

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**CARACTÉRISATION DU RÔLE DES PROTÉINES S100A8 ET S100A9 DANS LES
NEUTROPHILES ET LES CELLULES MONONUCLÉES DU SANG PÉRIPHÉRIQUE**

Par
Jean-Christophe Simard

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Virologie et Immunologie

JURY D'ÉVALUATION

Président du jury et examinateur interne	M. Jacques Bernier, PhD INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Mme. Caroline Gilbert, PhD Centre de recherche du CHUL
Examineur externe	Mme. Nathalie Grandvaux, PhD Centre de recherche du CHUM
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 fortement exprimées par les neutrophiles, représentant plus de 30% des protéines cytosoliques. Leur présence est associée au processus inflammatoire aigu et chronique. En effet, on retrouve S100A8 et S100A9 en réponse à différentes infections bactériennes, fongiques et virales ainsi que dans plusieurs pathologies inflammatoires chroniques comme l'arthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn. Des études précédentes ont révélé que S100A8 et S100A9 sont de puissants activateurs des neutrophiles et des monocytes. Dans cette étude, nous avons approfondi nos connaissances sur le rôle des protéines S100A8 et S100A9 dans la physiologie des neutrophiles et des monocytes. Nos résultats démontrent d'abord que S100A9 stimule le processus phagocytaire des neutrophiles dépendants des récepteurs Fc et des récepteurs du complément par un mécanisme dépendant des voies signalétiques Syk, Erk1/2 et PI3K/Akt. Nos résultats démontrent également que S100A9 régule la sécrétion d'interleukine-8 chez les neutrophiles stimulés avec les agonistes inflammatoires fMLP et GM-CSF par des mécanismes impliquant les différents facteurs de transcription NF- κ B, STAT-3, STAT-5 et CREB-1. Finalement, nos résultats suggèrent que S100A8 et S100A9 sont d'importants régulateurs de la libération de cytokines inflammatoires par les monocytes. En effet, S100A8 et S100A9 provoquent la translocation du facteur de transcription NF- κ B, régulant plusieurs gènes inflammatoires, dont ceux de l'inflammasome NLRP-3. Mis en commun, les résultats de ces études suggèrent que S100A8 et S100A9 seraient favorables à l'organisme dans un contexte d'infections à pathogènes puisqu'elles favoriseraient le recrutement de cellules immunitaires via la sécrétion d'interleukine-8 par les neutrophiles ainsi que de plusieurs autres chimiokines par les monocytes. De plus, S100A8 et S100A9 participeraient activement à l'élimination de pathogènes en augmentant la phagocytose des neutrophiles. Dans un contexte d'inflammation chronique et/ou d'auto-immunité, les concentrations élevées de S100A8 et S100A9 seraient néfastes pour l'organisme puisqu'elles participeraient à une boucle d'amplification inflammatoire via la sécrétion de médiateurs inflammatoires.

Remerciements

Merci au grand Denis Girard, un directeur de recherche exceptionnel. J'aimerais d'abord le remercier d'avoir cru en mes capacités de mener à terme un projet de recherche si intéressant. Merci également d'avoir été si disponible en tout temps. J'aimerais aussi souligner l'importance de son sens de l'humour légendaire qui nous a permis d'avoir des heures de plaisir.

J'aimerais remercier très sincèrement mon codirecteur Philippe Tessier de m'avoir laissé autant d'autonomie et de liberté sur le projet de recherche. Merci aussi pour les bonnes idées qui ont permis de bien faire avancer le projet.

Un merci particulier à Jamila Ennaciri, François Binet, Valérie Lavastre, Marie-Michelle Simon, David Garcês-Gonçalves, Rafael de Liz, Francis Antoine, Francis Vallières, Sonia Chiasson, Théo Stafford-Richard, Michelle Poirier, Kim Babin, Isabelle Durocher et Claudie Noël avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. Je remercie également toutes les autres personnes à l'institut avec qui j'ai pu échanger durant les six dernières années.

Merci aussi à toute l'équipe de Philippe Tessier: Nathalie Pagé pour les protéines recombinantes, Annabelle Cesaro pour l'aide qu'elle m'a donnée pendant les protocoles de colites, et Mélanie Tardif pour les bonnes idées et les discussions scientifiques enrichissantes.

Bien que j'adore la recherche, j'aimerais remercier ma famille et mes amis qui m'ont permis de faire autre chose que de la science. Ils m'ont permis de décrocher en plus de m'apporter leur soutien sans lequel les études graduées auraient été impossibles.

Finalement, merci à ma fiancée Anne-Julie avec qui j'ai surmonté les hauts et les bas de la vie reliés aux études graduées. Cette aventure m'a paru beaucoup plus facile en sa compagnie.

Table des matières

Résumé	iii
Remerciements.....	iv
Liste des abréviations	ix
Liste des figures.....	xiii
Liste des tableaux.....	xiv
Introduction	iv
SECTION 1: SYNTHÈSE	2
CHAPITRE 1: L'inflammation	2
1.1 L'inflammation aiguë	2
1.1.1 Caractéristiques de la réponse inflammatoire aiguë	3
1.1.2 Fonctions principales de l'inflammation aiguë.....	4
1.2 L'inflammation chronique	5
1.3 La régulation de l'inflammation	7
1.3.1 Les inducteurs de l'inflammation.....	7
1.3.2 La régulation de l'inflammation	9
1.3.3 La résolution de l'inflammation	12
1.3.4 La persistance de l'inflammation.....	14
CHAPITRE 2: Le neutrophile	17
2.2 L'adhésion, l'activation et la migration	18
2.3 La dégranulation	21
2.4 La phagocytose et la destruction de pathogènes	24
2.4.1 La phagocytose dépendante des récepteurs Fc (FcR)	25
2.4.2 La machinerie de polymérisation d'actine	25
2.4.3 La phagocytose dépendante des récepteurs du complément.....	26
2.4.4 La formation et la maturation du phagosome.....	27
2.4.5 La phagocytose de cellules apoptotiques	28
2.4.6 Facteurs modulant le processus de phagocytose	28
2.5 La production d'espèces réactives de l'oxygène.....	29
2.6 La production de cytokines et l'inter-communication avec les autres cellules.....	33
2.7 La mort du neutrophile	36

2.7.1 L'apoptose	36
2.7.2 Les <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> (NET)	39
2.7.3 L'élimination des neutrophiles apoptotiques	41
2.8 Le neutrophile dans l'inflammation aiguë et chronique	42
CHAPITRE 3: Les inflammasomes.....	46
3.1 La formation de l'inflammasome et la pyroptose.....	46
3.2 La régulation des inflammasomes	48
3.3 Les activateurs des inflammasomes	49
3.4 Fonctions des inflammasomes dans l'immunité.....	51
CHAPITRE 4: La voie NF-κB.....	52
4.1 Les membres de la famille NF- κ B	52
4.2 Le complexe de kinase I κ B	54
4.3 Régulation de NF- κ B.....	54
4.3.1 La boucle de rétroaction I κ B- α	55
4.3.2 L'ubiquitination.....	56
4.3.3 Les autres modifications post-traductionnelles	56
4.3.4 Les miARN.....	57
4.4 NF- κ B dans l'immunité innée et acquise	57
4.4.1 Fonctions pro et anti-apoptotiques de NF- κ B.....	57
4.4.2 Rôle dans la production de cytokines/chimiokines.....	58
4.4.3 Développement et homéostasie des tissus.....	58
4.5 Rôle de NF- κ B dans l'inflammation et le cancer	59
4.6 Rôle de NF- κ B dans l'auto-immunité	60
4.6.1 La régulation des fonctions des lymphocytes T et des cellules dendritiques ..	60
CHAPITRE 5: Les protéines S100A8 et S100A9	62
5.1 Généralités.....	62
5.1.1 Nomenclatures.....	63
5.1.2 Structure des protéines S100A8 et S100A9	63
5.2 Mécanismes de sécrétion	64
5.3 Les récepteurs	65
5.4 Rôles intracellulaires	66

5.4.1 Organisation du réseau de microtubules	66
5.4.2 Transport de l'acide arachidonique	66
5.4.3 Régulation de l'activité du complexe NADPH oxydase	67
5.5 Rôles extracellulaires	67
5.5.1 Propriétés antimicrobiennes	68
5.5.2 Rôles dans la physiologie des phagocytes	68
5.5.3 Propriétés antioxydantes	69
5.6 Les maladies associées à la présence de S100A8 et S100A9	70
5.6.1 Le cancer	70
5.6.2 Les maladies inflammatoires chroniques et auto-inflammatoires.....	71
Hypothèses du projet de recherche	75
Objectifs du projet de recherche	76
Objectif 1: Caractériser le rôle des protéines S100A8 et S100A9 dans la phagocytose et la production de réactifs oxygénés chez le neutrophile humain	76
Objectif 2: Caractériser le rôle des protéines S100A8 et S100A9 dans la production de cytokines par les cellules mononucléées du sang périphérique.....	77
Objectif 3: Caractériser le rôle des protéines S100A8 et S100A9 dans la production d'IL-8 chez le neutrophile humain	78
SECTION 2: ARTICLES SCIENTIFIQUES.....	79
Article 1	80
Résumé de l'article 1 en français	81
Article 2	92
Résumé de l'article 2 en français	93
Article 3	106
Résumé de l'article 3 en français	107
SECTION 3: DISCUSSION ET CONCLUSION	124
CHAPITRE 6: Discussion et Conclusion	125
6.1 Les protéines S100A8 et S100A9: des amplificateurs de la réponse innée	125
6.1.1 S100A9 régule la phagocytose des neutrophiles	125
6.1.2 S100A9 régule la libération d'IL-8 et l'activation de divers facteurs de transcription des neutrophiles	127

6.1.3 S100A8 et S100A9 seraient des facteurs impliqués dans une boucle d'amplification inflammatoire	128
6.2 S100A8 et S100A9 régule l'inflammasome NLRP-3	128
6.2.1 Implication dans l'auto-immunité et l'auto-inflammation	129
6.2.2 L'hypercalprotectinémie: un syndrome auto-inflammatoire associé aux protéines S100A8 et S100A9	130
6.2.3 Rôles dans la réponse inflammatoire aiguë et l'immunité	131
6.3 Limitations du projet de recherche	131
6.3.1 La calprotectine	132
6.3.2 Les autres médiateurs solubles et les facteurs de transcription.....	132
6.3.3 L'effet de S100A8 et S100A9 sur les cellules mononuclées du sang périphérique.....	133
6.3.4 La courte demi-vie des neutrophiles	134
6.3.5 La réalisation d'expériences in vivo	134
6.3.6 Le(s) récepteur(s)	134
6.4 Conclusions et perspectives	135
Bibliographie	137
Annexe 1	197

Liste des abréviations

AGE	<i>Advanced-Glycation-End product</i>
ANCA	<i>Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-related</i>
ANK	<i>Ankyrin repeat</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenosine-5-Triphosphate
BIR	<i>Baculoviral Inhibition of apoptosis protein</i>
BLyS	<i>B-lymphocyte Stimulation</i>
BPI	<i>Bacterial/Permeability-Increasing protein</i>
CARD	Domaine de recrutement de caspases
CGD	Maladie chronique granulomateuse
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX	Cyclo-oxygénase
CR	Récepteur du complément
CRP	Protéine C-réactive
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>
DC	Cellules dendritiques
DISC	<i>Death Inducing Signaling Complex</i>
FADD	<i>Fass-Associated Death Domain</i>
FcR	Récepteur Fc
FFM	Fièvre familiale méditerranéenne
fMLP	formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
GVH	Greffon contre l'hôte

HO	Radicaux hydroxyl
HOCl	Acide hypochlorique
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IL	Interleukine
IRAK	<i>IL-1 Receptor Associated Kinase</i>
JAK	Janus kinase
LAT	<i>Linker of Activated T-cell</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LOX	Lipoxygénase
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	<i>Leucine Rich Repeat</i>
LT	Lymphocyte T
LTB-4	Leucotriène B4
LX	Lipoxine
LZ	<i>Leucine-Zipper-like</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated-Protein-Kinase</i>
MDSC	<i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i>
MFG-E8	<i>Milk fat globule-EGF factor 8 protein</i>
MII	Maladie Inflammatoire de l'Intestin
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
MMP	Métalloprotéinase
MPO	Myélopéroxydase
MPOC	Maladie pulmonaire obstructive chronique
MRP	<i>Myeloid-Related Protein</i>
MSK-1	<i>Mitogen- and stress-activated protein kinase-1</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation primary response</i>

NACTH	<i>Nucleotide-binding and Oligomerization Domain</i>
NCF-1	<i>Neutrophil Cytosolic Factor-1</i>
NET	<i>Neutrophil Extracellular Trap</i>
NIK	<i>NF-κB Inducible Kinase</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NLR	<i>NOD-Like Receptor</i>
NO	Oxyde nitrique
NOD	<i>Nucleotide-binding Association Domain</i>
NOX	NADPH oxidase
PAF	Facteur activateur de plaquette
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
pDC	Cellule dendritique plasmocytaire
PGE2	Prostaglandine E2
PI3K	Phosphoinositide-3 kinase
PIP3	Phospho-inoside phosphate 3
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospho-lipase-C
PMA	Phorbol-méristate-acétate
PMN	Polymorphonucléaire neutrophile
PR3	Protéinase-3
PS	Phosphatidyl-sérine
PSGL-1	<i>P-Selectin Glycoprotein Ligand-1</i>
PX	Domaine N-terminal <i>Phox Homology</i>
PYD	Domaine pyrine
RAGE	<i>Receptor for Advanced-Glycation-End product</i>

RE	Réticulum endoplasmique
RHD	<i>Rel-Homology Domain</i>
RIG-1	<i>Retinoic acid Inducible Gene-1</i>
RLR	Récepteur <i>RIG-1-like</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SH2	<i>Src-Homology 2</i>
SH3	<i>Src-Homology 3</i>
SLE	Lupus érythémateux systémique
SLPI	<i>Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor</i>
SOD	Superoxide dismutase
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TA	Domaine de transactivation
TCR	Récepteurs de cellules T
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIM-4	<i>T-Cell Immunoglobulin and Mucin domain containing 4</i>
TIR	<i>Toll-IL-1 Receptor Resistance</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNF	Facteur de nécrose tumoral
TRADD	<i>Tumor-Associated Death Domain</i>
TRAIL	<i>TNF-Related-Apoptosis Inducing Ligand</i>
Treg	Cellule T régulatrice
UPR	<i>Unfold Protein Response</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WASP	<i>Wiskott-Aldrich Syndrome Protein</i>

Liste des figures

- Figure 1 :** Principaux inducteurs de l'inflammation
- Figure 2 :** Mécanismes et conséquences de la non-résolution de l'inflammation
- Figure 3 :** Mécanismes utilisés par le neutrophile pour éliminer les pathogènes
- Figure 4 :** Étapes du processus de migration paracellulaire et transcellulaire des neutrophiles
- Figure 5 :** Représentation du complexe NADPH oxydase du neutrophile suite à son activation
- Figure 6 :** Représentation simplifiée des deux principales voies apoptotiques
- Figure 7 :** Schématisation des domaines structuraux des principaux NLR
- Figure 8 :** Modèle de régulation et d'activation des inflammasomes via les deux principaux signaux
- Figure 9 :** Membres de la voie signalétique NF- κ B
- Figure 10 :** Modèle de régulation et d'activation de la voie NF- κ B canonique
- Figure 11 :** Structure primaire et secondaire des protéines S100A8 et S100A9

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales classes de médiateurs inflammatoires

Tableau 2 : Phénotypes des macrophages rM et M1

Tableau 3 : Molécules impliquées dans les différentes étapes de la diapédèse des neutrophiles

Tableau 4: Constituants des granules du neutrophile

Tableau 5: Fonctions des principales cytokines produites par les neutrophiles humains

Tableau 6: Principales caractéristiques des différents types de mort chez le neutrophile

Tableau 7: Principaux pathogènes connus pour activer les inflammasomes

Tableau 8: Présence de protéines S100A8 et S100A9 dans les différents types de cancers

Tableau 9: Présence de calgranulines dans différentes pathologies inflammatoires

Introduction

Les protéines S100A8 et S100A9 sont libérées dans le milieu extracellulaire principalement par les neutrophiles, les monocytes et les macrophages lors du processus inflammatoire. Elles sont sécrétées en réponse à divers agents ou libérées lors de la mort cellulaire par nécrose ou encore lors de la formation de trappes extracellulaires. S100A8 et S100A9 possèdent d'importantes propriétés dans l'inflammation aiguë et chronique. Ces protéines jouent un rôle, entre autres, dans la chimiotaxie, la dégranulation et la migration des neutrophiles. Par contre, leur présence est également associée au développement de maladies auto-immunes. On rapporte des concentrations de protéines S100A8 et S100A9 extrêmement élevées dans plusieurs pathologies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou la fibrose kystique. De plus, on retrouve des concentrations élevées de calprotectine dans le sérum de patients atteints de différents désordres auto-inflammatoires.

Le but principal de ce projet de recherche est d'approfondir nos connaissances sur l'effet des protéines S100A8 et S100A9 dans le processus inflammatoire aigu et chronique. Nous nous sommes concentrés particulièrement sur l'effet de ces protéines sur la production de réactifs oxygénés, la phagocytose et la libération de cytokines chez les neutrophiles humains. Nous avons également évalué leurs effets au niveau de la production de cytokines chez les cellules mononucléées du sang périphérique. Ces différentes fonctions effectrices des phagocytes jouent des rôles cruciaux dans l'élimination de pathogènes. Par contre, dans un contexte inflammatoire chronique, la production de cytokines inflammatoires participe à l'exacerbation des pathologies. La présence de ces protéines pourrait s'avérer bénéfique dans l'inflammation aiguë, mais néfaste dans l'inflammation chronique.

Les études précédentes ont attribué des rôles bactériostatiques et fongistatiques aux protéines S100A8 et S100A9. Le présent ouvrage démontre le rôle actif de la protéine S100A9 dans le contrôle des infections et l'élimination de bactéries par la modulation du processus phagocytaire des neutrophiles humains. De plus, nos résultats supportent le rôle de S100A8 et S100A9 comme modulateur de la réponse immunitaire via une amplification de la libération de cytokines et de chimiokines par les phagocytes.

Cette thèse revoit d'abord en détail les différentes étapes du processus inflammatoire aigu et chronique en préconisant le rôle du neutrophile. De plus, les inflammasomes et leurs rôles dans la réponse immunitaire sont abordés. Ensuite, le rôle du facteur de transcription NF- κ B dans

l'immunité est également décrit dans le chapitre quatre puisqu'il tient un rôle déterminant dans l'immunité. Enfin, l'état des connaissances sur les protéines S100A8 et S100A9 est détaillé dans un dernier chapitre synthèse. Ces sections de synthèse de la littérature sont suivies de trois articles scientifiques traitant du rôle des protéines S100A8 et S100A9 dans la phagocytose des neutrophiles humains ainsi que dans la production de cytokines et de chimiokines par les monocytes et les neutrophiles. Finalement, une section discussion et une conclusion générale permettront de mettre les résultats les plus importants en évidence afin d'en tirer une analyse globale.

SECTION 1: SYNTHÈSE

CHAPITRE 1: L'inflammation

La réponse inflammatoire, à laquelle participe activement le neutrophile, représente la première barrière biochimique d'un organisme. Cette réponse agit comme un système de défense et permet, entre autres, l'élimination de pathogènes. Elle consiste en un ensemble complexe de réponses cellulaires et humorales qui s'orchestrent suivant un traumatisme ou une infection. L'inflammation est caractérisée par l'apparition de cinq signes: la rougeur, la douleur, la chaleur, l'œdème et la perte de fonctions. Cette réponse biologique vise essentiellement le retour de l'homéostasie tissulaire.

L'inflammation est un processus actif qui est déterminant dans l'issue de la réponse immunitaire spécifique. De plus, une régulation hautement contrôlée des différentes étapes de l'inflammation est essentielle au maintien de l'homéostasie. Par contre, la dérégulation de l'inflammation mène, entre autres, à la persistance de l'inflammation et même aux développements de diverses maladies auto-immunes. La persistance de l'inflammation corrèle également avec le développement de différents cancers. Une meilleure compréhension du processus inflammatoire, en particulier concernant l'étape de la résolution de l'inflammation, laisse entrevoir sans doute l'idée de nouveaux traitements dirigés contre certaines maladies inflammatoires chroniques. Le présent chapitre se veut un portrait actuel et détaillé des différentes étapes du processus inflammatoire.

1.1 L'inflammation aiguë

La réponse inflammatoire aiguë est définie comme une série de réponses cellulaires et tissulaires qui surviennent durant les premières heures suivant une infection ou une blessure. Lors d'une infection bactérienne, par exemple, la réponse inflammatoire aiguë est exacerbée durant les premières heures voire les premiers jours, ce qui permet un recrutement accru de leucocytes. Cette réponse diminue ensuite graduellement après l'élimination du pathogène en cause. Évidemment, la résolution de l'inflammation aiguë nécessite l'élimination complète du pathogène ainsi que la clairance des débris cellulaires.

La réponse inflammatoire aiguë est déclenchée par la présence de pathogène ou par des dommages tissulaires. Lors d'une infection par un pathogène, il y a reconnaissance de motifs moléculaires des pathogènes par des récepteurs cellulaires, comme les récepteurs *Toll-Like* (TLR), les récepteurs *RIG-1-Like* (RLR) et les récepteurs *Nod-Like* (NLR) par exemple. La reconnaissance se fait généralement par les cellules résidentes des tissus comme les macrophages ou les mastocytes, qui entament la réponse inflammatoire aiguë. L'initiation de la réponse inflammatoire passe par la libération de médiateurs solubles incluant les cytokines et les chimiokines. Plusieurs changements se produisent alors au niveau des tissus et au niveau du système vasculaire. Ces différents changements caractérisent la réponse inflammatoire aiguë.

1.1.1 Caractéristiques de la réponse inflammatoire aiguë

Un des premiers changements à être entamé est l'activation des cellules endothéliales. L'activation de ces cellules induit, entre autres, l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion qui permettra l'adhésion des leucocytes. On parle notamment des E-sélectines, P-sélectines ou de ICAM-1. L'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion est accompagnée de la production de cytokines et chimiokines inflammatoires qui sont destinées principalement à la chimiotaxie des neutrophiles. On rapporte également une activation des cellules endothéliales et des macrophages tissulaires ainsi qu'une adhésion et un recrutement des leucocytes. Les cellules endothéliales subissent également des réarrangements importants au niveau de leur structure en permettant l'ouverture des jonctions serrées. Cette ouverture permet la sortie des fluides et des protéines des compartiments extravasculaires adjacents. Ce phénomène, que l'on appelle œdème, est une des caractéristiques principales du processus inflammatoire aigu. Dans certains cas extrêmes, l'œdème peut parfois entraîner une perte de fonctions temporaires d'un organe. Par exemple, l'œdème peut être si important lors de certaines pneumonies bactériennes qu'il compromet sérieusement l'échange d'air au niveau des alvéoles entraînant un état d'hypoxie grave dans l'organisme. Plusieurs agents sont responsables de l'ouverture des jonctions serrées. On parle notamment de l'histamine, des bradykinines et de certains constituants du complément comme le C3a et le C5a qui agissent comme activateurs des mastocytes (Serhan *et al.*, 2010b).

L'hémorragie, que l'on définit comme la présence de globules rouges au niveau des compartiments extravasculaires, est un autre événement caractéristique de la réponse inflammatoire aiguë. La présence d'une hémorragie implique nécessairement un dommage sévère à l'endothélium vasculaire puisque les globules rouges sont transportés de façon passive vers l'espace extravasculaire. Plusieurs facteurs, comme certains produits bactériens ou la présence de facteurs oxydants provenant des phagocytes sont également responsables de la perte de l'intégrité de l'endothélium, engendrant ainsi la fuite de globules rouges vers les tissus périphériques.

Le facteur activateur de plaquettes (PAF), un médiateur soluble sécrété par les mastocytes activés, est l'un des principaux facteurs sécrétés lors de ce processus et est responsable de l'activation et l'agrégation des plaquettes. L'activation des plaquettes est associée à la conversion de la pro-thrombine en thrombine. La thrombine, quant à elle, permet la conversion du fibrinogène en fibrine. Cette étape a pour conséquence d'induire l'agrégation des plaquettes en association avec les cellules endothéliales, ce qui provoque une réduction des fuites de protéines et de liquides plasmatiques.

Finalement, l'adhésion sur l'endothélium et le recrutement des neutrophiles est une caractéristique typique de l'inflammation aiguë. Normalement, les leucocytes circulent au centre des vaisseaux sanguins et n'interagissent que très peu avec l'endothélium. L'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion à la surface laminaire des cellules endothéliales permet une interaction plus étroite entre ces dernières et les neutrophiles. Le roulement des neutrophiles, défini par les interactions faibles et intermittentes entre les neutrophiles et les cellules endothéliales, sera décrit plus en détail dans le sous-chapitre sur le neutrophile. L'adhésion ferme des neutrophiles sur l'endothélium est l'étape suivante dans le recrutement des neutrophiles au niveau du tissu inflammé. Cette étape critique sera ensuite suivie de la diapédèse, soit le phénomène de passage des leucocytes de la circulation vers les tissus (Serhan *et al.*, 2010b).

1.1.2 Fonctions principales de l'inflammation aiguë

À la suite de la migration des neutrophiles au site inflammatoire, ces cellules sont activées directement par la reconnaissance de pathogènes ou indirectement par les médiateurs solubles. Les neutrophiles tentent alors d'éliminer les pathogènes par différents moyens comme

la libération d'enzymes protéolytiques et bactéricides ou encore par la production de réactifs oxygénés (ROS). Ces fonctions du neutrophile seront discutées plus en détail dans le prochain chapitre. Par conséquent, une réponse inflammatoire aiguë résulte généralement en l'élimination de l'agent infectieux puis en une phase de guérison et de réparation des tissus, une étape contrôlée principalement par les macrophages tissulaires (Serhan *et al.*, 2005). L'inflammation aiguë, constituée de trois phases, soit l'amorce, l'amplification et la résolution de l'inflammation, est un processus régulé par une variété de facteurs qui seront traités dans les prochaines sections.

1.2 L'inflammation chronique

Le type d'inflammation se définit selon la nature des cellules inflammatoires présentes dans le tissu inflammé. Contrairement à ce que l'on pourrait croire, l'inflammation chronique n'est pas exclusivement le reflet de la durée de l'inflammation, mais plutôt de la présence de cellules mononuclées comme les macrophages et les lymphocytes. Il arrive parfois que l'hôte ne soit pas en mesure d'éliminer le pathogène.

La réponse inflammatoire aiguë persiste alors et acquiert de nouvelles caractéristiques. Ainsi, une inflammation aiguë prolongée mène généralement au développement de l'inflammation chronique, caractérisée par le recrutement de cellules mononuclées comme les macrophages et les lymphocytes. (Medzhitov, 2008).

La persistance d'un pathogène est une cause importante de l'inflammation chronique, bien qu'elle ne soit pas la seule et unique cause. Il arrive parfois que l'inflammation chronique persiste durant plusieurs semaines, mois ou voire même années sans qu'il y ait présence d'antigènes étrangers. Dans ce contexte, les causes exactes de l'inflammation chronique sont plutôt obscures. Quoi qu'il en soit, on sait que ce type d'inflammation est inévitablement déclenché par une réponse vasculaire, comme la présence de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Cette réponse vasculaire induit l'adhésion de lymphocytes et de monocytes. Tout comme dans l'inflammation aiguë, les leucocytes, adhérant à la paroi endothéliale, sont activés par divers facteurs engendrant leur migration vers les tissus. La présence de molécules d'adhésion spécifiques à certains leucocytes détermine les types cellulaires qui migreront vers les compartiments extravasculaires. De plus, l'activation des fibroblastes est un facteur déterminant dans la progression et la persistance de l'inflammation

chronique puisque ce type cellulaire est responsable de la production de liaisons entre les fibres de collagène et les lésions collagèneuses. Dans l'arthrite et autres maladies auto-immunes, les plasmocytes sont responsables de la production d'anticorps résultant en une accumulation de complexes immuns au niveau des liquides synoviaux. L'inflammation chronique est souvent le résultat de la stimulation constante des cellules immunitaires innées et acquises contre des antigènes du soi. C'est le cas notamment de l'arthrite rhumatoïde. Cet état inflammatoire chronique provoque également la formation de granulomes et de tissus lymphoïdes tertiaires (Drayton *et al.*, 2006).

Comme il a été mentionné précédemment, l'inflammation aiguë progresse parfois vers l'inflammation chronique. Par contre, les signes cliniques de l'inflammation aiguë, comme l'accumulation de neutrophiles, peuvent se manifester dans les cas d'inflammation chronique. En effet, les inflammations aiguë et chronique coexistent pendant de longues périodes impliquant un recommencement continu de recrutement et d'activation des neutrophiles. On retrouve des épisodes inflammatoires aigus dans les maladies inflammatoires chroniques comme l'arthrite rhumatoïde, l'asthme, les maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC), la sclérose en plaques, la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse ainsi que certains types de cancers. Dans l'arthrite rhumatoïde, on observe une infiltration massive de macrophages et de lymphocytes ainsi qu'une activation de synoviocytes. Par contre, une énorme quantité de neutrophiles s'accumule également au niveau de ces tissus. En effet, plus d'un milliard de neutrophiles envahissent les articulations de patients arthritiques avec une demi-vie extrêmement réduite, soit d'environ quatre heures (Hollingsworth *et al.*, 1967). La persistance et l'accumulation de cellules immunitaires provoquent une production constante d'auto-anticorps ainsi que la formation de complexes immuns. La présence de neutrophiles dans ce contexte d'inflammation chronique permet sans doute l'activation des neutrophiles via la reconnaissance des anticorps, générant ainsi une quantité importante de ROS et d'enzymes protéolytiques, ce qui est dommageable pour le tissu (Han *et al.*, 2005). En effet, les protéines et les réactifs oxygénés antimicrobiens ne font pas de discrimination entre les pathogènes et les cellules de l'hôte provoquant inévitablement des dommages importants (Nathan, 2002).

1.3 La régulation de l'inflammation

La réponse inflammatoire aiguë se veut d'abord une réponse rapide contre les envahisseurs. Le but de ce processus étant évidemment le retour à l'homéostasie. Dans certains cas, la persistance du pathogène peut engendrer une réponse inflammatoire aiguë excessive et persistante qui mènera ultimement à d'importants dommages cellulaires et tissulaires. Ce potentiel destructeur de notre propre système immunitaire fait ressortir l'importance d'une régulation adéquate du processus inflammatoire. La réponse inflammatoire aiguë est donc sujette à une régulation serrée, permettant de contenir les cascades inflammatoires, avant qu'elle ne mène à des dommages trop importants. Les prochaines lignes dressent un portrait des différents agents inducteurs et régulateurs des processus inflammatoires aigus et chroniques.

1.3.1 Les inducteurs de l'inflammation

On retrouve deux types d'agents inducteurs de l'inflammation: les agents exogènes et les agents endogènes. Chez les agents exogènes, on retrouve les agents microbiens et les agents non microbiens. Les agents microbiens comprennent, entre autres, les *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP), qui sont des motifs moléculaires conservés au cours de l'évolution chez les différents micro-organismes (Medzhitov *et al.*, 1997), ainsi que les facteurs de virulence. Contrairement aux PAMP qui sont reconnus par des récepteurs spécifiques comme les TLR, les RLR ou les NLR, les facteurs de virulence induisent l'inflammation par le biais de leur activité biologique sur l'hôte. Par exemple, les toxines de certaines souches bactériennes Gram + induisent la formation de pores dans la cellule. Les pores engendrent la libération d'ions K⁺. Or, le récepteur NLRP-3 détecte les efflux de potassium, ce qui déclenche la libération de cytokines inflammatoires (IL-1 β et IL-18) par le biais de l'inflammasome, qui sera décrit dans le chapitre trois (Mariathasan *et al.*, 2006).

Les agents exogènes non microbiens comprennent les allergènes, les corps étrangers et les composés toxiques. Les allergènes sont souvent similaires en plusieurs points aux motifs moléculaires des pathogènes. Les cellules immunitaires reconnaissent donc ces produits comme des agents étrangers à détruire. Quant aux corps étrangers, ils sont généralement de grosses particules indigestes dommageables pour les phagocytes. La grosseur des particules

provoque un type particulier de phagocytose, soit la phagocytose frustrée qui implique la formation de la coupe phagocytaire sans toutefois la formation d'un phagosome. Ceci a pour effet d'activer vigoureusement les phagocytes impliqués. Les dommages cellulaires de ces corps étrangers peuvent également être détectés par l'inflammasome NLRP-3 (Dostert *et al.*, 2008).

D'autres facteurs de virulences provoquent des dommages cellulaires importants, induisant la libération de produits endogènes qui peuvent être perçus par les cellules environnantes. Les agents endogènes sont libérés en réponse à un stress ou à des dommages cellulaires. Par exemple, lors de la mort cellulaire par nécrose, il y a perte de l'intégrité des membranes cellulaires. La perte d'intégrité membranaire provoque la libération de différents inducteurs d'inflammation comme les *Damage-Associated Molecular Pattern* (DAMP). Cette famille de molécules comprend l'ATP (Adenosine-Triphosphate), HMGB-1 (J. S. Park *et al.*, 2006) et les protéines S100A8, S100A9 et S100A12 (M. E. Bianchi, 2007). Des dommages à l'endothélium vasculaire entraînent également la migration passive de protéines plasmatiques avec un potentiel inflammatoire. C'est le cas notamment du facteur Hageman, aussi connu sous le nom de facteur XII. En effet, ce facteur s'active en présence des protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène, provoquant ainsi une cascade inflammatoire (Medzhitov, 2008).

On retrouve plusieurs agents endogènes jouant des rôles importants dans le développement de l'inflammation chronique. On rapporte les cristaux d'urate qui sont associés au développement de la goutte (Rock *et al.*, 2008) et les AGE (*Advanced Glycation End-product*) qui sont reconnus par leur récepteur RAGE auxquels on associe le développement de certains types de diabète (Yan *et al.*, 2007).

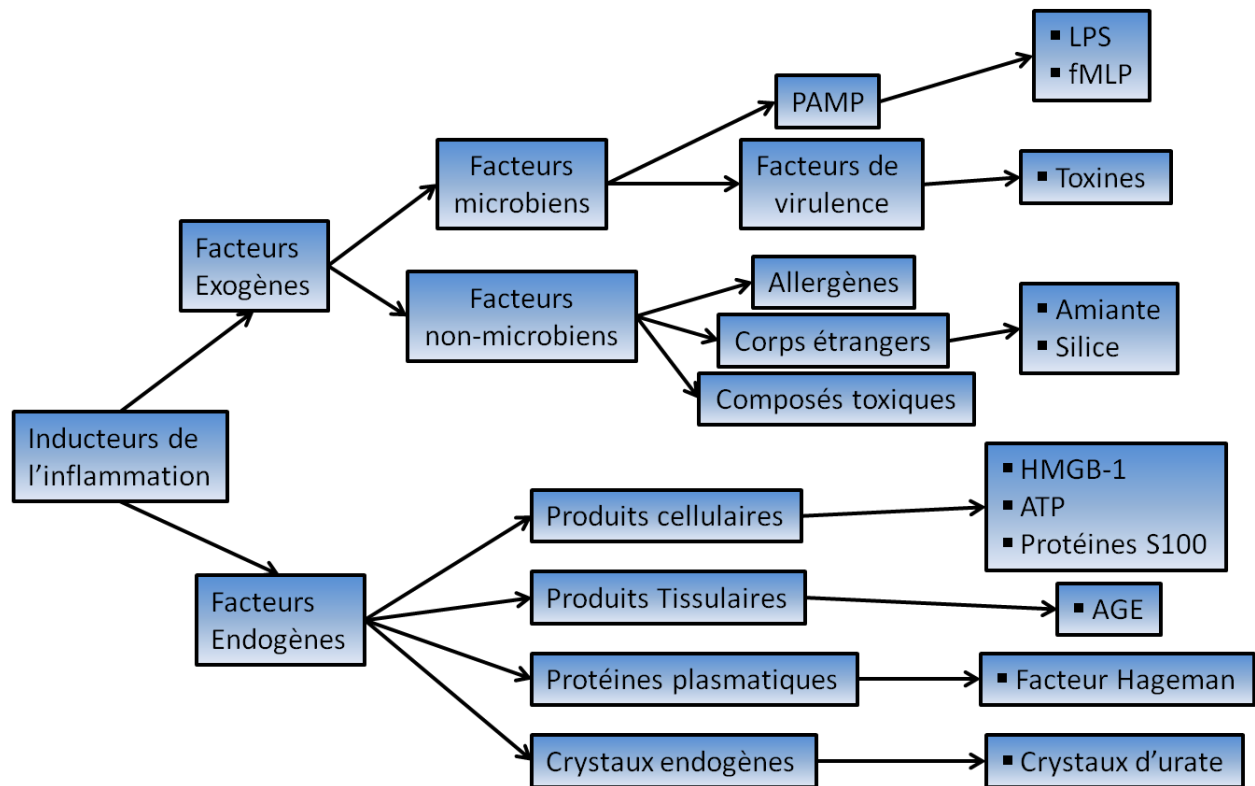


Figure 1: Principaux inducteurs de l'inflammation. Les inducteurs de l'inflammation sont classés en deux catégories: les facteurs exogènes et les facteurs endogènes. Les facteurs exogènes comprennent les facteurs microbiens et non microbiens alors que les facteurs endogènes comprennent les produits cellulaires et tissulaires, les protéines plasmatiques et les cristaux endogènes.

Inspirée de (Medzhitov, 2008)

1.3.2 La régulation de l'inflammation

La libération de médiateurs solubles permet de réguler l'inflammation, et ce, à tous les niveaux du processus inflammatoire. La littérature fait état de différents groupes de médiateurs de l'inflammation qui sont basés sur les propriétés biochimiques de chacun (Medzhitov, 2008).

Dans un premier temps, on retrouve les différentes cytokines pro- et anti-inflammatoires incluant l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α ainsi que l'IL-10 et le TGF- β respectivement. Ces cytokines sont libérées par plusieurs types cellulaires et ont une multitude de rôles dans l'induction ou la résolution de l'inflammation. Les chimiokines ont évidemment un rôle de premier plan à jouer dans la régulation de l'inflammation, à savoir le recrutement de leucocytes au site inflammatoire

(Serhan *et al.*, 2010b). Ces médiateurs sont en fait la cible de plusieurs traitements présentement sur le marché. On n'a qu'à penser aux inhibiteurs ciblant le TNF- α (Enbrel ou Humira) ou l'IL-1 β (Anakinra) pour le traitement de maladies inflammatoires. Ceci témoigne, par le fait même, de l'importance de ces molécules dans la régulation de l'inflammation.

Dans un deuxième temps, on retrouve les médiateurs lipidiques comme les prostaglandines qui dérivent de l'activation des cyclo-oxygénases (COX). Ces molécules ont un rôle très important à jouer dans la régulation de l'inflammation. Par exemple, la Prostaglandine-E2 (PGE2) provoque la vasodilatation ainsi que l'induction de la fièvre. De plus, des inhibiteurs de COX associés avec des drogues non stéroïdiennes comme l'aspirine ou l'ibuprofène ont longtemps été utilisés comme traitements cliniques de l'inflammation (Higgs *et al.*, 1987, Vane, 1971, Vane, 1987). Par contre, on sait maintenant que les dérivés métaboliques de l'acide arachidonique possèdent également des propriétés anti-inflammatoires (Gilroy, 2010, Gilroy *et al.*, 2004, Rajakariar *et al.*, 2006, Stables *et al.*, 2011), suggérant des rôles pro- et anti-inflammatoires associés à ces dérivés. Certains métabolites des eicosanoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires en favorisant le remplacement des neutrophiles par les macrophages entraînant ainsi l'élimination de cellules apoptotiques. En effet, l'activation des COX et des lipoxigénases (LOX) engendre la synthèse de médiateurs lipidiques ayant d'importantes propriétés anti-inflammatoires. C'est le cas notamment des résolvines (Serhan *et al.*, 2008a, Serhan *et al.*, 2008b, Serhan *et al.*, 2008c). L'activation des LOX provoque également la synthèse de lipoxines (LX) qui affectent grandement la réponse inflammatoire. Les LX bloquent la chimiotaxie, l'adhésion et la transmigration des neutrophiles. En marge de leurs effets anti-inflammatoires sur le neutrophile, les LX stimulent le recrutement des monocytes via la chimiotaxie et l'adhésion. Les LX favorisent ainsi la résolution de l'inflammation en permettant une meilleure phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les monocytes/macrophages et préparant ainsi le retour de l'homéostasie tissulaire. Plusieurs études sur le rôle des LX ont révélé que ces molécules étaient cruciales dans la résolution de l'inflammation aiguë. En inhibant la synthèse de LX4A, par exemple, on prolonge la clairance d'un œdème, dans un modèle d'œdème allergique chez le rat. Ces médiateurs lipidiques, essentiels pour la résolution de l'inflammation, représentent donc une avenue intéressante dans le développement de molécules anti-inflammatoires pour le traitement de l'inflammation chronique (tel que démontré dans plusieurs revues de Serhan (Serhan, 2007, Serhan, 2010, Serhan *et al.*, 2008a, Serhan *et al.*, 2008b, Serhan *et al.*, 2010b)).

D'autres molécules comme les amines et les peptides vasoactifs possèdent des fonctions inflammatoires importantes. Les amines vasoactives, qui incluent l'histamine et la sérotonine, sont plutôt connues pour leurs effets pro-inflammatoires. Ces molécules, produites par les mastocytes et les plaquettes, causent l'augmentation de la perméabilité membranaire, favorisant l'afflux de leucocytes. Les peptides vasoactifs, comme la thrombine ou la plasmine, sont générés lors de leur protéolyse par le facteur Hageman. Tout comme les amines vasoactives, ces peptides provoquent la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Le facteur Hageman induit également l'activation de la cascade inflammatoire Kallikrein-Kinin qui mène à la formation de bradykinine, un puissant facteur analgésique.

Certaines composantes de la cascade du complément sont aussi considérées comme des médiateurs avec d'importantes fonctions inflammatoires. En effet, les fragments C3a, C4a et C5a favorisent le recrutement de neutrophiles et de monocytes en plus d'induire la dégranulation des mastocytes (Q. Peng *et al.*, 2009). La dégranulation des mastocytes et des neutrophiles entraîne également la libération de plusieurs enzymes protéolytiques, incluant l'élastine, les cathepsines et les métalloprotéinases (MMP). Ces enzymes dégradent la matrice extracellulaire des cellules endothéliales affectant ainsi la migration des leucocytes (Sternlicht *et al.*, 2001).

Enfin, les glucocorticoïdes sont, encore à ce jour, l'un des agents endogènes anti-inflammatoires les plus efficaces. Ce type de molécules est utilisé depuis plus de 50 ans dans le traitement de crise aiguë de plusieurs maladies inflammatoires chroniques comme l'arthrite, la maladie de Crohn ainsi que chez les patients asthmatiques (Hench *et al.*, 1949). Les mécanismes d'action de cette famille de molécules sont généralement bien connus. En effet, les glucocorticoïdes s'associent avec leurs récepteurs cytoplasmiques, enclenchant ainsi leur translocation au niveau du noyau. Cette translocation réprime la transcription de gènes pro-inflammatoires. De plus, d'autres propriétés anti-inflammatoires des glucocorticoïdes sont décrites dans la littérature (Flower, 1988). On parle notamment de l'induction de la sécrétion d'annexine-1, connue pour son effet au niveau de l'inhibition des prostaglandines (Perretti *et al.*, 2009).

