., S. G. Blumenthal, et al. (2004). "Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses." Mol Cell **14**(3): 277-287.

Laudanna, C., G. Constantin, et al. (1994). "Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule." J Biol Chem **269**(6): 4021-4026.

Laudanna, C., J. Y. Kim, et al. (2002). "Rapid leukocyte integrin activation by chemokines." Immunol Rev **186**: 37-46.

Lazarus, G. S., R. S. Brown, et al. (1968). "Human Granulocyte Collagenase." Science **159**(3822): 1483-1485.

Lee, D. M. and M. E. Weinblatt (2001). "Rheumatoid arthritis." Lancet **358**(9285): 903-911.

Lekstrom-Himes, J. A. and J. I. Gallin (2000). "Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes." N Engl J Med **343**(23): 1703-1714.

Lemarchand, P., M. Vaglio, et al. (1992). "Translocation of a small cytosolic calcium-binding protein (MRP-8) to plasma membrane correlates with human neutrophil activation." J Biol Chem **267**(27): 19379-19382.

Leukert, N., T. Vogl, et al. (2006). "Calcium-dependent tetramer formation of S100A8 and S100A9 is essential for biological activity." J Mol Biol **359**(4): 961-972.

Ley, K., C. Laudanna, et al. (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." Nat Rev Immunol **7**(9): 678-689.

Liao, F., H. S. Shin, et al. (1992). "Tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 induced by cross-linking of the high-affinity or low-affinity Fc receptor for IgG in U937 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(8): 3659-3663.

Liao, H., J. Wu, et al. (2004). "Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **50**(12): 3792-3803.

Lichtman, M. A. and R. I. Weed (1972). "Alteration of the cell periphery during granulocyte maturation: relationship to cell function." Blood **39**(3): 301-316.

Lim, S. Y., M. J. Raftery, et al. "S-glutathionylation regulates inflammatory activities of S100A9." J Biol Chem.

Lim, S. Y., M. J. Raftery, et al. (2009). "Oxidative modifications of S100 proteins: functional regulation by redox." J Leukoc Biol **86**(3): 577-587.

Lominadze, G., M. J. Rane, et al. (2005). "Myeloid-related protein-14 is a p38 MAPK substrate in human neutrophils." J Immunol **174**(11): 7257-7267.

Lorenzi, R., P. M. Brickell, et al. (2000). "Wiskott-Aldrich syndrome protein is necessary for efficient IgG-mediated phagocytosis." Blood **95**(9): 2943-2946.

Lugering, N., R. Stoll, et al. (1995). "Immunohistochemical distribution and serum levels of the Ca(2+)-binding proteins MRP8, MRP14 and their heterodimeric form MRP8/14 in Crohn's disease." Digestion **56**(5): 406-414.

Lugering, N., R. Stoll, et al. (1995). "The myeloic related protein MRP8/14 (27E10 antigen)--usefulness as a potential marker for disease activity in ulcerative colitis and putative biological function." Eur J Clin Invest **25**(9): 659-664.

Machesky, L. M. and K. L. Gould (1999). "The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer." Curr Opin Cell Biol **11**(1): 117-121.

Madland, T. M., M. Hordvik, et al. (2002). "Leukocyte protein calprotectin and outcome in rheumatoid arthritis. A longitudinal study." Scand J Rheumatol **31**(6): 351-354.

Mambula, S. S., E. R. Simons, et al. (2000). "Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against Cryptococcus neoformans." Infect Immun **68**(11): 6257-6264.

Marionnet, C., F. Bernerd, et al. (2003). "Modulation of gene expression induced in human epidermis by environmental stress in vivo." J Invest Dermatol **121**(6): 1447-1458.

Marquardt, T., T. Brune, et al. (1999). "Leukocyte adhesion deficiency II syndrome, a generalized defect in fucose metabolism." J Pediatr **134**(6): 681-688.

Masson, P. L., J. F. Heremans, et al. (1969). "Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes." J Exp Med **130**(3): 643-658.

Matsumura, H., T. Shiba, et al. (1998). "A novel mode of target recognition suggested by the 2.0 Å structure of holo S100B from bovine brain." Structure **6**(2): 233-241.

Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." Science **296**(5566): 301-305.

May, R. C. and L. M. Machesky (2001). "Phagocytosis and the actin cytoskeleton." J Cell Sci **114**(Pt 6): 1061-1077.

McCormick, M. M., F. Rahimi, et al. (2005). "S100A8 and S100A9 in human arterial wall. Implications for atherogenesis." J Biol Chem **280**(50): 41521-41529.

McEver, R. P. and R. D. Cummings (1997). "Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment." J Clin Invest **100**(11 Suppl): S97-103.

Medor, W. E., A. R. Means, et al. (1992). "Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 Å structure of a calmodulin-peptide complex." Science **257**(5074): 1251-1255.

Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immunity." N Engl J Med **343**(5): 338-344.

Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "The Toll receptor family and microbial recognition." Trends Microbiol **8**(10): 452-456.

Miranda, L. P., T. Tao, et al. (2001). "Total chemical synthesis and chemotactic activity of human S100A12 (EN-RAGE)." FEBS Lett **488**(1-2): 85-90.

Mirmohammadsadegh, A., E. Tschakarjan, et al. (2000). "Calgranulin C is overexpressed in lesional psoriasis." J Invest Dermatol **114**(6): 1207-1208.

Miyamoto, S., M. Ueda, et al. (2008). "Increased serum levels and expression of S100A8/A9 complex in infiltrated neutrophils in atherosclerotic plaque of unstable angina." Heart **94**(8): 1002-1007.

Mocsai, A., Z. Jakus, et al. (2000). "Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases." J Immunol **164**(8): 4321-4331.

Moisan, E. and D. Girard (2006). "Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis." J Leukoc Biol **79**(3): 489-498.

Moore, B. W. (1965). "A soluble protein characteristic of the nervous system." Biochem Biophys Res Commun **19**(6): 739-744.

Moroz, O. V., A. A. Antson, et al. (2002). "The structure of S100A12 in a hexameric form and its proposed role in receptor signalling." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **58**(Pt 3): 407-413.

Moroz, O. V., A. A. Antson, et al. (2000). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human calcium-binding protein S100A12." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **56**(Pt 2): 189-191.

Muller, F., S. S. Froland, et al. (1994). "Elevated serum calprotectin levels in HIV-infected patients: the calprotectin response during ZDV treatment is associated with clinical events." J Acquir Immune Defic Syndr **7**(9): 931-939.

Muller, H., U. Haug, et al. (2008). "Evaluation of serum and urinary myeloid related protein-14 as a marker for early detection of prostate cancer." J Urol **180**(4): 1309-1312; discussion 1312-1303.

Muller, W. A. (2002). "Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response." Lab Invest **82**(5): 521-533.

Murphy, G., J. J. Reynolds, et al. (1977). "Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leucocytes." Biochem J **162**(1): 195-197.

Nakatani, Y., M. Yamazaki, et al. (2005). "Regulation of S100A8/A9 (calprotectin) binding to tumor cells by zinc ion and its implication for apoptosis-inducing activity." Mediators Inflamm **2005**(5): 280-292.