Tableau 1: Principales classes de médiateurs inflammatoires

Types de médiateurs inflammatoires	Exemples de médiateurs inflammatoires
Amines vasoactives	Histamine, Sérotonine
Peptides vasoactifs	Thrombine, Plasmine
Facteurs du complément	C3a, C4a, C5a
Médiateurs lipidiques	LX, PAF, PGE ₂
Cytokines inflammatoires	IL-1 β , IL-6, TNF- α
Cytokines anti-inflammatoires	IL-10, TGF- β
Enzymes protéolytiques	MMP-9, Elastase
Glucocorticoïdes	Cortisol
Hormones	Adrénaline, Noradrénaline

Modifié de (Serhan *et al.*, 2010b)

1.3.3 La résolution de l'inflammation

La résolution de l'inflammation est un processus complexe qui fait intervenir des centaines de facteurs. Ainsi, définir et comprendre cette étape du processus inflammatoire n'est pas une tâche simple. On divise généralement l'étape de résolution de l'inflammation en deux étapes, soit la phase anti-inflammatoire et la phase pro-résolution (Kolaczowska *et al.*, 2013, Serhan, 2007). La phase anti-inflammatoire passe par la libération de médiateurs anti-inflammatoires comme le TGF- β et l'IL-10 ainsi que par la régulation à la baisse des gènes pro-inflammatoires régulés par NF- κ B. Cette phase est également caractérisée par la sécrétion d'antagoniste de récepteurs de cytokines comme l'IL-1R α , diminuant ainsi les effets inflammatoires de cette dernière. La phase pro-résolution, quant à elle, est caractérisée par la présence de médiateurs solubles pro-résolution, comme LXA4, les résolvines et les protectines (Serhan, 2010, Serhan *et al.*, 2008c), qui font leur apparition beaucoup plus tard dans le processus inflammatoire.

Il est important de mentionner que la résolution de l'inflammation, qui est la dernière phase du processus inflammatoire, passe évidemment par l'élimination de l'agent causal. Dans le cas d'une infection bactérienne ou virale, la réponse paraît assez simple. Par contre, dans le cas d'une maladie inflammatoire chronique comme l'arthrite rhumatoïde dans laquelle on ne connaît pas réellement l'étiologie du problème, l'élimination de l'agent causal s'avère une tâche beaucoup plus complexe. Dans le cas d'une infection bactérienne ou virale, l'élimination de l'agent à l'origine de la réponse inflammatoire engendre la cessation de la production de médiateurs pro-inflammatoires. L'absence de ces médiateurs aura pour effet d'arrêter le recrutement massif de leucocytes et la formation d'œdème. Les différentes cellules

immunitaires ayant participé aux processus inflammatoires sont ensuite éliminées par les macrophages et cellules résidentes des tissus. Le retour à l'équilibre, qui régnait avant le début du processus inflammatoire, nécessite donc évidemment l'élimination des cellules immunitaires qui se sont accumulées au site inflammatoire. Une quantité très importante de neutrophiles s'accumule dans les premières heures de l'inflammation aiguë. Par contre, une fois l'agent pathogène éliminé, les neutrophiles n'ont plus de raison d'être. Les quantités considérables de ces granulocytes reflètent nécessairement l'importance de posséder des moyens d'éliminer ces cellules, et ce, de manière incroyablement efficace. La mort par apoptose des neutrophiles, qui sera traitée plus en détail dans une section à venir, permet de limiter des dommages cellulaires et tissulaires importants (Savill *et al.*, 2002, Savill *et al.*, 2000, Savill *et al.*, 2003, Serhan *et al.*, 2005). En effet, l'absence de libération de produits toxiques ou pro-inflammatoires par nécrose aide énormément à la résolution de l'inflammation. De plus, la présence de molécules à la surface des cellules apoptotiques permet une reconnaissance efficace par les macrophages. Cette reconnaissance de cellules apoptotiques engendre une sécrétion de cytokines anti-inflammatoires: les plus connues étant l'IL-10 et le TGF- β .

La dernière décennie de recherche a sans doute permis une meilleure compréhension des mécanismes complexes d'élimination de cellules apoptotiques. La compréhension de cette étape critique représente sans doute une clé dans le développement de traitements de maladies inflammatoires. L'élévation des niveaux d'AMPc par diverses prostaglandines permet entre autres, de réguler à la baisse la capacité des macrophages d'ingérer des cellules apoptotiques. À l'inverse, le traitement des phagocytes par des glucocorticoïdes, des LX et même certaines cytokines permet d'augmenter l'élimination de cellules apoptotiques (Dalli *et al.*, 2012, Schwab *et al.*, 2007). L'interaction des macrophages avec certaines composantes de la matrice extracellulaire, comme la fibronectine ou même encore l'activation du CD44, permet également d'augmenter l'élimination de neutrophiles apoptotiques *in vivo* (Hart *et al.*, 2012).

Une des caractéristiques principales de la résolution de l'inflammation est le remplacement des granulocytes par les monocytes et les macrophages qui participent à l'élimination de ces mêmes neutrophiles apoptotiques. La transition entre la présence accrue en neutrophile et la présence des macrophages phagocytaires dépend de plusieurs facteurs. Par exemple, les neutrophiles, qui infiltrent les tissus, sécrètent l'IL-6R qui s'associe avec son agoniste, l'IL-6, modulant ainsi les effets pro-inflammatoires de cette dernière (Hurst *et al.*, 2001). Le phénotype des macrophages présents au site inflammatoire est également crucial dans la résolution de l'inflammation. Les macrophages sont généralement classés comme étant soit activés de façon

classique (M1) ou de façon alternative (M2). Cependant, les macrophages favorisant la résolution de l'inflammation ne peuvent être classés dans aucune de ces deux catégories. Ces macrophages présentent un phénotype hybride puisqu'ils possèdent des niveaux élevés de récepteurs aux mannoses et qu'ils synthétisent des quantités importantes d'IL-10. Par contre, ils possèdent également des propriétés de macrophages M1, comme la COX et l'oxyde nitrique (iNOS). Le **Tableau 2** présente les principales caractéristiques des macrophages favorisant la résolution (rM) comparativement aux macrophages impliqués dans l'élimination de pathogènes (M1).

Tableau 2: Phénotypes des macrophages rM, M1 et M2

Caractéristiques	Macrophage favorisant la résolution (rM)	Macrophage pro-inflammatoire (M1)	Macrophage activé alternativement (M2)
Libération de cytokines pro-inflammatoires	0	+++	+
Libération de cytokines anti-inflammatoires	+++	0	+++
Bactéricide	+	+++	+
Capacité phagocytaire	++	+++	++
Expression des récepteurs aux mannoses	+++	+	+++
Libération de HMGB-1	0	+++	0
Production de iNOS	+++	+++	+++
Expression de COX-2	+++	+	+++
Niveaux d'AMP-c	+++	+	+++

Inspiré de (Serhan *et al.*, 2010a) et (Mosser *et al.*, 2008)

1.3.4 La persistance de l'inflammation

Plusieurs facteurs ont été mentionnés précédemment comme étant déterminants dans la régulation du processus inflammatoire. En ce sens, la défaillance dans l'un ou l'autre de ces facteurs contribue donc activement à la persistance de l'inflammation (**Figure 2**). C'est le cas des macrophages, qui favorisent la résolution de l'inflammation aiguë par la phagocytose de cellules apoptotiques et par la sécrétion de TGF- β et d'IL-10. L'inflammation aiguë persiste donc si les cellules apoptotiques ne sont pas éliminées correctement. Or, une déficience dans l'un ou

l'autre des facteurs impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques, comme la *Milk fat globule-EGF factor 8 protein* (MFG-E8) (Hanayama *et al.*, 2002) ou la *T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4* (TIM-4) (Miyanishi *et al.*, 2007), prolonge la durée de l'inflammation. Outre les macrophages, les *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) participent également à la résolution de l'inflammation en inhibant la réponse des lymphocytes T cytotoxiques (D. I. Gabrilovich *et al.*, 2009). En admettant que les cellules T CD8+ produisent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires, la suppression de ces cellules par les MDSC favoriserait la résolution de l'inflammation. En plus des cellules T cytotoxiques, les cellules T régulatrices (Treg) suppriment également plusieurs facteurs pro-inflammatoires. Une déficience en Treg contribue donc à la persistance de l'inflammation (Garrett *et al.*, 2007, E. H. Lo, 2009).

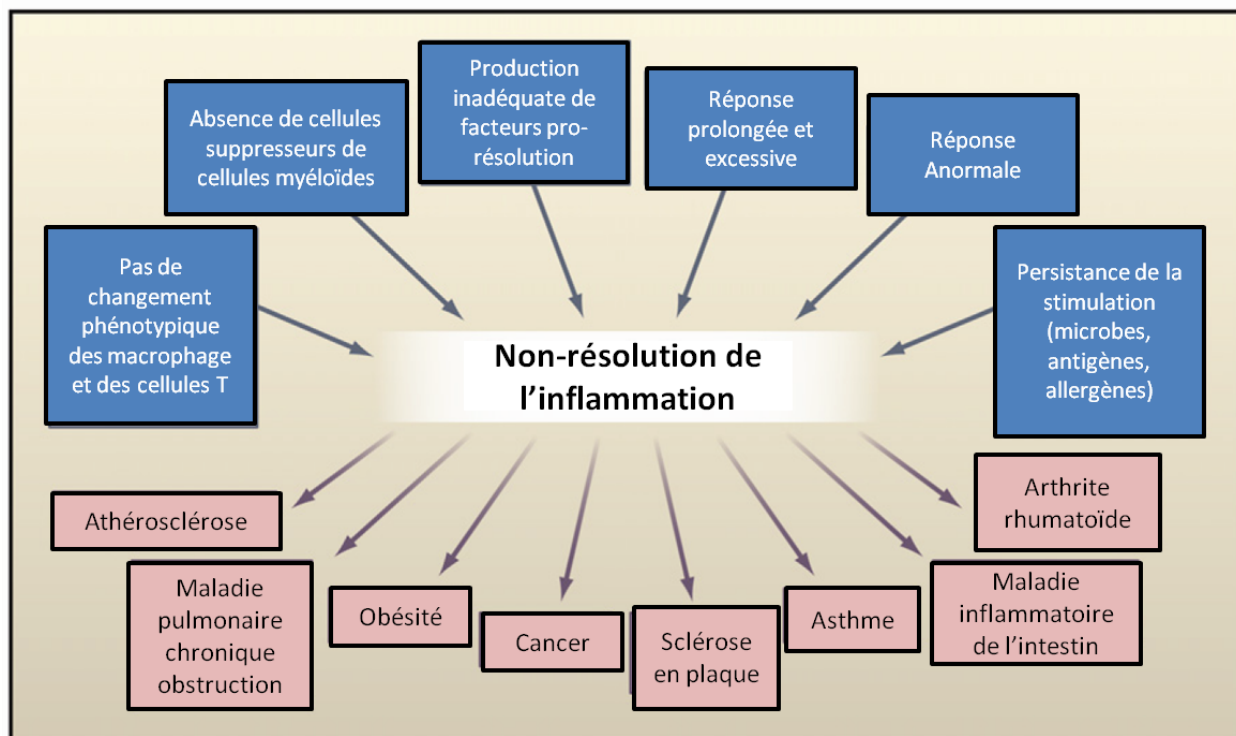


Figure 2: Mécanismes et conséquences de la non-résolution de l'inflammation. Plusieurs facteurs peuvent engendrer l'absence de résolution ou la persistance de l'inflammation. L'absence de macrophages favorisant la résolution ou des cellules suppressives de cellules myéloïdes peuvent être une cause importante dans le processus de résolution de l'inflammation. La production inadéquate de facteurs favorisant la résolution comme des médiateurs anti-inflammatoires affecte également la durée du processus inflammatoire et engendre parfois une réponse prolongée, excessive et anormale. Enfin, la persistance d'un stimulus inflammatoire tel qu'un pathogène entraîne également une absence de résolution de l'inflammation. Tous ces facteurs auraient un rôle important dans le développement de plusieurs pathologies.

Modifiée de (Nathan *et al.*, 2010)

L'incapacité à éliminer l'agent causal est l'une des causes menant vraisemblablement à la persistance de l'inflammation aiguë et même à l'inflammation de type chronique. Les infections bactériennes ou virales persistantes sont des exemples classiques de persistance de l'inflammation où l'inflammation chronique qui entoure la présence de mycobactéries peut persister pour des décennies. La persistance ou la non-résolution de l'inflammation est un facteur de risque non négligeable puisque cette dernière provoque des dommages cellulaires et tissulaires importants. En effet, la persistance de l'inflammation n'est pas la cause principale de diverses maladies comme l'athérosclérose, l'obésité, les cancers, l'asthme, les maladies inflammatoires de l'intestin, la sclérose en plaques ou l'arthrite rhumatoïde, mais elle contribue grandement à leur pathogenèse (Nathan *et al.*, 2010).

Les cytokines anti-inflammatoires jouent un rôle de premier plan dans la résolution de l'inflammation. Une production inadéquate dans l'une ou l'autre de ces cytokines entraîne indubitablement un effet important sur la durée du processus inflammatoire. On retrouve chez certains patients atteints de maladie de Crohn, une mutation au niveau de la protéine NOD2, qui illustre l'importance clinique d'une production d'IL-10 inadéquate. La mutation sur la protéine NOD2 bloque la phosphorylation par p38 d'une ribonucléoprotéine nécessaire à la transcription du gène de l'IL-10. Ces patients expriment donc des niveaux d'IL-10 significativement plus bas, contribuant ainsi à la persistance de l'inflammation (Noguchi *et al.*, 2009). La résolution de colite-induite chez la souris requiert également la présence d'IL-13, laquelle régule la production d'IL-10 et de TGF- β (Fichtner-Feigl *et al.*, 2008). Outre les cytokines, d'autres facteurs comme les inhibiteurs de protéases SLPI (Jin *et al.*, 1997), suppriment, entre autres, l'activation des neutrophiles par le TNF- α . Les fonctions inflammatoires des neutrophiles et des macrophages sont également régulées par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (NOS) qui antagonisent l'adhésion des phagocytes sur l'endothélium et inhibent la caspase-1, en plus de supprimer l'expansion clonale des cellules T CD8 (Bogdan, 2001a, Bogdan, 2001b).

CHAPITRE 2: Le neutrophile

Les neutrophiles polymorphonucléaires sont des cellules différenciées facilement reconnaissables par leur noyau multilobé et la présence de multiples granules dans leur cytoplasme. Tout comme les basophiles et les éosinophiles, les neutrophiles font partie de la famille des granulocytes. Ces trois types cellulaires constituent des cellules effectrices clés dans l'immunité innée. Les basophiles et les éosinophiles ne seront pas abordés plus en détail dans ce travail alors que le neutrophile sera le sujet principal du présent chapitre.

Le neutrophile constitue la première ligne de défense cellulaire de l'organisme contre les pathogènes. Ces cellules répondent rapidement aux différents stimuli inflammatoires et sont recrutées rapidement dans les tissus périphériques où ils migrent et détruisent les micro-organismes par divers mécanismes intra et extracellulaires: soit la phagocytose, la dégranulation, la production de ROS et la formation de trappes extracellulaires (NET) (**Figure 3**). Ces mécanismes de défense seront tous élaborés plus en détail dans les prochaines sections.

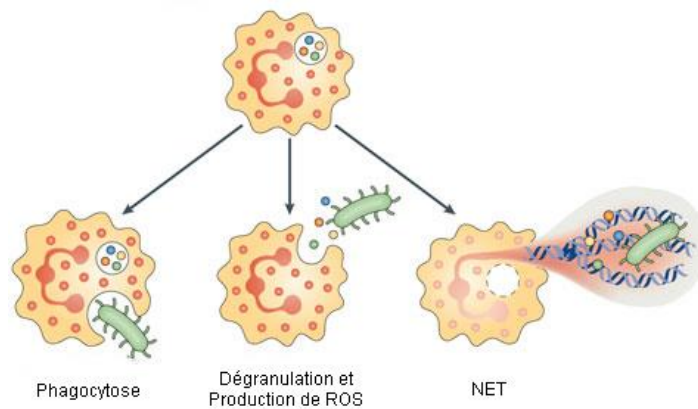


Figure 3: Mécanismes utilisés par le neutrophile pour éliminer les pathogènes. Les neutrophiles sont des cellules clés de l'immunité innée. Ils participent à la destruction des pathogènes via l'internalisation de particules (phagocytose), par la libération de peptides antimicrobiens (dégranulation), par la production de ROS ainsi que par la formation de trappes extracellulaires (NET).

Modifiée de (Kolaczowska *et al.*, 2013)

Les dernières années de recherche ont permis un progrès considérable dans la compréhension de la physiologie de cette cellule. Le présent chapitre fait état des connaissances du neutrophile

en mettant en évidence ses principales fonctions immunitaires ainsi que son rôle dans l'inflammation aiguë et chronique.

2.2 L'adhésion, l'activation et la migration

La migration des neutrophiles à travers la barrière endothéliale ou diapédèse est une caractéristique principale de l'inflammation aiguë. La diapédèse est d'abord caractérisée par l'adhésion des neutrophiles sur l'endothélium vasculaire. Cette dernière a été observée, pour la première fois, il y a presque 350 ans. Dès lors, Antoni Van Leeuwenhoek observait un attachement de cellules aux pourtours des veinules (Schierbeek, 1962). À l'époque, il n'avait évidemment aucune idée des mécanismes impliqués dans ce processus. Le roulement des neutrophiles sur l'endothélium activé est contrôlé par les protéines de la famille des sélectines (Bullard *et al.*, 1996, Dore *et al.*, 1993, E. J. Kunkel *et al.*, 1996, Labow *et al.*, 1994, Ley *et al.*, 1995, Mayadas *et al.*, 1993). On observe une augmentation du nombre de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales activées, qui résulte de l'effet de plusieurs molécules inflammatoires comme l'histamine, les leucotriènes et des cytokines (Ley *et al.*, 2007, Phillipson *et al.*, 2011). Les cellules endothéliales peuvent également être directement activées par la reconnaissance de PAMP via leur PRR. Celles-ci peuvent alors réguler à la hausse, et ce en quelques minutes, l'expression des sélectines P, préentreposées dans des structures appelées corps de Weibel-Palade. Les sélectines E, qui sont synthétisées *de novo*, sont régulées à la hausse en seulement 90 minutes (Petri *et al.*, 2008). Ces deux sélectines permettent de maximiser le roulement des neutrophiles sur l'endothélium. Les veinules post-capillaires sont les sites où l'on observe le plus l'adhésion de neutrophiles. Il est intéressant de noter qu'à ce niveau, les neutrophiles interagissent entre 150 et 1600 fois par seconde avec l'endothélium (Sundd *et al.*, 2012, Sundd *et al.*, 2011). Une fois exprimées à la surface des cellules endothéliales, les sélectines s'associent avec leur ligand *P-selectin glycoprotein ligand 1* (PSGL1) (Zarbock *et al.*, 2011). L'interaction avec ce ligand permet les phénomènes de roulement et de «*tethering*» des neutrophiles. D'autres molécules d'adhésion sont également impliquées dans l'adhésion et la migration des neutrophiles (**Tableau 4**).

Tableau 3: Molécules impliquées dans les différentes étapes de la diapédèse des neutrophiles

Étapes de migration des neutrophiles	Molécules de l'endothélium	Molécules des neutrophiles
Tethering et Roulement	Sélectine P	PSGL1 (régulation positive du recrutement) PTX3 (régulation négative du recrutement)
	Sélectine E	PSGL1, ESL1, CD44
	PSGL1, GlyCAM	L-sélectine
	ICAM1	LFA1
Roulement lent	E-sélectine	PSGL1, ESL1, CD44
Arrêt et Adhésion ferme	ICAM1	LFA1, CD11b/CD18
	VCAM1	VLA4
	Hyaluronane	CD44
	ICAM2	?
Rampement	ICAM1	CD11b/CD18
Transmigration	ICAM1, ICAM2	LFA1, CD11b/CD18
	VCAM1	VLA4
	CD99	CD99
	PECAM1	PECAM1
	JAM-A	LFA1
	JAM-B	VLA4
	JAM-C	CD11b/CD18
	CD99L2	?
	V-cadherine (régulation négative du recrutement), ESAM	?
	Hyaluronane	CD44

Modifié et inspiré de (Kolaczowska *et al.*, 2013)

Le roulement et la proximité des neutrophiles avec l'endothélium activé permettent l'activation du neutrophile par des cytokines inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1 β , ou encore par la présence de PAMP. De plus, les neutrophiles se voient attirés par la présence de chimioattractants comme l'IL-8. Tous ces facteurs sont nécessaires au recrutement des neutrophiles vers les tissus périphériques en contribuant, entre autres, au phénomène de

dégranulation (expliqué plus en détail dans un prochain sous-chapitre) des neutrophiles. De plus, l'activation des neutrophiles induit des changements de conformations des intégrines (signalisation «*inside-out*»), qui sont responsables de l'arrêt et de l'adhésion ferme sur l'endothélium (**Figure 3** et **Tableau 3**). La liaison des intégrines des neutrophiles avec leurs ligands provoque la transduction d'un signal à l'intérieur de la cellule permettant la stabilisation de l'adhésion et le début du phénomène de rampement (Ley *et al.*, 2007). Le rampement du neutrophile implique une élongation des pseudopodes des neutrophiles tout en restant fermement attaché à l'endothélium (Dewey *et al.*, 1981). Il permet également le mouvement des neutrophiles jusqu'aux jonctions serrées de l'endothélium, les sites préférentiels pour la diapédèse.

La diapédèse, qui est le passage de la circulation sanguine vers les tissus extravasculaires, se fait en deux étapes successives. La première est le passage de l'endothélium, une étape qui prend environ 2 à 5 minutes. La deuxième étape est le passage de la membrane basale qui prend entre 5 et 15 minutes (Ley *et al.*, 2007). Le passage à travers la couche de cellules endothéliales peut se faire par la voie paracellulaire (entre deux cellules endothéliales) ou par la voie transcellulaire (à travers une cellule endothéliale). La voie paracellulaire est celle qui est généralement favorisée par les neutrophiles puisque moins de protéines jonctionnelles s'y retrouvent. Cette voie requiert une quantité importante de molécules qui sont énumérées dans le tableau IV. La voie transcellulaire semble beaucoup moins efficace et requiert 20 à 30 minutes (Phillipson *et al.*, 2008). Durant le processus de transmigration, on observe un réarrangement du cytosquelette des neutrophiles et des cellules endothéliales. Ces dernières modifient leur attachement à la matrice extracellulaire par la formation de points d'attachement focaux, permettant de faciliter le passage des neutrophiles (Parsons *et al.*, 2012). La membrane endothéliale basale, qui est une structure continue composée de protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène et les laminines (Kolaczkowska *et al.*, 2013), est dégradée par les enzymes protéolytiques produites par la dégranulation des neutrophiles (Kolaczkowska *et al.*, 2009).

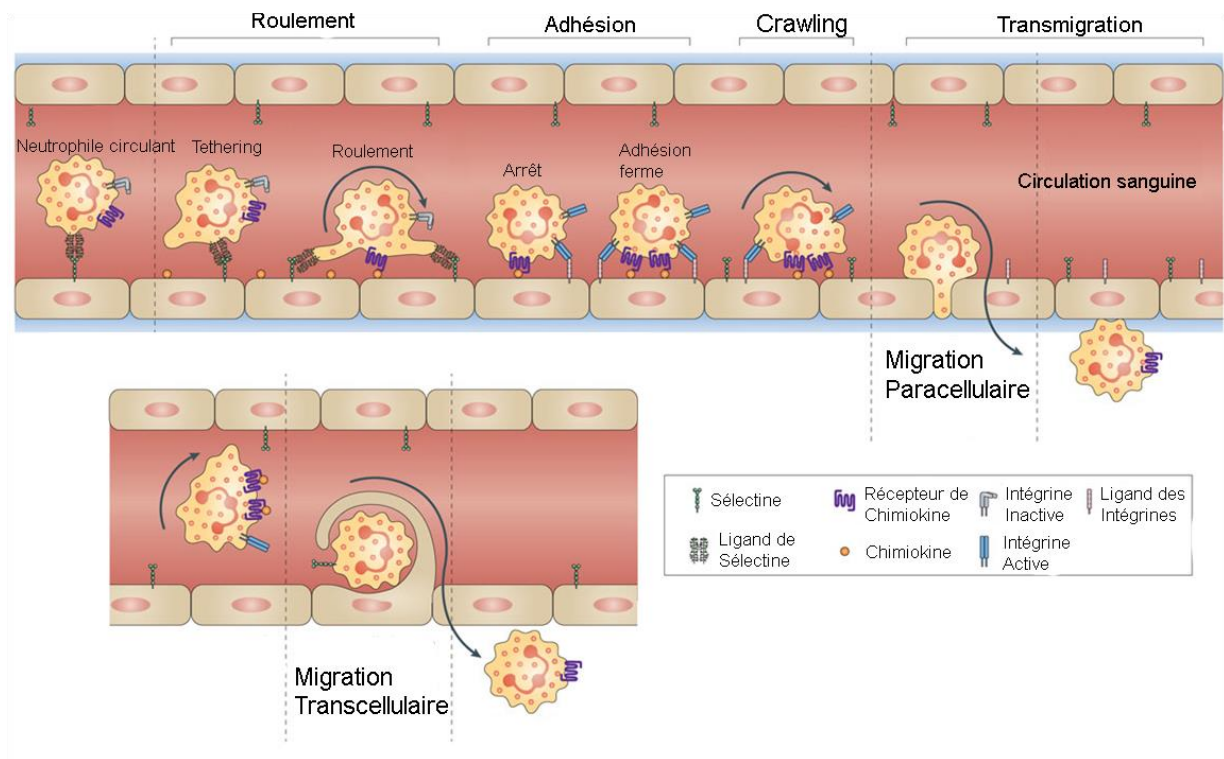


Figure 4: Étapes du processus de migration paracellulaire et transcellulaire des neutrophiles. L'activation des cellules endothéliales entraîne l'augmentation des niveaux d'expression des sélectines et des intégrines. Les neutrophiles interagissent avec les sélectines, entraînant le phénomène de roulement sur l'endothélium. Le roulement des neutrophiles permet des interactions plus étroites avec les cellules endothéliales. Les interactions entre les intégrines et leurs ligands entraînent l'adhésion ferme des neutrophiles sur l'endothélium. Les neutrophiles peuvent alors ramper sur l'endothélium jusqu'au niveau des jonctions serrées afin de traverser la barrière endothéliale.

Modifiée de (Kolaczowska *et al.*, 2013)

2.3 La dégranulation

La dégranulation est le processus permettant l'exocytose des granules du neutrophile. L'exocytose des granules se traduit par la fusion des granules du neutrophile avec la membrane plasmique libérant ainsi le contenu de ceux-ci dans le milieu extracellulaire. La fusion des granules peut également se faire avec les membranes du phagosome. Les neutrophiles possèdent trois types de granules et un type de vésicules possédant un arsenal de protéines spécifiques à chacun de ceux-ci (**Tableau 4**). Les granules sont généralement libérés en réponse à certains stimuli bien spécifiques. Plusieurs agonistes comme le formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) et le Phorbol Méristate Acétate (PMA), ou la liaison des intégrines

CD11b/CD18 ont montré la capacité d'induire une libération de tous les sous-types de granules du neutrophile (Laudanna *et al.*, 1994, Ng-Sikorski *et al.*, 1991).

Les premiers types de granules à être libérés sont les vésicules sécrétoires. Ces granules sont formés par l'endocytose de protéines plasmatiques lors des dernières étapes de différenciation des neutrophiles. Leur contenu est ainsi riche en protéines plasmatiques comme l'albumine. Ces vésicules contiennent aussi un réservoir de récepteurs cellulaires nécessaires aux différentes fonctions inflammatoires du neutrophile. La dégranulation des vésicules sécrétoires entraîne ainsi l'augmentation de l'expression de récepteurs comme le récepteur au complément CR1 ou les intégrines CD11b/CD18 qui sont importantes pour la migration et la phagocytose.

Les granules secondaires et tertiaires (spécifiques et gélatinases) sont une source d'enzymes protéolytiques comme les gélatinases MMP-9 et les collagénases MMP-8. Ces enzymes possèdent des rôles essentiels dans le processus de migration des neutrophiles. Par exemple, l'activation des neutrophiles par certains PAMP (fMLP), DAMP (S100A9) ou certaines cytokines (TNF- α), entraîne la libération des MMP dans le milieu extracellulaire permettant la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire (Simard *et al.*, 2010). Cette dégradation permet, par la suite, de faciliter la migration des autres leucocytes. Les MMP-8 et MMP-9 jouent également un rôle dans le remodelage des tissus qui ont lieu lors des processus de guérison des tissus.

Tableau 4: Constituants des granules du neutrophile

Granules azurophiliques (primaires)	Granules spécifiques (secondaires)	Granules gélatinases (tertiaires)	Vésicules sécrétoires
CD63	CD11b/CD18	CD11b/CD18	Phosphatase alcaline
CD68	CD15	CD66b	CD10
Preseniline	CD66b	Récepteur-fMLP	CD11b/CD18
Stomatine	CD67	Leukolysine (MMP-25)	CD13
Cathepsine-G	Récepteur-fMLP	Acétyltransférase	CD14
Défensine	Récepteur-Fibronectine	Gélatinase (MMP-9)	CD16
Elastase	Récepteur-Laminine	Lysozyme	CD45
Acide Mucopolysaccharide	Récepteur- Thrombospondine	SCAMP	DAF
Lysozyme	Leukolysine (MMP-25)	Collagénase (MMP-8)	CD35 ou CR1
MPO	Stomatine	Cytochrome b ₅₅₈	Récepteur-C1q
Protéinase-3	Récepteur-TNF	SNAP-23-25	Récepteur-fMLP
<i>Bacterial/permeability- increasing protein</i> (BPI)	Récepteur-vitronectine	β2-microglobuline	Leukolysine (MMP-25)
β-Glucuronidase	Collagénase (MMP-8)		Albumine
β-Glycerophosphatase	Gélatinase (MMP-9)		Cytochrome b ₅₅₈
α-Mannosidase	Histaminase		
α-1 Antitrypsine	Lactoférine		
	Lysozyme		
	Cytochrome b ₅₅₈		
	NGAL		
	SCAMP		
	SNAP-23-25		
	Antigène NB-1		
	Héparanase		
	Sialidase		
	hCAP-18		

Tiré de (Serhan *et al.*, 2010c)

Le dernier type de granule est le granule azurophilique. Ce granule représente la source principale d'enzymes microbicides, comme la myéloperoxydase (MPO). En plus de la MPO, ces granules contiennent plusieurs enzymes microbicides comme les sérines protéases élastases,

protéinase-3, la cathepsine et la BPI. Ces enzymes jouent un rôle déterminant dans la destruction des pathogènes. Par exemple, la BPI participe à l'élimination de bactéries Gram - en utilisant le LPS comme point d'attachement afin de créer des pores dans la paroi bactérienne.

La régulation du processus de dégranulation du neutrophile est très complexe. Nous savons, par contre, que l'exocytose des granules demeure *in vitro* sous le contrôle des niveaux intracellulaire de calcium (Berton *et al.*, 1994). Cette régulation est dépendante de plusieurs protéines dont la phospholipase C- γ (PLC- γ) et les *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) (Herlaar *et al.*, 1999, Krump *et al.*, 1997, Mocsai *et al.*, 2000).

2.4 La phagocytose et la destruction de pathogènes

La phagocytose a été observée pour la première fois il y a plus de 120 ans par Élie Metchnikoff. Depuis, les mécanismes d'action impliqués dans ce processus immunitaire ont été largement étudiés. La phagocytose demeure une composante critique de l'immunité innée et adaptative. La phagocytose est un processus dépendant de l'actine qui permet l'internalisation de particules d'une taille supérieure à 0,5 μm . Ce processus permet l'ingestion d'une large variété de particules cibles, incluant des micro-organismes, des cellules mortes et des débris environnementaux (Underhill *et al.*, 2012). En plus de son rôle important dans l'ingestion et la destruction de pathogènes, la phagocytose active la libération de cytokines pro-inflammatoires et permet la présentation antigénique.

La phagocytose passe par la reconnaissance des particules à l'aide des différents récepteurs présents à la surface de la cellule. Cette détection permet par la suite l'internalisation de la particule puis la destruction de cette dernière. Les neutrophiles possèdent une variété de récepteurs cellulaires distincts qui permettent la reconnaissance directe ou indirecte de particules. La liaison de ligands à ces récepteurs spécifiques engendre différents types de phagocytose. On retrouve la phagocytose dépendante des récepteurs Fc (FcR), celle dépendante des récepteurs delectine-1 ainsi que la phagocytose dépendante des récepteurs du complément (CR). Par exemple, les polysaccharides présents à la surface de certaines levures s'attachent au récepteur de mannose ou à delectin-1 (Herre *et al.*, 2004a, Herre *et al.*, 2004b), alors que le lipopolysaccharide exprimé par les bactéries Gram – est reconnu par les récepteurs

scavenger A (Peiser *et al.*, 2000). Les corps étrangers peuvent également être reconnus par des molécules solubles dans la circulation. C'est le cas des immunoglobulines qui reconnaissent des antigènes spécifiques et des composantes du complément qui s'attachent à plusieurs types de particules. Ces composantes qu'on appelle opsonine facilitent la reconnaissance d'un pathogène par les phagocytes professionnels comme les neutrophiles et les macrophages.

2.4.1 La phagocytose dépendante des récepteurs Fc (FcR)

Les FcR sont nécessaires pour l'internalisation des particules opsonisées avec des anticorps. Les neutrophiles expriment plusieurs FcR, soit les récepteurs FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) et FcγRIII (CD16) (Anderson *et al.*, 1990). L'engagement des récepteurs Fc par des anticorps mène à la formation d'une structure caractéristique appelée coupe phagocytaire. La coupe phagocytaire débute par l'agglomération de FcγR à proximité de la particule. Les domaines cytoplasmiques de ces récepteurs possèdent un motif d'activation ITAM qui est une région substrat de phosphorylation pour les protéines de la famille Src. La phosphorylation des ITAM s'effectue par les protéines Hck, Lyn ou Fgr (Ghazizadeh *et al.*, 1994, Hamada *et al.*, 1993, A. V. Wang *et al.*, 1994a). La phosphorylation des ITAM par les Src provoque le recrutement de la protéine Syk, qui possède des domaines *Src Homology 2* (SH2) (Johnson *et al.*, 1995, Kurosaki *et al.*, 1995). La présence des protéines Hck, Fgr, Lyn et Syk est essentielle au processus phagocytaire puisque l'absence de l'une ou l'autre de ces composantes mène à une réduction drastique de la capacité phagocytaire (Fitzer-Attas *et al.*, 2000, Kiefer *et al.*, 1998). L'activation de Syk mène également au recrutement de protéines adaptatrices comme le *Linker of activated T-cell* (LAT) et Grb2 (Gopal *et al.*, 2013). L'absence de ces protéines adaptatrices affecte grandement la capacité phagocytaire des macrophages murins (Gu *et al.*, 2003).

2.4.2 La machinerie de polymérisation d'actine

Le processus phagocytaire est un événement dépendant de la polymérisation de l'actine. Cette polymérisation permet, entre autres, l'extension des phagopodes qui est nécessaire à la

formation du phagosome. La polymérisation de l'actine dépend de petites protéines GTPases de la famille Rho. Ces protéines alternent entre la forme active (liée à GTP) et la forme inactive (liée à GDP) permettant ainsi l'assemblage des monomères d'actine. Plusieurs GTPases jouent des rôles clés dans la phagocytose dépendante des FcR. Cdc42 est l'une de ces protéines qui sont activées dans les étapes précoces de la phagocytose (Caron *et al.*, 1998). Rac1 et Rac2 sont deux autres GTPases activées lors du processus phagocytaire. Par contre, ces deux dernières sont impliquées beaucoup plus tardivement dans l'internalisation de particules (Hoppe *et al.*, 2004). La formation des filaments d'actine est également supportée par le complexe Arp2/3, qui est formé de sept protéines (May *et al.*, 2000). Ce complexe de protéines, qui induit la formation de noyau de polymère d'actine, demeure sous le contrôle des protéines *Wiskott-Aldrich syndrome protein* (WASP) et de la famille de protéines Scar/WAVE. Ces dernières sont des protéines effectrices en amont des Rho GTPases Cdc42 et Rac, respectivement. Les protéines de la famille de WASP ont été découvertes chez un patient possédant une diminution marquée de la phagocytose dépendante des FcγR chez qui on a retrouvé une mutation dans la protéine WASP (Lorenzi *et al.*, 2000). Des événements de phosphorylation dépendante des kinases PLCγ et PI3K modulent également le remodelage de l'actine, conférant à ces deux kinases des propriétés modulatrices (Scott *et al.*, 2005). En effet, PI3K régule une protéine contractile associée à l'actine, la myosine, qui contrôle l'internalisation de grosses particules (Mansfield *et al.*, 2000).

2.4.3 La phagocytose dépendante des récepteurs du complément

La phagocytose dépendante du CR3 (aussi connu sous le nom de $\alpha_M\beta_2$ ou Mac-1) est l'autre type de phagocytose bien décrit dans la littérature. Bien qu'il y ait quelques différences marquées dans les mécanismes d'internalisation de particules entre la phagocytose dépendante des FcγR et celle dépendante des CR, le processus de phagocytose demeure très similaire en général. Il existe des divergences notamment dans le rôle de Syk où une étude a démontré que la phagocytose dépendante des CR, contrairement à celle dépendante des FcγR, n'était pas affectée dans les macrophages Syk^{-/-} (Kiefer *et al.*, 1998). Par contre, une autre étude a démontré qu'un *knock-down* de Syk affectait grandement l'internalisation de particules via le récepteur CR3 (Shi *et al.*, 2006).

La phagocytose dépendante des CR demeure sous le contrôle d'autres types de GTPases. En effet, il a été démontré dans plusieurs études que la polymérisation de l'actine est dépendante de la GTPase RhoA et indépendante de Rac1 et Cdc42 (Caron *et al.*, 1998, May *et al.*, 2000). RhoA est donc responsable de la polymérisation de l'actine via deux mécanismes distincts. Premièrement, RhoA active les kinases Rho, ce qui provoque la phosphorylation et l'activation de la chaîne légère de la myosine II (Olazabal *et al.*, 2002). Deuxièmement, RhoA induit le recrutement de la protéine mDia1, qui est impliquée dans l'accumulation de F-actine au niveau de la coupe phagocytaire (Colucci-Guyon *et al.*, 2005).

2.4.4 La formation et la maturation du phagosome

Quoique les différents récepteurs engendrent des types distincts de réponses signalétiques, l'internalisation de différentes particules culmine vers la formation d'une vacuole formée par l'extension de la membrane plasmique que l'on appelle phagosome. La séparation du phagosome de la membrane plasmique est suivie d'une succession rapide de réactions biochimiques qui vont convertir le phagosome en une organelle avec un puissant pouvoir microbicide (Pitt *et al.*, 1992). Ce processus de remodelage, qu'on nomme maturation du phagosome, est orchestré par une série d'événements de fusion et de fission membranaire qui vont altérer la composition du phagosome (Desjardins *et al.*, 1994). Les changements biochimiques proviennent du trafic vésiculaire de petites vacuoles qui fusionnent avec le phagosome nouvellement formé. Les Rab GTPases coordonnent essentiellement ce trafic vésiculaire (Stenmark, 2009). Lors de sa maturation, le phagosome acquiert, entre autres, Rab5 grâce à la fusion avec les endosomes précoces (Kitano *et al.*, 2008). La maturation du phagosome coïncide avec l'augmentation progressive du niveau d'ions H⁺ via des vacuoles ATPases. La maturation du phagosome coïncide également avec la fusion des granules spécifiques et azurophiliques, qui fournissent des hydrolases et autres peptides antimicrobiens. De plus, il y a également l'assemblage de la NADPH oxydase à la membrane du phagosome qui génère une importante quantité de réactifs oxygénés (traité dans la prochaine section). Le phagosome devient ainsi un environnement très hostile pour les pathogènes. Cet environnement permet généralement la destruction de ces derniers. Dans les derniers stades de la phagocytose, le phagosome mature fusionne avec les lysosomes, une structure qu'on appelle phagolysosome. Cette structure est caractérisée par la présence de la GTPase Rab7 ainsi que de la perte de Rab5. Cette dernière étape permet la digestion complète de la particule

internalisée par les enzymes hydrolytiques. Le pH très bas du phagolysosome (pH 4.5) contribue également à ce processus.

2.4.5 La phagocytose de cellules apoptotiques

Chez l'humain, plus de 10 milliards de cellules meurent chaque jour. Les corps apoptotiques doivent ainsi être rapidement éliminés afin d'éviter tout risque de nécrose secondaire. La phagocytose est donc un processus essentiel au maintien de l'équilibre cellulaire et tissulaire. Quoique la phagocytose de corps cellulaires apoptotiques soit principalement effectuée par les macrophages, il a également été démontré que les neutrophiles avaient la capacité de phagocyter de telles structures et même des neutrophiles apoptotiques (Rydell-Tormanen *et al.*, 2006). Les cellules apoptotiques libèrent des molécules solubles, comme l'ATP, la lysophosphatidylcholine ou la fractaline (Chekeni *et al.*, 2011). Ces molécules sont chimioattractantes pour les phagocytes et leur permettent de trouver efficacement les cellules apoptotiques à éliminer. De plus, les cellules apoptotiques expriment à leur surface des molécules comme les phosphatidylsérines (PS) qui sont reconnues par des récepteurs comme TIM, BAI1 ou Stabilin-2 (Kobayashi *et al.*, 2007, S. Y. Park *et al.*, 2008). Ces récepteurs entraînent ensuite le processus de phagocytose. Ravichandran et Lorenz décrivent en détail l'implication de la phagocytose de cellules apoptotiques et les différents mécanismes régulant ce processus (Ravichandran *et al.*, 2007).

2.4.6 Facteurs modulant le processus de phagocytose

Certains récepteurs non-phagocytaires, comme les TLR, contribuent au processus phagocytaire. En effet, la stimulation du TLR-4 par le LPS mène à une augmentation de la macropinocytose et de l'internalisation de bactéries (Alpuche-Aranda *et al.*, 1994). L'engagement de TLR-4 mène également à l'augmentation de la phagocytose dépendante des CR3 (Caron *et al.*, 2000). Outre les TLR, il semblerait que la taille et la complexité des particules à ingérer modulent la capacité phagocytaire. En effet, plusieurs études rapportent une variation de la capacité de phagocytose pour des particules de différentes tailles (Brewer *et al.*, 2004, Doshi *et al.*, 2010, Rettig *et al.*, 2010). La forme et la complexité sont aussi des

facteurs non négligeables dans le processus phagocytaire (Champion *et al.*, 2006, Doshi *et al.*, 2010). Underhill et Goodridge reviennent en détail tous les facteurs et les propriétés physico-chimiques influençant l'internalisation de particules (Underhill *et al.*, 2012).

2.5 La production d'espèces réactives de l'oxygène

Afin de détruire les micro-organismes pathogènes, le neutrophile utilise une large variété de produits microbicides comme des peptides antimicrobiens et des enzymes protéolytiques, qui sont contenus au niveau des granules, ainsi que des produits oxydants dérivés de l'oxygène. La production de ROS résulte de l'activation d'un complexe protéique nommé *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) oxydase. Cette enzyme est responsable de transférer des électrons du NADPH à l'oxygène (O_2), se traduisant par la création d'anions superoxide (O_2^-) (Babior, 1999, R. A. Clark, 1999). Cette production rapide de O_2^- , appelée explosion respiratoire, engendre la transformation de ce composé en espèces réactives secondaires toxiques, permettant une destruction efficace des micro-organismes (Borregaard, 2010). Les effets potentiellement toxiques de ces espèces réactives pour l'organisme sont rapportés dans plusieurs maladies inflammatoires (Nauseef, 2007, Witko-Sarsat *et al.*, 2000), démontrant l'importance d'une régulation efficace de cette enzyme. À l'inverse, la déficience de cette enzyme est mise en évidence dans les cas de maladie granulomateuse chronique (CGD) (Holland, 2010). Les patients atteints de CGD, chez lesquels on observe une mutation génétique rare liée au chromosome X, souffrent d'infections bactériennes et fongiques récurrentes.

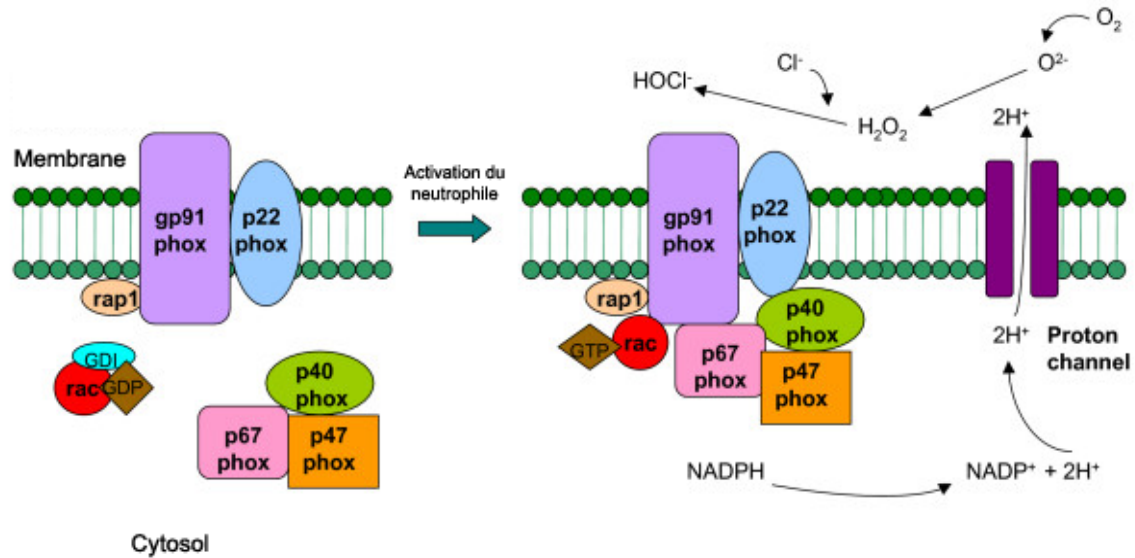


Figure 5: Représentation du complexe NADPH oxydase du neutrophile suite à son activation. Le flavocytochrome b, composé de la gp91^{phox} et la p22^{phox}, est présent au niveau de la membrane du phagosome. L'activation du neutrophile entraîne le recrutement des sous-unités cytosoliques p67^{phox}, p40^{phox} et p47^{phox} de façon dépendante des GTPases Rac. L'assemblage du complexe NADPH oxydase permet la synthèse d'O₂⁻ et d'ions H⁺, qui seront à leur tour utilisés pour générer d'autres dérivés d'espèces réactives de l'oxygène.

Modifiée de (Assari, 2006)

Il existe plusieurs NADPH oxydase. Le complexe NOX2, ou NADPH oxydase 2, est constituée de cinq protéines qui participent à la fonction d'oxydase: p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} et gp91^{phox}. L'activité de cette enzyme nécessite également la présence d'une petite GTPase (Rac1/2). Le premier constituant de NOX2 à être identifié fut le cytochrome b, flavocytochrome ou cytochrome b₅₅₈ (Segal *et al.*, 1978). Dans les neutrophiles naïfs, le cytochrome b est localisé au niveau des granules et de certaines vésicules. Lors de l'activation des neutrophiles, on observe une mobilisation de ce dernier au niveau des membranes des phagosomes (Borregaard *et al.*, 1983, Quinn *et al.*, 1993). En 1987, l'équipe de Parkos a développé une méthode permettant de purifier le cytochrome b; ce qui leur a permis d'identifier deux composantes au cytochrome b, soit une glycoprotéine de 91 Kda (gp91^{phox}) et une protéine non-glycosylée de 22 KDa (p22^{phox}). Des études sur des patients X-CGD ont permis d'identifier la protéine gp91^{phox} comme la protéine déficiente dans cette pathologie (Dinauer *et al.*, 1987). Lors de l'activation du neutrophile, plusieurs constituants de la NADPH oxydase sont phosphorylés; c'est le cas des deux sous-unités gp91^{phox} et p22^{phox} qui sont phosphorylées directement par la protéine kinase C (PKC). La phosphorylation de gp91^{phox} augmente l'activité catalytique et l'assemblage de NOX2 (Raad *et al.*, 2009). De plus, on observe une corrélation

entre le niveau de phosphorylation et l'activité de l'enzyme (Regier *et al.*, 2000, Regier *et al.*, 1999).

L'activité de transfert d'électrons du flavocytochrome b requiert la présence d'autres protéines cytoplasmiques. L'étude de certains patients CGD a permis d'observer que les neutrophiles de ces patients n'étaient pas en mesure de phosphoryler une protéine de 44 KDa. Des expériences de complémentation ont permis d'identifier cette protéine comme étant la *Neutrophil Cytosolic factor 1* (NCF1), aussi connue sous le nom de p47^{phox} (Nunoi *et al.*, 1988, Volpp *et al.*, 1988). Cette protéine possède plusieurs sites potentiels de phosphorylation (résidus 314-347), deux domaines *Src homology 3* (SH3), un domaine C-terminal riche en proline et un domaine *N-terminal phox homology* (PX). Chez les neutrophiles naïfs, la p47^{phox} demeure seule ou en complexe (1: 1: 1) avec p67^{phox} et p40^{phox} (J. W. Park *et al.*, 1992). Lors de l'activation des neutrophiles, on observe une phosphorylation de p47^{phox}, puis une translocation et un recrutement du complexe protéique au niveau de la membrane du phagosome. Ce recrutement engendre l'association de ce complexe avec le cytochrome b. Bien que la fonction exacte de p47^{phox} demeure inconnue, il semblerait que cette protéine soit un cofacteur permettant un assemblage efficace de NOX2 (El-Benna *et al.*, 2009).

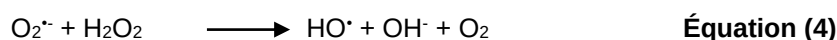
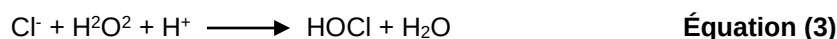
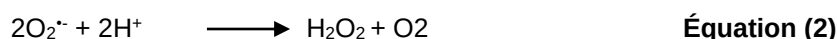
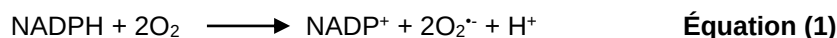
Tout comme la p47^{phox}, la p67^{phox} fut identifiée pour la première fois chez un patient X-CGD (Nunoi *et al.*, 1988, Volpp *et al.*, 1988). Cette protéine, également phosphorylée lors de l'activation des neutrophiles, transloque à la membrane du phagosome et joue un rôle important dans le transport des électrons (Alloul *et al.*, 2001). Certaines études supportent également l'hypothèse que cette sous-unité soit responsable de la liaison avec le NADPH (Dang *et al.*, 1999, Dang *et al.*, 2000, Umei *et al.*, 1986). La stabilisation du complexe NADPH oxydase est également assurée par la p40^{phox} (Wientjes *et al.*, 1993). Par contre, cette protéine semble se dissocier du complexe à la suite de l'activation de l'enzyme (El Benna *et al.*, 1999). Lors de la phosphorylation de p40^{phox} par la PKC, la p40^{phox} agit comme régulateur positif de l'activation de la NADPH oxydase permettant d'augmenter l'affinité de p47^{phox} pour le flavocytochrome b. De plus, la présence d'un domaine PX favorise l'accumulation de la protéine au niveau des groupements phosphatidylinositol 3-phosphate (PIP3) de la membrane du phagosome (Ellson *et al.*, 2001).

La production de O₂⁻ n'est pas possible sans la présence d'un troisième cofacteur cytosolique: les protéines GTPase Rac1 et Rac2 (Abo *et al.*, 1991, Knaus *et al.*, 1991). En effet, on observe une diminution dépendant de la dose d'O₂⁻ par l'utilisation d'oligonucléotides antisens dirigés

contre Rac et Rac2 (Dorseuil *et al.*, 1992). De surcroît, les neutrophiles de souris déficientes en Rac produisent des niveaux extrêmement faibles d'anions superoxydes, engendrant une immunité déficiente (Roberts *et al.*, 1999). L'activation des neutrophiles induit une translocation de Rac indépendante des autres facteurs cytosoliques, mais qui correspond au niveau d'activité de NOX2 (Abo *et al.*, 1994). Malgré sa translocation indépendante des autres facteurs, il a été démontré que Rac interagit avec p67^{phox} (Diekmann *et al.*, 1994) ainsi qu'avec le flavocytochrome b (Heyworth *et al.*, 1994), et que ces interactions sont nécessaires au bon fonctionnement du complexe protéique, notamment au niveau des liaisons avec l'assemblage du cytosquelette (Quinn *et al.*, 1989).

Tel que mentionné ci-haut, l'explosion respiratoire induite par l'activation de NOX2 génère des quantités importantes d'anions superoxydes. Par contre, l'hyperréactivité de ce composé avec les éléments présents dans la cellule induit d'importantes réactions biochimiques menant à la formation de radicaux libres et d'espèces oxydantes microbicides. L'oxydation du NADPH engendre la formation de deux molécules d'O₂⁻ et d'ion H⁺ (**Équation 1**). Les ions H⁺ participent à l'acidification du phagosome qui favorise la destruction de pathogènes. Quant aux molécules d'O₂⁻, elles sont rapidement transformées en peroxyde d'oxygène (H₂O₂); une réaction catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) (**Équation 2**) (Fridovich, 1997, Fridovich, 1998). Le H₂O₂ peut être toxique en lui-même pour les pathogènes. Pour cette raison, plusieurs pathogènes (genre *Staphylococcus*) produisent des catalases permettant de détoxifier le milieu riche en peroxyde. Ces espèces bactériennes sont particulièrement dangereuses pour les patients CGD qui génèrent peu de H₂O₂ (Holland *et al.*, 1998). En plus de l'explosion respiratoire, les granules azurophiliques fusionnent avec les phagosomes, relâchant leur contenu riche en MPO (Klebanoff, 1999). La MPO utilise le peroxyde d'hydrogène pour catalyser la formation d'acide hypochloreux (HOCl) (**Équation 3**). Le HOCl s'avère être un oxydant puissant et est cytotoxique pour une très grande variété de pathogènes, incluant des bactéries, des virus et des champignons (Rosen *et al.*, 1979). Le H₂O₂ peut également être converti en radicaux hydroxyl (HO), un autre métabolite réactif dérivé de l'oxygène (**Équation 4**). La très forte concentration de radicaux oxygénés fournit un environnement idéal pour la formation de métabolites secondaires. L'un des métabolites formé est le singlet oxygéné (¹O₂^{*}) via l'oxydation du HOCl par le H₂O₂ (**Équation 5**). Contrairement aux métabolites précédents, ¹O₂^{*} est beaucoup plus stable tout en possédant un pouvoir bactéricide extrêmement puissant (Krinsky, 1974). Il provoque des dommages au niveau de l'ADN et induit l'oxydation des protéines et la peroxydation des lipides (Sies *et al.*, 1992a, Sies *et al.*, 1992b). Enfin, l'oxyde

nitrique (NO) joue également un rôle important dans l'élimination des pathogènes et dans la réponse inflammatoire en général (Pacher *et al.*, 2007).



En résumé, un nombre important et très varié de ROS est produit directement ou indirectement par l'activation de NOX2. La production de ROS est essentielle à la défense de l'organisme. Par contre, elle cause également des dommages non négligeables aux tissus sains ou avoisinants. À cause de ce potentiel destructeur, le complexe NADPH oxydase est régulée de manière efficace par des événements de phosphorylation sur les différentes sous-unités.

2.6 La production de cytokines et l'inter-communication avec les autres cellules

La sécrétion de cytokines par les neutrophiles permet de réguler les différentes phases de l'inflammation, en plus de favoriser le lien entre l'immunité innée et adaptative. Une grande variété de stimuli est capable de provoquer la sécrétion de cytokines par les neutrophiles. Parmi ceux-ci, on retrouve les constituants bactériens comme le lipopolysaccharide (LPS) ou le fMLP. On retrouve également des médiateurs immunitaires solubles comme le leucotriène B4 (LTB4), PAF ou le composant du complément C5a.

Tableau 5: Fonctions des principales cytokines produites par les neutrophiles humains

Cytokines	Rôle dans la réponse inflammatoire	Références
IL-8 (CXCL-8)	Chimioattractant, induit l'explosion respiratoire, régulation des intégrines, adhésion sur l'endothélium. Effets sur les LT et les basophiles	(Baggiolini <i>et al.</i> , 1994, A. Dunican <i>et al.</i> , 2000a, A. L. Dunican <i>et al.</i> , 2000b, Villard <i>et al.</i> , 1995)
Gro-α (CXCL-1)	Chimioattractant, dégranulation, augmentation des molécules d'adhésion	(Gasperini <i>et al.</i> , 1995, Villard <i>et al.</i> , 1995)
IP-10 (CXCL-10)	Chimioattractant pour les NK, les monocytes et les LT	(Gasperini <i>et al.</i> , 1999, Tamassia <i>et al.</i> , 2007)
MIP-1α/MIP-1β (CCL-3/CCL-4)	Chimioattractant/Activateurs des monocytes, LT, DC, rôle dans l'immunité protectrice à <i>Leishmania</i>	(Charmoy <i>et al.</i> , 2010, Hatano <i>et al.</i> , 1999, S. L. Kunkel <i>et al.</i> , 1995)
TNF-α	Stimule la phagocytose, l'adhésion, la production de ROS et la dégranulation des neutrophiles, rôle important dans l'apoptose (via TRAIL)	(A. L. Dunican <i>et al.</i> , 2000b, Kamohara <i>et al.</i> , 2004)
IL-1β	Cytokines pro-inflammatoires avec des effets pléiotropiques: voir référence	(Guma <i>et al.</i> , 2009)
IL-12	Pro-inflammatoire et immunomodulateur pour les LT, les NK. Induit la sécrétion d'IL-8 chez les neutrophiles	(Ethuin <i>et al.</i> , 2001, Ethuin <i>et al.</i> , 2003, Tsai <i>et al.</i> , 2002)
IFN-α	Rôle dans l'immunité anti-virale	(E. R. Brandt <i>et al.</i> , 1994, Decker, 2011)
INF-γ	Cytokine Th1, induit la sécrétion d'IL-12 et de TNF-α, lien entre l'immunité innée et adaptative	(Ethuin <i>et al.</i> , 2004, Hodge-Dufour <i>et al.</i> , 1998, Yeaman <i>et al.</i> , 1998, J. Yin <i>et al.</i> , 2009)
IL-17	Régulation de l'inflammation à plusieurs niveaux (voir références)	(Cua <i>et al.</i> , 2010, Ferretti <i>et al.</i> , 2003, Li <i>et al.</i> , 2010, Linden, 2003, Witowski <i>et al.</i> , 2004)
IL-4	Cytokines Th2, Effets sur les neutrophiles (voir références)	(Bober <i>et al.</i> , 2000, E. Brandt <i>et al.</i> , 2000, Girard <i>et al.</i> , 1997)
IL-10	Inhibition des fonctions des monocytes/macrophages	(Bober <i>et al.</i> , 2000, Ocuin <i>et al.</i> , 2011)
TGF-β	Guérison des plaies, fonctions anti-inflammatoires	(Szymkowiak <i>et al.</i> , 2000)

Les neutrophiles sont connus pour sécréter plusieurs types de chimiokines. L'interleukine-8 (IL-8) et Gro-α sont deux des chimiokines les plus étudiées chez le neutrophile. Ces deux chimiokines, sécrétées par les neutrophiles en réponse à plusieurs agents comme le LPS ou le TNF-α, ont des effets sur le système immunitaire. En effet, l'IL-8 et Gro-α sont chimiotactiques pour les neutrophiles en plus d'induire la dégranulation, l'explosion respiratoire et la régulation à la hausse des intégrines CD11b/CD18 (Gasparini *et al.*, 1995). L'IL-8 a également d'autres effets importants sur les lymphocytes T (LT) et les basophiles (Dmitry Gabrilovich, 2013a).

Quoique sécrétée en très faible quantité, IP-10 est une autre chimiokine libérée par les neutrophiles humains en réponse à l'INF- γ (Gasperini *et al.*, 1999). La libération d'IP-10 par les neutrophiles pourrait contribuer au recrutement de cellules NK, de monocytes et de LT activés puisqu'il est chimiotactique pour ces trois sous-types cellulaires.

La capacité des neutrophiles à produire les *Macrophage inflammatory protein-1 α* (MIP-1 α) et 1 β (MIP-1 β) est maintenant bien documentée (Hatano *et al.*, 1999, S. L. Kunkel *et al.*, 1995). Les effets de ces deux chimiokines sont également bien connus et leur production est essentielle au développement de l'immunité protectrice contre certains pathogènes. Le neutrophile produit également de bonnes quantités de cytokines pro- et anti-inflammatoires ayant des effets à tous les niveaux de la réponse inflammatoire. Ces cytokines ainsi que leurs principales fonctions dans l'inflammation sont énumérées dans le **Tableau 5**. Il est important de mentionner que plusieurs études ont mis en évidence la production de différentes cytokines qui ne sont pas réellement exprimées chez le neutrophile. L'investigation de la sécrétion de cytokines par le neutrophile nécessite une purification de plus de 99,5%. Par exemple, il a été démontré que la présence de l'ARNm de l'IL-6 est un marqueur de contamination monocyttaire. L'équipe de Wang a ainsi démontré que les niveaux d'IL-6 sont indétectables dans une préparation extrêmement pure de neutrophiles (P. Wang *et al.*, 1994b).

De plus en plus d'indices suggèrent une communication entre les neutrophiles et les autres cellules du système immunitaire. La sécrétion des différentes cytokines est, entre autres, responsable de cette communication intercellulaire. Par exemple, il a été notamment démontré que les neutrophiles sécrètent des quantités importantes de CCL20 et de CCL2 permettant un recrutement de cellules Th17 (Pelletier *et al.*, 2010). Ces Th17 sécrèteraient alors d'importante quantité d'IL-8, induisant à leur tour le recrutement de neutrophiles. Les neutrophiles pourraient également générer une inter-communication avec les DC lors d'infections microbiennes en plus d'orchestrer le recrutement d'autres cellules comme les LT et les NK au site inflammatoire pour ainsi contribuer à la régulation de la réponse immunitaire (Bennouna *et al.*, 2003). La sécrétion de *B lymphocyte stimulator* (BLyS) par les neutrophiles aurait aussi un rôle non négligeable dans la régulation des cellules B (Scapini *et al.*, 2005, Scapini *et al.*, 2003). Tous ces indices démontrent donc une communication intercellulaire importante non négligeable dans l'immunité.

2.7 La mort du neutrophile

Sans stimulus inflammatoire, les niveaux de neutrophiles matures demeurent relativement stables dans l'organisme (Nathan, 2006). Comme il a été discuté auparavant, les neutrophiles possèdent un arsenal qui peut s'avérer destructeur pour l'organisme. Les neutrophiles doivent donc être rapidement éliminés à la suite de la destruction de l'agent pathogène afin d'éviter les risques de dommages cellulaires subséquents. L'importance fondamentale de l'apoptose des neutrophiles, suivi de l'efferocytose (élimination de cellules apoptotiques pour les macrophages) est mise en évidence dans plusieurs pathologies où l'on observe une déficience dans l'un ou l'autre de ces mécanismes (Diep *et al.*, 2010, Knapp *et al.*, 2003, Loffler *et al.*, 2010). L'apoptose ou mort programmée du neutrophile est ainsi régulée à plusieurs niveaux.

Le neutrophile est à la base une cellule ayant une demi-vie extrêmement courte. Les premières études traitant de ce sujet ont révélé que les neutrophiles possédaient une demi-vie d'environ 8-12 heures en circulation (Galli *et al.*, 2011). Par contre, ces données se basent sur un marquage des cellules *ex vivo* avant leur injection *in vivo*. Récemment, une étude a remis en doute cette affirmation (Pillay *et al.*, 2010). Dans cette étude, les auteurs ont injecté oralement de l' $^2\text{H}_2\text{O}$ afin de marquer les cellules. Ils révèlent que la durée de vie de base d'un neutrophile pourrait se situer autour de 5,4 jours. Ceci étant dit, la durée de vie des neutrophiles se trouve augmentée lors de l'activation de ceux-ci (Colotta *et al.*, 1992). Dans certaines conditions, il a même été suggéré que certains neutrophiles matures puissent proliférer en dehors de la moelle osseuse en réponse à la sérum amyloïde A (De Santo *et al.*, 2010).

Plusieurs formes de mort cellulaire sont maintenant caractérisées chez le neutrophile. On rapporte la nécrose, la nécroptose (Vandenabeele *et al.*, 2010), la pyroptose (traitée dans le chapitre sur les inflammasomes) et la mieux caractérisée, l'apoptose.

2.7.1 L'apoptose

L'apoptose est une forme de mort dépendante de l'énergie cellulaire ainsi que de l'activation des caspases (Kerr *et al.*, 1972). En plus de ces deux caractéristiques, les cellules qui meurent par apoptose conservent l'intégrité membranaire et le contenu intracellulaire. D'autres propriétés comme la vacuolisation, la condensation et la fragmentation de l'ADN ainsi que

l'exposition des phosphatidylsérines (PS) sont des caractéristiques de l'apoptose. Les protéines effectrices responsables des changements physiologiques sont des protéases de la famille des caspases (*cysteine aspartic-specific proteases*). Les caspases sont des protéines cytosoliques maintenues sous forme inactive (zymogène ou pro-caspase). Certains signaux endogènes comme le TNF- α ou exogènes comme des agents chimiothérapeutiques engendrent le processus d'apoptose caractérisé, entre autres, par l'activation des caspases. On retrouve les caspases initiatrices, comme les caspases-8 et -10 qui participent à l'activation des autres caspases, ainsi que les caspases effectrices, comme les caspases-3 et -7 qui participent à la dégradation de différents substrats comme l'ADN. Les neutrophiles possèdent neuf des quatorze caspases identifiées, soient les caspases-1, -3, -4, -6, -7, -8, -9, -10 et -14 (Goepel *et al.*, 2004, Murphy *et al.*, 2003).

Les caspases peuvent être activées via deux voies principales, soient la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. La voie intrinsèque est induite par des stress cellulaires comme les radiations UV, les agents chimiothérapeutiques ou l'absence de facteurs de croissance. Cette voie apoptotique est régulée par la famille de protéines Bcl-2. Cette famille de protéines comprend des protéines pro- (Bax, Bad, Bid) et anti-apoptotiques (Bcl-2, Mcl-1 et Bcl_{XL}), qui contrôlent la perméabilité de la membrane mitochondriale. La balance des protéines pro- et anti-apoptotiques contrôle la perméabilité membranaire mitochondriale (Akgul *et al.*, 2001, Moulding *et al.*, 2001). L'augmentation de cette perméabilité membranaire entraîne la libération de cytochrome c vers le cytoplasme. Le cytochrome c s'associe alors avec la caspase 9, l'ATP ainsi que le facteur Apaf-1 pour former une structure appelée apoptosome, activant les caspases effectrices 3, 6 et 7. En plus du cytochrome c, la perte d'intégrité de la membrane mitochondriale entraîne la libération de facteurs pro-apoptotiques comme SMAC qui inactive les facteurs inhibiteurs de l'apoptose (**Figure 6**).

La voie d'apoptose extrinsèque est amorcée par l'engagement de récepteur de mort comme le récepteur au TNF (TNF-R), le récepteur de Fas (Fas-R) ou récepteur de *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL-R). L'engagement de ces récepteurs provoque le recrutement des protéines adaptatrices *Fas-associated death domain* (FADD) et *Tumor-associated death domain* (TRADD). Ces deux protéines recrutent à leur tour la pro-caspase 8 pour former un complexe connu sous le nom de *death-induced signaling complex* (DISC). L'activation de la caspase 8 entraîne alors l'activation de la caspase-10 puis de la caspase 3 (Fox *et al.*, 2010). DISC provoque également l'activation des composantes de la voie intrinsèque via Bid. Quoique Fas-L et TRAIL induisent directement l'apoptose des neutrophiles, le TNF- α induit de prime

abord l'apoptose des neutrophiles puis une survie à long terme via l'activation de NF- κ B (Ward *et al.*, 1999)

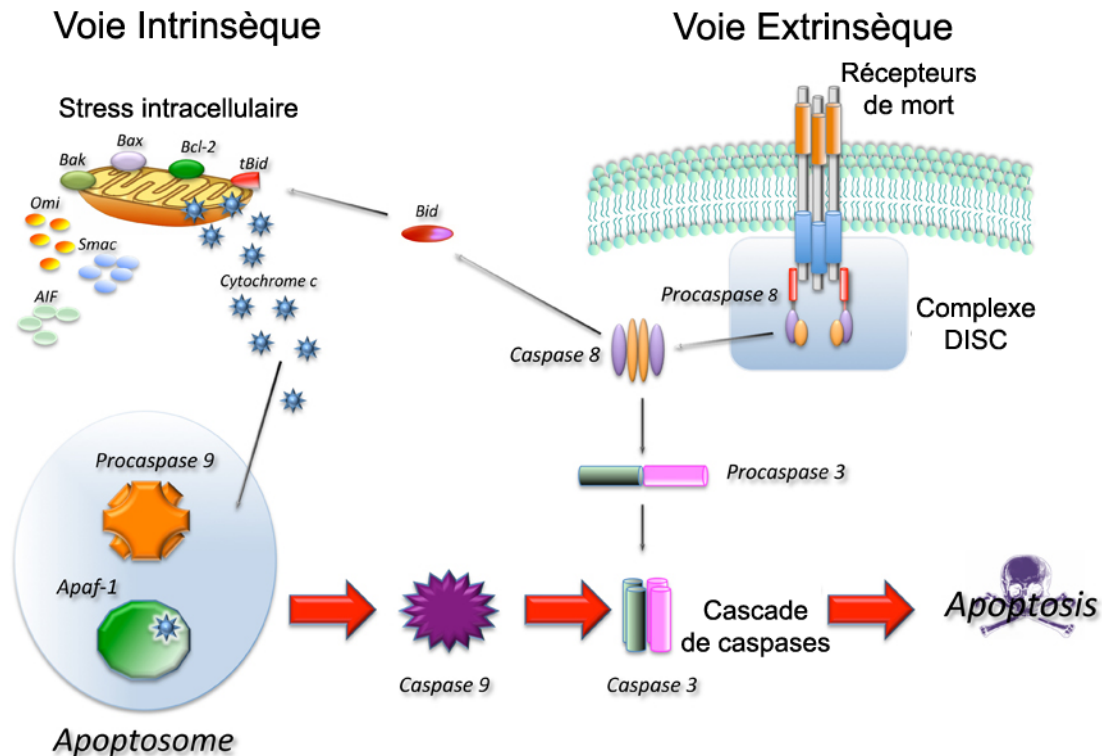


Figure 6: Représentation simplifiée des deux principales voies apoptotiques. La liaison de facteurs de mort à leur récepteur mène à la formation du complexe DISC permettant le recrutement de la caspase initiatrice 8. La caspase 8 est ensuite responsable de l'activation de certaines caspases effectrices comme la caspase 3. Elle permet également le clivage de facteurs anti-apoptotiques comme Bid. La dégradation des facteurs anti-apoptotiques permet alors la libération de cytochrome c, qui en se liant avec Apaf-1 et la pro-caspase 9, vont former l'apoptosome. Cette cascade d'activation des caspases contrôle ainsi le phénomène d'apoptose.

Modifiée de (Favaloro *et al.*, 2012)

Récemment, une troisième voie apoptotique a été décrite chez le neutrophile: la voie du réticulum endoplasmique (RE) (Binet *et al.*, 2010a, Binet *et al.*, 2010b). La voie du RE nécessite l'activation d'éléments de stress ainsi qu'une réponse appelée UPR pour *unfold protein response*. Dans l'UPR, on dénote l'augmentation de l'expression de protéines chaperonnes et de molécules permettant l'arrêt de la synthèse protéique par le RE comme GRP78, GADD153,

ATF6, XBP1, PERK et eIF2- α . L'activation de la caspase inflammatoire -4 est également un marqueur de la voie du RE.

L'apoptose des neutrophiles est sujette à une régulation qui dépend de plusieurs facteurs. Le GM-CSF est la cytokine la plus étudiée et ayant l'effet le plus important chez le neutrophile. L'activation des neutrophiles par cette cytokine engendre l'activation de voies signalétiques comme PI3K/Akt, les *Mitogen-activated proteine kinase* (MAPK) et les *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription* (JAK/STAT). Ces trois voies signalétiques jouent des rôles déterminants dans le retard de l'apoptose provoqué par le GM-CSF (Epling-Burnette *et al.*, 2001, Klein *et al.*, 2000).

2.7.2 Les *Neutrophil Extracellular Traps* (NET)

En plus de l'apoptose, les neutrophiles meurent également par la formation de *Neutrophil extracellular traps* (NET) (Brinkmann *et al.*, 2004). Les NET sont composés d'éléments de l'ADN, comme les histones, ainsi que d'éléments cytoplasmiques comme les lactoférines, la MPO et l'élastase (Brinkmann *et al.*, 2004). Les NET immobilisent les bactéries et les parasites. Cette manœuvre permet de contenir les pathogènes en évitant la diffusion et la progression de l'infection. De plus, les NET ont un effet bactéricide par le biais des protéases, des histones antimicrobiennes et des protéines S100 (Chapitre 5) (Papayannopoulos *et al.*, 2009). Certains pathogènes semblent d'ailleurs avoir développé des stratégies afin de contrer ce processus immunitaire. Une des stratégies employées par certains pathogènes est la libération de DNases qui clivent les brins d'ADN des NET (Beiter *et al.*, 2006, Buchanan *et al.*, 2006).

Les NET sont formés en réponse à une variété de stimuli pro-inflammatoires comme le LPS, l'IL-8, le TNF- α ou le phorbol-meristate-acetate (PMA). Plusieurs espèces bactériennes (Erment *et al.*, 2009, Ramos-Kichik *et al.*, 2009), fongiques (Bruns *et al.*, 2010, Urban *et al.*, 2009) et protozoaires (Baker *et al.*, 2008, Guimaraes-Costa *et al.*, 2009) sont également connues pour induire la formation de NET. La formation de NET est d'abord caractérisée par le changement de morphologie nucléaire où l'on peut observer la dégradation de la membrane nucléaire accompagnée de la décondensation de l'ADN et le mélange des composantes nucléaires et cytoplasmiques. Finalement, les NET sont relâchés dans le milieu extracellulaire par la rupture de la membrane plasmique. Il est important de mentionner que ce processus de rupture

membranaire est différent de celui de l'apoptose et de la nécrose. En effet, une expérience avec le colorant de viabilité *calcein-blue* ainsi que le marquage des PS avec l'annexin-V a permis de mettre en évidence les processus distincts de mort du neutrophile. Un neutrophile apoptotique exprime d'abord les PS à sa surface membranaire avant de perdre son colorant (viabilité) plusieurs heures après. À l'inverse, la NETose implique d'abord une perte de l'intégrité membranaire (perte du colorant de viabilité) avant d'exprimer les PS à la surface interne de leur membrane (Fuchs *et al.*, 2007). Ceci permet ainsi d'éviter que ces cellules soient phagocytées par les macrophages via la reconnaissance des PS (Remijsen *et al.*, 2011a). Récemment, il a été démontré que malgré la perte de l'intégrité membranaire, les neutrophiles libèrent leur ADN, mais continuent tout de même à exécuter certaines de leurs fonctions effectrices, soit la phagocytose et la chimiotaxie (Yipp *et al.*, 2012).

La formation des NET est régulée par la production de ROS induite par la NADPH oxydase ainsi que par la formation de vacuoles par le biais du processus d'autophagie (Remijsen *et al.*, 2011b). Contrairement à l'apoptose, la formation des NET est dite indépendante des caspases. Les principales caractéristiques des différents types de morts cellulaires sont énumérées dans le **Tableau 6**. D'autres cellules, comme les éosinophiles et les mastocytes, sont également connues pour relâcher des trappes extracellulaires (von Kockritz-Blickwede *et al.*, 2008, Yousefi *et al.*, 2008). Le terme ETosis est d'ailleurs employé pour désigner une cellule qui libère les trappes extracellulaires.

Tableau 6: Principales caractéristiques des différents types de mort chez le neutrophile

Inspiré de (Labbe *et al.*, 2008)

Caractéristiques	Apoptose	Nécrose	NETose	Pyroptose
Exposition des PS à la surface membranaire	+	—	—	—
Perte de l'intégrité membranaire	—	+	+	+
Dépendant des caspases	+	—	—	+(caspase -1 et -7)
Condensation de l'ADN	+	—	—	+
Décondensation de l'ADN	—	—	+	—
Clivage de l'ADN	+	—	—	+
Dépendant des ROS et de l'autophagie	?	?	+	?
Relâchement de cytochrome c	+	?	?	+
Inflammatoire	-	+	+	+

2.7.3 L'élimination des neutrophiles apoptotiques

L'apoptose de plusieurs milliards de neutrophiles à éliminer témoigne de la nécessité de mécanismes d'élimination efficaces des neutrophiles âgés. L'élimination des neutrophiles apoptotiques via la reconnaissance de molécules caractéristiques comme les PS est largement documentée dans la littérature (Flannagan *et al.*, 2012, Krysko *et al.*, 2006, Ravichandran *et al.*, 2007). De plus, il a récemment été démontré que la phagocytose de neutrophiles apoptotiques par les macrophages entraîne la cessation de la production d'IL-23. Cette diminution d'IL-23 engendre ainsi une diminution de la sécrétion d'IL-17 par les Th-17. Étant donné que l'IL-17 agit au niveau de la sécrétion de G-CSF, il s'en suit une diminution de cette cytokine. L'absence de

G-CSF permet de ralentir la production et la différenciation des neutrophiles de la moelle osseuse afin de les maintenir à un niveau stable (Stark *et al.*, 2005). D'autres cellules contribuent également à la clairance de neutrophiles apoptotiques. C'est le cas des cellules de la rate et du foie qui contribuent à la clairance des neutrophiles âgés morts par apoptose via l'engagement du TNF- α (J. Murray *et al.*, 1997) ou de Fas-L (Tortorella *et al.*, 1998).

Quoique les mécanismes ne soient pas encore entièrement compris, nous savons que la signalisation de la cytokine SDF-1 (CXCL-12) via son récepteur CXCR4 joue un rôle de premier plan dans l'élimination des neutrophiles apoptotiques. SDF-1 est une chimiokine sécrétée dans la moelle osseuse qui attire par chimiotaxie les neutrophiles exprimant leur récepteur CXCR4 (Nagase *et al.*, 2002). Des études ont démontré que les neutrophiles augmentent l'expression de CXCR4 avec le temps, acquérant ainsi la capacité de migrer vers la moelle osseuse suivant le gradient de SDF-1. Cette migration des neutrophiles âgés vers la moelle osseuse permet ainsi l'élimination de ces cellules du sang (Martin *et al.*, 2003). L'importance de CXCR-4 est mise en évidence chez les patients atteints du syndrome myelokatexis, aussi appelé WHIM (Zou *et al.*, 1998). On observe une absence du récepteur chez ces patients chez qui on note une leucopénie, une neutropénie ainsi qu'une accumulation des neutrophiles dans la moelle osseuse (Sierro *et al.*, 2007).

2.8 Le neutrophile dans l'inflammation aiguë et chronique

Les neutrophiles jouent un rôle déterminant dans l'inflammation aiguë. Comme il a été mentionné auparavant, la migration et l'accumulation des neutrophiles sont d'ailleurs des marqueurs d'inflammation aiguë. Les neutrophiles participent, entre autres, au recrutement des autres leucocytes, dont les neutrophiles. La sécrétion de chimiokines comme l'IL-8 et le LTB₄ contribue directement à ce recrutement (Ng *et al.*, 2011), alors que la sécrétion de cytokines comme l'IL-17 contribue indirectement. Cette dernière cytokine active les cellules du mésenchyme et les cellules myéloïdes qui contribuent à leur tour au recrutement de neutrophiles (Cua *et al.*, 2010). Pour cette raison, les neutrophiles ont longtemps été considérés comme des cellules ayant exclusivement des propriétés pro-inflammatoires. Par contre, de plus en plus d'indices suggèrent qu'ils possèderaient également des propriétés anti-inflammatoires, en plus de contribuer à la résolution de l'inflammation et à la guérison des tissus endommagés. Même dans les cas d'inflammation stérile, les neutrophiles contribuent à l'élimination de débris

cellulaires, participant ainsi à la résolution de l'inflammation (Fournier *et al.*, 2012). L'expression et la sécrétion de protéases, comme la MMP-9, lors du processus de dégranulation participent également à la dégradation des composantes de la matrice extracellulaire, qui est nécessaire au processus de guérison (Cauwe *et al.*, 2009). La MMP-9 dégrade également certaines DAMP comme HMGB1, ce qui favoriserait la terminaison du processus inflammatoire. La sécrétion de cytokines et de chimiokines par les neutrophiles joue aussi un rôle prépondérant dans le recrutement de monocytes et de macrophages. Ces cytokines, comme le TGF- β , favorisent également le phénotype de macrophages rM. Les neutrophiles favorisent le recrutement de macrophages via la sécrétion de signaux de type «find me» (Soehnlein *et al.*, 2010). Ce processus promeut ainsi la phagocytose de neutrophiles apoptotiques par les macrophages, contribuant ainsi à la résolution de l'inflammation et à la réparation des tissus (Canturk *et al.*, 2001).

En plus de leurs rôles établis dans l'inflammation aiguë, plusieurs indices s'accumulent et démontrent une association des neutrophiles avec l'inflammation chronique. En fait, la mort des neutrophiles par la formation des NET demeure bénéfique dans un contexte de contrôle d'une infection bactérienne. Par contre, la formation de NET engendre la libération de chromatine/ADN qui pourrait être associée avec le développement de différentes maladies inflammatoires chroniques comme le lupus. En effets, les NET des neutrophiles représentent une source importante de DAMP. Ces DAMP participent parfois à l'activation indésirable des neutrophiles. Curieusement, on retrouve d'importantes concentrations d'HMGB-1 (Abdulahad *et al.*, 2010) et de LL37 dans les patients atteints de psoriasis et de lupus érythémateux (Garcia-Romo *et al.*, 2011, Lande *et al.*, 2011). Ce relargage de médiateurs solubles par les neutrophiles contribue alors à l'activation de cellules dendritiques plasmocytaires (pDC). Il est également à noter qu'on retrouve la présence d'anticorps anti-LL-37 dans les cas de lupus (Lande *et al.*, 2011). D'autres études ont également démontré que les neutrophiles détectent et relarguent des DAMP, ce qui participent activement au développement de la fibrose kystique (Makam *et al.*, 2009).

Comme il a été mentionné précédemment, l'inflammation se développe lors de la reconnaissance de PAMP, présents dans les tissus infectés, ou encore en réponse aux DAMP libérés par les cellules de l'hôte lors de blessures stériles (Kolaczowska *et al.*, 2013). Bien que la présence des neutrophiles lors d'infections bactériennes et virales soit essentielle à la réponse immunitaire, la présence de ces derniers dans les cas d'inflammation stérile pourrait s'avérer nuisible pour l'organisme (G. Y. Chen *et al.*, 2010a). En effet, les neutrophiles

représentent une source importante de DAMP. Or, l'activation des neutrophiles, via notamment la liaison des DAMP aux PRR, entraîne la libération de produits oxydants et d'enzymes protéolytiques. Cette libération d'enzymes et de ROS est inévitablement dommageable pour l'organisme, en plus de contribuer à la persistance de l'inflammation. Dans les cas d'obésité, il existe un niveau de base élevé de mort cellulaire qui participe à la libération de DAMP, qui induit l'activation du NLRP-3 inflammasome (revue en détail dans un prochain chapitre). Les niveaux d'ATP retrouvés dans les tissus contribuaient également à l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion des neutrophiles ainsi qu'à la migration des neutrophiles dans les tissus périphériques (McDonald *et al.*, 2010, van Oostrom *et al.*, 2004). Ces niveaux de base d'inflammation sont aussi associés au diabète, à l'hypertension et à la démence (Vandanmagsar *et al.*, 2011). Ces données suggèrent que les neutrophiles auraient un rôle bénéfique à jouer dans l'inflammation aiguë, mais néfaste dans l'inflammation chronique. En effet, on retrouve une importante infiltration de neutrophiles dans les tissus inflammés de patients atteints de maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux, la maladie de Crohn, la thrombose veineuse ou l'*anti-neutrophile cytoplasmic antibody-related* (ANCA) vasculitites. Cette dernière pathologie est associée avec le développement d'anticorps dirigés contre certaines protéines granulaires des neutrophiles comme la MPO et la PR3 (M. Chen *et al.*, 2010b, Kallenberg, 2010). Les mécanismes impliquant la génération de ces auto-anticorps demeurent non-résolus. Par contre, les neutrophiles ont visiblement un rôle déterminant à jouer.

Le lupus érythémateux systémique (SLE) est une maladie auto-immune où l'on observe une perte de la tolérance envers les antigènes nucléaires. Les niveaux de neutrophiles sanguins sont généralement très bas dans cette pathologie, alors que les niveaux des neutrophiles tissulaires sont normaux. Le traitement de la neutropénie est généralement traité par l'administration de G-CSF. Ce traitement est par contre associé avec des crises aiguës suggérant un rôle important des neutrophiles dans le lupus (Vasiliu *et al.*, 2006). De plus, la présence des complexes immuns dans le SLE active les neutrophiles induisant ainsi la formation de NET (Villanueva *et al.*, 2011).

Ces données suggèrent un rôle pour le neutrophile dans la réponse inflammatoire aiguë et chronique. Il n'en demeure pas moins que d'autres études doivent être effectuées afin d'élucider les mécanismes régissant la physiologie des neutrophiles. En élucidant les voies qui contrôlent la survie et la physiologie des neutrophiles, nous pourrions être en mesure

d'améliorer les traitements existants pour les pathologies inflammatoires chroniques (Filep *et al.*, 2009).

CHAPITRE 3: Les inflammasomes

Le système immunitaire joue un rôle de premier plan dans la détection rapide de pathogènes. Cette reconnaissance rapide des envahisseurs est déterminante pour tout le reste du processus immunitaire allant jusqu'à l'élimination complète du pathogène. La reconnaissance des pathogènes passe, entre autres, par l'expression de PRR, qui reconnaît des motifs conservés au cours de l'évolution. Parmi les PRR, on retrouve notamment les TLR et les récepteurs aux lectines de type C (CLR) qui permettent de détecter la présence de pathogènes extracellulaires. D'autres récepteurs comme le *retinoic acid inducible gene-1* (RIG-I) (O'Neill *et al.*, 2010) et les récepteurs Nod-like (NLR) permettent de détecter les perturbations cytosoliques (Takeuchi *et al.*, 2010). En plus de détecter la présence de molécules bactériennes et virales exogènes, les NLR reconnaissent les molécules de danger endogènes libérées en réponse au stress ou aux dommages cellulaires et tissulaires (M. E. Bianchi, 2007, Schroder *et al.*, 2010). La reconnaissance de certains motifs spécifiques à chacun des NLR mène à la formation d'un complexe multiprotéique appelé inflammasome. Les inflammasomes sont des molécules effectrices qui participent activement à la résistance de l'hôte contre les bactéries, les virus, les parasites et les champignons (Skeldon *et al.*, 2011). Ce chapitre se veut un survol des principaux inflammasomes, de leur contribution dans la réponse immunitaire, ainsi que de leurs mécanismes de régulation.

3.1 La formation de l'inflammasome et la pyroptose

À ce jour, plus de 22 NLR ont été identifiés (Schroder *et al.*, 2010). Ces récepteurs partagent plusieurs domaines similaires. Le NLRP-3 est le NLR le mieux caractérisé. Il comprend 3 domaines, soit une portion N-terminal permettant les interactions protéines-protéines avec un domaine pyrine (PYD) ou un domaine de recrutement des caspases (CARD), un domaine central de liaison et de dimérisation aux nucléotides (NOD) et un domaine C-terminal permettant la liaison spécifique aux agonistes de type *leucine-rich repeats* (LRR). La figure suivante illustre les structures des principaux NLR.