- Nathan, C. (2002). "Points of control in inflammation." Nature **420**(6917): 846-852.
- Nathan, C. (2006). "Neutrophils and immunity: challenges and opportunities." Nat Rev Immunol **6**(3): 173-182.
- Nathan, C. F. (1987). "Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes." J Clin Invest **80**(6): 1550-1560.
- Nauseef, W. M. (2004). "Assembly of the phagocyte NADPH oxidase." Histochem Cell Biol **122**(4): 277-291.
- Newton, R. A. and N. Hogg (1998). "The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils." J Immunol **160**(3): 1427-1435.
- Ng-Sikorski, J., R. Andersson, et al. (1991). "Calcium signaling capacity of the CD11b/CD18 integrin on human neutrophils." Exp Cell Res **195**(2): 504-508.
- Nimmerjahn, F. and J. V. Ravetch (2008). "Fcgamma receptors as regulators of immune responses." Nat Rev Immunol **8**(1): 34-47.
- Nunez, G., M. A. Benedict, et al. (1998). "Caspases: the proteases of the apoptotic pathway." Oncogene **17**(25): 3237-3245.
- O'Reilly, P. J., A. Gaggar, et al. (2008). "Interfering with extracellular matrix degradation to blunt inflammation." Curr Opin Pharmacol **8**(3): 242-248.
- Odin, J. A., J. C. Edberg, et al. (1991). "Regulation of phagocytosis and [Ca²⁺]i flux by distinct regions of an Fc receptor." Science **254**(5039): 1785-1788.
- Odink, K., N. Cerletti, et al. (1987). "Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis." Nature **330**(6143): 80-82.
- Orre, L. M., M. Pernemalm, et al. (2007). "Up-regulation, modification, and translocation of S100A6 induced by exposure to ionizing radiation revealed by proteomics profiling." Mol Cell Proteomics **6**(12): 2122-2131.
- Ott, H. W., H. Lindner, et al. (2003). "Calgranulins in cystic fluid and serum from patients with ovarian carcinomas." Cancer Res **63**(21): 7507-7514.

Ottonello, L., M. Cutolo, et al. (2002). "Synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis inhibits neutrophil apoptosis: role of adenosine and proinflammatory cytokines." Rheumatology (Oxford) **41**(11): 1249-1260.

Owen, C. A. and E. J. Campbell (1999). "The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis." J Leukoc Biol **65**(2): 137-150.

Paul, W. E., Ed. (2008). Fundamental Immunology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Payen, D., A. C. Lukaszewicz, et al. (2008). "Gene profiling in human blood leucocytes during recovery from septic shock." Intensive Care Med **34**(8): 1371-1376.

Pechkovsky, D. V., O. M. Zalutskaya, et al. (2000). "Calprotectin (MRP8/14 protein complex) release during mycobacterial infection in vitro and in vivo." FEMS Immunol Med Microbiol **29**(1): 27-33.

Pei, D. (1999). "Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage." Cell Res **9**(4): 291-303.

Pelletier, M., L. Maggi, et al. (2009). "Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells." Blood.

Perera, C., H. P. McNeil, et al. "S100 Calgranulins in inflammatory arthritis." Immunol Cell Biol **88**(1): 41-49.

Pezzilli, R., A. Barassi, et al. (2007). "Fecal calprotectin and elastase 1 determinations in patients with pancreatic diseases: a possible link between pancreatic insufficiency and intestinal inflammation." J Gastroenterol **42**(9): 754-760.

Phillips, M. L., B. R. Schwartz, et al. (1995). "Neutrophil adhesion in leukocyte adhesion deficiency syndrome type 2." J Clin Invest **96**(6): 2898-2906.

Prehoda, K. E., J. A. Scott, et al. (2000). "Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex." Science **290**(5492): 801-806.

Propper, C., X. Huang, et al. (1999). "Analysis of the MRP8-MRP14 protein-protein interaction by the two-hybrid system suggests a prominent role of the C-terminal domain of S100 proteins in dimer formation." J Biol Chem **274**(1): 183-188.

Rabinovitch, M. (1995). "Professional and non-professional phagocytes: an introduction." Trends Cell Biol **5**(3): 85-87.

Rammes, A., J. Roth, et al. (1997). "Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway." J Biol Chem **272**(14): 9496-9502.

Raquil, M. A., N. Anceriz, et al. (2008). "Blockade of antimicrobial proteins S100A8 and S100A9 inhibits phagocyte migration to the alveoli in streptococcal pneumonia." J Immunol **180**(5): 3366-3374.

Ravichandran, K. S. and U. Lorenz (2007). "Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal." Nat Rev Immunol **7**(12): 964-974.

Renaud, W., M. Merten, et al. (1994). "Increased coexpression of CFTR and S100 calcium binding proteins MRP8 and MRP14 mRNAs in cystic fibrosis human tracheal gland cells." Biochem Biophys Res Commun **201**(3): 1518-1525.

Reth, M. (1989). "Antigen receptor tail clue." Nature **338**(6214): 383-384.