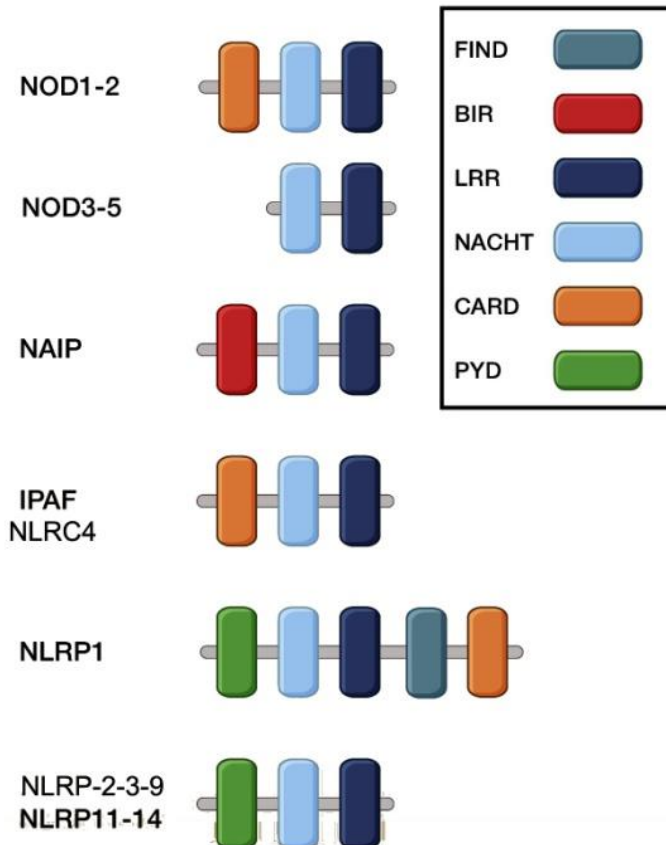


Figure 7: Schématisation des domaines structuraux des principaux NLR

Domaine FIND: domaine avec fonction inconnue. Domaine BIR: *baculoviral inhibition of apoptosis protein repeat*. Domaine LRR: *Leucine-rich repeat*. Domaine NACHT: *Nucleotide-binding and oligomerization domain*. Domaine CARD: *Caspase recruitment domain*. Domaine PYD: domaine pyrine

Modifiée de (Schroder *et al.*, 2010)

Au contact de certains stimuli spécifiques, les NLR forment un complexe multiprotéique appelé inflammasome qui permet le recrutement direct de la caspase-1 ou indirect via la protéine adaptatrice *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) (Martinon *et al.*, 2002). À la suite de la stimulation de l'inflammasome, qui est spécifique à chacun des NLR, les protéines ASC s'agrègent et forment de larges structures appelées pyroptosomes. Cette structure permet le recrutement et l'activation de la caspase-1. L'activation de la caspase-1 comprend le clivage des deux domaines p20 et p10. Ceux-ci possèdent plusieurs substrats qui sont requis pour l'induction de la réponse inflammatoire. La caspase-1 permet, entre autres, la conversion de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-18 en IL-1 β et IL-18 mature respectivement, en plus de participer à leur sécrétion dans le milieu extracellulaire (Thornberry *et al.*, 1992). La caspase-

1 est également essentielle dans la libération de plusieurs molécules pro-inflammatoires comme l'IL-1 α (Keller *et al.*, 2008). En plus de ces effets pro-inflammatoires, l'activation de la caspase-1 mène à une forme de mort appelée pyroptose qui partage certaines des propriétés de l'apoptose et de la nécrose (Labbe *et al.*, 2008). Une synthèse des principales caractéristiques de ce type de mort a été présentée précédemment (**Tableau 6**).

3.2 La régulation des inflammasomes

La régulation des inflammasomes est contrôlée de façon très serrée par différentes étapes. Il est d'abord important de comprendre que l'activation de l'inflammasome dépend de deux signaux clés. Le premier signal consiste au «*priming*» de l'inflammasome qui s'effectue par un contrôle transcriptionnel des composantes (NLR) et des cytokines impliquées (pro-IL-1 β). Cette étape est généralement régulée par la signalisation de certaines cytokines ou certains PRR (via les TLR) et ce, sous le contrôle du facteur de transcription NF- κ B. Concrètement, le premier signal induit, entre autres, la synthèse de pro-IL-1 β et de pro-IL-18. Le deuxième signal entraîne l'activation, à proprement dit, de l'inflammasome. Ce signal correspond généralement à la liaison du ligand avec la portion LRR du NLR (**Figure 8**). En plus du contrôle via ces deux signaux, plusieurs autres molécules jouent un rôle dans la régulation de l'inflammasome. C'est le cas de la caspase-4 (Sollberger *et al.*, 2012), 5 (X. Y. Lin *et al.*, 2000) et de la caspase-11 (S. Wang *et al.*, 1998b) qui sont requises pour l'activation de la caspase-1 dans certains contextes spécifiques. La régulation des inflammasomes est essentielle au développement d'une réponse immunitaire adéquate. Ainsi, la dérégulation ou des mutations génétiques dans les gènes encodant les différentes structures des inflammasomes sont associées à des désordres génétiques incluant différents syndromes auto-inflammatoires comme la fièvre familiale méditerranéenne (FFM) ou le syndrome Muckle-Wells (Rodrigue-Gervais *et al.*, 2010).

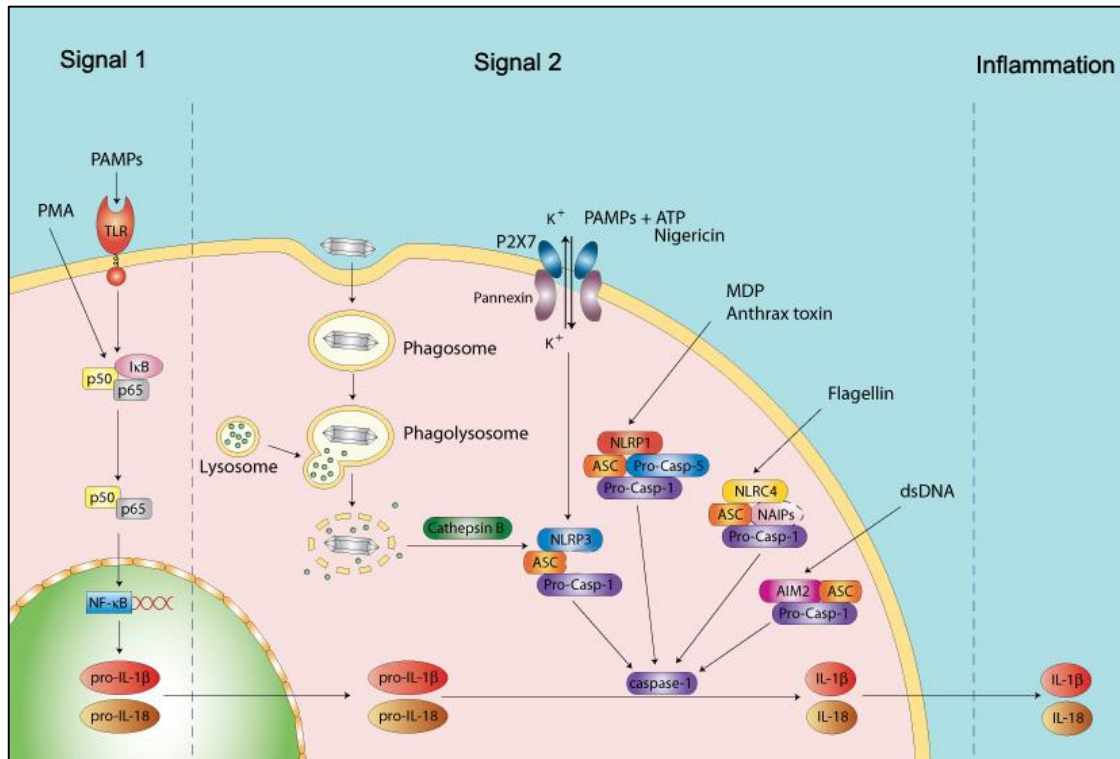


Figure 8: Modèle de régulation et d'activation des inflammasomes via les deux principaux signaux. La régulation des inflammasomes s'effectue à deux niveaux. Un premier signal, provenant généralement de la liaison d'un ligand des TLR, engendre la translocation de facteur de transcription tel que NF-κB, qui régule la transcription des gènes de l'IL-1β. L'IL-1β, synthétisé sous une proforme (pro-IL-1β). La proforme est clivée et sécrétée dans le milieu extracellulaire par l'activation de l'inflammasome via la caspase-1. Ce signal provient généralement d'un deuxième signal, comme l'ATP ou la nigréicine, qui induisent un important efflux de potassium. On assiste alors à l'activation de l'inflammasome qui est caractérisée par la formation du complexe protéique formé du récepteur NLR, de la protéine adaptatrice ASC et de la caspase-1.

Modifiée de (InVivogen, 2013)

3.3 Les activateurs des inflammasomes

Un très large spectre d'agents activent les différents inflammasomes. L'activation des inflammasomes est engendrée par la liaison de certains motifs spécifiques à chacun des NLR. Par exemple, l'inflammasome NLRC4 reconnaît la flagelline qu'on retrouve sur plusieurs pathogènes bactériens. Un résumé des principaux inflammasomes ainsi que leurs agonistes sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 7: Principaux pathogènes connus pour activer les inflammasomes

Inspiré de (Skeldon *et al.*, 2011)

Pathogènes	Inflammasomes	Activateurs	Références
Bactéries			
<i>Salmonella enterica</i>	NLRC4	Flagellin, PrgJ, SopE	(Hersh <i>et al.</i> , 1999, Mariathasan <i>et al.</i> , 2004)
<i>Legionella pneumophila</i>	NLRC4	Flagellin	(Broz <i>et al.</i> , 2010, Miao <i>et al.</i> , 2006)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	NLRP3	ESAT-6, Ag85	(Juffermans <i>et al.</i> , 2000)
<i>Listeria monocytogenes</i>	NLRC4	Flagellin	(Tsuji <i>et al.</i> , 2004)
<i>Francisella tularensis</i>	NLRP3, AIM2	LLO, ADN	(Mariathasan <i>et al.</i> , 2005)
<i>Bacillus anthracis</i>	NLRP1	Toxine létale, muramyl-dipeptide	(Boyden <i>et al.</i> , 2006)
Champignons			
<i>Candida albicans</i>	NLRP3	?	(Hise <i>et al.</i> , 2009)
Protozoaires			
<i>Plasmodium</i>	NLRP3	Hemozoïne	(Dostert <i>et al.</i> , 2009, Shio <i>et al.</i> , 2009)
Virus			
Influenza	NLRP3	Canaux d'ions M2, ssRNA	(Kanneganti <i>et al.</i> , 2006a, Kanneganti <i>et al.</i> , 2006b)
Virus de la stomatite vésiculaire (VSV)	RIG-I	ARN 5' triphosphate	(Nakhaei <i>et al.</i> , 2009)
CMV	AIM2	ADN	(Rathinam <i>et al.</i> , 2010)
Virus de la vaccine	AIM2	ADN	(Johnston <i>et al.</i> , 2005)

En plus des motifs bactériens et viraux, d'autres signaux comme certains DAMP sont connus pour activer les inflammasomes. On retrouve l'adénosine triphosphate (ATP) (Mariathasan *et al.*, 2006), des toxines, les radiations UV, les cristaux d'urate (Martinon *et al.*, 2006) ainsi que l'amiante et la silice (Dostert *et al.*, 2008). Tous ces agents sont connus pour activer l'inflammasome NLRP-3. Contrairement à l'inflammasome NLRP-3, les autres inflammasomes ont des activateurs plus spécifiques jouant des rôles de premier plan dans la résistance aux pathogènes.

3.4 Fonctions des inflammasomes dans l'immunité

Plusieurs parasites intracellulaires sont capables de résister aux agents microbicides des phagocytes et de persister à l'intérieur de la cellule. Ces pathogènes évitent ainsi la reconnaissance par le système immunitaire, réduisant leur exposition aux agents microbicides ainsi que leur opsonisation par les anticorps ou les protéines du complément. Ces parasites profitent de cette situation pour se répliquer à l'intérieur des cellules. L'organisme humain a donc évolué de manière à empêcher la réplication de ces pathogènes. L'activation des inflammasomes et la mort cellulaire par pyroptose sont parmi les moyens utilisés par le système immunitaire pour contrer les pathogènes (Skeldon *et al.*, 2011).

Le pathogène *Salmonella enterica* est le parasite bactérien intracellulaire le mieux caractérisé et son étude a permis d'élucider le rôle des inflammasomes dans la résistance aux pathogènes. Ce pathogène induit une mort cellulaire dépendante de la caspase-1 dans les macrophages (Hersh *et al.*, 1999). En utilisant des souris caspase-1 KO, une autre équipe a permis de déterminer que la mort cellulaire dépendante de la caspase-1 avait un rôle essentiel dans la survie des souris infectées par le pathogène (Lara-Tejero *et al.*, 2006, Raupach *et al.*, 2006). En plus du rôle essentiel de la caspase-1 dans la sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-18, la mort des macrophages par pyroptose induit la formation de pore dans la cellule qui libère le pathogène dans le milieu extracellulaire favorisant ainsi son exposition aux autres phagocytes et aux produits microbicides (Miao *et al.*, 2010). De la même façon, la pyroptose induite par la caspase-1 est un facteur déterminant dans le développement d'une réponse contre plusieurs virus dont influenza (Stasakova *et al.*, 2005). De plus, la revue de Skeldon *et al.* a rapporté des rôles similaires pour tous les types de parasites et pour tous les inflammasomes connus (Skeldon *et al.*, 2011)).

Le rôle des inflammasomes semble donc favorable à l'élimination de parasites intra et extracellulaire en éliminant, entre autres, leur niche répliquative. La découverte de plusieurs protéines bactériennes qui inhibent l'activation des inflammasomes comme ExoU de *Pseudomonas aeruginosa* (Sutterwala *et al.*, 2007) ou zmp1 de *Mycobacterium tuberculosis* (Master *et al.*, 2008), témoigne de l'importance des inflammasomes dans le processus immunitaire.

CHAPITRE 4: La voie NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B a été découvert en 1986 comme un facteur nucléaire s'associant avec l'élément de réponse de la chaîne légère de l'immunoglobuline Kappa des lymphocytes B (Sen *et al.*, 1986). Les multiples études qui ont suivi ce premier article ont révélé que ce facteur, qui possède plusieurs sites de liaison à l'ADN, était exprimé dans presque tous les types cellulaires et régulait une panoplie de gènes cibles (Hayden *et al.*, 2012). NF- κ B est aujourd'hui l'un des facteurs de transcription les plus étudiés. Il demeure un élément d'importance capitale dans la régulation de l'immunité innée et adaptative. Les perturbations associées avec ce facteur de transcription contribuent à la pathogenèse de maladies inflammatoires chroniques et de maladies auto-immunes. Paradoxalement, NF- κ B joue un rôle de premier plan dans le développement de la tolérance immunitaire, tant au niveau de la tolérance centrale qu'au niveau de la tolérance périphérique. Les conséquences de la perturbation de ce facteur de transcription illustrent l'importance du contrôle efficace de la signalisation de NF- κ B. Ce chapitre résume les fonctions et la régulation principalement de la voie classique de NF- κ B dans l'immunité.

4.1 Les membres de la famille NF- κ B

La famille de facteurs de transcription NF- κ B contient cinq membres: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50) et NF- κ B2 (p52). Les sous-unités NF- κ B1 et NF- κ B2 sont synthétisées sous les proformes p105 et p100, respectivement. Ces deux proformes sont ensuite clivées sur leur portion C-terminale par le protéasome pour former p50 et p52.

Les membres de cette famille possèdent tous un domaine *Rel homology domain* (RHD), qui est essentiel à leur association avec les domaines cibles à l'ADN et à leur dimérisation. En effet, les protéines NF- κ B forment, entre elles, divers homo et hétérodimères. L'activité transcriptionnelle de NF- κ B est régulée principalement par deux voies principales. La voie d'activation canonique, ou classique, est contrôlée principalement par les dimères RelA/p50 (Hayden *et al.*, 2008). La deuxième voie, appelée voie d'activation alternative, s'applique généralement aux dimères RelB/p52 (Razani *et al.*, 2011).

Les dimères sont généralement séquestrés au niveau du cytoplasme via l'interaction avec les protéines de la famille d'inhibiteurs de NF- κ B (I κ B) et transloquent au niveau nucléaire en réponse à différents stimuli, les plus connus étant le LPS, le TNF- α et l'IL-1. La famille I κ B est caractérisée par des répétitions de type ankyrine. Cette répétition lui confère une capacité d'association avec le domaine de liaison à l'ADN des facteurs de transcription NF- κ B. Conséquemment, NF- κ B demeure inactif via l'association de cette protéine inhibitrice. Il est intéressant de noter que les différentes combinaisons de dimères possèdent également différents sites préférentiels de liaisons à l'ADN. Ainsi, diverses combinaisons de dimères induisent la transcription de gènes cibles différents. Cette propriété confère à NF- κ B un rôle de premier plan dans le contrôle d'une variété d'activités cellulaires (Wong *et al.*, 2011). Il est à noter que RelA, RelB et c-Rel possèdent tous des domaines de transactivation en portion C-terminale qui leur confèrent des propriétés transcriptionnelles. À l'inverse, p50 et p52 ne possèdent pas ce domaine. Les dimères formés de ces deux protéines agissent ainsi en tant que répresseurs transcriptionnels (Hayden *et al.*, 2012). Par contre, lorsque p50 ou p52 s'associe avec RelA ou RelB, ils constituent des activateurs transcriptionnels. RelA et p50 sont ubiquitaires et les dimères formés de ces deux unités constituent la forme la plus commune associée à l'ADN. À l'inverse, p52, Rel-B et c-Rel sont exprimées préférentiellement dans les cellules et les tissus lymphoïdes.

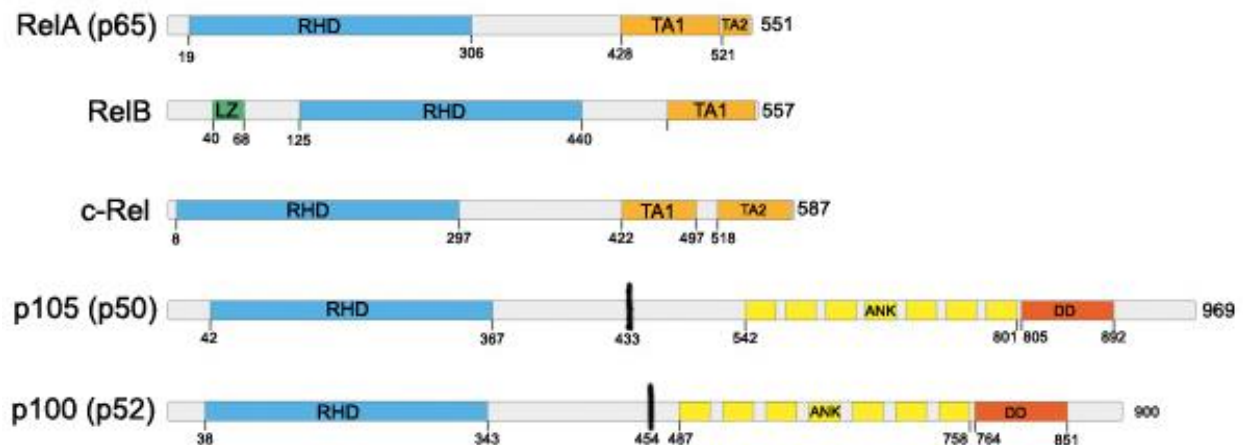


Figure 9: Membres de la voie signalétique NF- κ B. Rel-Homology Domain (RHD), Transactivation Domain (TA), Leucine-Zipper-like motif (LZ), Ankyrin repeats (ANK), Death Domain (DD)

Modifiée de (Hoesel *et al.*, 2013)

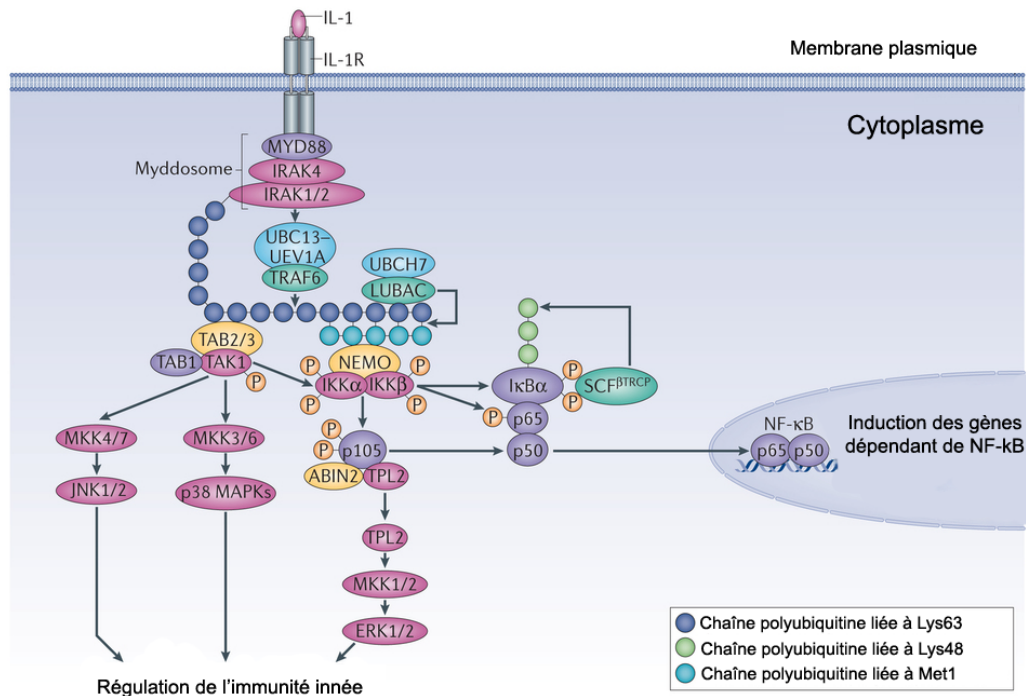
4.2 Le complexe de kinase I κ B

L'engagement de l'IL-1R, de TNF-R ou encore du TLR-4, provoque le recrutement de la protéine *Myeloid Differentiation Primary Response* (MyD88) en s'associant avec le domaine *Toll-IL-1 Receptor Resistance* (TIR). MyD88 est requise pour la signalisation du récepteur de l'IL-1 et du TNF-R ainsi que de presque tous les TLR (O'Neill *et al.*, 2007) puisqu'elle contient des domaines de mort (DD) permettant le recrutement des *IL-1 Receptor Associated Kinase* (IRAK) -1, -2 et -4. La structure formée de ces différentes protéines est appelée myddosome (Gay *et al.*, 2011). Elle permet l'activation des voies signalétiques en aval qui contrôlent l'activation de NF- κ B via le clivage de la protéine inhibitrice I κ B- α . Sa dégradation est assurée par le protéasome 26S où la polyubiquitination est une étape requise à cette dégradation. La lysine 48 est le site principal d'ubiquitination et cette réaction est catalysée par une ligase de type E (Tan *et al.*, 1999). L'ubiquitination par cette ligase requiert une double phosphorylation du substrat qui agit en tant que site de reconnaissance (K. Wu *et al.*, 2000). Le complexe de kinases I κ B (complexe IKK) contrôle la phosphorylation de ce site. Le complexe IKK est formé de deux protéines catalytiques, IKK α et IKK β , ainsi que d'une protéine régulatrice non catalytique, IKK γ (aussi appelée NEMO) (Ghosh *et al.*, 2008, Hayden *et al.*, 2008). L'activation de ce complexe IKK est elle-même régulée par des événements de phosphorylation dépendante des différentes kinases en amont (Delhase *et al.*, 1999) ou même de transphosphorylation par d'autres composantes du complexe (J. A. Schmid *et al.*, 2008). Plusieurs kinases sont maintenant connues pour activer le complexe IKK. On parle notamment de *NF- κ B Inducing Kinase* (NIK) qui phosphoryle IKK α , de MEKK1, de MEKK2, de MEKK3 et de TAK1 qui phosphoryle IKK β (Ling *et al.*, 1998, Malinin *et al.*, 1997, Nakano *et al.*, 1998, Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999).

4.3 Régulation de NF- κ B

Étant donné son importance dans la physiologie cellulaire, plusieurs mécanismes de régulation existent afin de contrôler efficacement NF- κ B. Outre les événements de phosphorylation du complexe IKK mentionnés précédemment, on observe une régulation à plusieurs autres niveaux comme la boucle de rétroaction I κ B- α , l'ubiquitination ainsi que les microARN (miARN).

Un des mécanismes fondamentaux de ce facteur de transcription est sa boucle d'inhibition régulée I κ B- α . À la suite de sa dégradation par le protéasome, I κ B- α est rapidement resynthétisé par la translocation de NF- κ B lui-même. On suppose que cette régulation permet d'éviter une translocation et une transcription de gènes inflammatoires excessives. L'importance de cette boucle de rétroaction négative a récemment été mise en évidence par l'utilisation d'un modèle ingénieux de souris I κ B- α *Knock-in* dans lesquelles on retrouve un site de liaison à NF- κ B muté dans le site du promoteur du gène d'I κ B- α . Ces souris sont évidemment incapables de synthétiser des niveaux basaux d'I κ B- α , provoquant une activation incontrôlée de NF- κ B. Or, ces souris développent spontanément une auto-immunité avec des symptômes s'apparentant au syndrome de Sjögren.



Modifiée de (K. Clark et al., 2013)

4.3.2 L'ubiquitination

L'ubiquitination représente un mécanisme de régulation centrale dans la signalisation de NF- κ B (J. Chen *et al.*, 2013, K. Clark *et al.*, 2013). Les premières études sur le rôle de l'ubiquitination ont permis de révéler que la polyubiquitination de la lysine 48 était cruciale dans la dégradation d'I κ B- α (Z. J. Chen *et al.*, 1996). D'autres études ont permis de mettre en évidence que l'ubiquitination d'autres résidus lysine, comme la lysine 63, régulait le complexe IKK et l'activation de NF- κ B par le fait même (C. J. Wu *et al.*, 2006). NEMO est également régulée par une chaîne d'ubiquitine liée à la méthionine-1 (Rahighi *et al.*, 2009). En effet, l'interaction de NEMO avec cette chaîne provoque un réarrangement nécessaire à la translocation du signal nécessaire à l'activation de NF- κ B (Y. C. Lo *et al.*, 2009). De plus, des mutations dans ce site d'ubiquitination affectent l'activation du complexe IKK (Ea *et al.*, 2006). La figure 10 illustre le rôle de l'ubiquitination dans le contrôle de la voie NF- κ B.

4.3.3 Les autres modifications post-traductionnelles

Outre la poly-ubiquitination, plusieurs autres modifications post-traductionnelles participent activement à la régulation du facteur de transcription NF- κ B. La phosphorylation des résidus sérines/thréonines de la protéine RelA est d'ailleurs une étape importante de cette régulation (Baeuerle *et al.*, 1996). Les enzymes protéine kinase A (PKA) ainsi que *mitogen- and stress-activated protein kinase-1* (MSK-1) sont, entre autres, responsable de la phosphorylation de RelA, régulant ainsi l'activation de NF- κ B (Jamaluddin *et al.*, 2007, Zhong *et al.*, 1997). Plusieurs autres sites de phosphorylation par d'autres kinases sont présents sur la protéine Rel-A. Ces sites sont revus en détail par Huang *et al.* (Huang *et al.*, 2010).

L'acétylation de RelA est également une étape important de la régulation de NF- κ B. Sept lysines ont été identifiées sur la séquence protéique de Rel-A. Elles sont acétylées par p300/CBP ou encore par la protéine PCAF (Kiernan *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter que l'acétylation de RelA module différentes fonctions du facteur de transcription. En effet, certaines acétylations augmentent la liaison de NF- κ B avec l'ADN alors que d'autres contribuent à la dissociation du complexe RelA-I κ B (L. F. Chen *et al.*, 2002). Enfin, la méthylation est une autre modification post-traductionnelle jouant un rôle clé dans la régulation de RelA (Hayden *et al.*, 2008).

4.3.4 Les miARN

Les miARN ont récemment été découverts comme des régulateurs importants de l'expression génique en régulant les niveaux d'ARNm cibles (Guo *et al.*, 2010). Il n'est donc pas surprenant de constater l'implication de ces ARN dans la régulation de l'activation de NF- κ B (O'Neill *et al.*, 2011). De récentes études révèlent que les miARN sont synthétisés à la suite de la translocation de NF- κ B par la signalisation dépendante des TLR. Par exemple, le miARN miR-9, qui est synthétisé par les agonistes des TLR, cible directement l'ARNm de p50 (Bazzoni *et al.*, 2009). On suppose ainsi que les miARN réguleraient la force, la localisation et la durée de la réponse aux TLR. Ils participeraient également au passage de la réponse pro-inflammatoire à la réponse anti-inflammatoire, une étape critique dans la résolution de l'inflammation (Guo *et al.*, 2010).

4.4 NF- κ B dans l'immunité innée et acquise

NF- κ B contrôle plusieurs fonctions clés de l'immunité comme l'apoptose, l'architecture et l'homéostasie des tissus lymphoïdes, la sécrétion de cytokines et chimiokines ainsi que l'activation des lymphocytes B et T (Bonizzi *et al.*, 2004). Le rôle clé de NF- κ B dans ces fonctions témoigne de son importance dans l'immunité innée et adaptative. De plus, plusieurs dizaines, voire centaines, de pathogènes sont connus pour activer directement ou indirectement NF- κ B, suggérant un rôle de premier plan de ce facteur dans l'immunité. Les prochaines lignes dressent un bref portrait des rôles connus de NF- κ B dans l'immunité innée et adaptative.

4.4.1 Fonctions pro et anti-apoptotiques de NF- κ B

L'activation de NF- κ B est fortement associée à l'inhibition de l'apoptose (Beg *et al.*, 1996, Van Antwerp *et al.*, 1996). En effet, NF- κ B régule l'expression de gènes anti-apoptotiques comme TRAF1, TRAF2, c-IAP1 ainsi que plusieurs protéines de la famille Bcl- χ_L (Khoshnan *et al.*, 2000, C. Y. Wang *et al.*, 1998a). L'utilisation de cellules déficientes en RelA et de souris déficientes en NF- κ B1 a permis de mettre en évidence le rôle crucial de NF- κ B dans l'apoptose. Ainsi, les fibroblastes RelA $-/-$ sont plus susceptibles à l'induction de l'apoptose par le TNF- α . De plus, les

souris RelA $-/-$ meurent au stade embryonnaire à cause de l'apoptose induite par le TNF- α au niveau du foie (Beg *et al.*, 1995).

Bien que l'activation de NF- κ B fut longtemps associée à l'inhibition de l'apoptose, plusieurs études ont démontré un rôle pro-apoptotique de ce facteur de transcription (Kasibhatla *et al.*, 1999). Par exemple, NF- κ B joue un rôle important dans l'apoptose dépendante de p53 (Ryan *et al.*, 2000). De plus, la surexpression de p65/RelA provoque la mort spontanée de mélanome M14 et de cellules cancéreuses du sein MCF7, démontrant ainsi un rôle pro-apoptotique de NF- κ B dans certains types de cancer (Ricca *et al.*, 2001). Plusieurs autres rôles pro-apoptotiques de NF- κ B sont revus par Radhakrishnan et Kamalakaran (Radhakrishnan *et al.*, 2006). Toutes les études sur les rôles pro- et anti-apoptotiques de NF- κ B impliquent un réseau signalétique complexe et sa contribution en tant que facteur pro- ou anti-apoptotique n'est pas claire.

4.4.2 Rôle dans la production de cytokines/chimiokines

Le facteur de transcription NF- κ B contrôle l'expression de plusieurs centaines de gènes cibles (Pahl, 1999). De plus, la grande majorité de ces gènes joue un rôle directement ou indirectement dans la réponse immunitaire. Parmi ceux-ci, on retrouve les protéines impliquées dans la présentation antigénique, comme les molécules du CMH et plusieurs cytokines et chimiokines. En fait, on retrouve 27 différentes cytokines et chimiokines sous le contrôle de NF- κ B dont, entre autres, l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- α (Ghosh *et al.*, 2008, Hayden *et al.*, 2008, Pahl, 1999). La production de ces cytokines est associée à la résistance et au développement de l'immunité contre une panoplie de pathogènes (J. Caamano *et al.*, 2002). Ces cytokines et chimiokines participent activement à la réponse immunitaire innée et adaptative soulignant, par le fait même, l'importance de NF- κ B dans l'immunité.

4.4.3 Développement et homéostasie des tissus

L'utilisation de souris déficientes dans certaines composantes de NF- κ B a permis de constater le rôle de ce facteur de transcription dans le développement des différents types cellulaires et tissus lymphoïdes. Le transfert adoptif de cellules RelA $-/-$ et c-Rel $-/-$ dans des souris WT irradiées mène à une granulopoïèse dérégulée (Grigoriadis *et al.*, 1996). RelB possède

également un rôle crucial dans le développement des cellules dendritiques (Neumann *et al.*, 2000, Rescigno *et al.*, 1998) ainsi que dans la maturation des lymphocytes B (J. H. Caamano *et al.*, 1998, Franzoso *et al.*, 1998).

En plus de son rôle dans le développement de cellules immunitaires, NF- κ B participe activement au développement de l'architecture des tissus lymphoïdes. Les souris déficientes en RelB sont caractérisées par une augmentation du volume de la rate ainsi que des défauts majeurs dans la structure des centres germinatifs (D. S. Weih *et al.*, 2001, F. Weih *et al.*, 1995). De plus, RelA est important dans le développement des plaques de Peyer's et des noyaux lymphatiques (Alcamo *et al.*, 2002). Les fonctions des autres constituants de la voie NF- κ B dans le développement et l'homéostasie des tissus est revue en détail par Caamano *et al.* (J. Caamano *et al.*, 2002).

4.5 Rôle de NF- κ B dans l'inflammation et le cancer

L'inflammation est associée à l'activation de la voie canonique de NF- κ B et avec le développement de cancers, suggérant un lien direct entre NF- κ B et la cancérogénèse (Ben-Neriah *et al.*, 2011). Le rôle de NF- κ B paraît cependant plutôt paradoxal puisque d'une part, l'activation de NF- κ B joue un rôle critique dans le développement de l'immunité et dans l'élimination de cellules transformées cancéreuses (Disis, 2010). En effet, l'immunosurveillance tumorale à laquelle participe activement NF- κ B joue un rôle prépondérant dans l'élimination de cellules tumorales (Smyth *et al.*, 2006). D'autre part, on associe maintenant l'augmentation de l'expression de NF- κ B avec le développement de plusieurs cancers. Par conséquent, l'immunosurveillance n'est visiblement pas suffisante pour l'élimination des cellules aberrantes et favorise parfois l'édition des cellules tumorales, soit la sélection de cellules échappant à la surveillance immune. Ces étapes d'édition des cellules résistantes sont caractérisées par des conditions inflammatoires chroniques avec des niveaux élevés d'expression de NF- κ B, suggérant un rôle important pour ce dernier dans la croissance de tumeurs résistantes à la surveillance immune (Dunn *et al.*, 2004). De plus, NF- κ B joue un rôle de premier plan dans le contrôle du cycle cellulaire puisqu'il contrôle l'expression des cyclines D1 (Guttridge *et al.*, 1999) et l'expression de plusieurs oncogènes connus comme c-Myc (La Rosa *et al.*, 1994). On associe aussi à NF- κ B l'expression de plusieurs facteurs favorisant la progression de tumeurs, comme les MMP (Huber *et al.*, 2004) qui favorisent le réarrangement de la matrice

extracellulaire, ou encore des facteurs d'angiogenèse comme le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Xie *et al.*, 2010). Plusieurs excellentes revues sur NF- κ B expliquent en détail les liens de ce facteur de transcription avec le développement de cancers (Ben-Neriah *et al.*, 2011, Hoesel *et al.*, 2013) ainsi que son rôle potentiel pro-apoptotique à exploiter dans le traitement contre le cancer (Radhakrishnan *et al.*, 2006).

4.6 Rôle de NF- κ B dans l'auto-immunité

L'auto-immunité est définie comme une réaction immunitaire contre des antigènes du soi. Cette réaction immunitaire mène à l'inflammation chronique et à la destruction de tissus (Theofilopoulos, 1995). NF- κ B demeure, encore à ce jour, le facteur de transcription le plus étudié. Son étude a permis d'associer son expression au développement de plusieurs maladies auto-immunes. Parmi celles-ci, on retrouve l'arthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux, le diabète de type I, la sclérose en plaques ainsi que les maladies inflammatoires de l'intestin (MII) (Pai *et al.*, 2008). Un des rôles connus de ce facteur de transcription est évidemment sa contribution comme inducteur de cytokines et chimiokines inflammatoires. De plus, NF- κ B favorise les réactions auto-immunes médiées par les LT en modulant les fonctions des cellules dendritiques (DC).

4.6.1 La régulation des fonctions des lymphocytes T et des cellules dendritiques

Les cytokines inflammatoires contribuent au recrutement et à l'activation des cellules immunitaires telles que les LT et les DC. NF- κ B joue un rôle crucial dans la régulation des LT en contrôlant la signalisation des récepteurs de cellules T (TCR). En effet, la dérégulation de NF- κ B est associée avec une perturbation de l'homéostasie des cellules T et une auto-immunité systémique dépendante des LT CD8⁺ (M. Chang *et al.*, 2011, B. Peng *et al.*, 2010). NF- κ B contrôle également la différenciation des LT CD4⁺, en particulier les cellules Th17. On attribue à ces dernières un rôle central dans la pathogenèse de plusieurs désordres inflammatoires (Dong, 2008). La voie alternative de NF- κ B possède aussi une fonction dans la physiologie des LT, où elle participe à la tolérance immunitaire. Dans un modèle de greffon contre l'hôte (GVH),

les souris déficientes en NIK sont tolérantes à cette réaction immunitaire alors qu'une surexpression de NIK provoque une auto-immunité létale (S. E. Murray *et al.*, 2011).

NF- κ B demeure le facteur de transcription principal dans la sécrétion de cytokines inflammatoires. De plus, les DC sont les principales cellules présentatrices d'antigènes. Par conséquent, en considérant l'implication de cytokines inflammatoires dans la maturation des DC, il n'est pas surprenant de constater un rôle important pour NF- κ B dans la maturation des DC. La dérégulation de NF- κ B chez les DC est d'ailleurs associée au développement d'une réponse auto-immune dans différents modèles murins (G. E. Hammer *et al.*, 2011, Kool *et al.*, 2011). Sun *et al.* expliquent en détail le rôle de NF- κ B dans la tolérance centrale et périphérique ainsi que son implication des sous-types cellulaires comme les LT et les DC (Sun *et al.*, 2013).

CHAPITRE 5: Les protéines S100A8 et S100A9

Les protéines S100A8 et S100A9 font partie de la grande famille des protéines S100, regroupant 21 membres. Elles forment également, avec la protéine S100A12, une sous-famille de protéines appelée *Myeloid-Related Protein* (MRP) ou calgranulines. Ces dernières possèdent d'importantes fonctions pro-inflammatoires et sont impliquées dans la régulation des fonctions de plusieurs types cellulaires. Ce chapitre résume les principales fonctions de ces protéines ainsi que leur implication dans les maladies inflammatoires.

5.1 Généralités

S100A8 et S100A9 représentent plus de 30% des protéines cytosoliques totales du neutrophile (Hessian *et al.*, 1993) et constituent des niveaux inférieurs à 5% chez les monocytes. Bien qu'elles soient majoritairement localisées au niveau du cytosol, on retrouve ces protéines dans différentes fractions du neutrophile, soit dans les granules et au niveau de la membrane plasmique (Stroncek *et al.*, 2005). Chez l'humain, on retrouve deux isoformes de S100A9, soit la forme longue et la forme tronquée. Cette dernière représente 30% des protéines S100A9 chez le neutrophile et est produite par la présence d'un site de traduction alternatif présent au niveau de la méthionine 5 (Lim *et al.*, 2010). Les calgranulines sont également exprimées faiblement dans d'autres types cellulaires à la suite d'une stimulation à divers agents (Thorey *et al.*, 2001). Leur expression a été retrouvée dans les macrophages, les DC, les cellules myéloïdes suppressives de tumeurs, les cellules endothéliales et épithéliales, les ostéoclastes, les chondrocytes, les kératinocytes et les synoviocytes (Bando *et al.*, 2010, Endoh *et al.*, 2009, Hsu *et al.*, 2005, Lood *et al.*, 2011, Sinha *et al.*, 2008, Xu *et al.*, 2001, Yen *et al.*, 1997, Zreiqat *et al.*, 2010).

5.1.1 Nomenclatures

S100A8 et S100A9 ont été identifiées dans plusieurs études différentes, et ce, pratiquement au même moment. Ceci explique donc l'émergence de plusieurs appellations pour la même protéine (Hessian *et al.*, 1993). La nomenclature généralement utilisée pour S100A8 est hS100A8, A8, MRP-8 ou Calgranuline A chez l'humain, et CP-10 ou mS100A8 chez la souris (Ravasi *et al.*, 2004). S100A9 est également appelé MRP-14, A9 ou Calgranuline B. Le dimère formé de S100A8 et S100A9 (S100A8/A9) est connu sous le nom de calprotectine.

5.1.2 Structure des protéines S100A8 et S100A9

Le gène des protéines S100 contient 21 membres qui sont pour la majorité localisés sur le chromosome 1q21.3 chez l'humain et leur structure est généralement conservée au cours de l'évolution (Ravasi *et al.*, 2004). Elles possèdent un domaine *EF-hand* typique et un second domaine atypique. Ces deux domaines de type *EF-hand* confèrent à ces protéines une capacité de lier les ions divalents avec une affinité particulière pour le Ca^{2+} . Cette propriété leur confère des fonctions importantes pour la physiologie de plusieurs types cellulaires, dont le neutrophile. Les deux domaines de type EF-hand des protéines S100 sont liés par la présence d'une région charnière. Cette région charnière confère, avec la portion C-terminal, est unique à chacune des protéines S100, leur conférant ainsi des particularités propres (Kligman *et al.*, 1988).

S100A8 et S100A9 sont deux protéines hydrophobes ne possédant pas d'ancrage membranaire. L'analyse de structure par cristallographie aux rayons X des protéines S100A8 et S100A9 révèle des structures secondaires très similaires. Cette structure leur confère la possibilité de former des homodimères en absence de calcium. La présence de calcium provoque un réarrangement dans la structure de ces deux protéines et favorise la formation d'oligotétramères S100A8/S100A9 (Vogl *et al.*, 2006). L'hétérodimérisation engendre la stabilisation de S100A9, ce qui permet l'exposition de deux sites de liaisons au Zn^{2+} (Korndorfer *et al.*, 2007). Cette caractéristique pourrait s'avérer importante pour leurs fonctions antimicrobiennes qui seront discutées plus loin.

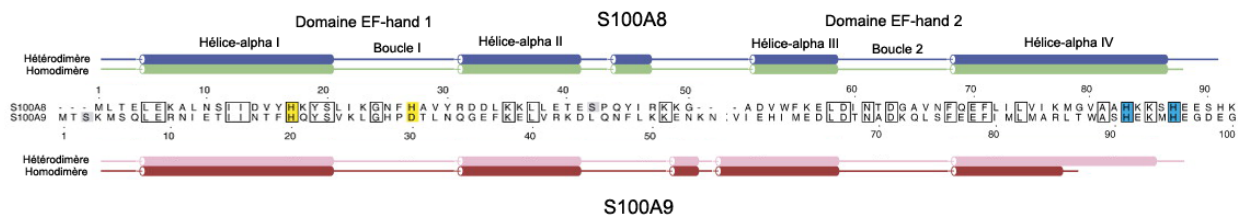


Figure 11: Structure primaire et secondaire des protéines S100A8 et S100A9. Les résidus conservés sont encadrés. Le domaine EF-hand 1 comprend l'hélice I (résidus 4-20 dans S100A8 et résidus 7-23 dans S100A9), la boucle 1 de liaison au calcium (résidus 21-30 dans S100A8 et 34-44 dans S100A9). Le domaine EF-hand 1 comprend l'hélice I (résidus 4-20 dans S100A8 et résidus 7-23 dans S100A9), la boucle 1 non canonique de liaison au calcium (résidus 21-30 dans S100A8 et 24-33 dans S100A9) et l'hélice II (résidus 31-41 dans S100A8 et résidus 34-44 dans S100A9). Le domaine EF-hand 2 comprend l'hélice III (résidus 51-58 dans S100A8 et résidus 56-66 dans S100A9), la boucle 1 canonique de liaison au calcium (résidus 59-67 dans S100A8 et 67-75 dans S100A9) et l'hélice IV (résidus 68-86 dans S100A8 et résidus 76-94 dans S100A9). Les deux domaines EF-hand sont séparés par des régions charnières de longueurs variables dans les deux protéines (résidus 42-50 dans S100A8 et résidus 45-55 dans S100A9). Les structures secondaires des homo-hétérodimères correspondent aux couleurs bleues et vertes pour S100A8 ainsi que rose et rouge pour S100A9, respectivement. Les deux motifs HXXXH en cyan sont les sites potentiels de liaison au Zn²⁺.

Modifiée de (Korndorfer *et al.*, 2007)

5.2 Mécanismes de sécrétion

Tel que mentionné précédemment, on dénote une présence élevée de S100A8 et S100A9 dans le cytosol des neutrophiles. Ces protéines sont libérées de plusieurs façons dans le milieu extracellulaire. Notamment, puisqu'elles sont présentes dans le cytosol, ces protéines se retrouvent dans le milieu extracellulaire lors de la rupture de la membrane des neutrophiles. De plus, la formation de NET par les neutrophiles mène à la libération d'une quantité importante de S100A8/S100A9 dans le milieu extracellulaire (Urban *et al.*, 2009). La présence accrue de S100A8/S100A9 dans les granules des neutrophiles suggère également qu'elles pourraient être libérées lors du processus de dégranulation des neutrophiles. Plusieurs agents sont connus pour induire la libération de S100A8 et S100A9. Les divers agents qui induisent la formation de NET sont évidemment connus pour induire une libération importante. Les cristaux d'urate, le PMA, le TNF- α , le LTB₄, l'IL-1 β , le zymosan opsonisé ainsi que le LPS provoquent tous la libération d'une quantité importante de S100A8/A9 chez le neutrophile (Eue *et al.*, 2000, Frosch *et al.*, 2000, Kido *et al.*, 2005, Kido *et al.*, 2003, Robinson *et al.*, 2002, Ryckman *et al.*, 2004, Suryono *et al.*, 2003). Le PMA, le GM-CSF, l'IL-1 β et le LPS provoquent aussi la libération de

S100A8/A9 chez les monocytes et macrophages. Il est intéressant de noter que cette libération de S100A8 et S100A9 est régulée à la baisse par certaines cytokines comme l'IL-4 et l'IL-10 (Lugering *et al.*, 1997).

Les mécanismes de sécrétion actifs, impliquant généralement des protéines avec des peptides signaux, ne semblent pas réguler la sécrétion de ces deux protéines puisqu'elles ne possèdent pas de peptide signal. De plus, l'inhibition du trafic vésiculaire à l'interface du Golgi et du réticulum endoplasmique ne renverse pas la sécrétion de S100A8/S100A9 (Rammes *et al.*, 1997, Ryckman *et al.*, 2004). Les mécanismes de sécrétion alternatifs, comme celui retrouvé pour l'IL-1 β dans l'inflammasome, ne semblent pas non plus être impliqués dans leur sécrétion (Rammes *et al.*, 1997). Par contre, plusieurs constituants du cytosquelette de la cellule sont nécessaires à cette sécrétion. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de la polymérisation des microtubules bloque la sécrétion de calprotectine en réponse au PMA et aux cristaux d'urate. De plus, cette sécrétion requiert un réseau de tubuline intacte (Rammes *et al.*, 1997).

L'activation des neutrophiles par certains agents provoque la translocation de S100A8/S100A9 du cytosol vers la membrane plasmique (Bengis-Garber *et al.*, 1993, Guignard *et al.*, 1996, van den Bos *et al.*, 1996). Cette translocation semble être un événement régulé par la phosphorylation de S100A9 par la PKC. La translocation à la membrane plasmique suggère également que S100A8 et S100A9 pourraient transloquer de la membrane plasmique vers le milieu extracellulaire, un mécanisme vu auparavant avec une autre protéine S100 (Matsunaga *et al.*, 2006).

5.3 Les récepteurs

S100A12 fut la première MRP à laquelle est associée le *Receptor for Advanced-Glycation-End product* (RAGE) comme récepteur principal (Hofmann *et al.*, 1999). Des études de résonance plasmonique de surface indiquent qu'en présence de Ca²⁺ ou de Zn²⁺, S100A9 possède une grande affinité pour RAGE alors que S100A8 n'en possède aucune (Bjork *et al.*, 2009). Ces données suggèrent que S100A9 pourrait être le ligand principal de RAGE. Par ailleurs, une étude récente révèle une association du complexe S100A8/A9 avec RAGE dans des cellules cancéreuses du sein (C. G. Yin *et al.*, 2013). Plusieurs autres études ont révélé l'association de S100A8 ou S100A9 avec d'autres récepteurs cellulaires. Les protéoglycans avec des sulfates

héparinés représentent un site de liaison potentiel pour S100A8/A9. En effet, S100A9 possède une forte affinité pour les sulfates d'héparines/héparanes présents à la surface des cellules endothéliales (Robinson *et al.*, 2002). Le récepteur *scavenger* CD36 a également été proposé comme récepteur possible de S100A8/A9 et S100A12 (Hoppmann *et al.*, 2010, Kerkhoff *et al.*, 2001). Enfin, le TLR-4 a récemment été suggéré comme récepteur principal de S100A8, alors que le complexe S100A8/A9 avait une activité réduite (Loser *et al.*, 2010, Vogl *et al.*, 2007). Dernièrement, une étude a démontré que S100A9 se liait avec CD-147 à la surface de mélanome métastatique, ce qui favorisait la production de cytokines inflammatoires et la libération de MMP (Hibino *et al.*, 2013). Les études sur les récepteurs de S100A8 et S100A9 semblent parfois contradictoires, notamment dans le cas du TLR-4, et demandent à être approfondies davantage.

5.4 Rôles intracellulaires

5.4.1 Organisation du réseau de microtubules

Tel que mentionné précédemment, S100A8 et S100A9 s'associent avec le calcium. Ainsi, S100A9 module plusieurs voies signalétiques dépendantes du calcium dans les neutrophiles humains. De plus, l'élévation des niveaux de calcium intracellulaire dans les monocytes et les neutrophiles mène à un changement conformationnel du complexe S100A8/A9 et une phosphorylation de S100A9 par la kinase p38. Cette phosphorylation promeut la dissociation du complexe avec le réseau de microtubules ainsi que la dépolymérisation de ce dernier. S100A8 et S100A9 pourraient donc jouer un rôle important dans la migration transendothéliale puisque la migration des neutrophiles S100A9^{-/-} est compromise (Lominadze *et al.*, 2005, Vogl *et al.*, 2004).

5.4.2 Transport de l'acide arachidonique

En tant que précurseur de plusieurs médiateurs lipidiques, l'acide arachidonique demeure un élément très important dans la physiologie des neutrophiles. S100A8/A9 est un transporteur majeur de l'acide arachidonique et d'acides gras insaturés (Kerkhoff *et al.*, 1999b). L'activation

des neutrophiles induit l'élévation du calcium intracellulaire provoquant la sécrétion de S100A8/A9 liée à l'acide arachidonique dans le milieu extracellulaire. De plus, S100A8/A9 joue un rôle important dans le transport intracellulaire de l'acide arachidonique dans les neutrophiles et les kératinocytes ainsi que son transport au niveau de l'endothélium (Kerkhoff *et al.*, 1999b, Kerkhoff *et al.*, 2001, Siegenthaler *et al.*, 1997, Sopalla *et al.*, 2002).

5.4.3 Régulation de l'activité du complexe NADPH oxydase

S100A8/A9 s'associe avec Rac-2 et p67^{phox} favorisant l'interaction et la stabilisation avec le cytochrome b558 de façon dépendante du calcium. Cette interaction semble favoriser l'activation de la NADPH oxydase (Bouzidi *et al.*, 2004, Doussiere *et al.*, 2001, Doussiere *et al.*, 2002, Kerkhoff *et al.*, 2005) possiblement via l'apport de l'acide arachidonique par S100A8/A9. En effet, des protéines S100A8/A9 mutantes qui n'interagissent plus avec l'acide arachidonique ne possèdent plus la capacité d'activer la NADPH oxydase (Kerkhoff *et al.*, 2005). Alors que la surexpression de S100A8/A9 dans les kératinocytes provoque une augmentation de l'activation de la NADPH oxydase, la réduction des niveaux de S100A9 dans la lignée NB-4 induit une diminution de l'activité de NOX2. Ces deux études supportent donc le rôle de ces protéines dans l'activation de l'enzyme NOX2 (Benedyk *et al.*, 2007, Kerkhoff *et al.*, 2005). La phosphorylation de S100A9 par p38 ainsi que la phospholipase A2 sur la Thr113 semble être essentielle à l'activation de la NADPH oxydase (Lominadze *et al.*, 2005, Schenten *et al.*, 2010). Conséquemment, ces données suggèrent un rôle intracellulaire important de S100A8/A9 dans l'activité de NOX2, qui est essentielle à la destruction des pathogènes. Cette idée est d'ailleurs supportée par une étude récente démontrant que la destruction de pathogènes était régulée, entre autres, par S100A8/A9 (Steinckwich *et al.*, 2011).

5.5 Rôles extracellulaires

Les rôles exacts des protéines S100A8 et S100A9 ne sont pas facilement définissables. D'abord, la structure des protéines S100 est sujette à des changements de conformation par la présence d'ions divalents ou encore par la présence des autres protéines S100.

Deuxièmement, la présence de différents récepteurs possibles à la surface de types cellulaires variés détermine d'une certaine façon des fonctions spécifiques. Ceci étant dit, S100A8 et S100A9 sont associées avec l'inflammation et sont des membres de la famille des DAMP (Ehrchen *et al.*, 2009). Ils activent différents types cellulaires, dont les neutrophiles, et sont responsables de l'inhibition de la croissance microbienne. Les principales fonctions de S100A8 et S100A9 sont revues dans les prochaines sections.

5.5.1 Propriétés antimicrobiennes

S100A8 et S100A9 sont libérées en réponse à différents stimuli au site inflammatoire. Des niveaux d'expression extrêmement élevés de S100A8 et S100A9, de l'ordre de 20 µg/mL, sont retrouvés au niveau des abcès bactériens (Clohessy *et al.*, 1995, Corbin *et al.*, 2008, Hsu *et al.*, 2009). La calprotectine possède des propriétés bactéricides et bactériostatiques envers plusieurs micro-organismes (Hsu *et al.*, 2009). On associe ces propriétés à la capacité de S100A9 de chélater les ions Zn^{2+} et Mn^{2+} , deux ions essentiels à la croissance de micro-organismes (Corbin *et al.*, 2008). De plus, le changement de conformation provoqué par son association à S100A8 est crucial à la chélation des ions par S100A9. La résistance aux infections à *Aspergillus* est d'ailleurs dépendante de la présence de calprotectine (M. Bianchi *et al.*, 2011). En effet, en reconstituant l'activité de la NADPH oxydase de patients CGD, la capacité de former des NET contenant la calprotectine est également restaurée, inhibant par le fait même la croissance d'*Aspergillus*. La présence de calprotectine est également essentielle à la clairance d'infections à *Candida albicans*, supportant le rôle de ces protéines dans l'immunité antifongique.

5.5.2 Rôles dans la physiologie des phagocytes

S100A8 et S100A9 sont associées à la migration des phagocytes depuis déjà plusieurs années. CP-10 est chimiotactique pour les neutrophiles et les monocytes (Lackmann *et al.*, 1993). De plus, S100A8 et S100A9 sont également chimiotactiques pour les macrophages alvéolaires et péritonéaux (Ehrchen *et al.*, 2009). La neutralisation de S100A8 et S100A9 avec des anticorps

inhibent d'ailleurs le recrutement de neutrophiles et de macrophages au niveau des alvéoles dans un modèle d'infection à *Streptococcus* (Raquil *et al.*, 2008).

S100A8, S100A9 et S100A8/A9 sont chimiotactiques pour les neutrophiles humains (Ryckman *et al.*, 2003b). Par contre, S100A9 semble être l'activateur le plus puissant des neutrophiles humains. Cette protéine stimule l'adhésion des neutrophiles sur des matrices de fibrinogène, de fibronectine ainsi que sur des cellules endothéliales (Anceriz *et al.*, 2007b, Newton *et al.*, 1998, Ryckman *et al.*, 2003b). L'augmentation de l'adhésion est associée avec l'augmentation de l'expression et de l'activation des intégrines $\beta 2$ à la surface (Anceriz *et al.*, 2007b). Nous avons également démontré que S100A9 provoque l'exocytose des granules gélatinases et spécifiques ainsi que la libération des vésicules sécrétoires (Simard *et al.*, 2010). La dégranulation des neutrophiles est donc possiblement responsable de l'augmentation de l'expression des intégrines de surface. S100A9 est également associée à une augmentation de la migration des neutrophiles et des monocytes à travers les cellules endothéliales (Cesaro *et al.*, 2012, Eue *et al.*, 2000, Kerkhoff *et al.*, 1999a). En plus d'augmenter l'expression des molécules d'adhésion à la surface des phagocytes, S100A8/A9 pourraient également augmenter l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales (Ehlermann *et al.*, 2006, Vogl *et al.*, 2004).

5.5.3 Propriétés antioxydantes

La production excessive de réactifs oxygénés mène à d'importants dommages cellulaires et tissulaires. De plus, la présence de ROS provoque principalement des modifications de types Cys-thiols sur des protéines susceptibles à ce genre de modifications. S100A8 demeure une de ces protéines extrêmement sensibles à la présence d'oxydants dans le milieu extracellulaire. S100A9 possède également certaines propriétés antioxydantes, mais de façon moindre à S100A8 (Lim *et al.*, 2011, Lim *et al.*, 2010, Lim *et al.*, 2009). Ainsi, S100A8 et S100A9 sont fortement oxydées par le peroxyde d'hydrogène (Harrison *et al.*, 1999). En fait, elles sont des centaines de fois plus susceptibles à l'oxydation que l'albumine sérique ou la *Low-Density-Lipoprotein* (LDL), supportant leur rôle d'antioxydants puissants (McCormick *et al.*, 2005).

La présence de différentes espèces réactives à l'oxygène provoque diverses modifications. Ainsi, S100A8 est principalement oxydée par le HOCl, ce qui inhibe la formation de la calprotectine avec S100A9 (Raftery *et al.*, 2001). La présence de modifications oxydatives sur S100A8 ou S100A9 affecte le potentiel pro- ou anti-inflammatoire de ces protéines. Par

exemple, les dimères de S100A8 oxydés ne sont plus chimiotactiques pour les neutrophiles (Harrison *et al.*, 1999, Raftery *et al.*, 2001). Les propriétés fongistatiques de S100A8 et S100A9 dépendent également de leur niveau d'oxydation (Sroussi *et al.*, 2007, Sroussi *et al.*, 2010). S100A8 et S100A9 sont également sujettes à d'autres types de modifications comme la s-glutathionylation ou la s-nitrosylation (Dimitry Gabrilovich, 2013b).

S100A8 et S100A9 sont sujettes à des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, la méthylation, l'acétylation et l'oxydation (Harrison *et al.*, 1999, Lim *et al.*, 2010). De plus, S100A9 possède également des sites de palmitoylation, de sumoylation et d'ubiquitination. Ces modifications ont d'ailleurs plusieurs effets au niveau des fonctions effectrices de ces protéines.

5.6 Les maladies associées à la présence de S100A8 et S100A9

5.6.1 Le cancer

Il est maintenant bien documenté que l'inflammation est associée avec le développement de différents cancers (Mantovani *et al.*, 2008). Étant donné le rôle de S100A8 et S100A9 dans l'inflammation, il n'est donc pas surprenant de retrouver d'importantes concentrations de S100A8 et S100A9 dans plusieurs types de cancers (Cross *et al.*, 2005, Ehrchen *et al.*, 2009, Gebhardt *et al.*, 2006). S100A8 et S100A9 sont d'ailleurs associées à l'activation des MAPK ainsi qu'avec la translocation de NF- κ B dans des cellules de cancer de la prostate (Hermani *et al.*, 2006). La calprotectine favoriserait également la migration et l'invasion de cellules de cancer du sein par une signalisation dépendante de NF- κ B (C. G. Yin *et al.*, 2013). D'autres études ont révélé l'importance de NF- κ B dans le développement de cancer associé avec S100A8 et S100A9 (Benedyk *et al.*, 2007, Hermani *et al.*, 2006, Kwon *et al.*, 2013). Les concentrations intracellulaires de S100A8 et S100A9 joueraient également un rôle dans l'agressivité de certains cancers du sein (Cormier *et al.*, 2013).

En plus de leur effet sur les cellules cancéreuses, S100A8 et S100A9 pourraient moduler l'établissement de niches métastatiques via le recrutement de cellules myéloïdes Mac-1⁺ (Hiratsuka *et al.*, 2006, Rafii *et al.*, 2006) et de MDSC (Hiratsuka *et al.*, 2008, Sinha *et al.*, 2008). Finalement, l'accumulation de MDSC, une caractéristique bien connue du

développement de cancer, semble être régulée par S100A9 (Cheng *et al.*, 2008, Sinha *et al.*, 2008).

Tableau 8: Présence de protéines S100A8 et S100A9 dans différents types de cancers.

Types de cancers	Références
Cancer du sein	(Arai <i>et al.</i> , 2004, Cormier <i>et al.</i> , 2013, McKiernan <i>et al.</i> , 2011, C. G. Yin <i>et al.</i> , 2013)
Cancer de la prostate	(Hermani <i>et al.</i> , 2006, H. Muller <i>et al.</i> , 2008)
Cancer colorectal	(Ang <i>et al.</i> , 2010, Duan <i>et al.</i> , 2013, H. J. Kim <i>et al.</i> , 2009, J. H. Kim <i>et al.</i> , 2012, Stulik <i>et al.</i> , 1999)
Carcinome hépatique	(Arai <i>et al.</i> , 2000, R. Wu <i>et al.</i> , 2013)
Cancer gastrique	(Fan <i>et al.</i> , 2012, Kwon <i>et al.</i> , 2013, L. Wang <i>et al.</i> , 2013)
Mélanome	(Hibino <i>et al.</i> , 2013, Petersson <i>et al.</i> , 2009)
Cancer du côlon	(Ichikawa <i>et al.</i> , 2011, Zhao <i>et al.</i> , 2012)
Cancer du pancréas	(Ang <i>et al.</i> , 2010, Sheikh <i>et al.</i> , 2007)
Cancer du foie	(Nemeth <i>et al.</i> , 2009)
Carcinome de la thyroïde	(Ito <i>et al.</i> , 2005)
Adénocarcinome pulmonaire	(Arai <i>et al.</i> , 2001)
Lymphome	(Hsieh <i>et al.</i> , 2003)
Cancer des ovaires	(Ott <i>et al.</i> , 2003)
Cancer de la peau	(Hummerich <i>et al.</i> , 2006)

Contrairement aux effets favorisant le développement de cancer, quelques études *in vitro* ont démontré des effets pro-apoptotiques de S100A8 et S100A9 sur des lignées cancéreuses (Nakatani *et al.*, 2005, Yui *et al.*, 2003). Ces effets pro-apoptotiques étaient généralement dépendants de la chélation d'ions (Nakatani *et al.*, 2005, Yui *et al.*, 1997, Yui *et al.*, 1995, Yui *et al.*, 2002). Par contre, aucune étude *in vivo* n'a permis de mettre en évidence les effets antitumoraux de S100A8 et S100A9.

5.6.2 Les maladies inflammatoires chroniques et auto-inflammatoires

Les protéines S100A8 et S100A9 ont été initialement découvertes dans les phagocytes infiltrant le synovium de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Odink *et al.*, 1987). Depuis, plusieurs études ont démontré que les concentrations de S100A8/S100A9 sont fortement augmentées dans le sérum ainsi que dans les liquides synoviaux de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde et de plusieurs autres désordres inflammatoires (Foell *et al.*, 2004a, Foell *et al.*, 2007).

L'activité de l'arthrite rhumatoïde ainsi que la destruction des cartilages sont classiquement mesurées par la protéine C réactive (CRP) ainsi que les taux de sédimentation d'érythrocytes. Il est intéressant de noter que la corrélation entre les concentrations sériques de calprotectine et l'activité de la maladie est supérieure à celle des marqueurs classiques (Brun *et al.*, 1992, Brun *et al.*, 1994b, H. B. Hammer *et al.*, 2007, Kane *et al.*, 2003).

Le développement de l'arthrite expérimentale induite avec des antigènes est associé avec une augmentation précoce des concentrations de calprotectine sérique. Il s'avère également que S100A8 et S100A9 s'accumulent au niveau des sites de destruction massive de la membrane synoviale, supportant leur implication dans l'exacerbation de la pathologie (Youssef *et al.*, 1999). De plus, les symptômes associés au développement de l'arthrite comme l'infiltration leucocytaire et la dégradation des cartilages sont de beaucoup réduits dans les souris S100A9^{-/-} (van Lent *et al.*, 2008a, van Lent *et al.*, 2008b). Finalement, l'utilisation d'anticorps neutralisant anti-S100A9 diminue l'infiltration leucocytaire, la production de cytokines inflammatoires au niveau du sérum et au niveau de l'articulation, en plus de préserver l'intégrité du collagène (Cesaro *et al.*, 2012). L'arthrite n'est pas la seule pathologie inflammatoire associée avec des concentrations élevées de protéines S100A8 et S100A9. Les maladies inflammatoires de l'intestin sont d'ailleurs un exemple classique d'une corrélation presque parfaite entre l'activité de la maladie et la présence de S100A8/A9. La calprotectine est associée à une augmentation des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales ainsi qu'à une augmentation de la sécrétion de cytokines inflammatoires, corrélant avec une augmentation de la migration des phagocytes (Foell *et al.*, 2008). Le dosage de la calprotectine fécale est d'ailleurs utilisé cliniquement comme moyen de diagnostic des maladies inflammatoires intestinales (MII) (Brinar *et al.*, 2010, Sipponen, 2013, Waugh *et al.*, 2013).

La forte teneur en calgranulines chez les patients atteints de psoriasis est également bien documentée (Batliwalla *et al.*, 2005, Benoit *et al.*, 2006, Foell *et al.*, 2003b, Kane *et al.*, 2003, Mirmohammadsadegh *et al.*, 2000). Chez ces patients, la présence de S100A8 et S100A9 est, entre autres, associée à une hyper-prolifération et à une différenciation anormale des kératinocytes (Benoit *et al.*, 2006). De plus, une récente étude suggère que la calprotectine soit responsable de l'augmentation des niveaux de molécules du complément C3, modulant ainsi le développement du psoriasis (Schonthaler *et al.*, 2013).

Finalement, l'hypercalprotectinémie, également appelée hyperzincémie, est une pathologie auto-inflammatoire génétique rare caractérisée par des concentrations de zinc et de

calprotectine sérique extrêmement élevées (généralement supérieur 1.4 à 6.5 g/L de sang). Les patients atteints de cette pathologie présentent des symptômes d'inflammation systémique généralisée, d'hépatosplénomégalie, d'infections récurrentes ainsi que d'importants problèmes de croissance (Fessatou *et al.*, 2005, Saito *et al.*, 2002, Sampson *et al.*, 2002). De prime abord, des analyses génétiques de ces patients avaient permis d'exclure les mutations associées aux promoteurs des gènes codant pour S100A8 et S100A9, suggérant qu'un défaut dans la sécrétion et/ou la production de S100A8 et S100A9 pourrait être envisageable (Sampson *et al.*, 2002). Par contre, une étude récente suggère que l'hypercalprotectinémie serait une variante du syndrome auto-inflammatoire *Pyogenic sterile Arthritis with Pyoderma gangrenosum and Acne* (PAPA), associée à une mutation du gène *PSTPIP-1* (D. Holzinger *et al.*, 2013a).

Le **Tableau 9** résume les principales pathologies inflammatoires ainsi que les infections associées à des concentrations élevées de calgranulines.

Tableau 9: Présence de calgranulines dans différentes pathologies inflammatoires

Pathologies inflammatoires	Références
Inflammation pulmonaire	
Fibrose kystique	(Barthe <i>et al.</i> , 1991, Clohessy <i>et al.</i> , 1996, Golden <i>et al.</i> , 1996, Hayward <i>et al.</i> , 1987, Renaud <i>et al.</i> , 1994, Tirkos <i>et al.</i> , 2006)
Syndrome de la détresse respiratoire aiguë	(Foell <i>et al.</i> , 2007, Lorenz <i>et al.</i> , 2008)
Maladie pulmonaire obstructive chronique	(Lorenz <i>et al.</i> , 2008)
Asthme	(Yang <i>et al.</i> , 2007)
Fibrose idiopathique chronique	(Bargagli <i>et al.</i> , 2011)
Inflammation des articulations	
Arthrite rhumatoïde	(Berntzen <i>et al.</i> , 1991a, Berntzen <i>et al.</i> , 1991b, Brun <i>et al.</i> , 1992, Brun <i>et al.</i> , 1994b, Foell <i>et al.</i> , 2003b, Liao <i>et al.</i> , 2004, Madland <i>et al.</i> , 2002, Odink <i>et al.</i> , 1987, Youssef <i>et al.</i> , 1999, Zwadlo <i>et al.</i> , 1988)
Arthrite psoriasique	(Batliwalla <i>et al.</i> , 2005, Kane <i>et al.</i> , 2003)
Arthrite idiopathique juvénile	(Foell <i>et al.</i> , 2004a, Foell <i>et al.</i> , 2004b, Frosch <i>et al.</i> , 2003)
Goutte	(Ryckman <i>et al.</i> , 2003a)
Spondylarthrite	(Kruithof <i>et al.</i> , 2006)
Inflammation de la peau	
Psoriasis	(Benoit <i>et al.</i> , 2006, Broome <i>et al.</i> , 2003, Mirmohammadsadegh <i>et al.</i> , 2000, Schonthaler <i>et al.</i> , 2013, Semprini <i>et al.</i> , 2002)
Inflammation de l'intestin	
Maladie de Crohn et colite ulcéreuse	(Brinar <i>et al.</i> , 2010, Costa <i>et al.</i> , 2003, de Jong <i>et al.</i> , 2006, Foell <i>et al.</i> , 2008, Kaiser <i>et al.</i> , 2007, Lawrance <i>et al.</i> , 2001, Luger <i>et al.</i> , 1995, K. W. Schmid <i>et al.</i> , 1995)
Inflammation du cerveau	
Alzheimer	(K. A. Chang <i>et al.</i> , 2012, Shepherd <i>et al.</i> , 2006)
Sclérose en plaques	(Floris <i>et al.</i> , 2004)
Ischémie	(Postler <i>et al.</i> , 1997)
Maladies auto-immunes	
Lupus érythémateux	(Frosch <i>et al.</i> , 2004, Lood <i>et al.</i> , 2011)
Maladie de Kawasaki	(Ebihara <i>et al.</i> , 2005, Foell <i>et al.</i> , 2003a, Hirono <i>et al.</i> , 2006)
Syndrome de Sjögren	(Brun <i>et al.</i> , 1994a, Cuida <i>et al.</i> , 1996)
Pathologies auto-inflammatoires	
Syndrome périodique associé à cryopyrine	(Lachmann <i>et al.</i> , 2009, Wittkowski <i>et al.</i> , 2011)
Fièvre familiale méditerranéenne	(Kallinich <i>et al.</i> , 2010, Wittkowski <i>et al.</i> , 2008)
Hypercalprotectinémie	(Fessatou <i>et al.</i> , 2005, Sampson <i>et al.</i> , 2002)
Syndrome de Marshall (PFAPA)	(Kolly <i>et al.</i> , 2013)
Infections	
VIH	(Hashemi <i>et al.</i> , 2001, F. Muller <i>et al.</i> , 1994, Ryckman <i>et al.</i> , 2002, Strasser <i>et al.</i> , 1997)
<i>Staphylococcus spp.</i>	(Herndon <i>et al.</i> , 2003, Russell, 2008)

Hypothèses du projet de recherche

Nous nous sommes précédemment intéressés aux rôles des protéines S100A8 et S100A9 dans la physiologie des neutrophiles. Les résultats précédents ont permis de démontrer un rôle important de ces protéines dans la physiologie des phagocytes, en particulier du neutrophile. S100A8 et S100A9 affectent plusieurs fonctions des neutrophiles. En effet, S100A8 et S100A9 sont chimioattractantes et augmentent l'adhésion des neutrophiles (Ryckman *et al.*, 2003b). De plus, mes travaux de maîtrises ont permis de démontrer que S100A9 induisait également la libération des vésicules sécrétoires et des granules spécifiques/gélatinases des neutrophiles via l'activation de plusieurs voies signalétiques clés comme les MAPK p38 et JNK (Simard *et al.*, 2010). Les granules des neutrophiles sont un important réservoir de récepteurs cellulaires participant activement au processus de phagocytose. Ces résultats nous suggèrent donc que S100A9 pourrait moduler la fonction de phagocytose des neutrophiles humains. Or, nous émettons l'hypothèse que S100A9 aurait un rôle important à jouer dans la phagocytose des neutrophiles humains. De plus, plusieurs résultats préliminaires suggèrent que S100A8 et S100A9 pourraient jouer un rôle clé dans la libération de cytokines inflammatoires chez les neutrophiles et les cellules mononuclées du sang périphérique. Nous émettons ainsi une deuxième hypothèse de travail: S100A8 et S100A9 joueraient un rôle important dans la libération de cytokines inflammatoires des neutrophiles et des cellules mononuclées du sang périphérique.

Objectifs du projet de recherche

Objectif 1: Caractériser le rôle des protéines S100A8 et S100A9 dans la phagocytose et la production de réactifs oxygénés chez le neutrophile humain

On retrouve plusieurs études dans la littérature qui ont associé les protéines S100A8 et S100A9 à l'activation de la NADPH oxydase via une interaction directe avec ce complexe protéique. Par contre, aucune d'entre elles ne s'est intéressée aux rôles extracellulaires de S100A8 et S100A9 dans l'activation de la NADPH oxydase et dans la génération d'espèces réactives de l'oxygène. De plus, le rôle de ces protéines dans la capacité phagocytaire des neutrophiles demeure encore inconnu. Par conséquent, nous avons voulu déterminer les rôles de S100A8 et S100A9 dans la production de réactifs oxygénés et dans la phagocytose des neutrophiles humains. Le rôle de certaines voies signalétiques dans le processus phagocytaire sera également investigué.

Objectif 2: Caractériser le rôle des protéines S100A8 et S100A9 dans la production de cytokines par les cellules mononucléées du sang périphérique

La production de cytokines est une étape déterminante dans l'établissement d'une réponse immunitaire efficace. De plus, certains résultats préliminaires du laboratoire suggéraient que les protéines S100A8 et S100A9 pourraient moduler la production de cytokines et de chimiokines par les cellules mononucléées du sang périphérique. D'autres résultats personnels nous indiquaient que ces protéines pourraient également moduler l'activation de NF- κ B, un facteur de transcription impliqué dans la régulation de gènes inflammatoires. Or, nous avons voulu déterminer le rôle spécifique de S100A8 et S100A9 dans la production de cytokines et de chimiokines ainsi que le rôle du facteur de transcription NF- κ B dans ce processus.

Objectif 3: Caractériser le rôle des protéines S100A8 et S100A9 dans la production d'IL-8 chez le neutrophile humain

Des expériences préliminaires ont permis de mettre en évidence que les protéines S100A8 et S100A9 ne modulaient pas directement la libération de cytokines par les neutrophiles humains. Par contre, S100A8 et S100A9 ont démontré d'excellentes propriétés immunomodulatrices telles que la chimiotaxie, la dégranulation et la migration des neutrophiles. Ainsi, nous avons voulu déterminer le rôle de S100A8 et S100A9 dans la modulation de la production d'IL-8 ainsi que l'implication de différents facteurs de transcription dans ce processus.

SECTION 2: ARTICLES SCIENTIFIQUES

Article 1

Titre

Damage-Associated Molecular Pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophil by enhancing phagocytosis

Auteurs

Jean-Christophe Simard, Marie-Michelle Simon, Philippe A. Tessier et Denis Girard

Publié dans la revue

Journal of Immunology. 2011 Mar 15;186(6):3622-31.

Contributions personnelles

J'ai personnellement réalisé toutes les expériences de ce papier. De plus, j'ai participé au design des expériences et rédigé le papier en bonne partie.

Contributions des autres auteurs

M-M Simon a participé aux expériences de bactéricidie. P.A Tessier et D. Girard ont participé à la planification des expériences ainsi qu'à la rédaction du papier.

Résumé de l'article 1 en français

Le motif moléculaire associé au dommage S100A9 augmente l'activité bactéricide des neutrophiles humains en augmentant la phagocytose

Le motif moléculaire associé au dommage S100A9 est retrouvé au site inflammatoire dans les cas d'infections et de différentes maladies auto-immunes. Cette protéine est libérée en grande quantité dans le milieu extracellulaire par les neutrophiles et les monocytes activés en réponse à divers agents. Cette protéine pro-inflammatoire est retrouvée dans les muqueuses infectées et les abcès agit comme agent activateur du neutrophile. Dans cette étude, nous avons examiné le rôle de S100A9 dans le contrôle des infections. S100A9 a augmenté l'activité bactéricide des neutrophiles humains envers *Escherichia coli*. Bien que S100A9 provoque l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène via l'activation de la NADPH oxydase, l'effet microbicide a été induit principalement par l'augmentation de la phagocytose. Étonnamment, l'effet de S100A9 ne dépendait pas de l'augmentation du CD16, CD32 ou CD64, indiquant que l'effet sur la phagocytose dépendante des récepteurs Fc est indépendant de l'augmentation de l'expression des récepteurs Fcγ. Toutefois, l'effet de S100A9 sur l'activité phagocytaire requiert la phosphorylation de Erk1/2, Akt et Syk. Mis en commun, ces résultats démontrent que S100A9 stimule l'activité microbicide du neutrophile en provoquant une augmentation de la phagocytose.

Damage-Associated Molecular Pattern S100A9 Increases Bactericidal Activity of Human Neutrophils by Enhancing Phagocytosis

Jean-Christophe Simard,* Marie-Michelle Simon,* Philippe A. Tessier,^{†,‡} and Denis Girard*

The damage-associated molecular-pattern S100A9 is found at inflammatory sites in infections and various autoimmune diseases. It is released at very high concentrations in the extracellular milieu by activated neutrophils and monocytes in response to various agents. This proinflammatory protein is found in infected mucosae and tissue abscesses where it acts notably as a potent neutrophil activator. In this study, we examined the role of S100A9 in the control of infections. S100A9 was found to increase human neutrophil bactericidal activity toward *Escherichia coli*. Although S100A9 induced the accumulation of reactive oxygen species over time through the activation of NADPH oxidase, its antimicrobial activity was mediated mainly by enhancing the efficiency of neutrophil phagocytosis. Interestingly, S100A9 did not act by increasing cell surface expression of CD16, CD32, or CD64 in neutrophils, indicating that its biological effect in FcR-mediated phagocytosis is independent of upregulation of FcγR levels. However, S100A9-induced phagocytic activity required the phosphorylation of Erk1/2, Akt, and Syk. Taken together, our results demonstrate that S100A9 stimulates neutrophil microbicidal activity by promoting phagocytosis. *The Journal of Immunology*, 2011, 186: 3622–3631.

Neutrophils kill microorganisms by phagocytosis and liberation of reactive oxygen species (ROS) or antimicrobial peptides stored in granules (1). Phagocytosis occurs through direct binding of bacteria and is facilitated by opsonization with Ig (2) or complement components (3). This is an active process that requires the reorganization of the actin cytoskeleton (4) and signal transduction from the cell membrane (5). Additionally, recognition and phagocytosis of invaders often induces the production of ROS. Although the major source of ROS in phagocytes is NADPH oxidase activation, mitochondria and cyclooxygenase enzymes are also responsible for the production of oxygen species (6).

Among the various molecules produced by phagocytes after pathogen recognition, the recently identified damage-associated molecular patterns S100A8 (MRP8), S100A9 (MRP14), and S100A12 (MRP6) are increasingly gaining interest. These proteins are highly expressed in neutrophils, representing close to 40% of total cytoplasmic proteins (7). Their expression is also inducible by multiple factors in monocytes (8), macrophages (9), and endothelial cells (10). These proteins are liberated as homo- or

heterodimers after phagocyte activation (11), cell necrosis, or by the formation of neutrophil extracellular traps (12), where they act as danger signals for the organism presumably by activating TLR4 (13) or the receptor for advanced glycation end products (14).

There is a correlation between chronic inflammatory diseases and high concentrations of S100A8, S100A9, and S100A12. Their role in pathogenesis or in exacerbation of diseases such as rheumatoid arthritis and inflammatory bowel diseases are becoming more and more apparent (15, 16). For instance, Loser and et al. (17) have recently demonstrated a key role for S100A8 and S100A9 in the development of autoreactive CD8 T cells in a lupus model. Additionally, we and others have demonstrated important roles for these proteins in neutrophil activation and migration toward inflammatory sites. For instance, S100A8, S100A9, and S100A12 are chemotactic for neutrophils and promote their adhesion to fibrinogen, whereas S100A9 induces adhesion to fibronectin and vitronectin matrices via activation of β_2 integrins (18–21). More recently, we demonstrated that S100A9 induces neutrophil degranulation, corroborating the important role of this protein in general phagocyte biology and migration (22).

S100A8, S100A9, and S100A12 are highly expressed in tissue abscesses and infected mucosae (23–27) where they are presumed to exert major roles in the control of infection by chelating Zn^{2+} and other ions (28). Additionally, S100A8/A9 heterodimers (= calprotectin) are crucial for the clearance of infection after challenge with *Candida albicans* (12). In contrast, blockade of S100A8 and S100A9 with neutralizing Abs inhibits phagocyte migration to the alveoli in a mouse model of streptococcal pneumonia (29). Taken together, these results suggest an essential role for S100A9 in the control of infection both in the recruitment of neutrophils and in the control of microbial growth. However, the mechanism of action of these proteins during infection remains to be clarified.

In this study, we investigated the role of S100A9 in acute infection by examining its effect on the antibacterial functions of neutrophils. We report that S100A9 increases the bactericidal activity of human neutrophils. Although S100A9 induced ROS

*Laboratoire de Recherche en Inflammation et Physiologie des Granulocytes, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique–Institut Armand-Frappier, Laval, Québec City, Québec H7V 1B7, Canada; †Centre de Recherche en Infectiologie, Centre Hospitalier de l'Université Laval, Québec City, Québec G1V 4G2, Canada; and ‡Faculté de Médecine, Université Laval, Québec City, Québec G1V 4G2, Canada

Received for publication September 2, 2010. Accepted for publication January 10, 2011.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Philippe A. Tessier, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval, 2705 Boulevard Laurier, Room RC-709, Québec City, Québec G1V 4G2, Canada. E-mail address: Philippe.Tessier@crchu.ulaval.ca

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: carboxy-H2DCFDA, 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; CR, complement receptor; K_E , killing rate constant; K_p , phagocytosis rate constant; Δ MPF, difference in mean fluorescence intensity; ROS, reactive oxygen species; Syk, Syk inhibitor.

Copyright © 2011 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/11/\$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1002956

accumulation over time through NADPH oxidase activation, that damage-associated molecular pattern protein mainly mediated its effect by increasing the rate of neutrophil phagocytosis via the activation of Syk, PI3K/Akt, and Erk1/2. These results further support a crucial role for S100A9 in the control of microbial infection.

Materials and Methods

Reagents

Human recombinant S100A8, S100A9, and S100A12 were produced as previously described (20, 30) and found to contain <1 pg endotoxin/ μ g protein. PD98059, SB203580, piceatannol, PMA, and superoxide dismutase (bovine erythrocytes) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). JNK inhibitor II and U0126 were purchased from Calbiochem (San Diego, CA). Wortmannin and Syk inhibitor (Syki) II were obtained from EMD Biosciences (San Diego, CA). Mouse IgG1 isotype-FITC, mouse anti-human CD16-FITC, mouse anti-human CD32-FITC, and mouse anti-human CD64-FITC were all obtained from BD Biosciences (San Diego, CA). SRBCs were purchased from Quela (Montreal, Québec, Canada). Luria-Bertani broth (Lennox) and Luria-Bertani agar (Lennox) were obtained from BD Difco (Franklin Lakes, NJ). Fluorescein YG carboxylate microspheres (1.75 μ m) were bought from Polysciences (Warrington, PA). Anti-phospho-specific Akt (Ser⁴⁷³) clone D9E, Syk (Tyr^{525/526}), and anti-total form of Akt Abs were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Anti-phospho-specific Erk1/2 and anti-phosphoserine Abs were purchased from BioSource International (Camarillo, CA). Rabbit polyclonal Erk1/2 and anti-phospho-specific tyrosine Abs were obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Mouse monoclonal Syk Ab (clone 4D10), as well as goat polyclonal anti-p47^{phox} (C-20) and rabbit polyclonal anti-p47^{phox} (H-195) Abs, was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). 5-(and-6)-Carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H2DCFDA), MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator, *Escherichia coli* (K-12 strain), Alexa Fluor 488 conjugate, and phalloidin-Alexa Fluor 568 were obtained from Invitrogen/Molecular Probes (Camarillo, CA). CaCl₂ was purchased from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ). Cytochrome *c* (horse heart) was obtained from ICN Biomedicals (Aurora, OH). GM-CSF was obtained from PeproTech (Rocky Hill, NJ). *E. coli* MG1655 strain was a gift from Prof. Éric Déziel (Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada).

Neutrophil isolation

Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque cushions (Pharmacia Biotech, Québec, Québec, Canada) as described previously (22). Blood donations were obtained from informed, 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 monitored by cytology from cytocentrifuged preparations treated with Wright-Giemsa stain (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada). Cell viability was systematically evaluated before and after each treatment and was always $\geq$ 98%. Neutrophils were resuspended at 10×10^6 cells/ml in HBSS (1 $\times$) unless specified.

Phagocytosis of SRBCs

SRBCs were opsonized with a 1:200 dilution of a rabbit IgG anti-SRBC Ab (Sigma-Aldrich) for 45 min at 37°C as published (31). Neutrophils were treated 30 min with the indicated agonists and then incubated in a 1:5 ratio of opsonized SRBCs for 30 min at 37°C. In some experiments, cells were treated with specific inhibitors as indicated. Cells were washed twice after incubation with inhibitors. After incubation with SRBCs, the samples were centrifuged at $200 \times g$ for 10 min at 4°C. Supernatants were discarded and an osmotic shock was performed on the pellets by resuspending the cells with 400 μ l H₂O for 15 s, followed by the addition of 4.5 ml PBS. The samples were then washed twice and the final pellets were resuspended in 100 μ l PBS. Phagocytosis is expressed as the percentage of neutrophils having ingested at least one opsonized SRBC or neutrophils having ingested two or more opsonized SRBCs (phagocytosis index). GM-CSF (65 ng/ml) was used as a positive control (32).

Phagocytosis of latex microspheres or Alexa Fluor 488-labeled *E. coli*

Phagocytosis was assessed by flow cytometry using FITC-labeled latex microspheres or Alexa Fluor 488 conjugate *E. coli*. Cells were stimulated

with the indicated agonists at 37°C for 30 min before incubation with latex beads or serum-opsonized *E. coli*. Cells were then centrifuged and supernatant was discarded. Beads or bacteria (10:1 neutrophil) were diluted in HBSS and were then added to neutrophils. After 30 min, latex beads or bacteria that were not uptaken by the cells were washed twice with PBS and removed by centrifugation onto a 4.5-ml gradient of RPMI 1640 medium containing 5% BSA. Latex beads or bacteria remaining at the surface were then removed and cells located in the pellet were quenched with trypan blue. After three washes, cells were suspended in 500 μ l PBS for analysis. Cellular phagocytosis was monitored by flow cytometry at 525 nm. A negative control was performed in parallel by incubating cells with latex beads or bacteria at 4°C instead of 37°C. Phagocytosis of latex microspheres and Alexa Fluor 488 conjugate *E. coli* were expressed as the difference in the mean fluorescence intensity (Δ MFI) measured between 37°C (uptake at 37°C) and 4°C (uptake at 4°C) (33).