Rety, S., D. Osterloh, et al. (2000). "Structural basis of the Ca(2+)-dependent association between S100C (S100A11) and its target, the N-terminal part of annexin I." Structure **8**(2): 175-184.

Robinson, J. M. (2008). "Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes." Histochem Cell Biol **130**(2): 281-297.

Robinson, M. J., P. Tessier, et al. (2002). "The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells." J Biol Chem **277**(5): 3658-3665.

Roos, D., R. van Bruggen, et al. (2003). "Oxidative killing of microbes by neutrophils." Microbes Infect **5**(14): 1307-1315.

Rosales, C. and E. J. Brown (1991). "Two mechanisms for IgG Fc-receptor-mediated phagocytosis by human neutrophils." J Immunol **146**(11): 3937-3944.

Roseth, A. G., M. K. Fagerhol, et al. (1992). "Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study." Scand J Gastroenterol **27**(9): 793-798.

Roseth, A. G., P. N. Schmidt, et al. (1999). "Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease." Scand J Gastroenterol **34**(1): 50-54.

Ross, G. D., C. I. Jarowski, et al. (1978). "The sequential appearance of Ia-like antigens and two different complement receptors during the maturation of human neutrophils." J Exp Med **147**(3): 730-744.

Roth, J., F. Burwinkel, et al. (1993). "MRP8 and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner." Blood **82**(6): 1875-1883.

Roth, J., S. Teigelkamp, et al. (1992). "Complex pattern of the myelo-monocytic differentiation antigens MRP8 and MRP14 during chronic airway inflammation." Immunobiology **186**(3-4): 304-314.

Rouleau, P., K. Vandal, et al. (2003). "The calcium-binding protein S100A12 induces neutrophil adhesion, migration, and release from bone marrow in mouse at concentrations similar to those found in human inflammatory arthritis." Clin Immunol **107**(1): 46-54.

Rugtveit, J., P. Brandtzaeg, et al. (1994). "Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes." Gut **35**(5): 669-674.

Ryckman, C., C. Gilbert, et al. (2004). "Monosodium urate monohydrate crystals induce the release of the proinflammatory protein S100A8/A9 from neutrophils." J Leukoc Biol **76**(2): 433-440.

Ryckman, C., S. R. McColl, et al. (2003). "Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis." Arthritis Rheum **48**(8): 2310-2320.

Ryckman, C., K. Vandal, et al. (2003). "Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion." J Immunol **170**(6): 3233-3242.

Saito, Y., K. Saito, et al. (2002). "Hyperzincemia with systemic inflammation: a heritable disorder of calprotectin metabolism with rheumatic manifestations?" J Pediatr **140**(2): 267-269.

Salas, A., M. Shimaoka, et al. (2004). "Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alpha₁beta₂ and relation to alpha₁ and beta₁-like domain interaction." Immunity **20**(4): 393-406.

Sampson, B., M. K. Fagerhol, et al. (2002). "Hyperzincaemia and hypercalprotectinaemia: a new disorder of zinc metabolism." Lancet **360**(9347): 1742-1745.

Santhanagopalan, V., B. L. Hahn, et al. (1995). "Resistance of zinc-supplemented Candida albicans cells to the growth inhibitory effect of calprotectin." J Infect Dis **171**(5): 1289-1294.

Savill, J. S., P. M. Henson, et al. (1989). "Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism." J Clin Invest **84**(5): 1518-1527.

Savill, J. S., A. H. Wyllie, et al. (1989). "Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages." J Clin Invest **83**(3): 865-875.

Sawyer, D. W., J. A. Sullivan, et al. (1985). "Intracellular free calcium localization in neutrophils during phagocytosis." Science **230**(4726): 663-666.

Scallon, B. J., E. Scigliano, et al. (1989). "A human immunoglobulin G receptor exists in both polypeptide-anchored and phosphatidylinositol-glycan-anchored forms." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(13): 5079-5083.

Scapini, P., J. A. Lapinet-Vera, et al. (2000). "The neutrophil as a cellular source of chemokines." Immunol Rev **177**: 195-203.

Schafer, B. W., J. M. Fritschy, et al. (2000). "Brain S100A5 is a novel calcium-, zinc-, and copper ion-binding protein of the EF-hand superfamily." J Biol Chem **275**(39): 30623-30630.