Cell surface expression of CD16, CD32, and CD64

Cell surface expression of CD16, CD32, and CD64 was monitored by flow cytometry. Neutrophils were resuspended in a final volume of 100 μ l following addition of agonists. After stimulation, the cells were centrifuged and washed twice with cold PBS. Nonspecific binding of Abs was prevented by incubating cells with PBS plus 20% decompartmented human autologous serum for 30 min on ice. After several washes with PBS, the cells were incubated with FITC-coupled Abs (CD16, CD32, CD64, or IgG isotype) for 30 min on ice. After three washes, the cells were resuspended in PBS for FACS analysis on a BD FACScan apparatus (BD Biosciences).

Immunoprecipitation

Polymorphonuclear leukocytes (7×10^6 cells/condition) were treated with the indicated agonists for the indicated period of time at 37°C, centrifuged, and lysed in nondenaturing cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.01% SDS, 1 mM orthovanadate, 1 mM PMSE, 10 μ g/ml trypsin inhibitor, aprotinin, leupeptin, and pepstatin) for 1 h on ice and sonicated three times for 20 s. The lysates were preincubated with protein G-Sepharose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). After 1 h, samples were centrifuged to remove Sepharose beads and then incubated with 2 μ g/ml goat anti-human p47^{phox} at 4°C with gentle agitation overnight. Protein G-Sepharose was then added for 4 h with gentle agitation at 4°C. The solid matrix was collected and washed three times with lysis buffer before adding an equivalent volume of sample buffer. The samples were then boiled at 100°C for 10 min. Immunoprecipitates were electrophoresed on an SDS-polyacrylamide gel, followed by Western blot analysis.

Western blot analysis

Neutrophils (40×10^6 cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 25 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin) were stimulated with PMA (10^{-7} M) for 5 min, GM-CSF (65 ng/ml) for 10 min, and with S100A9 (40 μ g/ml) or the diluent HBSS for 1–60 min at 37°C. In some experiments, cells were preincubated for 30 min at 37°C with the following inhibitors: wortmannin (10 nM), piceatannol (30 μ M), Syki II (1 μ M), PD98059 (5 μ M), or U0126 (5 μ M). At the end of the incubation period, the cells were lysed in 4 $\times$ Laemmli's sample buffer (0.25 M Tris-HCl [pH 6.8], 8% SDS, 40% glycerol, and 20% 2-ME), and aliquots of extracts corresponding to 1×10^6 cells were loaded onto 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes for the detection of p-Syk, Syk, p-Akt, Akt, p-Erk1/2, Erk1/2, and p-Tyr. For detecting the phosphorylated form of p47^{phox}, p47^{phox} immunoprecipitates were electrophoresed onto a 15% SDS-PAGE gel and transferred to polyvinylidene fluoride membranes. Membranes were blocked for 1 h at room temperature in TBS-Tween containing 5% nonfat dry milk or 3% BSA. After washing, the anti-phospho-specific Syk, Erk1/2, and Akt Abs were added at a final dilution of (1:1000) in TBS-Tween 0.15% containing 3% BSA. The anti-phospho-specific Ab directed against tyrosine residues and the Ab against total Syk were added at a final concentration of 1:4000. Anti-phospho-specific serine Ab was added at a final concentration of 1:750. A dilution of 1:1000 in 3% BSA was used for total Akt Ab. 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 Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) diluted 1:20,000 in TBS-Tween plus 5% nonfat dry milk, or a goat anti-mouse IgG HRP secondary Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluted 1:20,000 in TBS-Tween plus 5% nonfat dry milk followed by several washes. Protein expression was revealed using an ECL Western blot analysis detection system (Amersham Biosciences). Membranes were stripped and reprobed to confirm equal loading of proteins.

Preparation of bacteria

Bacteria were prepared essentially as previously described (34), with few modifications. Briefly, *E. coli* MG1655 was grown overnight in a shaking incubator at 37°C. Bacteria were centrifuged at $1000 \times g$ for 5 min and washed twice with PBS. The final pellet was resuspended in HBSS and the concentration of bacteria was calculated by measuring the OD at 550 nm using an established standard curve. Bacteria were opsonized by suspending 1×10^8 CFU in 1 ml HBSS containing 10% autologous serum and by rotating the solution end over end for 20 min at 37°C.

One-step and two-step killing assay

To measure neutrophil bactericidal activity, a one-step assay was used in which neutrophils were not separated from uningested bacteria (34). Neutrophils (3×10^6 cells) were stimulated with 40 µg/ml S100A8, S100A9, S100A12, or the equivalent volume of the diluent (HBSS) for 30 min at 37°C with end-over-end rotation. For some experiments, cells were pretreated with the p38 pharmacological inhibitor (5 µM SB203580) for 30 min at 37°C. In a separate assay (control), the cells were replaced with the equivalent volume of HBSS, thus allowing the direct measurement of the starting number of bacteria, their growth over the time course, any negative impact of opsonization and dilution in water, and all the possible effects of S100 proteins on bacterial growth. The reaction was started by adding 3×10^7 opsonized bacteria (1×10^8 bacteria/ml) and incubated for various periods of time at 37°C. Fifty-microliter aliquots were removed at 10, 20, and 30 min and diluted into 2.45 ml H₂O with one drop of 1 mM NaOH (pH 11). Neutrophils were lysed for 5–10 min at room temperature, then vortexed vigorously for 10 s to disperse bacteria. Each sample was diluted further into water (pH 11) and spread on Luria-Bertani agar plates at ~ 100 –150 CFU per plate in duplicate. Plates were incubated overnight at 37°C and the numbers of colonies formed were counted. Results were expressed as percentage of survival. This killing assay provided a composite measure of both phagocytosis and killing. For the two-step assay, 50-µl samples were taken from at 10, 20, and 30 min and diluted with 950 µl ice-cold PBS to stop neutrophil activity. Samples were centrifuged at $100 \times g$ for 5 min at 4°C. Supernatants were collected and pellets were washed twice with ice-cold PBS while pooling the supernatants (uningested bacteria). The pellets were then resuspended in 2.5 ml H₂O (pH 11). Neutrophils were lysed for 10 min and then vortexed to disperse bacteria (ingested bacteria). Each sample was diluted further into water. Pellets and supernatants were spread separately on Luria-Bertani agar plates at ~ 100 –150 CFU per plate (i.e., two plates were used for each sample). Plates were incubated overnight at 37°C and the number of colonies formed was counted. Colony counts were converted to original bacterial densities by multiplying with the appropriate dilution factor. Growth adjustment, phagocytosis rate constant (K_p), and killing rate constant (K_k) values were calculated according to the formula described by Green et al. (34).

Detection of intracellular and mitochondrial ROS

Cells were resuspended in HBSS containing 10 µM CM-H₂DCFDA or 10 µM mitochondrial superoxide indicator MitoSOX at 1×10^7 cells/ml for 15 min at 37°C. Cells were then washed twice with PBS before being incubated in the presence or absence of S100A9 (40 µg/ml) for the indicated period of time. PMA (10^{-7} M) was used as a positive control. For some experiments, S100A9-stimulated cells were incubated with opsonized SRBCs as phagocytic stimuli, and ROS production was measured for the indicated periods of time. Fluorescence was recorded using a FACScan. ROS production was expressed as MFI.

Detection of extracellular O₂⁻

Superoxide production was monitored by the reduction of ferrocytochrome *c*, as previously reported (35, 36) with few modifications. Briefly, neutrophils (1×10^6 cells/ml) were suspended in HBSS (supplemented with 1.6 mM CaCl₂) with or without 10 µg/ml superoxide dismutase with 150 µM ferrocytochrome *c* for 5–180 min at 37°C in the presence of 40 µg/ml S100A8, S100A9, S100A12, buffer, diluent, or PMA (10^{-7} M). The reduction of ferrocytochrome *c* was monitored at 550 nm, and the concentration of superoxide anions (O₂⁻) produced was calculated from the difference between corresponding wells either with or without superoxide dismutase using a molar coefficient extinction of $21.1 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Immunofluorescence microscopy

Following phagocytosis of Alexa Fluor 488-labeled *E. coli*, as described before, cells were washed twice in ice-cold PBS and then cytocentrifuged on glass coverslips (Fisher Scientific). Cells were fixed and permeabilized in 3% paraformaldehyde plus 0.1% digitonin at room temperature for 20 min.

After three washes, cells were incubated with 2 U phalloidin-Alexa Fluor 568 at 37°C for 30 min to detect F-actin filaments. After three washes, coverslips were mounted with Vectashield plus DAPI (Vector Laboratories, Burlington, Ontario, Canada). Fluorescent-labeled cells were captured from high-power field ($\times 400$) and observed with a Leica microscope equipped with an epi 100 dc epifluorescent condenser. Images were taken with a Cooke Sensicam high-performance camera (Applied Scientific Instrumentation) coupled to the Image-Pro Plus program (version 4.0; Media Cybernetics).

Statistical Analysis

Experimental data are expressed as means $\pm$ SEM. Repeated-measures ANOVA (Dunnett multiple-comparison test) were performed using Graph-Pad Prism (version 5.01). Differences were considered statistically significant as follows: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.005$ versus buffer or the appropriate diluent. Densitometric analyses were performed using Quantity One, version 4.6.6 (Bio-Rad, Hercules, CA).

Results

S100A9 induces ROS production through NADPH oxidase activation

Neutrophils are key components of innate immunity against bacterial infections. In addition to sensing invading pathogens, neutrophils have developed efficient mechanisms for extracellular killing and for processing of phagocytized bacteria. One of the key mechanisms involved in bacterial killing is the production of ROS, which can occur through NADPH oxidase activation or triggered by an alteration of the mitochondria transmembrane potential in response to diverse stimuli (1). Because S100A9 is secreted during infections and is a potent neutrophil agonist, we investigated its effect on neutrophil bactericidal activity through the production of ROS. As shown in Fig. 1, S100A9 induced a significant intracellular accumulation of ROS over time (Fig. 1A), but little or no accumulation of O₂⁻ in the extracellular medium (Fig. 1B). This contrasts with the rapid burst of ROS detected when neutrophils were stimulated with PMA, which occurred both in the intracellular and extracellular compartments (Fig. 1A, 1B). Unlike S100A9, S100A8 or S100A12 had no effect on ROS production even when neutrophils were stimulated for longer periods of time (Fig. 1B, inset). Because S100A8/A9 was previously found to induce mitochondrial ROS production in cancer cells (37), we then investigated the origin of ROS in S100A9-induced neutrophils. Based on our results, S100A9, as well as S100A8 and S100A12, do not induce damage in mitochondria since no O₂⁻ has been detected in S100A-stimulated neutrophils compared with PMA-treated cells (Fig. 1C). We next investigated whether the observed ROS production in S100A9-primed neutrophils was from the activation of NADPH oxidase. For this purpose, we measured the phosphorylation of p47^{phox}, which is the initial step in the activation of the enzyme. We demonstrated in this case that signaling cascade triggers by S100A9 led to phosphorylation of p47^{phox}, suggesting an activation of NADPH oxidase (Fig. 1D). Uptake of phagocytic stimuli often triggers the activation of NADPH oxidase and ROS production to kill pathogens. According to our previous data, we were interested to know whether S100A9-primed neutrophils can further produce ROS in response to phagocytic stimuli. Interestingly, S100A9-primed neutrophils have an increased capacity to generate ROS in response to opsonized SRBCs (Fig. 1E), suggesting that the bactericidal activity of those cells is more powerful.

S100A9 increases neutrophil bactericidal activity

ROS production is associated with neutrophil bactericidal activity (38, 39), and patients with deficiency in NADPH oxidase components suffer from repeated bacterial infections (40). Because we demonstrated that S100A9 induces an accumulation of intracel-

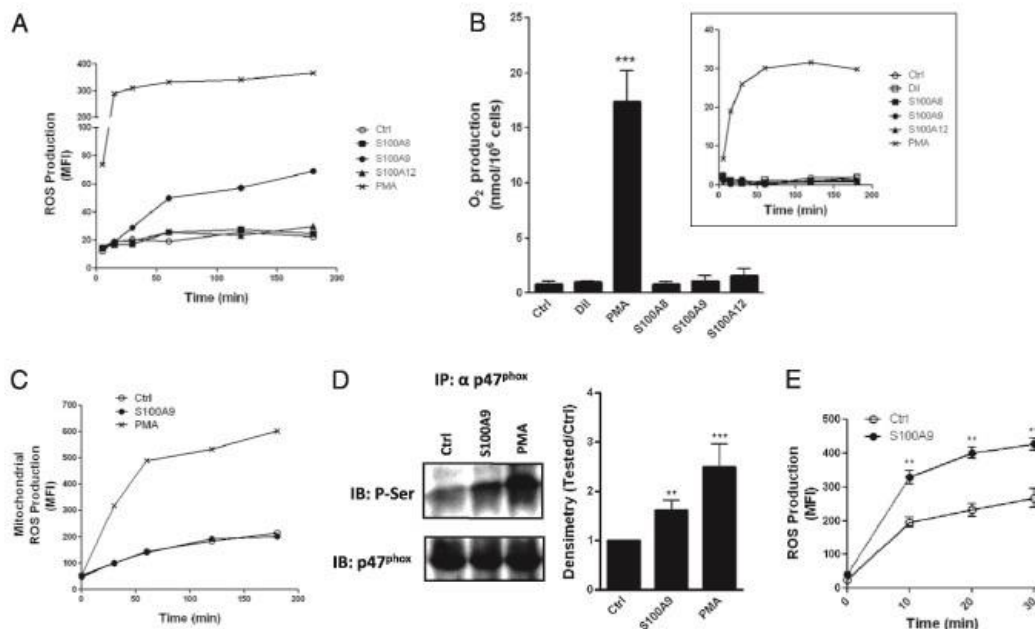


FIGURE 1. S100A9 induces intracellular ROS accumulation over time via NADPH oxidase activation in human neutrophils. Production of reactive oxygen species was assessed by (A) oxidation of carboxy-H2DCFDA, (B, E) reduction of ferrocytochrome *c*, and (C) oxidation of mitochondrial superoxide indicator, as described in *Materials and Methods*. Cells were incubated in the presence of buffer (Ctrl), diluent (0.1% DMSO), or 40 μ g/ml S100A8, S100A9, or S100A12, or 10^{-7} M PMA for 5–180 min (A, inset in B and C) or 30 min (B). Results are from one experiment representative of four others (A, inset in B and C). NADPH oxidase activation was determined based on p47^{phox} phosphorylation by immunoprecipitation (IP) of p47^{phox} followed by immunoblotting with an anti-phosphoserine Ab, as described in *Materials and Methods*. Cells were treated in the presence of buffer (Ctrl), 40 μ g/ml S100A9 for 60 min, or 10^{-7} M PMA for 5 min. E, Cells were treated with buffer (Ctrl) or S100A9 before being stimulated with opsonized SRBCs. Data represent the mean $\pm$ SEM of at least three experiments performed on cells from different donors (B, D, E).

lular ROS and increases the oxidative burst in response to a phagocytic stimulus, we next investigated the possibility that it could potentiate neutrophil bactericidal activity. As illustrated in Fig. 2, S100A9-primed neutrophils showed an enhanced capacity to kill *E. coli* as early as 10 min after incubation with bacteria, and this effect was sustained over time. Again, this effect was restricted to S100A9, as other S100 proteins failed to potentiate neutrophil bacterial killing (Fig. 2). Because this assay does not discriminate between phagocytosis and killing, we next proceeded to a two-step assay, allowing the distinction between intracellular killing (phagocytosis) and extracellular killing. As shown in Fig. 3A, cells treated with S100A9 showed more intracellular bacteria after 10 min as compared with control. Intracellular and extracellular bacteria analyses allowed the determination of K_p and K_k . Interestingly, S100A9 increased the K_p of neutrophils, but had no effect on their K_k (Fig. 3B). The concentration of S100A8, S100A9, and S100A12 used in our study had no effect on *E. coli* growth (data not shown). This is in agreement with a previous study showing that higher concentrations of S100A8/A9 were required to inhibit *E. coli* growth (41). Because we previously demonstrated that S100A9 induced the degranulation of human neutrophils mainly through activation of the MAPK p38 (22) and that released granules can have antimicrobial activities, we tested the involvement of this pathway in S100A9-induced extracellular killing. Interestingly, inhibition experiments revealed that this pathway is not involved in overall S100A9-treated neutrophil bactericidal activity (Supplemental Fig. 1).

S100A9 increases FcR-mediated phagocytosis

Because exposure to S100A9 increased K_p in neutrophils, we then investigated how S100A9 modulates this process. Phagocytosis in neutrophils and macrophages generally occurs via two major distinct mechanisms, namely complement receptor-dependent and Fc receptor-dependent pathways (42). Accordingly, we first examined the effect of S100A9 pretreatment on FcR-mediated phagocytosis through the uptake of IgG-opsonized SRBCs (Fig.

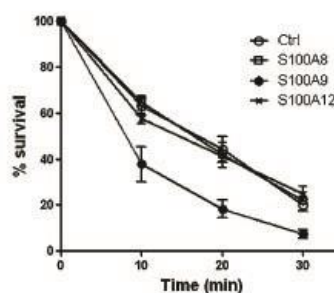
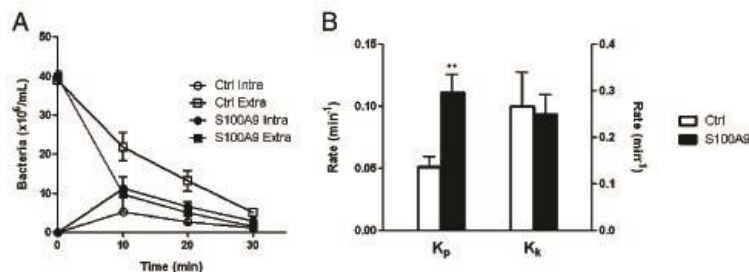


FIGURE 2. S100A9 increases human neutrophil bactericidal activity. Killing of *E. coli* was evaluated by a one-step assay, as described in *Materials and Methods*. Cells were incubated in the presence of buffer (Ctrl) or 40 μ g/ml S100A9, S100A8, or S100A12 for 10–30 min before incubation with *E. coli*. Data represent the mean $\pm$ SEM of four experiments performed on cells from different donors.

FIGURE 3. S100A9 increases intracellular bactericidal activity and K_p . Killing of *E. coli* was evaluated by a two-step assay (A), as described in *Materials and Methods*. K_p and K_k were evaluated using bacterial concentrations from the two-step assay (B). Cells were treated with buffer (Ctrl) or 40 μ g/ml S100A9 for 30 min before incubation with *E. coli*. Data represent the mean $\pm$ SEM of three experiments performed with cells from different donors.



4) Treatment with S100A9 increased not only the phagocytosis rate (one or more SRBCs) (Fig. 4A), but also the phagocytosis index (three or more SRBCs/cell) (Fig. 4B). Interestingly, the effect of S100A9 was stronger than the positive control, GM-CSF (32, 43). Although concentrations of 40–100 μ g/ml S100A9 were found to be optimal, concentrations as low as 1 μ g/ml showed a significant effect on phagocytosis (Fig. 4C).

Because S100A9 induces neutrophil degranulation and Fc γ RIII (CD16) is a known component of neutrophil granules (44), we next investigated the cell surface expression of Fc γ Rs. Fig. 5 shows that CD16 was not significantly increased in cells treated with S100A9 as compared with unstimulated cells. Additionally, S100A9 had no effect on either CD32 or CD64 cell surface expression.

S100A9 increases complement receptor-mediated phagocytosis in human neutrophils

Next, we determined whether the effect of S100A9 was restricted to Fc γ R-mediated phagocytosis. We thus investigated the possibility that this protein might also modulate complement receptor (CR)-mediated phagocytosis. First, the internalization of FITC-labeled microspheres was examined by flow cytometry. Exposure of neutrophils to S100A9 markedly increased the uptake of FITC-labeled microspheres as compared with untreated cells. More than 61% of neutrophils had internalized at least five latex beads compared with 35% in buffer-treated cells (see markers in Fig. 6A). To further support these findings, we evaluated the effect of S100A9 on the uptake of *E. coli* incubated in the presence of

serum. Again, S100A9 markedly increased the internalization of bacteria based on flow cytometry (Fig. 6B) and immunofluorescence microscopy experiments (Fig. 6C). Therefore, stimulation of neutrophils with S100A9 enhances phagocytic processes independently of the receptors used to engulf opsonized Ags.

S100A9 induces phosphorylation events in human neutrophils

Phagocytosis and bacterial killing are complex processes involving, among other things, cytoskeleton reorganization (4) and phosphorylation of different proteins, including the Syk tyrosine kinase (45), PI3K/Akt, and Erk1/2 (46). Consequently, phosphorylation events were evaluated in S100A9-stimulated neutrophils. S100A9 induced a strong phosphorylation of total tyrosine residues after 30 min (Fig. 7A). Phosphorylation was sustained and further increased after 60 min. Among phosphorylated targets, S100A9 induced the phosphorylation of Syk. This phosphorylation was reversed by two Syk inhibitors, namely piceatannol and Syki II (Fig. 7B). Additionally, neutrophils treated with S100A9 displayed increased levels of phosphorylated Erk1/2 (Fig. 7C) and Akt (Fig. 7D). S100A9-induced Erk1/2 phosphorylation was partially reversed by preincubation with the MEK inhibitors PD98059 and U0126, whereas Akt phosphorylation was completely inhibited by wortmannin.

S100A9 enhances human neutrophil phagocytosis by a Syk-, Erk1/2-, and PI3K/Akt-dependent mechanism

To further decipher the mechanisms of action of S100A9, we next examined the involvement of the Syk, MEK/Erk1/2, and PI3K/Akt

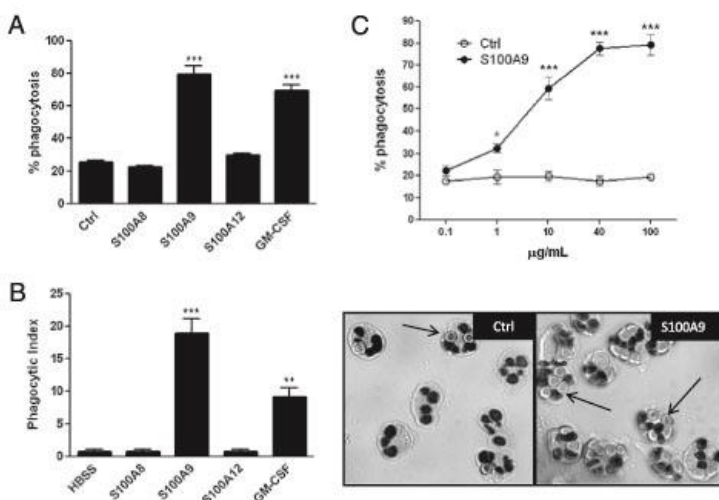
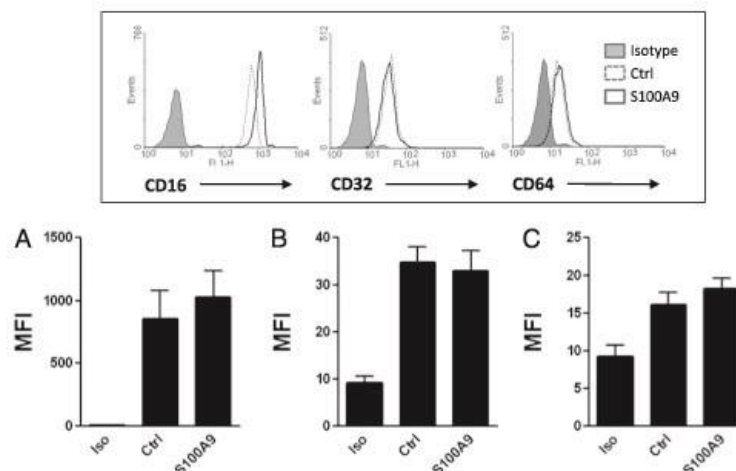


FIGURE 4. S100A9 increases human neutrophil phagocytosis dependent of Fc γ R in a concentration-dependent manner. Percentage of phagocytosis was assessed by counting the uptake of opsonized SRBCs, as described in *Materials and Methods*. Cells were stimulated with 40 μ g/ml S100A8, S100A9, or S100A12 or 65 ng/ml GM-CSF (A, B) or 0.1–100 μ g/ml S100A9 (C) for 30 min. SRBCs were then added at a 5:1 ratio for 30 min and the phagocytosis rate (A, C) and index (B) were determined. Data represent the mean $\pm$ SEM of four experiments performed on cells from different donors. Arrows point to ingested SRBCs. Images were obtained by cytology from cytocentrifuged preparations colored by Wright–Giemsa staining (original magnification $\times 400$).

FIGURE 5. Cell surface expression of FcγRs in human neutrophils stimulated with S100A9. Cell surface expression of CD16 (A), CD32 (B), and CD64 (C) were monitored by flow cytometry, as described in *Materials and Methods*. Cells were incubated in the presence of 40 μg/ml S100A9 or the equivalent volume of buffer (Ctrl) for 30 min at 37°C. Data represent the mean ± SEM of three experiments performed on cells from different donors. For the *inset*, results are from one experiment representative of three others.



pathways in S100A9-primed phagocytosis. Cells were preincubated in the presence or absence of specific inhibitors of Syk (piccatannol and Syki II), MEK1/2 (PD98059 and U0126), and PI3K/Akt (wortmannin) for 30 min and then stimulated with S100A9. Because we had previously demonstrated that S100A9 also induces the phosphorylation of p38 and JNK in human neutrophils (22), SB203580 and JNK inhibitor II were also tested for

their ability to block S100A9-induced phagocytosis as specific inhibitors of p38 and JNK MAPKs, respectively (22). However, both SB203580 (Supplemental Fig. 1) and JNK II had no effect on the ability of S100A9 to enhance phagocytosis. In contrast, the MEK1/2 (PD98059 and U0126) inhibitors partly blocked the effect of S100A9 on phagocytosis without affecting the control (Fig. 8). Interestingly, the Syk inhibitors (piccatannol and Syki II)

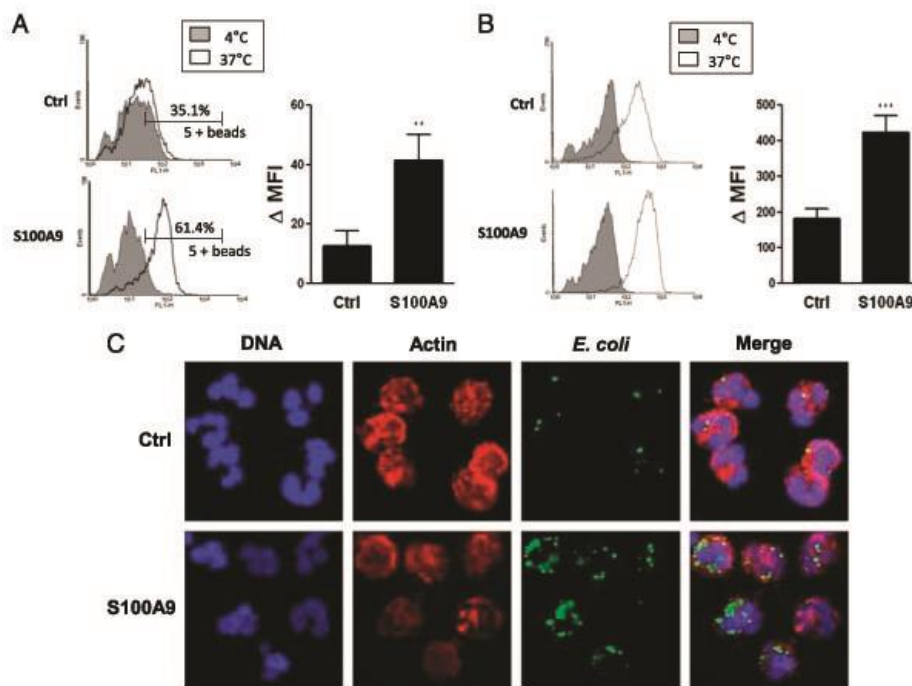


FIGURE 6. S100A9 increases CR-mediated phagocytosis in human neutrophils. Phagocytosis was assessed by flow cytometry (A, B) by monitoring fluorescence intensity or by immunofluorescence microscopy (C), as described in *Materials and Methods*. Cells were stimulated with 40 μg/ml S100A9 or the equivalent volume of buffer (Ctrl) for 30 min. FITC-labeled microspheres (A) or Alexa Fluor 488-labeled *E. coli* (B), in a 10:1 ratio, were then added to neutrophils for 30 min at 37°C or 4°C (negative control) to measure phagocytosis. Results are representative of one out of at least three experiments. Uptakes, expressed as ΔMFI (ΔMFI = MFI_{37°C} - MFI_{4°C}), are means ± SEM of four experiments performed on cells from different donors.

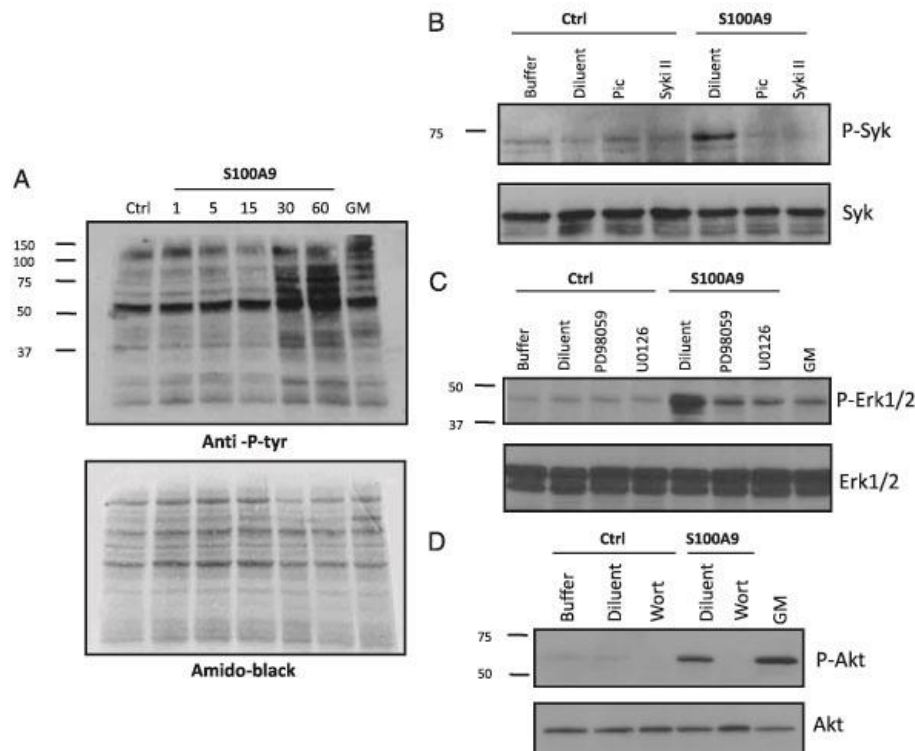


FIGURE 7. S100A9 induces phosphorylation events in human neutrophils. Phosphorylation of (A) total tyrosyl residues, (B) Syk, (C) Erk1/2, and (D) Akt were assessed by immunoblotting using specific Abs as described in *Materials and Methods*. Cells (4×10^7 cells/ml) were incubated with 40 μ g/ml S100A9 (A9) or the equivalent volume of buffer (Ctrl) for 1–60 min (A), or 10 min with 65 ng/ml GM-CSF. For some samples, a 30-min pretreatment with specific inhibitors of the Syk, MEK1/2, or PI3K/Akt pathways (30 μ M piceatannol, 1 μ M Syki II, 5 μ M PD98059, 5 μ M U0126, or 10 nM wortmannin) was performed. Shown here is one experiment representative of at least three others.

blocked the S100A9-enhanced phagocytosis by 90%, whereas phagocytosis in control cells was not significantly affected by the inhibitors. Finally, the PI3K inhibitor (wortmannin) reduced phagocytosis rate by ~25% in both control and S100A9-stimulated neutrophils. Collectively, these results demonstrate that the S100A9-enhanced phagocytic activity in neutrophils is strongly mediated by the activation of Syk and its downstream substrates, and partly by the activation of MEK1/2.

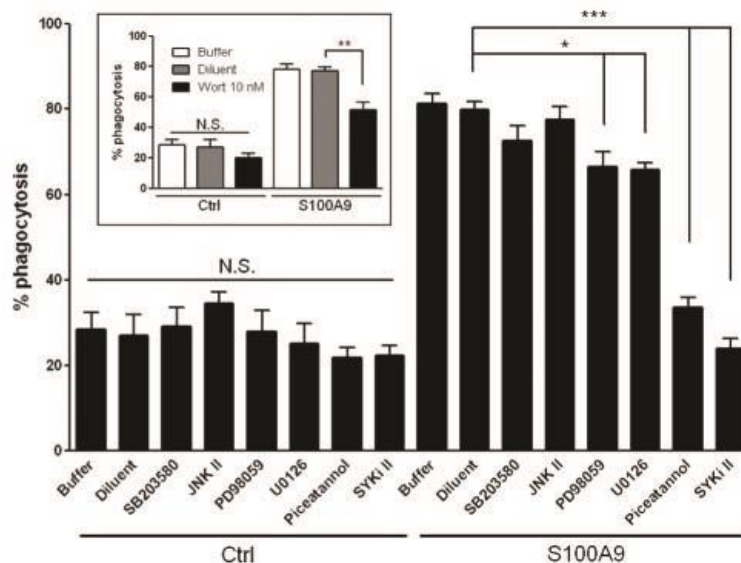
Discussion

S100A8, S100A9, and S100A12 form a subgroup of S100 proteins collectively referred to as myeloid-related proteins. They modulate neutrophil functions, including chemotaxis, adhesion, and transmigration via the activation of CD11b/CD18 (18–21). Recently, we demonstrated that S100A9, but neither S100A8 or S100A12, induces neutrophil degranulation (22). This suggests that these proteins have separate functions, a hypothesis corroborated by the fact that they are secreted separately by neutrophils (P. A. Tessier, unpublished observations). In this study, we further explored the activity of myeloid-related proteins and demonstrated that S100A9, but not S100A8 or S100A12, induces intracellular ROS accumulation over time through NADPH oxidase activation. We also found that S100A9 increases human neutrophil bactericidal activity against *E. coli* at least partly by increasing neutrophil FcR- and CR-mediated phagocytosis. The effect of S100A9

on phagocytosis was independent of the expression of FcγR since it did not upregulate the cell surface expression of CD16, CD32, and CD64.

Acute inflammation occurs a few hours following trauma or infection and is characterized by neutrophil adhesion to the endothelial barrier and migration toward affected tissues (47). Polymorphonuclear neutrophils are the first immune cells to arrive at the inflammatory site and they are crucial for the containment of pathogens within the infected site (1). In some cases, the acute response fails to eliminate pathogens and the response is exacerbated, leading to a chronic inflammatory state (47). This attests to the importance of an efficient and fast clearance of pathogens. During the inflammation process, different types of soluble molecules are secreted to regulate the immune response. Among these molecules, S100A8, S100A8/A9, and S100A9 are released in the extracellular milieu after phagocyte activation or cell necrosis. S100A8, S100A9, and S100A12 are potent antimicrobial factors inhibiting microorganismal growth (24, 48). The importance of these proteins is illustrated by the fact that S100A9-deficient mice had increased abscess lesions and mortality after s.c. challenge with *C. albicans*, probably due to the loss of S100A8/A9 (12). S100A8/A9 is thought to mediate its effect by chelating divalent ions, which are essential for microbial growth. Our results show that S100A9 also enhances neutrophil phagocytosis, corroborating its importance in the control of infection. Thus, in the context of

FIGURE 8. S100A9 increases human neutrophil phagocytosis by Syk-PI3K/Akt-Erk1/2-dependent mechanisms. The percentage of phagocytosis was assessed by counting the uptake of SRBCs as described in *Materials and Methods*. Cells (1×10^7 cells/ml) were pretreated with specific inhibitors (30 μ M piceatannol, 1 μ M Syk II, 5 μ M PD98059, 5 μ M U0126, 5 μ M SB203580, 10 μ M JNKII, or 10 nM wortmannin) and then incubated with 40 μ g/ml S100A9 or the equivalent volume of buffer (Ctrl) for 30 min. SRBCs were then added at a 5:1 ratio for 30 min and phagocytosis was assayed. Data represent the mean $\pm$ SEM of four experiments performed on cells from different donors.



an infection, S100A9 secretion would favor clearance of pathogens and restore the normal homeostatic state of the tissue, thereby limiting or preventing excessive tissue injury and chronic inflammation. The results presented in this study demonstrate a new role for S100A9 in pathogen clearance and in the acute immune response.

Phagocytosis plays a crucial role in host defense leading to internalization and destruction of pathogens >0.5 μ m. It is also involved in Ag presentation (42), although this latter function for neutrophils remains controversial. Albeit phagocytosis can occur in absence of opsonization, it is greatly enhanced by interactions between the Fc portion of Ig or complement components (iC3b) and FcRs or CRs at the phagocyte surface (3, 49). Interactions between receptors and their ligands trigger the formation of phagopods and ultimately lead to the complete uptake of the particle. Several soluble mediators are known to enhance phagocytosis in human macrophages or neutrophils, including the cytokines GM-CSF, IL-4, and IL-15 (31, 43, 50), but the mechanisms underlying this biological response remain unclear. However, it has been demonstrated that Src proteins and Syk are essential for signal transduction leading to cytoskeleton remodeling and phagocytosis (51, 52). Additionally, downstream signaling pathways such as PI3K and ERK or the actin regulator protein complex Arp2/3 are also crucial for the uptake of particles (46, 53, 54). Importantly, FcR- and CR-mediated phagocytosis are differentially regulated (4). For instance, FcR-mediated phagocytosis is dependent on Cdc42 and Rac, whereas CR-mediated phagocytosis is regulated by Rho (55). Interestingly, our results demonstrate that S100A9 modulates both types of phagocytosis, suggesting that this protein acts on both pathways or, at least, on common signaling molecules.

S100A9 induced tyrosine phosphorylation events, including the phosphorylation of Syk, Erk1/2, and Akt. Interestingly, this latter phenomenon is also pivotal for FcR-mediated phagocytosis (56), suggesting that S100A9 mediates its effect through phosphorylation-based mechanisms. It is noteworthy that tyrosine phosphorylation is associated with actin assembly, a key step in the process of cell adhesion and migration (57, 58), two functions that

S100A9 also activates in human neutrophils (19, 21, 22). It is well known that phagocytosis mediated by Fc γ RIIIa and/or Fc γ RIIIb depends on Syk, PI3K, and ERK1/2 (22). We have already

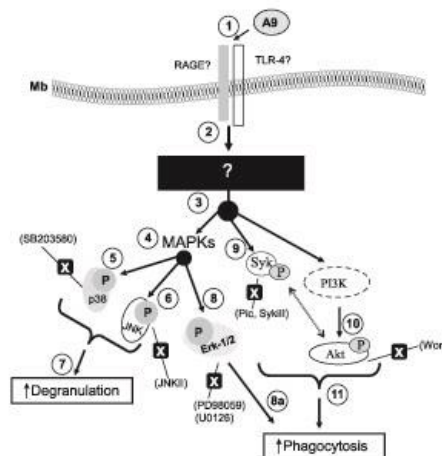


FIGURE 9. Proposed model of signaling involved in S100A9-induced degranulation and phagocytosis in human neutrophils. 1) S100A9 (A9) binds to its as yet unidentified receptor (possibly the receptor for advanced glycation end products and/or TLR-4) and induces early events (2) that are still unknown (represented here as a black box), ultimately leading to the activation of MAPKs (3). More specifically, S100A9 activates p38 (3) and JNK (6), which are both involved in its ability to induce degranulation. Unlike these two MAPKs, the activation of Erk-1/2 by S100A9 (8) leads to enhanced phagocytosis (8a). In addition to MAPKs, S100A9 activates Syk (9) and Akt (10), which are both involved in phagocytosis. The use of specific inhibitors of p38 (SB203580), JNK (JNKII), MEK1/2 (PD98059 and U0126), Syk (piceatannol [Pic] and SykII), and Akt (wortmannin [Wort]) leads to inhibition of S100A9-induced degranulation and phagocytosis (see boxed Xs). The dotted arrow indicates a probable association between Syk and Akt.

demonstrated that the MAPKs p38, JNK, and ERK1/2 are activated in neutrophils in response to S100A9 and that only p38 and JNK participate in the induction of degranulation (22). Therefore, we first tested the involvement of these kinases in S100A9-enhanced phagocytic activity. Unexpectedly, p38 and JNK inhibitors had no effects on the enhanced phagocytic activity of S100A9-primed neutrophils. However, abolishment of ERK1/2 activation, through the inhibition of MEK1/2, slightly diminished the priming effect of S100A9 on phagocytosis. Therefore, this pathway seems not to be largely implicated in S100A9-mediated signals rendering neutrophils more efficient to phagocyte pathogens.

Interestingly, using Syk-deficient neutrophils, it was recently demonstrated that specific deletion of Syk results in reduced host defense against bacterial infection, including *E. coli* (59). Corroborating the importance of Syk in neutrophil phagocytosis, we recently demonstrated that depletion of Syk by an antisense strategy dramatically diminished the ability of IL-4 to enhance phagocytosis of opsonized SRBCs (31). In this study, we demonstrate that S100A9 induces phosphorylation of Syk in neutrophils. Indeed, phosphorylation occurs between 15 and 30 min postexposure to S100A9. According to our data and considering the role of Syk in the phosphorylation of downstream cytoskeletal substrates and in F-actin remodeling (reviewed in Ref. 60), we think that S100A9-exposed neutrophils start reorganization of actin cytoskeleton before the addition of the phagocytic stimuli. This phenomenon might facilitate upstream events and augment the efficacy of the engulfment. Because membrane 3'-phosphoinositides, products derived from the activation of the PI3K, play also a relevant role in the recruitment of cytoskeletal substrates, pseudopods extension, and phagocytosis (46), experiments using the PI3K inhibitor wortmannin have been performed to investigate whether exposure to S100A9 can activate this kinase. We demonstrate signaling cascades induced by S100A9 promote phosphorylation of Akt in neutrophils, which is a substrate of the activated PI3K. However, based on our results we cannot discriminate between the S100A9- and SRBCs-mediated PI3K activation in the initiation of phagocytosis since wortmannin inhibits similarly phagocytosis in control and in S100A9-treated neutrophils. Overall, these observations suggest specific roles for p38, ERK1/2, Syk, PI3K/Akt, and JNK in neutrophil functions as well as a new mechanism of action for S100A9, which is summarized in Fig. 9.

S100A8, S100A9, and S100A12 have both intracellular and extracellular activities. Via its interaction with arachidonic acid, $p67^{\text{phox}}$, and Rac-2, intracellular S100A8/A9 activates NADPH oxidase (60). However, a recent study reported that exogenous administration of S100A8, S100A8/A9, and S100A9 inhibit neutrophil oxidative metabolism (61). This is in contrast with our results indicating that S100A9 (but not S100A8 or S100A12) induces neutrophil ROS production. These different outcomes might be explained by the sensitivity of S100 proteins to their environment, as the functions of these proteins are regulated by various modifications, including oxidation and glutathionylation (62–64), thereby providing a possible explanation for this discrepancy. Compared to PMA, which induces a strong and rapid oxidative burst, S100A9 rather induced ROS accumulation over a longer period of time. No superoxide anions were detected in the extracellular medium following S100A9 stimulation. Although ROS were detected in the intracellular compartment, we did not observe any significant difference in the neutrophil K_L . This suggests that ROS are dispensable in S100A9-induced bacterial killing. Of note, as ROS can also transmit signals, these results suggest that S100A9-induced ROS accumulation could act as

a danger signal for the organism, as ROS regulate neutrophil functions, including gene expression, cytokine production, and, more importantly, phagocytosis (65). Additionally, potentiation of neutrophil responses by ROS production was previously associated with tyrosine phosphorylation (66, 67). However, ROS can also act as second messengers by inducing tyrosine phosphorylation events, which can in turn modulate ROS accumulation (68). The evidence that reactive oxygen species act as signaling molecules suggests that S100A9 could transduce its effects, at least in part, via a ROS-dependent mechanism that needs to be further investigated. ROS production could occur via multiple routes in neutrophils. For example, the production of PGs and leukotrienes is a process known to generate ROS. Whether S100A9 induces the production of these proinflammatory mediators remains to be confirmed.

In conclusion, this study leads us to propose a novel role for S100A9 relevant to the control of infections. Early on during infections, S100A8, S100A9, and S100A12 are released upon phagocyte activation, for example, in tissue abscesses and infected mucosae (23–27). As they are highly expressed in the cytoplasm of neutrophils, the secretion of S100A9 even by a few neutrophils could easily lead to high concentrations of S100 proteins at the infection site. Upon their release, S100A8, S100A9, and S100A12 act as danger signals for the organism, inducing the recruitment of neutrophils from the blood to the inflammatory site. This activity is triggered by the stimulation of Mac-1 and the degranulation of neutrophils (20, 22, 30). Additionally, S100A8/A9 and S100A12 would inhibit the growth of bacteria at the infection site, allowing time for the migration of large numbers of neutrophils to occur. Finally, as neutrophils reach the infection site, they become activated by S100A9, leading to the enhancement of their phagocytic activity and the rapid clearance of the pathogens.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Nathan, C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 173–182.
- Nimmerjahn, F., and J. V. Ravetch. 2008. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 34–47.
- Brown, E. J. 1992. Complement receptors, adhesion, and phagocytosis. *Infect. Agents Dis.* 1: 63–70.
- May, R. C., and L. M. Machesky. 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 114: 1061–1077.
- García-García, E., and C. Rosales. 2002. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* 72: 1092–1108.
- Turrens, J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552: 335–344.
- Edgeworth, J., M. Gorman, R. Bennett, P. Freemont, and N. Hogg. 1991. Identification of p8,14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells. *J. Biol. Chem.* 266: 7706–7713.
- Berntzen, H. B., and M. K. Fagerhol. 1990. L1, a major granulocyte protein; isolation of high quantities of its subunits. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 50: 769–774.
- Endoh, Y., Y. M. Chung, I. A. Clark, C. L. Geczy, and K. Hsu. 2009. IL-10-dependent S100A8 gene induction in monocytes/macrophages by double-stranded RNA. *J. Immunol.* 182: 2258–2268.
- Yen, T., C. A. Harrison, J. M. Devery, S. Leong, S. E. Iismaa, T. Yoshimura, and C. L. Geczy. 1997. Induction of the S100 chemotactic protein, CP-10, in murine microvascular endothelial cells by proinflammatory stimuli. *Blood* 90: 4812–4821.
- Foell, D., H. Wittkowski, T. Vogl, and J. Roth. 2007. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J. Leukoc. Biol.* 81: 28–37.
- Urban, C. F., D. Ernert, M. Schmid, U. Abu-Abed, C. Goosmann, W. Nacken, V. Brinkmann, P. R. Jungblut, and A. Zychlinsky. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 5: e1000639.
- Vogl, T., K. Tenbrock, S. Ludwig, N. Leukert, C. Ehrhardt, M. A. van Zoelen, W. Nacken, D. Foell, T. van der Poll, C. Sorg, and J. Roth. 2007. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat. Med.* 13: 1042–1049.

14. Hofmann, M. A., S. Drury, C. Fu, W. Qu, A. Taguchi, Y. Lu, C. Avila, N. Kambham, A. Bierhaus, P. Nawroth, et al. 1999. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97: 889–901.
15. Lügering, N., R. Stoll, T. Kucharzik, K. W. Schmid, G. Rohlmann, G. Burmeister, C. Sorg, and W. Domschke. 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.
16. van Lent, P. L., L. Grevers, A. B. Blom, A. Slotjes, J. S. Mort, T. Vogl, W. Nacken, W. B. van den Berg, and J. Roth. 2008. Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 67: 1750–1758.
17. Loser, K., T. Vogl, M. Voskort, A. Lueken, V. Kupas, W. Nacken, L. Klenner, A. Kuhn, D. Foell, L. Sorokin, et al. 2010. The Toll-like receptor 4 ligands MRP8 and MRP14 are crucial in the development of autoreactive CD8⁺ T cells. *Nat. Med.* 16: 713–717.
18. Newton, R. A., and N. Hogg. 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.
19. Anceriz, N., K. Vandal, and P. A. Tessier. 2007. S100A9 mediates neutrophil adhesion to fibronectin through activation of β_2 integrins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354: 84–89.
20. Ryckman, C., K. Vandal, P. Rouleau, M. Talbot, and P. A. Tessier. 2003. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J. Immunol.* 170: 3233–3242.
21. Vandal, K., P. Rouleau, A. Boivin, C. Ryckman, M. Talbot, and P. A. Tessier. 2003. Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 171: 2602–2609.
22. Simard, J. C., D. Girard, and P. A. Tessier. 2010. Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. *J. Leukoc. Biol.* 87: 905–914.
23. Pechkovsky, D. V., O. M. Zalutskaya, G. I. Ivanov, and N. I. Misuno. 2000. Calprotectin (MRP8/14 protein complex) release during mycobacterial infection in vitro and in vivo. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29: 27–33.
24. Corbin, B. D., E. H. Seeley, A. Raab, J. Feldmann, M. R. Miller, V. J. Torres, K. L. Anderson, B. M. Dattilo, P. M. Dunman, R. Gerads, et al. 2008. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science* 319: 962–965.
25. Herndon, B. L., S. Abbasi, D. Bennett, and D. Bamberger. 2003. Calcium-binding proteins MRP 8 and 14 in a *Staphylococcus aureus* infection model: role of therapy, inflammation, and infection persistence. *J. Lab. Clin. Med.* 141: 110–120.
26. Kocher, M., P. A. Kenny, E. Farram, K. B. Abdul Majid, J. J. Finlay-Jones, and L. Geczy. 1996. Functional chemotactic factor CP-10 and MRP-14 are abundant in murine abscesses. *Infect. Immun.* 64: 1342–1350.
27. Leach, S. T., H. M. Mitchell, C. L. Geczy, P. M. Sherman, and A. S. Day. 2008. S100 calgranulin proteins S100A8, S100A9 and S100A12 are expressed in the inflamed gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected children. *Can. J. Gastroenterol.* 22: 461–464.
28. Sohnle, P. G., M. J. Hunter, B. Bahn, and W. J. Chazin. 2000. Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). *J. Infect. Dis.* 182: 1272–1275.
29. Raquil, M. A., N. Anceriz, P. Rouleau, and P. A. Tessier. 2008. Blockade of antimicrobial proteins S100A8 and S100A9 inhibits phagocyte migration to the alveoli in streptococcal pneumonia. *J. Immunol.* 180: 3366–3374.
30. Rouleau, P., K. Vandal, C. Ryckman, P. E. Poubelle, A. Boivin, M. Talbot, and P. A. Tessier. 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. Ennaciri, J., and D. Girard. 2009. IL-4Ra, a new member that associates with Syk kinase: implication in IL-4-induced human neutrophil functions. *J. Immunol.* 183: 5261–5269.
32. Williamson, D. J., and T. C. Brown. 1987. Enhancement of neutrophil-mediated phagocytosis by human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor demonstrated using a novel mathematical model. *Immunol. Cell Biol.* 65: 329–335.
33. Lemarie, A., C. Morzadec, E. Bourdonnay, O. Fardel, and L. Vernhet. 2006. Human macrophages constitute targets for immunotoxic inorganic arsenic. *J. Immunol.* 177: 3019–3027.
34. Green, J. N., C. C. Winterbourn, and M. B. Hampton. 2007. Analysis of neutrophil bactericidal activity. In *Neutrophil Methods and Protocols*. M. T. Quinn, F. R. DeLeo, and G. M. Bokoch, eds. Humana Press, Totawa, NJ, p. 319–332.
35. Pelletier, M., C. J. Roberge, M. Gauthier, K. Vandal, P. A. Tessier, and D. Girard. 2001. Activation of human neutrophils in vitro and dieldrin-induced neutrophilic inflammation in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 70: 367–373.
36. Gauthier, M., C. J. Roberge, M. Pelletier, P. A. Tessier, and D. Girard. 2001. Activation of human neutrophils by technical toxaphene. *Clin. Immunol.* 98: 46–53.
37. Ghavami, S., M. Eshragi, S. R. Ande, W. J. Chazin, T. Klonisch, A. J. Halayko, K. D. McNeill, M. Hashemi, C. Kerkhoff, and M. Lox. 2010. S100A8/A9 induces autophagy and apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes that involves BNIP3. *Cell Res.* 20: 314–331.
38. Babior, B. M., R. S. Kipnes, and J. T. Curnutte. 1973. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* 52: 741–744.
39. Roos, D., R. van Bruggen, and C. Meischl. 2003. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* 5: 1307–1315.
40. Good, R. A., P. G. Quie, D. B. Windhorst, A. R. Page, G. E. Rodey, J. White, J. J. Wolfson, and B. H. Holmes. 1968. Fatal (chronic) granulomatous disease of childhood: a hereditary defect of leukocyte function. *Semin. Hematol.* 5: 215–254.
41. Steinbakk, M., C. F. Naess-Andresen, E. Lingaas, I. Dale, P. Brandtzaeg, and M. K. Fagerhol. 1990. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 336: 763–765.
42. W. E. Paul, ed. 2008. *Fundamental Immunology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
43. Kodzierska, K., N. J. Vardaxis, A. Jaworowski, and S. M. Crowe. 2001. Fc γ R-mediated phagocytosis by human macrophages involves Hck, Syk, and Pyk2 and is augmented by GM-CSF. *J. Leukoc. Biol.* 70: 322–328.
44. Borregaard, N., O. E. Sørensen, and K. Theilgaard-Mönch. 2007. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 28: 340–345.
45. Greenberg, S., P. Chang, and S. C. Silverstein. 1994. Tyrosine phosphorylation of the γ subunit of Fc γ receptors, p72syk, and paxillin during Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J. Biol. Chem.* 269: 3897–3902.
46. García-García, E., R. Rosales, and C. Rosales. 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: 107–114.
47. C. N. Serhan, P. A. Ward, and D. W. Gilroy, eds. 2010. *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press, New York.
48. Sohnle, P. G., B. L. Hahn, and V. Santhanagopalan. 1996. Inhibition of *Candida albicans* growth by calprotectin in the absence of direct contact with the organisms. *J. Infect. Dis.* 174: 1369–1372.
49. Ravetch, J. V., and S. Bolland. 2001. IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 275–290.
50. Pelletier, M., V. Lavastre, A. Savoie, C. Rathé, R. Saller, K. Hostanska, and D. Girard. 2001. Modulation of interleukin-15-induced human neutrophil responses by the plant lectin *Vicia alba* agglutinin-I. *Clin. Immunol.* 101: 229–236.
51. Korade-Mirnic, Z., and S. J. Corey. 2000. Src kinase-mediated signaling in leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 68: 603–613.
52. Turner, M., E. Schweighoffer, F. Colucci, J. P. Di Santo, and V. L. Tybulewicz. 2000. Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol. Today* 21: 148–154.
53. Coxon, P. Y., M. J. Rane, D. W. Powell, J. B. Klein, and K. R. McLeish. 2000. Differential mitogen-activated protein kinase stimulation by Fc γ receptor IIa and Fc γ receptor IIb determines the activation phenotype of human neutrophils. *J. Immunol.* 164: 6530–6537.
54. May, R. C., E. Caron, A. Hall, and L. M. Machesky. 2000. Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by Fc γ R or CR3. *Nat. Cell Biol.* 2: 246–248.
55. Caron, E., and A. Hall. 1998. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282: 1717–1721.
56. Greenberg, S., P. Chang, and S. C. Silverstein. 1993. Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J. Exp. Med.* 177: 529–534.
57. Gaudry, M., A. C. Caon, C. Gilbert, S. Lille, and P. H. Naccache. 1992. Evidence for the involvement of tyrosine kinases in the locomotory responses of human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 51: 103–108.
58. Melamed, I., G. P. Downey, and C. M. Roifman. 1991. Tyrosine phosphorylation is essential for microfilament assembly in B lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176: 1424–1429.
59. Van Ziffle, J. A., and C. A. Lowell. 2009. Neutrophil-specific deletion of Syk kinase results in reduced host defense to bacterial infection. *Blood* 114: 4871–4882.
60. Kerkhoff, C., W. Nacken, M. Benedyk, M. C. Dagher, C. Sopalla, and J. Doussiere. 2005. The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2. *FASEB J.* 19: 467–469.
61. Sroussi, H. Y., Y. Lu, Q. L. Zhang, D. Villines, and P. T. Marucha. 2010. S100A8 and S100A9 inhibit neutrophil oxidative metabolism in-vitro: involvement of adenosine metabolites. *Free Radic. Res.* 44: 389–396.
62. Sroussi, H. Y., J. Berline, and J. M. Palefsky. 2007. Oxidation of methionine 63 and 83 regulates the effect of S100A9 on the migration of neutrophils in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 81: 816–824.
63. Lim, S. Y., M. J. Rafferty, J. Goyette, and C. L. Geczy. 2010. S-glutathionylation regulates inflammatory activities of S100A9. *J. Biol. Chem.* 285: 14377–14388.
64. Lim, S. Y., M. J. Rafferty, J. Goyette, K. Hsu, and C. L. Geczy. 2009. Oxidative modifications of S100 proteins: functional regulation by redox. *J. Leukoc. Biol.* 86: 577–587.
65. Fialkow, L., Y. Wang, and G. P. Downey. 2007. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic. Biol. Med.* 42: 153–164.
66. Waddell, T. K., L. Fialkow, C. K. Chan, T. K. Kishimoto, and G. P. Downey. 1994. Potentiation of the oxidative burst of human neutrophils: a signaling role for L-selectin. *J. Biol. Chem.* 269: 18485–18491.
67. Fortes, M., W. W. Jin, and C. Nathan. 1993. Adhesion-dependent protein tyrosine phosphorylation in neutrophils treated with tumor necrosis factor. *J. Cell Biol.* 120: 777–784.
68. Brumell, J. H., A. L. Burkhardt, J. B. Bolen, and S. Grinstein. 1996. Endogenous reactive oxygen intermediates activate tyrosine kinases in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 271: 1455–1461.

Article 2

Titre

S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF- κ B

Auteurs

Jean-Christophe Simard, Annabelle Cesaro, Julie Chapeton-Montes, Mélanie Tardif, Francis Antoine, Denis Girard et Philippe A. Tessier

Publié dans la revue

PLoS One. 2013 Aug 19;8(8):e72138.

Contributions personnelles

J'ai personnellement réalisé la majorité des expériences de ce papier à l'exception des expériences de certains autres auteurs. J'ai planifié et conçu la plupart des expériences et j'ai rédigé le papier.

Contributions des autres auteurs

A. Cesaro a réalisé des expériences de microréseaux d'anticorps et a participé à la correction du papier. J. Chapeton-Montes a également effectué des expériences de microréseaux d'anticorps. M. Tardif a réalisé les expériences avec les lignées THP-Xblue en plus de participer à la rédaction du papier. F. Antoine a participé aux expériences de types EMSA. D. Girard et P.A. Tessier ont participé à la planification des expériences et à la rédaction du papier.

Résumé de l'article 2 en français

S100A8 et S100A9 induisent l'expression de cytokines et régulent l'inflammasome NLRP-3 via une activation de NF- κ B dépendante des espèces réactives de l'oxygène

S100A8 et S100A9 sont des protéines cytoplasmiques exprimées par les phagocytes. Des concentrations élevées de ces protéines ont été associées avec diverses conditions inflammatoires, incluant des maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn ainsi que des maladies auto-inflammatoires. Dans la présente étude, nous avons étudié les effets de S100A8 et S100A9 sur la sécrétion de cytokines et chimiokines par les cellules mononucléées du sang périphérique. S100A8 et S100A9 ont provoqué la sécrétion de cytokines comme l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-1 β . Cette sécrétion a été associée avec l'activation et la translocation du facteur de transcription NF- κ B. L'inhibition de NF- κ B avec une approche d'ARN antisens ainsi qu'avec l'agent pharmacologique BAY-117082 a confirmé l'implication de ce facteur de transcription dans la sécrétion de ces trois cytokines. L'activation de NF- κ B, de la protéine NLRP-3 et de la pro-IL-1 β par S100A8 et S100A9 dépendait de la génération d'espèces réactives de l'oxygène. Cet effet a été synergiquement augmenté par l'ajout d'ATP, un activateur connu de l'inflammasome. Ces résultats suggèrent que S100A8 et S100A9 augmentent la réponse inflammatoire en provoquant la sécrétion de cytokines par les cellules mononucléées du sang périphérique.

S100A8 and S100A9 Induce Cytokine Expression and Regulate the NLRP3 Inflammasome via ROS-Dependent Activation of NF- κ B¹

Jean-Christophe Simard¹, Annabelle Cesaro², Julie Chapeton-Montes², Mélanie Tardif², Francis Antoine¹, Denis Girard¹, Philippe A. Tessier^{2*}

¹ Laboratoire de Recherche en Inflammation des Granulocytes, Université du Québec Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada, ² Axe Maladies Infectieuses et Immunitaires, Centre de Recherche du CHU de Québec et Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Canada

Abstract

S100A8 and S100A9 are cytoplasmic proteins expressed by phagocytes. High concentrations of these proteins have been correlated with various inflammatory conditions, including autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and Crohn's disease, as well as autoinflammatory diseases. In the present study, we examined the effects of S100A8 and S100A9 on the secretion of cytokines and chemokines from PBMCs. S100A8 and S100A9 induced the secretion of cytokines such as IL-6, IL-8, and IL-1 β . This secretion was associated with the activation and translocation of the transcription factor NF- κ B. Inhibition studies using antisense RNA and the pharmacological agent BAY-117082 confirmed the involvement of NF- κ B in IL-6, IL-8, and IL-1 β secretion. S100A8- and S100A9-mediated activation of NF- κ B, the NLR family, pyrin domain-containing 3 (NLRP3) protein, and pro-IL-1 β expression was dependent on the generation of reactive oxygen species. This effect was synergistically enhanced by ATP, a known inflammasome activator. These results suggest that S100A8 and S100A9 enhance the inflammatory response by inducing cytokine secretion of PBMCs.

Citation: Simard J-C, Cesaro A, Chapeton-Montes J, Tardif M, Antoine F, et al. (2013) S100A8 and S100A9 Induce Cytokine Expression and Regulate the NLRP3 Inflammasome via ROS-Dependent Activation of NF- κ B¹. PLoS ONE 8(8): e72138. doi:10.1371/journal.pone.0072138

Editor: Emma H. Wilson, University of California, Riverside, United States of America

Received: April 4, 2013; **Accepted:** July 6, 2013; **Published:** August 19, 2013

Copyright: © 2013 Simard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by a studentship to JCS from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and a grant from the Canadian Institutes of Health Research to PAT and DG. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have read the journal's policy and have the following conflicts. This manuscript is related to the following patents: 1. P.A. Tessier, K. Vandal, P. Rouleau C. Ryckman, CHEMOTACTIC FACTOR INHIBITOR FOR MODULATING INFLAMMATORY REACTIONS, European Patent Application EP1519749, filing date 20/06/2003, publication date 06/04/2005, granted 06/03/2009, Licensed to InflammatoRx inc. 2. P.A. Tessier, K. Vandal, P. Rouleau C. Ryckman, ANTIBODIES AGAINST S100A8 AND S100A9 PROTEINS FOR MODULATING INFLAMMATORY REACTIONS, US7,553,488, filing date 15/07/2005, publication date 29/12/2005, granted 30/06/2009, Licensed to InflammatoRx inc. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies of sharing data and materials.

* E-mail: Philippe.Tessier@crchul.ulaval.ca

Introduction

Endogenous signals originating from stressed, injured, and necrotic cells can activate the innate and adaptive immune systems [1]. These signals have been termed as danger-associated molecular patterns (DAMPs) or alarmins [2]. Like pathogen-associated molecular patterns, DAMPs are recognized by a variety of pathogen-recognition receptors (PRRs) including the toll-like receptors, the formyl-methionine receptors, and the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) [1]. Hyaluronan, galectins, high-mobility group box protein, IL-1, and S100A8/A9 are examples of DAMPs [2]. Most DAMPs combine intra- and extra-cellular activities. S100A8 and S100A9 are not exceptions and act as regulators of NADPH oxidase inside the cells and as pro-inflammatory factors once secreted [3,4]. S100A8 and S100A9 are arranged as noncovalently bonded homodimers. In addition, in the presence of calcium, S100A8 and S100A9 form a noncovalent heterodimer called S100A8/A9 or calprotectin, which is presumed to be involved in the cellular control of calcium concentrations. Once released extracellularly, they participate actively in the inflammation process by promoting phagocyte migration [5–7]. S100A8 and S100A9 are presumed to

bind to the PRRs, TLR4, and RAGE, thereby leading to transcription of pro-inflammatory genes [8,9]. S100A9 is also a potent activator of various neutrophil functions, such as degranulation and phagocytosis [10,11], supporting its role as a DAMP.

High extracellular concentrations of S100A8 and S100A9 are found in the serum and at inflammatory sites in autoimmune diseases including arthritis [12–14], lupus, and Crohn's disease [15,16]. In addition, recent studies have demonstrated a role for S100A9 in animal models of lupus, arthritis, and Alzheimer's disease [17–20].

IL-1 β is a well-known cytokine, and its effect on inflammation and in autoinflammatory disorders has been extensively studied [21–23]. In monocytes/macrophages, IL-1 β secretion is predominantly controlled by the NLR family, pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome (a multi-protein complex formed by the protein NLRP3), the adaptor protein called apoptotic speck protein (ASC), and the effector protein caspase-1 [24]. Upon activation of the inflammasome, pro-caspase-1 is recruited into the inflammasome complex and is auto-cleaved into its caspase-recruitment and activation domain, a p10 and a p20 fragment, respectively. Two molecules of the p10 fragment then associate with two p20 fragments to form the active heterotetramer caspase-

1 enzyme that cleaves pro-IL-1 β into IL-1 β and allows its secretion [24].

The inflammasome is formed in cells exposed to microbial, environmental, or endogenous danger stimuli. Two signals are traditionally required for NLRP3 inflammasome activation. The first signal, for example, transmitted by lipopolysaccharide (LPS), induces pro-IL-1 β transcription [25,26]. The second required signal is provided by reduction of intracellular K⁺ [27]. Stimuli such as ATP or the microbial pore-forming toxin nigericin induce strong K⁺ efflux, thus promoting rapid activation of caspase-1 and secretion of mature IL-1 β [28].

We recently reported that S100A9 induces the secretion of cytokines/chemokines in human monocytes [17]. We herein report that S100A8 and S100A9 induce the secretion of several pro-inflammatory cytokines, including IL-6, TNF α , and IL-1 β , by stimulating production of reactive oxygen species (ROS). These, in turn, activate the transcription factor NF- κ B, leading to cytokine secretion and expression and activation of the NLRP3 inflammasome.

Materials and Methods

Ethics Statement

These studies were approved by the INRS-Institut Armand-
Frappier's ethical committee, and all participants gave written informed consent.

Reagents

Human recombinant S100A8 and S100A9 were produced as previously described [29] and found to contain less than 1 pg endotoxin/mg of protein. LPS (from *E. coli*), cycloheximide, diphenylpicrylhydrazonium chloride (DPI), N-acetylcysteine (NAC), and anti- β -actin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). BAY-117082 (BAY) was purchased from Calbiochem (San Diego, CA). Anti-phospho-inhibitory kappa B kinase (IKK)- α / β (Ser176/177), anti-phospho-IKK- γ (Ser376), and anti-caspase-1 were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Antibodies against I κ B- α (H-4), GAPDH (FL), NF- κ B p50 (4D1), NF- κ B p65 (C-20), ASC and pro-IL-1 β (H-153) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The NLRP3/NALP-3 antibody was purchased from Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY). RPMI 1640, HEPES, penicillin/streptomycin (pen/strep), heat-inactivated FBS, opti-MEM media, and HBSS were purchased from Life Technologies (Grand Island, NY). Ficoll-Paque was obtained from GE Healthcare Bio-Science AB (Uppsala, Sweden). All secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). The Proteome Profiler™ Array (Human Cytokine Array Panel A) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). THP-Blue™, QuantiBlue™, and standard LPS 0111:B4 were purchased from InvivoGen (San Diego, CA). Protease Inhibitor Cocktail was purchased from Thermo Fisher Canada (Nepean, Ontario). PureProteome Protein A Magnetic Beads were obtained from Millipore (Billerica, MA).

PBMC Isolation

Blood samples were obtained from informed, consenting individuals according to institutionally approved procedures. PBMCs were isolated from venous blood of healthy volunteers using dextran sedimentation, followed by centrifugation over a Ficoll-Paque cushion. PBMCs were harvested and washed after centrifugation. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion and consistently found to be greater than 99%. PBMCs

were resuspended at 1×10^6 cells/ml in RPMI 1640 containing 10% autologous decompartmented serum.

Western Blot Analyses

PBMCs were stimulated with S100A8 (10 μ g/ml), S100A9 (10 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), or the equivalent volume of diluent (HBSS, 1 $\times$) at 37°C for various periods of time, as specified. For detection of I κ B- α , cells were pre-treated with 5 μ M cycloheximide to limit rapid turnover of the protein. At the end of the incubation period, cells were lysed in Laemmli's sample buffer (0.25 M Tris-HCl [pH 6.8], 8% SDS, 40% glycerol, and 20% 2-ME), and aliquots of extracts (corresponding to 8×10^5 cells) were subjected to 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes for detection of specific proteins. Membranes were blocked for 1 h at room temperature in 5% milk or in BLOK-PO Reagent from Millipore for phosphorylated proteins. After washing, primary antibodies were added at a final dilution of 1:1000 in 0.15% TBS-Tween. The membranes were incubated overnight at 4°C, washed with TBS-Tween, and incubated for 1 h at room temperature with a goat anti-rabbit IgG HRP secondary Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluted 1:25,000 in TBS-Tween or a goat anti-mouse IgG HRP secondary Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluted 1:25,000 in TBS-Tween. After several washes, protein expression was evaluated using the Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore). Membranes were stripped with ReBlot Plus Strong (Millipore) and reprobed to confirm equal loading of proteins.

Immunoprecipitation

PBMCs (6×10^6 cells) were stimulated for 4 hours with the indicated agonists followed by 30 min with 1 mM ATP. Cells were then centrifuged and lysed in ice-cold lysis buffer 1X (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA and Protease Inhibitor Cocktail 1X) for 1 hour on ice and sonicated 3 times for 20 s. The lysates were first incubate 1 h on ice with magnetic beads (5 μ l per 10^6 cells) for 1 h with agitation to remove non-specific binding. The beads were then removed and the samples were incubated overnight with 5 μ g of rabbit anti-ASC at 4°C with agitation. Protein A magnetic beads were then added (5 μ l per 1×10^6 cells) for 30 min at R.T. with agitation. The complex (antibody, bead, protein) was collected and 50 μ l of Laemmli's sample buffer 1X was added. The samples were then boiled at 100°C for 10 min, and the immunoprecipitates were then loaded on a SDS-page gel for western blot analysis.

EMSA

Nuclear extracts from cells stimulated for 4 h were prepared using the NucBuster protein extraction kit from EMD Millipore. The EMSA reaction was performed using the Gel Shift Assay System from Promega (Madison, WI). Briefly, 7 μ g of nuclear protein was mixed with 1.75 pmol of unlabeled NF- κ B consensus oligonucleotides (competitive assay) or unlabeled AP-1 consensus oligonucleotides (non-competitive assay) for 15 min at room temperature. Next, 0.03 pmol of (³²P)-labeled NF- κ B consensus oligonucleotides were added for 30 min at room temperature. The DNA-protein complex was resolved on 4% non-denaturing polyacrylamide gels. Gels were exposed for 24 h at -80°C, and the bands were visualized using X-OMAT films.

NF- κ B p50 TransFactor ELISA Assay

Assays were performed using the Colorimetric TransFactor ELISA kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, nuclear extracts were

prepared as described above. Nuclear proteins (25 µg) were incubated with or without competitor oligonucleotides for 15 min on ice. Competitor oligonucleotides correspond to the same DNA sequence as that of the oligo-coated wells, showing the binding specificity between DNA and the transcription factor. Samples were then added to wells for 60 min at room temperature. After four washes, primary antibody was added to each well and incubated for 60 min at room temperature. After four washes, a goat-anti-rabbit IgG-HRP secondary antibody was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. After four washes, the tetramethylbenzidine (TMB) substrate was added to each well for 10 min at room temperature. Finally, 1 M H₂SO₄ was added to each well, and absorbance was read at 450 nm using a SpectraMax M5 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Antisense Experiments

PBMCs (1×10⁶/ml) were incubated with p50 (5'-tggtattctgcattct-3'), p65 (5'-ggggaacagctgctccatgac-3'), or scrambled (5'-ttaccgcgcgtagacgggca-3') antisense oligonucleotides (AS) with a phosphorothioate backbone at a final concentration of 10 µM or 40 µM at 37°C in serum-free Opti-MEM media (Invitrogen) for 4 h to increase oligonucleotide uptake. Subsequently, cells were stimulated with agonists for 20 h in Opti-MEM media supplemented with 5% FBS. The transfection efficiency was greater than 90%, as determined using the same oligonucleotide sequences with a Cy3 fluorophore coupled to the 5' end and visualized by fluorescence microscopy. p50 and p65 protein expression was monitored by western blot analysis.

Immunofluorescence Microscopy

As described previously [30], following the incubation of Cy5-AS, cells were washed twice in ice-cold PBS and cytocentrifuged on glass coverslips (Fisher Scientific, Ottawa, Canada). Coverslips were mounted using ProLong Gold Antifade Media containing DAPI (Invitrogen). Fluorescent-labeled cells were captured from high-power field (3400) and observed using a Leica microscope equipped with an ebc 100 dc epifluorescent condenser.

Proteome Profiler™ Array

The Human Cytokine Array Panel A (Proteome Profiler™ Array) was purchased from R&D Systems. All steps were performed within 3 weeks of harvesting the cells. Cells from 10 different PBMC donors were stimulated for 24 h with the corresponding agonists. Supernatants were pooled together and used to probe the membranes. The chemiluminescent signals from the bound cytokines present in the supernatants were detected on X-OMAT films. Values obtained from densitometry analyses were considered when above 9000 units, which corresponds to the background value.

Caspase-1 Assay

Caspase-1 activity was measured using the Caspase-1 Colorimetric Assay kit (R&D Systems) according to the recommended protocol. Briefly, 2×10⁶ cells were stimulated with agonists for the indicated time period. Cells were lysed in ice-cold lysis buffer and incubated on ice for 10 min. Cells were centrifuged at 10,000 g for 1 min. Supernatants were then used for enzymatic reactions. Caspase-1 colorimetric substrate (WEHD-pNA) from the kit was added to each reaction mix with the corresponding volume of cell lysate, reaction buffer, and DTT. Plates were incubated for 2 h at 37°C. After incubation, plates were read on a microplate reader at

a wavelength of 405 nm. Results are expressed as fold-increase in caspase-1 activity.

IL-6, IL-8, and IL-1β Production

IL-6, IL-8, and IL-1β levels were measured using commercially available ELISA kits (Invitrogen). Freshly isolated cells were incubated with S100A8 (10 µg/ml), S100A9 (10 µg/ml), LPS (1 µg/ml), or the diluent (HBSS) for the indicated time period in 96-well plates containing RPMI-1640 supplemented with 10% autologous serum. Supernatants were harvested after centrifugation and stored at -80°C before ELISA.

Measurement of NF-κB Activity Using THP1-XBlue™ Cells

THP1-XBlue™ cells (1×10⁶) were pretreated with DPI (10 µM) or vehicle (DMSO) for 1 h and then stimulated with S100A8 (10 µg/ml), S100A9 (10 µg/ml), or LPS (1 µg/ml) for 24 h. Supernatants were harvested and incubated with Quanti-Blue™, which turns purple in the presence of secreted alkaline phosphatase (SEAP). SEAP levels were determined spectrophotometrically at 650 nm.

siRNA Transfection

PBMCs were transfected with Silencer Select Pre-designed siRNA from Ambion (Austin, TX) according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were suspended in 500 µL of opti-MEM reduced serum medium containing 3 µL of Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Life Technologies) and various concentration of siRNA. siRNA targeting ASC (sense UGAU-CUUUUUAUACACAAUTT, antisense AUUGU-GUAUAAAAAGAUCAGA), NLRP-3 (sense GGAGAGACCUUUUAUGAGAATT, antisense UUCU-CAUAAGGUCUCUCCTG) or Control non-silencing siRNA (sense UUCUCCGAACGUGUCACGUTT, antisense ACGU-GACACGUUCGGAGGAGAATT) were used. After 24 hours, cells were washed and stimulated with the indicated agonists.

Statistical Analyses

Experimental data are expressed as means ± SEM. One-way ANOVA (Dunnett's multiple-comparison test) and two-way ANOVA (Bonferroni's post-test) were performed using Graph-Pad Prism (version 5.01). Differences were considered statistically significant as follows: *p≤0.05, **p≤0.01, and ***p≤0.005 versus buffer or the appropriate diluent. Densitometric analyses were performed using AlphaEaseFC (FluorChem HD2).

Results

S100A8 and S100A9 Induce Inflammatory Cytokine Secretion

The effect of S100A8 and S100A9 on the production of cytokines/chemokines was first screened using an antibody array. As illustrated in Figure 1A and 1B, S100A8 and S100A9 induced the secretion of several pro-inflammatory cytokines in PBMCs (Fig. 1A and 1B). Among these, the cytokines IL-6, IL-1β, TNF-α and the chemokines IL-8, growth-regulated oncogene alpha (Gro-α), MIP-1α, and MIP-1β were the most secreted. The secretion of IL-6 and IL-8 in PBMCs was also confirmed by ELISA (Fig. 1C). The concentrations of these cytokines were comparable to those observed in the supernatants of cells stimulated with LPS. Isolation of monocytes, CD4+ T cells, CD8+ T cells, and B cells revealed that monocytes were the only cell type responsible for cytokine production (data not shown).

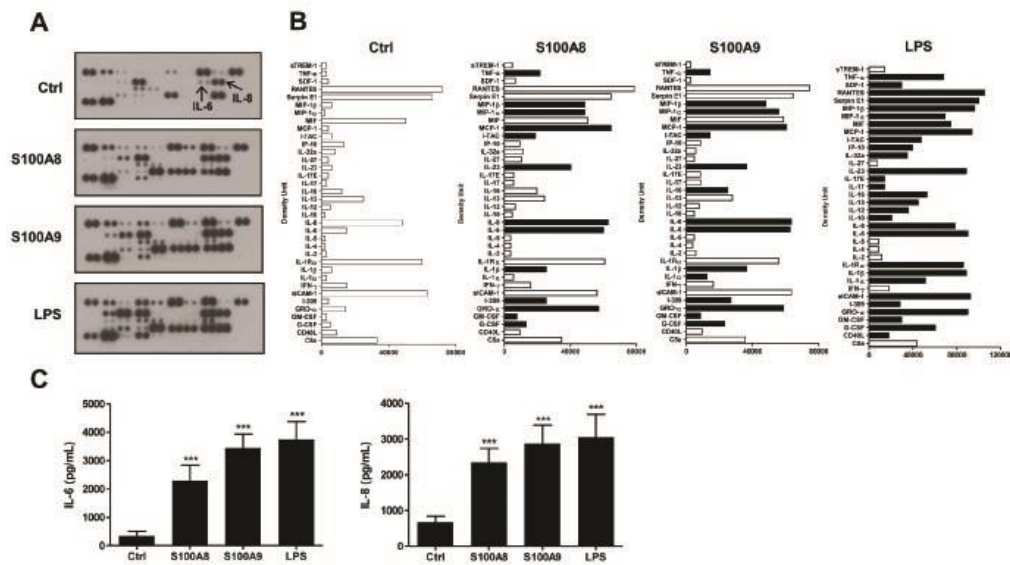


Figure 1. S100A8 and S100A9 induce the secretion of several cytokines in human PBMCs. Cytokine production was evaluated using proteome profiler arrays (A and B) or ELISA (C), as described in Materials and Methods. Cells were stimulated for 24 hours, and supernatants were harvested and used for experiments. (B) Densitometry analyses of antibody arrays in PBMCs. Data represent supernatants pooled from 10 different donors (A and B). Black bars, upregulated cytokines; white bars, unchanged cytokines. Data are the mean $\pm$ SEM of at least five experiments performed on cells from different donors (C). *** $p \leq 0.005$, Dunnett's multiple comparison test. doi:10.1371/journal.pone.0072138.g001

S100A8 and S100A9 Increase NF- κ B Translocation and Activation

The production of pro-inflammatory cytokines and chemokines largely depends on transcription factors such as NF- κ B and AP-1. Activation of NF- κ B in S100A8- and S100A9-treated PBMCs was therefore examined using EMSA. As shown in Figure 2, after stimulation for 4 h, S100A8 and S100A9 increased the DNA-binding activity of NF- κ B in PBMCs compared with that in untreated cells. As expected, LPS, which was used as a positive control, also increased this activity. These results were confirmed using an NF- κ B p50 TransFactor ELISA kit (Clontech Laboratories), which allows direct measurement of the p50 subunit levels in the nucleus (Fig. 2B). NF- κ B translocates into the nucleus after degradation of its inhibitor I κ B- α , which occurs upon phosphorylation of the p50 subunit by the IKK complex [31]. Phosphorylation of the IKK complex and degradation of I κ B- α in S100A8- and S100A9-stimulated cells was therefore investigated. Both proteins induced phosphorylation of IKK α /I κ B- α and degradation of I κ B- α in PBMCs (Fig. 2C), which was comparable to the effect induced by LPS. These results were consistent with the translocation of NF- κ B induced by S100A8 and S100A9 in PBMCs.

S100A8- and S100A9-mediated IL-6 and IL-8 Secretion Partially Depends on NF- κ B Activation

Next, we examined the role of NF- κ B activation in S100A8- and S100A9-induced cytokine secretion. First, an antisense strategy was used to down-regulate p50 or p65 (Rel A) expression. As shown in Figure 3, p50 and p65 expression remained similar to that in control cells when scrambled antisense was added to the

culture media. However, p50 antisense markedly decreased the expression of p50 (~30%), whereas p65 antisense inhibited p65 less potently (~15%). These results confirm that the p50 and p65 oligonucleotides were specific. Moreover, all antisense oligonucleotides were able to enter the cells at the same efficiency, as assessed by fluorescence microscopy. Decreased p50 and p65 expression resulted in reduced IL-8 secretion, confirming the importance of NF- κ B for the activity of S100A8 and S100A9 (Fig. 4). Interestingly, inhibition of p50 and p65 did not significantly diminish IL-6 production. The I κ B- α specific inhibitor BAY-117082 was also used to confirm these results. Addition of BAY-117082 almost completely inhibited IL-8 secretion, but IL-6 production was less affected.

Translocation of NF- κ B in Response to S100A8 and S100A9 Depends on ROS Production

ROS actively participate as the second messenger in the induction of several genes in numerous physiological and pathological conditions [reviewed in [32–34]], and function, at least in part, through the activation of NF- κ B [35,36]. Because S100A8 and S100A9 trigger ROS production in other myeloid cells, including human neutrophils [11], the role of ROS in S100A8 and S100A9-induced NF- κ B activation was investigated. First, the production of ROS in monocytes was measured using the dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) probe. S100A8 and S100A9 induced a slow accumulation of ROS over time (Fig. 5A), with ROS production becoming detectable after 90 min of stimulation with S100A9 and after 120 min of stimulation with S100A8. Next, we used the flavoprotein inhibitor DPI, which inhibits ROS generation (Fig. 5B) from NADPH

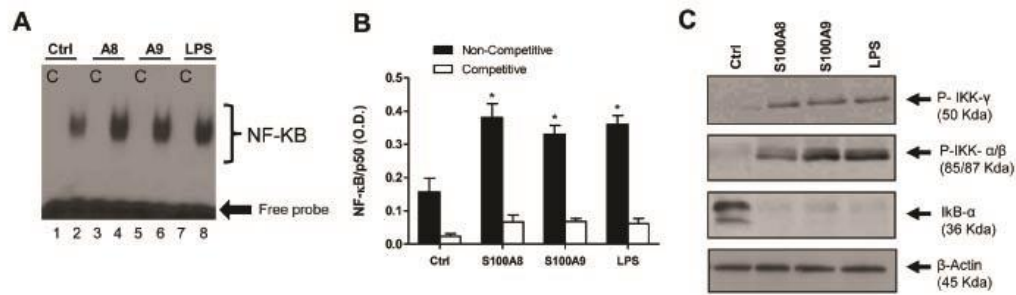


Figure 2. S100A8 and S100A9 increase translocation of NF-κB in human PBMCs. NF-κB translocation and binding were assessed by EMSA (A) and by a NF-κB p50 TransFactor ELISA kit (B). Nuclear proteins were isolated from cells stimulated for 4 h. Lanes 1, 3, 5, and 7 (C, competitive assay). Lanes 2, 4, 6, and 8 (non-competitive assay). Phosphorylation of the IKK complex and degradation of IκB-α were assessed by immunoblotting (C). Results shown are of one experiment that is representative of at least four other experiments (A and C). Data are the mean $\pm$ SEM of three experiments performed on cells from different donors (B). * $p \leq 0.05$, Dunnett's multiple comparison test. doi:10.1371/journal.pone.0072138.g002

oxidases and mitochondria, and monitored the production of IL-8 and IL-6, as well as the activation of NF-κB. DPI was found to block the production of IL-8 (Fig. 5C) and IL-6 (Fig. 5D) in a dose-dependent manner. Translocation of NF-κB was evaluated by measuring the p50 subunit levels in the nucleus in the presence of 10 μ M DPI. DPI significantly reduced the p50 subunit levels in

the nucleus of cells stimulated with S100A9 or LPS (Fig. 5E). A similar trend was observed when cells were exposed to S100A8. To confirm the negative role of DPI in S100A8- and S100A9-mediated NF-κB activation, the THP1-XBlueTM cell line reporting NF-κB activity was used. As expected, DPI strongly inhibited the activation of NF-κB in S100A8-, S100A9-, and LPS-treated

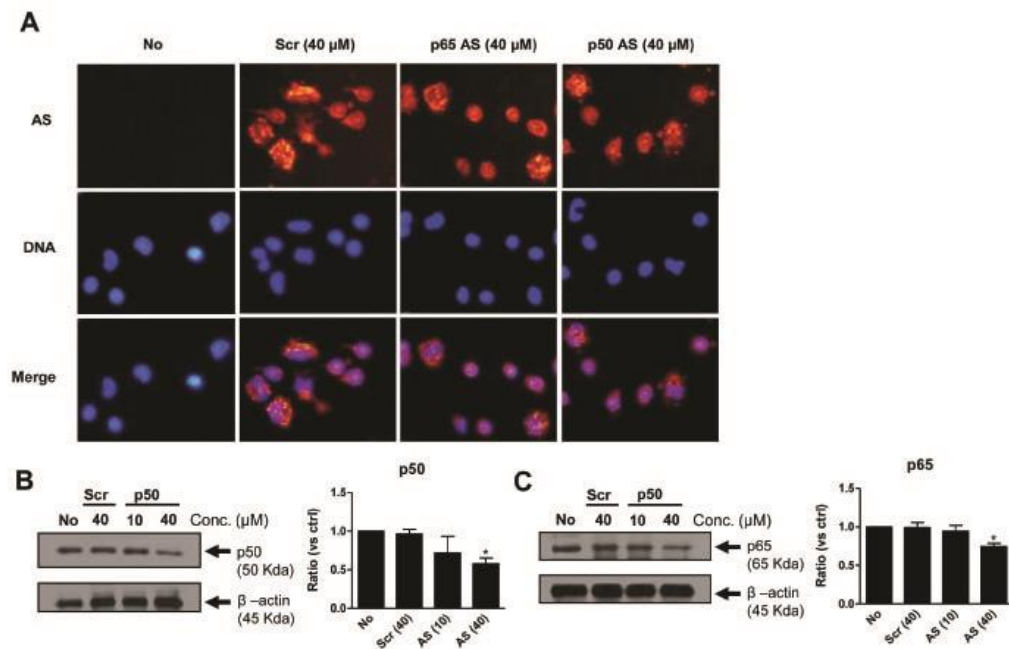


Figure 3. Inhibition of p50 and p65 using an antisense (AS) strategy in human PBMCs. Cells were treated for 4 h with p50 AS (10 or 40 μ M), p65 AS (10 or 40 μ M), the scrambled sequence AS (Scr 40 μ M), or the equivalent volume of diluent (No). Cells were then fixed on coverslips for fluorescence microscopy (A) or lysed for immunoblotting of p50 (B) and p65 (C). Results are from one experiment out of 4 total experiments are shown. * $p \leq 0.05$, Dunnett's multiple comparison test. doi:10.1371/journal.pone.0072138.g003

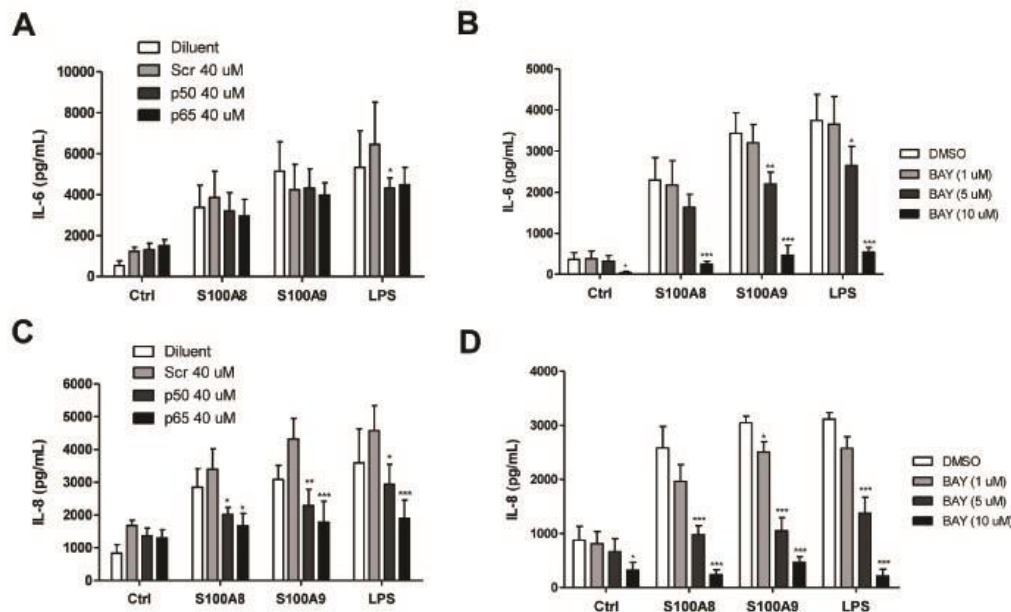


Figure 4. S100A8 and S100A9 induce IL-6 and IL-8 secretion via activation of NF- κ B in human PBMCs. Secretion of IL-6 (A and B) and IL-8 (C and D) was evaluated using ELISA. Cells were pre-treated with 1–10 μ M of BAY-117082 (or the equivalent amount of diluent) for 30 min or with antisense (Scr, p50, p65) for 4 h, followed by incubation with the indicated agonist for a total of 24 h. Supernatants were harvested and used for ELISA. Data are the mean $\pm$ SEM of at least four experiments performed on cells from different donors. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.005$, Dunnett's multiple comparison test.

doi:10.1371/journal.pone.0072138.g004

cells (Fig. 5F). Again, S100A9 was found to be a more potent activator than S100A8.