Schluesener, H. J., P. G. Kremsner, et al. (1998). "Widespread expression of MRP8 and MRP14 in human cerebral malaria by microglial cells." Acta Neuropathol **96**(6): 575-580.

Schmid, K. W., N. Lugering, et al. (1995). "Immunohistochemical demonstration of the calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 and their heterodimer (27E10 antigen) in Crohn's disease." Hum Pathol **26**(3): 334-337.

Schmidt, A. M., S. D. Yan, et al. (2001). "The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses." J Clin Invest **108**(7): 949-955.

Semprini, S., F. Capon, et al. (2002). "Evidence for differential S100 gene over-expression in psoriatic patients from genetically heterogeneous pedigrees." Hum Genet **111**(4-5): 310-313.

Sengelov, H., F. Boulay, et al. (1994). "Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils." Biochem J **299** (Pt 2): 473-479.

Sengelov, H., P. Follin, et al. (1995). "Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils." J Immunol **154**(8): 4157-4165.

Sengelov, H., L. Kjeldsen, et al. (1993). "Control of exocytosis in early neutrophil activation." J Immunol **150**(4): 1535-1543.

Sengelov, H., L. Kjeldsen, et al. (1993). "Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils." J Clin Invest **92**(3): 1467-1476.

Sengelov, H., L. Kjeldsen, et al. (1994). "Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils." J Immunol **153**(2): 804-810.

Shaw, S. K., P. S. Bamba, et al. (2001). "Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium." J Immunol **167**(4): 2323-2330.

Shepherd, C. E., J. Goyette, et al. (2006). "Inflammatory S100A9 and S100A12 proteins in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **27**(11): 1554-1563.

Shibata, F., A. Ito, et al. (2005). "Mitogenic activity of S100A9 (MRP-14)." Biol Pharm Bull **28**(12): 2312-2314.

Siegenthaler, G., K. Roulin, et al. (1997). "A heterocomplex formed by the calcium-binding proteins MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9) binds unsaturated fatty acids with high affinity." J Biol Chem **272**(14): 9371-9377.

Silverstein, S. C. (1995). "Phagocytosis of microbes: insights and prospects." Trends Cell Biol **5**(3): 141-142.

Simon, S. I., Y. Hu, et al. (2000). "Neutrophil tethering on E-selectin activates beta 2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway." J Immunol **164**(8): 4348-4358.

Smith, J. C., J. A. Zeller, et al. (1976). "Elevated plasmz zinc: a heritable anomaly." Science **193**(4252): 496-498.

Sohnle, P. G., B. L. Hahn, et al. (1996). "Inhibition of *Candida albicans* growth by calprotectin in the absence of direct contact with the organisms." J Infect Dis **174**(6): 1369-1372.

Sohnle, P. G., M. J. Hunter, et al. (2000). "Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14)." J Infect Dis **182**(4): 1272-1275.

Srikrishna, G. and H. H. Freeze (2009). "Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer." *Neoplasia* **11**(7): 615-628.

Srikrishna, G., K. Panneerselvam, et al. (2001). "Two proteins modulating transendothelial migration of leukocytes recognize novel carboxylated glycans on endothelial cells." *J Immunol* **166**(7): 4678-4688.

Srikrishna, G., D. K. Toomre, et al. (2001). "A novel anionic modification of N-glycans on mammalian endothelial cells is recognized by activated neutrophils and modulates acute inflammatory responses." *J Immunol* **166**(1): 624-632.

Sroussi, H. Y., J. Berline, et al. (2007). "Oxidation of methionine 63 and 83 regulates the effect of S100A9 on the migration of neutrophils in vitro." *J Leukoc Biol* **81**(3): 818-824.

Sroussi, H. Y., Y. Lu, et al. (2010). "S100A8 and S100A9 inhibit neutrophil oxidative metabolism in-vitro: Involvement of adenosine metabolites." *Free Radic Res* **44**(4): 389-396.

Steinbakk, M., C. F. Naess-Andresen, et al. (1990). "Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin." *Lancet* **336**(8718): 763-765.

Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 463-516.

Stulik, J., J. Osterreicher, et al. (1999). "The analysis of S100A9 and S100A8 expression in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma: the S100A9 and S100A8 positive cells underlie and invade tumor mass." *Electrophoresis* **20**(4-5): 1047-1054.

Sugiura, T., K. Goto, et al. (2006). "Effects of cyclosporine A in hyperzincaemia and hypercalprotectinaemia." *Acta Paediatr* **95**(7): 857-860.

Summerton, C. B., M. G. Longlands, et al. (2002). "Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract." *Eur J Gastroenterol Hepatol* **14**(8): 841-845.

Suryono, J. Kido, et al. (2003). "Effect of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1beta on calprotectin release in human monocytes." *J Periodontol* **74**(12): 1719-1724.

Swanson, J. A. and S. C. Baer (1995). "Phagocytosis by zippers and triggers." *Trends Cell Biol* **5**(3): 89-93.

Sweet, S. P., A. N. Denbury, et al. (2001). "Salivary calprotectin levels are raised in patients with oral candidiasis or Sjogren's syndrome but decreased by HIV infection." Oral Microbiol Immunol **16**(2): 119-123.

Tanida, N., N. Ohno, et al. (1992). "Modification of immunopharmacological activities of synthetic monosaccharide lipid A analogue, GLA60, by lysozyme." J Biochem **112**(5): 616-623.

Tapon, N. and A. Hall (1997). "Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **9**(1): 86-92.

Tarabykina, S., M. Krajewska, et al. (2000). "Heterocomplex formation between metastasis-related protein S100A4 (Mts1) and S100A1 as revealed by the yeast two-hybrid system." FEBS Lett **475**(3): 187-191.

Ten Klooster, J. P., E. E. Evers, et al. (2006). "Interaction between Tiam1 and the Arp2/3 complex links activation of Rac to actin polymerization." Biochem J **397**(1): 39-45.

Thorey, I. S., J. Roth, et al. (2001). "The Ca²⁺-binding proteins S100A8 and S100A9 are encoded by novel injury-regulated genes." J Biol Chem **276**(38): 35818-35825.

Thornton, B. P., V. Vetvicka, et al. (1996). "Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18)." J Immunol **156**(3): 1235-1246.

Thrasher, A. J. (2002). "WASp in immune-system organization and function." Nat Rev Immunol **2**(9): 635-646.

Tibble, J., G. Sigthorsson, et al. (2001). "Faecal calprotectin and faecal occult blood tests in the diagnosis of colorectal carcinoma and adenoma." Gut **49**(3): 402-408.

Tirkos, S., S. Newbigging, et al. (2006). "Expression of S100A8 correlates with inflammatory lung disease in congenic mice deficient of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." Respir Res **7**: 51.

Tobe, T., K. Murakami, et al. (1989). "Amino acid sequences of 60B8 antigens induced in HL-60 cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. The antigens are identical with macrophage-related protein-14 and -8." Chem Pharm Bull (Tokyo) **37**(6): 1576-1580.

Tsuboi, S. and J. Meerloo (2007). "Wiskott-Aldrich syndrome protein is a key regulator of the phagocytic cup formation in macrophages." J Biol Chem **282**(47): 34194-34203.

Turovskaya, O., D. Foell, et al. (2008). "RAGE, carboxylated glycans and S100A8/A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis." Carcinogenesis **29**(10): 2035-2043.

van den Bos, C., J. Roth, et al. (1996). "Phosphorylation of MRP14, an S100 protein expressed during monocytic differentiation, modulates Ca(2+)-dependent translocation from cytoplasm to membranes and cytoskeleton." J Immunol **156**(3): 1247-1254.

van Lent, P. L., L. Grevers, et al. (2008). "Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis." Ann Rheum Dis **67**(12): 1750-1758.

van Spriel, A. B., J. H. Leusen, et al. (2001). "Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation." Blood **97**(8): 2478-2486.

Vandal, K., P. Rouleau, et al. (2003). "Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide." J Immunol **171**(5): 2602-2609.

Viemann, D., A. Strey, et al. (2005). "Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells." Blood **105**(7): 2955-2962.

Vogl, T., S. Ludwig, et al. (2004). "MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes." Blood **104**(13): 4260-4268.

Vogl, T., C. Propper, et al. (1999). "S100A12 is expressed exclusively by granulocytes and acts independently from MRP8 and MRP14." J Biol Chem **274**(36): 25291-25296.

Vogl, T., K. Tenbrock, et al. (2007). "Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock." Nat Med **13**(9): 1042-1049.

Wang, A. V., P. R. Scholl, et al. (1994). "Physical and functional association of the high affinity immunoglobulin G receptor (Fc gamma RI) with the kinases Hck and Lyn." J Exp Med **180**(3): 1165-1170.

Wang, G., P. S. Rudland, et al. (2000). "Interaction in vivo and in vitro of the metastasis-inducing S100 protein, S100A4 (p9Ka) with S100A1." J Biol Chem **275**(15): 11141-11146.

Weiss, S. J. (1989). "Tissue destruction by neutrophils." N Engl J Med **320**(6): 365-376.

Welte, K. and L. A. Boxer (1997). "Severe chronic neutropenia: pathophysiology and therapy." Semin Hematol **34**(4): 267-278.

Welte, K. and D. Dale (1996). "Pathophysiology and treatment of severe chronic neutropenia." Ann Hematol **72**(4): 158-165.

Wimley, W. C., M. E. Selsted, et al. (1994). "Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores." Protein Sci **3**(9): 1362-1373.

Witko-Sarsat, V., P. Rieu, et al. (2000). "Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects." Lab Invest **80**(5): 617-653.

Wolk, K., E. Witte, et al. (2006). "IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis." Eur J Immunol **36**(5): 1309-1323.

Wulffraat, N. M., P. J. Haas, et al. (2003). "Myeloid related protein 8 and 14 secretion reflects phagocyte activation and correlates with disease activity in juvenile idiopathic arthritis treated with autologous stem cell transplantation." Ann Rheum Dis **62**(3): 236-241.

Yang, Q., D. O'Hanlon, et al. (1999). "Demonstration of heterodimer formation between S100B and S100A6 in the yeast two-hybrid system and human melanoma." Exp Cell Res **246**(2): 501-509.

Yang, Z., T. Tao, et al. (2001). "Proinflammatory properties of the human S100 protein S100A12." J Leukoc Biol **69**(6): 986-994.

Ye, F., D. Foell, et al. (2004). "Neutrophil-derived S100A12 is profoundly upregulated in the early stage of acute Kawasaki disease." Am J Cardiol **94**(6): 840-844.

Yen, T., C. A. Harrison, et al. (1997). "Induction of the S100 chemotactic protein, CP-10, in murine microvascular endothelial cells by proinflammatory stimuli." Blood **90**(12): 4812-4821.

Youssef, P., J. Roth, et al. (1999). "Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane." J Rheumatol **26**(12): 2523-2528.

Yui, S., M. Mikami, et al. (1997). "Growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities of calprotectin derived from inflammatory exudate cells on normal fibroblasts: regulation by metal ions." J Leukoc Biol **61**(1): 50-57.

Yui, S., M. Mikami, et al. (1995). "Induction of apoptotic cell death in mouse lymphoma and human leukemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudate cells." J Leukoc Biol **58**(6): 650-658.

Yui, S., Y. Nakatani, et al. (2002). "Implication of extracellular zinc exclusion by recombinant human calprotectin (MRP8 and MRP14) from target cells in its apoptosis-inducing activity." Mediators Inflamm **11**(3): 165-172.

Zhou, M., R. F. Todd, 3rd, et al. (1993). "Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with Fc gamma receptor III on human neutrophils. Possible role of lectin-like interactions." J Immunol **150**(7): 3030-3041.

Zimmer, D. B., P. Wright Sadosky, et al. (2003). "Molecular mechanisms of S100-target protein interactions." Microsc Res Tech **60**(6): 552-559.

Zwadlo, G., J. Bruggen, et al. (1988). "Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues." Clin Exp Immunol **72**(3): 510-515.