S100A8 and S100A9 Regulate the NLRP3 Inflammasome

Caspase-1 processing is the ultimate step in the activation of the NLRP3 inflammasome and leads to the secretion of IL-1 β , one of the cytokines up-regulated by S100A8 and S100A9 in human PBMCs (Fig. 1). The NLRP3 inflammasome is tightly controlled by a priming step that is dependent on NF- κ B [37]. Because S100A8 and S100A9 induced ROS production that resulted in the activation of NF- κ B, the roles of these proteins in NLRP3 inflammasome regulation and activation were investigated. The expression of pro-IL-1 β and NLRP3 was first analyzed by western blot after 4-h stimulation with S100A8, S100A9, or LPS. Both S100A8 and S100A9 increased pro-IL-1 β levels, albeit more modestly than LPS (Fig. 6A). However, NLRP3 expression was greatly increased following stimulation with S100A8 and S100A9 to levels comparable to those achieved by LPS stimulation (Fig. 6B). Pretreatment of cells with S100A8 or S100A9 followed by stimulation with ATP, a known inflammasome activator, increased the association between ASC and NLRP-3 compared to control cells without affecting the expression of the adaptor protein ASC (Fig. 6C and D). Next, the processing of caspase-1 into the active 10-kDa and 20-kDa subunits was monitored in the presence or absence of a second signal mediated by ATP. Cell priming with S100A8 or S100A9 alone was not sufficient to induce a strong cleavage of caspase-1 (Fig. 6E). However, caspase-1 cleavage was synergistically enhanced by the addition of ATP. Caspase-1 assays

were performed to further confirm the ability of S100A8 and S100A9 to modulate the enzymatic activity of caspase-1. As expected, the catalytic activity of caspase-1 was enhanced by ATP and potentiated by the presence of S100A8, and to a greater extent, by S100A9 (Fig. 6F). Next, the ability of S100A8 and S100A9 to induce IL-1 β secretion in the presence or absence of ATP was examined using ELISA. Interestingly, the levels of extracellular IL-1 β released by monocytes exposed to ATP+S100A9 were similar to those in cells exposed to ATP+LPS; however, the priming with S100A8 was again less potent (Fig. 6G).

NLRP-3 and ASC are Essentials for IL-1 β Secretion in S100A8 and S100A9-treated Cells

Secretion of IL-1 β is known to be regulated, at least in part, through the NLRP-3 inflammasome and its adaptor protein ASC [24,25]. Therefore, the roles of NLRP-3 and ASC in the production of IL-1 β in S100A8 and S100A9-primed cells were investigated. Addition of ASC-specific siRNA led to a 90% depletion of ASC (Fig. 7A) while siRNA against NLRP-3 reduced its expression by about 60% (Fig. 7B). Nevertheless, both silencing markedly reduced the secretion of IL-1 β in S100A8 and S100A9-primed cells.

ROS-mediated NF- κ B Activation is Involved in NLRP3 Regulation by S100A8 and S100A9

NLRP3 activation is intimately linked to ROS generation [32]. Given that stimulation with S100A8 and S100A9 generated

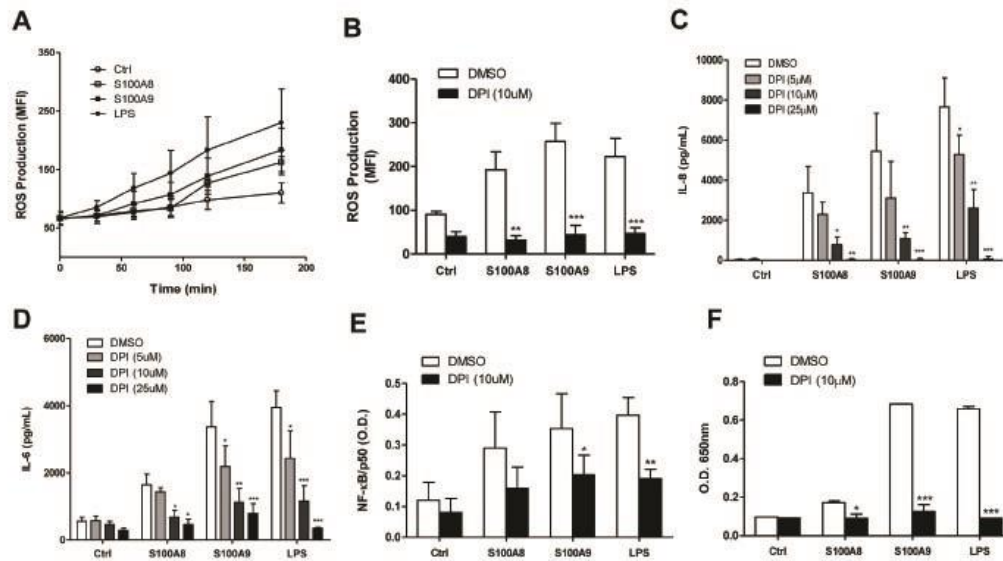


Figure 5. NF- κ B translocation and IL-8 production in S100A8- or S100A9-treated cells are dependent on ROS production. Cells were stimulated for different time periods and ROS production was assessed by oxidation of H_2DCFDA (A and B). In some experiments, cells were pre-treated with DPI for 30 min (B-F). ROS production was measured after 180 min (B). IL-6 and IL-8 secretion was assessed using ELISA (C and D). Translocation of NF- κ B was assessed using the TransFactor p50 kit (E). NF- κ B activity was followed with THP1-XBlue cells (F). Data are the mean $\pm$ SEM of three independent experiments performed on cells from four different donors (A-E). Data are the mean $\pm$ SEM of three independent experiments (F). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.005$, Dunnett's multiple comparison test. doi:10.1371/journal.pone.0072138.g005

intracellular ROS in monocytes and promoted NF- κ B activity, we investigated the possibility that oxidative stress is involved in S100A8- and S100A9-mediated NLRP3 inflammasome regulation and activation. DPI and the anti-oxidant NAC, a well-known ROS scavenger, were used to abrogate the effects of the oxidative stress induced by S100A8 and S100A9. DPI slightly reduced the expression of NLRP3 and pro-IL-1 β in S100A8, S100A9-, and LPS-primed cells. However, NAC efficiently inhibited the expression of both NLRP3 and pro-IL-1 β (Fig. 8A). The inhibition was to a similar extent when cells were treated with the NF- κ B inhibitor BAY-117082, suggesting that oxidative stress is important in the observed phenomenon (ASC expression levels remained constant, Fig. 8C). DPI and NAC strongly inhibited caspase-1 processing, whereas BAY-117082 had little impact on cells stimulated with S100A8, S100A9, or LPS in the presence of ATP (Fig. 8B). These results were corroborated by analyzing IL-1 β release into the supernatant from the same samples. As illustrated in Figure 8D, NAC strongly impaired the secretion of IL-1 β induced by S100A9 and LPS, and to a lesser extent, by S100A8. Again, NAC was a more potent inhibitor of IL-1 β production than either DPI or BAY-117082.

Discussion

In the last few years, studies have classified S100A8 and S100A9 as DAMPs. S100A8 and S100A9 were shown to be actively involved in the inflammatory response by regulating neutrophil functions [5–7,10,11,38]. In this study, we further explored the roles of these two proteins by investigating cytokine production in human PBMCs. Both S100A8 and S100A9 induced the secretion

of various pro-inflammatory cytokines in monocytes, including IL-8, IL-6, and IL-1 β , through mechanisms dependent on ROS production and the activation of ROS-sensitive transcription factors, such as NF- κ B. This study further demonstrated that S100A9, and to a lesser extent, S100A8, regulate the NLRP3 inflammasome by acting as priming agents. IL-1 β secretion mediated by S100A8 or S100A9 alone was modest, but was greatly increased following caspase-1 activation via ATP.

The ability of S100A8 and S100A9 to promote expression of pro-inflammatory mediators including TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-8 through NF- κ B activation has been previously reported in the cell line THP-1 and human macrophages [39,40]. As in the present study, S100A9 more potently induced cytokine production compared with S100A8. This might reflect the use of different receptors, or a different affinity for their putative receptors TLR4 and/or RAGE [9,41,42]. However, the mechanisms by which these proteins increased NF- κ B-mediated expression of pro-inflammatory cytokines remained unclear. Here, we report up-regulation of several other cytokines and chemokines, such as MIP-1 α , MIP-1 β , Gro- α , IL-23, G-CSF, and GM-CSF, in addition to TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-8. The expression of most of these cytokines depends on NF- κ B activation, but other transcription factors could also be involved. This is highlighted by the fact that IL-6 secretion in response to S100A8 and S100A9 is less affected by NF- κ B inhibition compared to IL-8 and IL-1 β secretion, suggesting the involvement of other transcription factors in the secretion of IL-6. Indeed, multiple transcription factor-binding sites were identified in the human IL-6 promoter, including AP-1 [43–45]. AP-1 is intimately linked with the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as

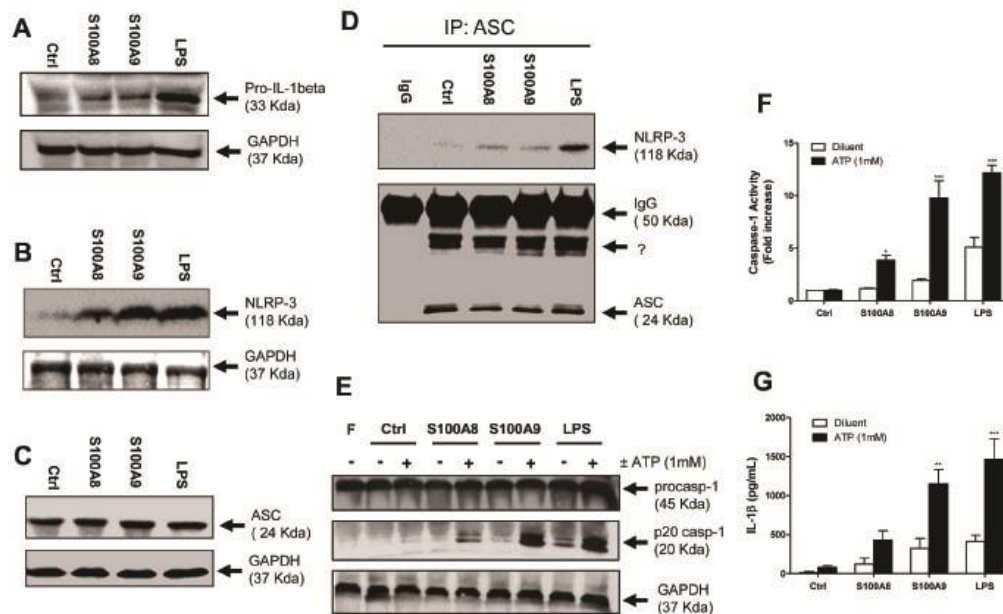


Figure 6. S100A8 and S100A9 regulate the NLRP3 inflammasome. Cells were incubated for 4 h with S100A8 (10 μ g/ml), S100A9 (10 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), or the equivalent volume of buffer (Ctrl). For some experiments, ATP (1 mM) was added for 30 min (D–G). Cells were harvested and lysed with Laemmli's buffer for immunoblotting of pro-IL-1 β (A), NLRP3 (B), ASC (C) or caspase-1 (E). Cells were lysed with caspase-1 lysis buffer for the caspase assay (F). ASC immunoprecipitates were loaded on SDS-PAGE for NLRP-3 and ASC western blot analysis (D). Supernatants were harvested before performing IL-1 β ELISA (G). Results are from one experiment that is representative of at least three others (A–E). Data are the mean $\pm$ SEM of three experiments performed on cells from different donors (F–G). ?, non-specific band (as indicated in the manufacturer's datasheet). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.005$, Dunnett's multiple comparison test. doi:10.1371/journal.pone.0072138.g006

p38 and extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) [46]. We and others have previously demonstrated that S100A9 induced phosphorylation of p38, ERK1/2, Syk, and AKT in monocytes and neutrophils [10,11,40]. Interestingly, most of these kinases are regulated by redox-sensitive phosphatases such as tyrosine phosphatases (PTPs) and phosphatase and tensin homologs deleted on chromosome 10 (PTENs) [33,47]. As previously observed in neutrophils, S100A9, and to a lesser extent, S100A8, induce ROS generation in monocytes that could potentially inactivate redox-sensitive phosphatases and thereby sustain cell activation.

ROS act as important second messengers and participate in numerous cellular functions through the regulation of redox-sensitive transcription factors, including NF- κ B and AP-1 [33,35,48]. Our results show that the expression of IL-6 and IL-8 in monocytes primed with S100A8 or S100A9 depends largely on ROS generation, because DPI significantly impaired the expression of both cytokines. Similar effects were observed for IL-1 β , the secretion of which is tightly regulated by caspase-1 activation. Signals triggering formation and activation of the inflammasome involve decreased intracellular K^+ and the generation of oxidative stress [27,49,50]. These signals are typically provided by the engagement of toll-like receptors (TLRs) or the presence of endogenous stresses that modulate the ionic milieu and redox balance. Various inflammasomes have been identified in monocytes/macrophages such as the NLRP1, NLRP4, and NLRP3, which remains the most studied [51]. All

of them converge toward caspase-1 activation and IL-1 β secretion. The exact mechanisms responsible for the production and secretion of IL-1 β remain unclear, but require two main steps. The first step involves the transcription and expression of proteins and/or precursors including pro-IL-1 β and inflammasome subunits. The second step is inflammasome-mediated caspase-1 activation by stimuli such as ATP that generate robust K^+ release [24,28]. Tight control and regulation of the inflammasome is required to avoid excessive cytokine secretion. Therefore, regulation of the NLRP3 inflammasome occurs at the transcriptional and post-transcriptional levels. For instance, expression of NLRP3 requires a signal to be highly induced [52]. Interestingly, TLR signaling molecules are potent regulators of NLRP3 expression [37,53]. In fact, efficient priming of cells by TLR signaling molecules is well documented, showing the importance of the priming step for efficient inflammasome activation [26,54]. Our results demonstrate the importance of S100A8 and S100A9 in the regulation of the NLRP3 inflammasome, because these molecules upregulate NLRP3 and pro-IL-1 β expression.

Various microbial-derived products can activate the NLRP3 inflammasome. Moreover, mitochondrial stresses, and host-derived molecules abundantly found in some metabolic and inflammatory diseases, such as excess ATP levels, oxidized low-density lipoproteins (LDLs), excess glucose, cholesterol crystals, monosodium uric acid (MSU), and high-mobility group box 1 (HMGB1) protein are also involved in NLRP3 inflammasome

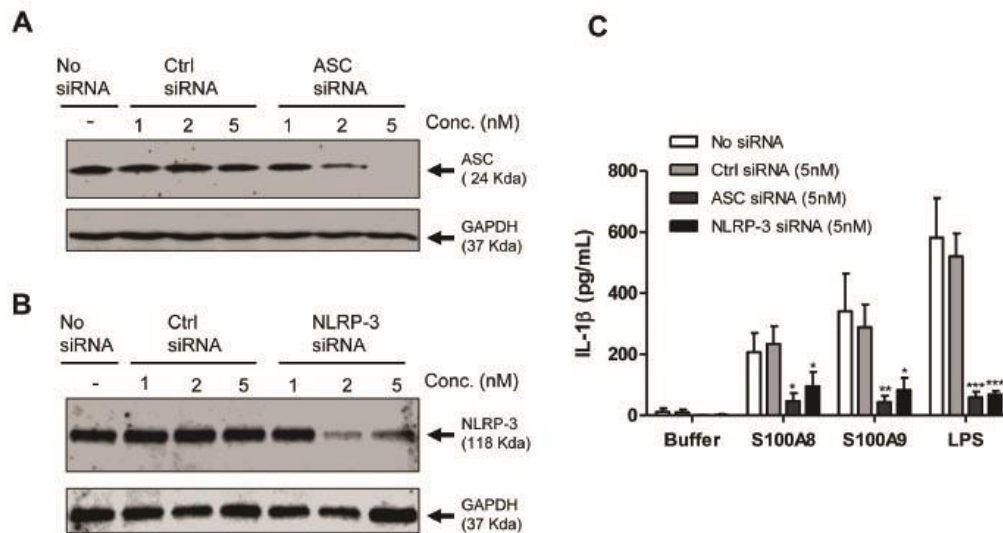


Figure 7. Role of ASC and NLRP-3 in the production of IL-1 β by S100A8 and S100A9-treated human PBMCs. Cells were transfected with ASC siRNA, NLRP-3 siRNA, Ctrl siRNA or the equivalent volume of buffer (No) for 24 hours. Cells were then harvested and lysed for western blot analysis (A and B) or stimulated for 4 hours with the indicated agonists and another 30 min with ATP 1mM. Supernatants were then harvested before performing ELISA (C). Results are from one experiment representative of three others (A and B). Data are the mean $\pm$ SEM of four experiments performed on cells from different donors (C). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.005$, Dunnett's multiple comparison test. doi:10.1371/journal.pone.0072138.g007

activation [55–58]. Here, we demonstrate that extracellular S100A8 and S100A9 are potent regulators of the NLRP3 inflammasome, and they act by influencing the redox balance in human monocytes. The mechanisms by which these proteins enhance ROS production are still unknown. However, considering that S100A8 and S100A9 partially mediate their effects through TLR4 activation [8,40], we propose that intracellular signals induced by S100A8 and S100A9 are likely to be similar to LPS, which is known to trigger ROS production crucial for the expression of inflammatory cytokines through the activation of redox-sensitive transcription factors.

Release of mature IL-1 β is greatly potentiated by priming of the NLRP3 inflammasome by NF- κ B-driven protein synthesis stimulated by LPS [26]. However, long-term stimulation of monocytes in the absence of a co-signal, such as ATP, also leads to a slow activation of caspase-1 and liberation of IL-1 β [59–61]. Our results show that S100A8 and S100A9 alone induce IL-1 β secretion after long-term stimulation (24 h). This secretion was greatly enhanced by the addition of ATP. In fact, only 4 h of priming with S100A8 and S100A9 and 30 min of stimulation with ATP were sufficient to observe caspase-1 cleavage and IL-1 β release. Uncontrolled activation of the inflammasome has been previously linked to several immune and non-immune diseases [58,62]. For example, dextran sodium sulfate-mediated colitis and MSU-induced joint inflammation in a murine model of gout are less severe in mice deficient in caspase-1 or NLRP3 [63–65]. Similarly, mice deficient for the NLRP3 inflammasome adaptor protein, ASC, are protected from chronic obesity-induced pancreatic damage [66]. Interestingly, S100A8 and S100A9 concentrations have been correlated to disease activity in inflammatory bowel disease [15,16,67–69], gout [29,70], obesity-mediated type 2 diabetes, and arteriosclerosis [reviewed in [71]],

suggesting a possible link between S100A8, S100A9, and exacerbated production of IL-1 β .

Patients with hypercalprotecinemia have blood concentrations of S100A8/A9 that are 1000 to 10,000 times higher than the normal concentrations. These patients suffer from chronic systemic inflammation, presumably due to dysregulation of the S100A8/A9 metabolism [72]. This hereditary syndrome results from a mutation in the gene PSTPIP-1, which increases the binding of S100A8/A9 to PSTPIP-1. Interestingly, high concentrations of cytokines like IL-1 β , IL-8, and TNF α were found in the serum of a patient with hypercalprotecinemia (unpublished observation). These cytokines are also detected in the supernatant of PBMCs stimulated with S100A8 and S100A9, suggesting that S100A8 and S100A9 could be responsible for dysregulation of cytokine production in hypercalprotecinemia patients. The higher concentrations of IL-1 β detected in the serum of the hypercalprotecinemia patient also support the potential effects of S100A8 and S100A9 on NLRP3 inflammasome priming. This effect is likely not restricted to hypercalprotecinemia, because several cytokines actively involved in arthritis [73], including IL-6 and TNF α , were found to be upregulated by S100A8 and S100A9. In addition, blocking S100A9 resulted in diminished TNF α and IL-6 expression in a collagen-induced arthritis model [17].

In conclusion, the results presented in this study suggest a new role for S100A8 and S100A9 in redox-sensitive biological responses, including pro-inflammatory cytokine secretion. These findings also suggest a role of S100A8 and S100A9 in the pathogenesis of various inflammatory diseases.

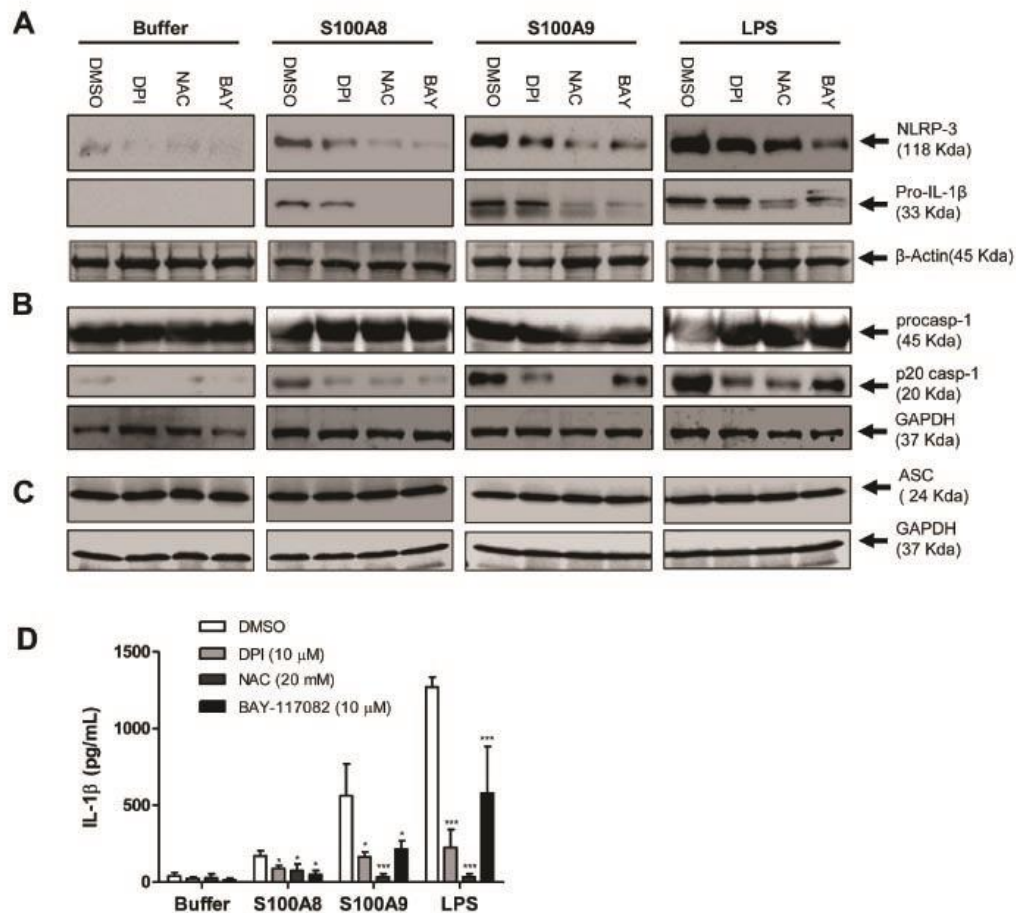


Figure 8. ROS- and NF- κ B-mediated NLRP3 inflammasome priming by S100A8 and S100A9 in human PBMCs. Cells were pre-treated with various inhibitors (DPI, NAC, BAY-117082 or the equivalent volume of DMSO), then stimulated for 4 h with the indicated agonists. ATP (1 mM) was added for 30 min for caspase-1 immunoblots and for IL-1 β ELISA (B and D). Cells were harvested and lysed in Laemmli's buffer for immunoblotting of NLRP-3, pro-IL-1 β , ASC and caspase-1 (A-C). Supernatants were harvested and IL-1 β secretion was evaluated using ELISA (D). * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.005$, Dunnett's multiple comparison test. doi:10.1371/journal.pone.0072138.g008

Acknowledgments

We would like to thank Nathalie Pagé and Audrey Plante for the production of recombinant S100A8 and S100A9.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JCS AC JCM MT FA DG PAT. Performed the experiments: JCS AC JCM MT FA DG PAT. Analyzed the data: JCS AC JCM MT FA DG PAT. Wrote the paper: JCS AC JCM MT FA DG PAT.

References

- Matzinger P (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12: 991–1045.
- Bianchi ME (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81: 1–5.
- Kessel C, Holzinger D, Foell D (2012) Phagocyte-derived S100 proteins in autoinflammation: Putative role in pathogenesis and usefulness as biomarkers. *Clin Immunol*.
- Lim SY, Raftery MJ, Goyette J, Hsu K, Geczy CL (2009) Oxidative modifications of S100 proteins: functional regulation by redox. *J Leukoc Biol* 86: 577–587.
- Ancieriz N, Vandal K, Tessier PA (2007) S100A9 mediates neutrophil adhesion to fibronectin through activation of beta2 integrins. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 84–89.

6. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA (2003) Proinflammatory activities of S100 proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* 170: 3233–3242.
7. Vandal K, Rouleau P, Boivin A, Ryckman C, Talbot M, et al. (2003) Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 171: 2602–2609.
8. Vogt T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, et al. (2007) Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med* 13: 1042–1049.
9. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, et al. (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97: 889–901.
10. Simard JC, Girard D, Tessier PA (2010) Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 87: 905–914.
11. Simard JC, Simon MM, Tessier PA, Girard D (2011) Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. *J Immunol* 186: 3622–3631.
12. Kane D, Roth J, Froesch M, Vogt T, Bresnahan B, et al. (2003) Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 1676–1685.
13. Berzins HB, Munthe E, Fagerhol MK (1989) A longitudinal study of the leukocyte protein L1 as an indicator of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 16: 1416–1420.
14. Brun JG, Jonsson R, Haga HJ (1994) Measurement of plasma calprotectin as an indicator of arthritis and disease activity in patients with inflammatory rheumatic diseases. *J Rheumatol* 21: 733–738.
15. Lugerling N, Stoll R, Kucharzik T, Schmid KW, Rohmann G, 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: 406–414.
16. Schmid KW, Lugerling N, Stoll R, Brinkbauer P, Winde G, 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: 334–337.
17. Cesaro A, Anzeriz N, Plante A, Page N, Tardif MR, et al. (2012) An Inflammation Loop Orchestrated by S100A9 and Calprotectin Is Critical for Development of Arthritis. *PLoS ONE* 7: e35478.
18. van Lent PL, Blom AB, Schelbergen RF, Slortjes A, Lafaber FP, et al. (2012) Active involvement of alarmins S100A8 and S100A9 in the regulation of synovial activation and joint destruction during mouse and human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 64: 1466–1476.
19. Chang KA, Kim HJ, Suh YH (2012) The role of S100a9 in the pathogenesis of Alzheimer's disease: the therapeutic effects of S100a9 knockdown or knockout. *Neurodegener Dis* 10: 27–29.
20. Loser K, Vogt T, Voskott M, Lueken A, Kupas V, et al. (2010) The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8(+) T cells. *Nat Med*.
21. Dinarello CA (2010) IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol* 40: 599–606.
22. Dinarello CA (2009) Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27: 519–550.
23. Dinarello CA (2011) Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117: 3720–3732.
24. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Núñez G (2009) The inflammasome: a caspase-1 activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 10: 241–247.
25. Yamamoto M, Yaginuma K, Tsutsui H, Sagara J, Guan X, et al. (2004) ASC is essential for LPS-induced activation of procaspase-1 independently of TLR-associated signal adaptor molecules. *Genes Cells* 9: 1055–1067.
26. Kahlenberg JM, Lundberg KC, Kertesz SB, Qu Y, Dubyak GR (2005) Potentiation of caspase-1 activation by the P2X7 receptor is dependent on TLR signals and requires NF-kappaB-driven protein synthesis. *J Immunol* 175: 7611–7622.
27. Perregraux DG, Gabel CA (1998) Human monocyte stimulus-coupled IL-1beta posttranslational processing: modulation via monovalent cations. *Am J Physiol* 275: C1538–1547.
28. Perregraux D, Gabel CA (1994) Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem* 269: 15195–15203.
29. Ryckman C, McColl SR, Vandal K, de Medicis R, Lussier A, 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: 2310–2320.
30. Ennaciri J, Girard D (2009) IL-1R(alpha), a new member that associates with Syk kinase: implication in IL-4-induced human neutrophil functions. *J Immunol* 183: 5261–5269.
31. Liu F, Xia Y, Parker AS, Verma IM (2012) IKK biology. *Immunol Rev* 246: 239–253.
32. Rubartelli A (2012) Redox control of NLRP3 inflammasome activation in health and disease. *J Leukoc Biol* 92: 951–958.
33. Miki H, Funato Y (2012) Regulation of intracellular signalling through cysteine oxidation by reactive oxygen species. *J Biochem* 151: 255–261.
34. Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura AL, Persechini PM, et al. (2007) ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* 282: 2871–2879.
35. Loukili N, Rosenblatt-Velin N, Rolli J, Levrard S, Feihl F, et al. (2010) Oxidants positively or negatively regulate nuclear factor kappaB in a context-dependent manner. *J Biol Chem* 285: 15746–15752.
36. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10: 2247–2258.
37. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, et al. (2009) Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 183: 787–791.
38. Newton RA, Hogg N (1998) The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils. *J Immunol* 160: 1427–1435.
39. Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, Kawashima M, et al. (2006) The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 8: R69.
40. Riva M, Kallberg E, Bjork P, Hancz D, Vogt T, et al. (2012) Induction of nuclear factor-kappaB responses by the S100A9 protein is Toll-like receptor-4-dependent. *Immunology* 137: 172–182.
41. Robinson MJ, Tessier P, Poulson 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.
42. Kallberg E, Vogt T, Laberg D, Olsson A, Bjork P, et al. (2012) S100A9 interaction with TLR4 promotes tumor growth. *PLoS One* 7: e34207.
43. Dendorfer U, Oettgen P, Libermann TA (1994) Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol* 14: 4443–4454.
44. Libermann TA, Baltimore D (1990) Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* 10: 2327–2334.
45. Samuel JM, Kelberman D, Smith AJ, Humphries SE, Woo P (2008) Identification of a novel regulatory region in the interleukin-6 gene promoter. *Cytokine* 42: 256–264.
46. Karin M (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270: 16483–16486.
47. Finkow L, Wang Y, Downey GP (2007) Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 42: 153–164.
48. Ryan KA, Smith MF, Jr., Sanders MK, Ernst PB (2004) Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infect Immun* 72: 2123–2130.
49. Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, Franchi L, Núñez G, et al. (2011) Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* 187: 613–617.
50. Jiang Y, Wang M, Huang K, Zhang Z, Shao N, et al. (2012) Oxidized low-density lipoprotein induces secretion of interleukin-1beta by macrophages via reactive oxygen species-dependent NLRP3 inflammasome activation. *Biochem Biophys Res Commun* 425: 121–126.
51. Martinon F, Mayor A, Tschopp J (2009) The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 27: 229–265.
52. Hornung V, Latz E (2010) Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation. *Eur J Immunol* 40: 620–623.
53. Qiao Y, Wang P, Qi J, Zhang L, Gao C (2012) TLR-induced NF-kappaB activation regulates NLRP3 expression in murine macrophages. *FEBS Lett* 586: 1022–1026.
54. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, et al. (2004) Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430: 213–218.
55. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440: 237–241.
56. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, et al. (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440: 228–232.
57. He Q, You H, Li XM, Liu TH, Wang P, et al. (2012) HMGB1 promotes the synthesis of pro-IL-1beta and pro-IL-18 by activation of p38 MAPK and NF-kappaB through receptors for advanced glycation end-products in macrophages. *Asian Pac J Cancer Prev* 13: 1365–1370.
58. Schroder K, Tschopp J (2010) The inflammasomes. *Cell* 140: 821–832.
59. Cheneval D, Ramage P, Kastelic T, Szelestenyi T, Niggli H, et al. (1998) Increased mature interleukin-1beta (IL-1beta) secretion from THP-1 cells induced by nigericin is a result of activation of p45 IL-1beta-converting enzyme processing. *J Biol Chem* 273: 17846–17851.
60. Schumann RR, Belka C, Reuter D, Lamping N, Kirschning CJ, et al. (1998) Lipopolysaccharide activates caspase-1 (interleukin-1-converting enzyme) in cultured monocytic and endothelial cells. *Blood* 91: 577–584.
61. Grahames CB, Michel AD, Chessell IP, Humphrey PP (1999) Pharmacological characterization of ATP- and LPS-induced IL-1beta release in human monocytes. *Br J Pharmacol* 127: 1915–1921.
62. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinau E, Flavell R (2012) Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481: 278–286.

63. Bauer C, Dueswell P, Mayer C, Lehr HA, Fitzgerald KA, et al. (2010) Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut* 59: 1192–1199.
64. Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G, Dinarello CA (2001) IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13249–13254.
65. Amaral FA, Costa VV, Tavares LD, Sachs D, Coelho FM, et al. (2012) NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout. *Arthritis Rheum* 64: 474–484.
66. Youm YH, Adijiang A, Vandanmagsar B, Burk D, Ravussin A, et al. (2011) Elimination of the NLRP3-ASC inflammasome protects against chronic obesity-induced pancreatic damage. *Endocrinology* 152: 4039–4045.
67. Foell D, Witkowski H, Ren Z, Turton J, Pang G, et al. (2008) Phagocyte-specific S100 proteins are released from affected mucosa and promote immune responses during inflammatory bowel disease. *J Pathol* 216: 183–192.
68. Roseth AG, Schmidt PN, Fagerhol MK (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: 50–54.
69. Luger N, Stoll R, Schmid KW, Kucharzik T, Stein H, et al. (1995) The myeloid 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: 659–664.
70. Ryckman C, Gilbert C, de Medicis R, Lussier A, Vandal K, et al. (2004) Monosodium urate monohydrate crystals induce the release of the proinflammatory protein S100A8/A9 from neutrophils. *J Leukoc Biol* 76: 433–440.
71. Averill MM, Kerkhoff C, Bornfeldt KE (2012) S100A8 and S100A9 in cardiovascular biology and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 223–229.
72. Sampson B, Fagerhol MK, Sunderkotter C, Golden BE, Richmond P, et al. (2002) Hyperzincemia and hypercalprotectinaemia: a new disorder of zinc metabolism. *Lancet* 360: 1742–1745.
73. McInnes IB, Schett G (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7: 429–442.

Article 3

Titre

S100A9 potentiates IL-8 production in response to GM-CSF or fMLP via activation of a different set of transcription factors in human neutrophils

Auteurs

Jean-Christophe Simard, Claudie Noël, Philippe A. Tessier et Denis Girard

Soumis dans la revue

FEBS Letters

Contributions personnelles

J'ai personnellement réalisé la majorité des expériences de ce papier. J'ai planifié et conçu toutes les expériences et j'ai également rédigé le papier.

Contributions des autres auteurs

C. Noël a réalisé des dosages d'IL-8 par ELISA. D. Girard et P.A. Tessier ont participé à la planification des expériences et à la rédaction du papier.

Résumé de l'article 3 en français

S100A9 est un puissant activateur des neutrophiles et un inducteur de la production de cytokines par les monocytes. Nous rapportons ici que ce motif moléculaire associé au dommage (DAMP) ne provoque pas directement la production de cytokines par les neutrophiles humains. Toutefois, S100A9 potentialise la production d'IL-8 induite par les neutrophiles stimulés avec le fMLP ou le GM-CSF via les facteurs de transcription NF- κ B et CREB-1, ou NF- κ B, STAT-3 et STAT-5, respectivement. L'inhibition pharmacologique confirme l'importance de ces facteurs de transcription en diminuant significativement la production d'IL-8. Ces résultats démontrent pour la première fois qu'un agencement de différents facteurs de transcription jouent un rôle important dans la potentialisation de la production de cytokines par S100A9 en réponse à des stimuli pro-inflammatoires.

S100A9 potentiates IL-8 production in response to GM-CSF or fMLP via activation of a different set of transcription factors in human neutrophils

Jean-Christophe Simard¹, Claudie Noël¹, Philippe A. Tessier² and Denis Girard^{1*}

¹ Laboratoire de Recherche en Inflammation et physiologie des Granulocytes, Université du Québec

² Axe Maladies Infectieuses et Immunitaires, Centre de Recherche du CHU de Québec, and Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Canada.

*Corresponding author : Denis Girard, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Room K-138, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7. E-mail address: Denis.girard@iaf.inrs.ca

Short title: Cytokine production in S100A9-induced human neutrophils

Keywords: S100A9, NF- κ B, CREB-1, STAT-3, STAT-5, neutrophils

Abstract

S100A9 is a potent neutrophil activator and inducer of cytokine production in monocytes found in inflammatory settings. We report here that this damage-associated molecular pattern does not directly activate cytokine production in neutrophils. However, S100A9 primed IL-8 production by fMLP- or GM-CSF-stimulated neutrophils via NF- κ B and CREB-1, or NF- κ B, STAT-3 and STAT-5, respectively. Pharmacological inhibition confirmed the importance of these transcription factors by significantly decreasing IL-8 production. This is the first time that a different set of transcription factors are shown to be involved in S100A9-primed neutrophils in response to proinflammatory agonists.

Introduction

The innate immune system, in which neutrophils play a major role, is the first biological barrier against invading pathogens. Toll-like and NOD-like receptors are the main receptors responsible for recognition of pathogens. Engagement of these receptors initiates an inflammatory response via the secretion of inflammatory cytokines/chemokines and the recruitment of leukocytes. Production of cytokines and chemokines is largely dependent on transcription factors such as NF- κ B and CREB-1, especially in neutrophils [1, 2]. Initiation of the immune response is also amplified by secretion and liberation of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) such as HMGB-1 and S100/calgranulins, which modulate many inflammatory functions [3, 4].

S100A8/calgranulin A, S100A9/calgranulin B and S100A12/calgranulin C belong to the S100 family of proteins comprising 21 members [5]. S100A8, S100A9 as well as the heterodimer S100A8/A9 (also named calprotectin) were previously found to bind to TLR-4, RAGE and some other putative receptors, thereby modulating various functions of phagocytes and endothelial cells [6-9]. S100A8, S100A8/A9 and S100A9 are chemoattractant for neutrophils and increase their adhesion [10]. S100A9 also induce the expression and activation of β 2-integrins [11, 12]. We recently demonstrated that S100A9 also stimulates neutrophil degranulation and phagocytosis [13, 14]. In addition, S100A8 and S100A9 stimulate the secretion of several inflammatory cytokines and regulate the NLRP-3 inflammasome, resulting in IL-1 β processing and secretion by human monocytes [15].

Neutrophils are exposed to bioactive lipids, cytokines and DAMPs as they migrate to the inflammatory site, and each of these stimulate or inhibit their activity. As S100A8 and S100A9 are found on the endothelium near sites of inflammation, we examined the effect of S100A9 on neutrophil cytokine production. Unexpectedly, we show here that S100A8 and S100A9 do not directly induce cytokine production in human neutrophils. However, we demonstrate that S100A9 potentiates IL-8 production by fMLP- or GM-CSF-stimulated neutrophils following NF- κ B, CREB-1 and STAT3/STAT5 activation.

Materials and Methods

Reagents

Human recombinant S100A8 and S100A9 were produced as previously described [16]. Cycloheximide, fMLP and anti- β -actin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). BAY-117082, AG-490 and the CBP-CREB interaction inhibitor were purchased from Calbiochem (San Diego, CA). Phospho-IKK- α/β (Ser176/177), phospho-IKK- γ (Ser376), phospho-CREB-1/ATF-1, phospho-STAT-3, phospho-STAT-5, phospho-STAT-6 and I κ B- α antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). GAPDH (FL), STAT-3 and CREB-1 antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). RPMI 1640, HEPES, penicillin/streptomycin (Pen/Strep), heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) was from Life Technologies (Camarillo, CA). Ficoll-Paque was obtained from GE Healthcare Bio-Science AB (Uppsala, Sweden). All secondary antibodies were purchased from Jackson Immuno-Research Laboratories (West Grove, PA). Proteome Profiler Array (Human Cytokine Array Panel A) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Ultrapure-LPS (from *E.coli*) were purchased from Invivogen (San Diego, CA). GM-CSF was from Peprotech (Rocky Hill, NJ).

Neutrophil isolation

Blood samples were obtained from informed, consenting individuals according to institutionally approved procedures as previously described [13]. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion and found to be consistently higher than 99%. Neutrophils were suspended at 10×10^6 cells/ml in RPMI 1640 containing 10% autologous decompartmented serum.

Cell stimulation

Neutrophil were stimulated with S100A8 (10 μ g/ml), S100A9 (10 μ g/ml), LPS (100 ng/ml) or the equivalent volume of diluent (Hank's Balanced Salt Solution 1X) at 37°C for various period of time, as specified. In some experiments, cells were primed for 30 min with S100A8 (10 μ g/mL) or S100A9 (10 μ g/mL) and then stimulated with fMLP (10^{-7} M), GM-CSF (65 ng/mL) or the equivalent volume of diluent for 30 min at 37°C for western-blots or 24h for measurement of cytokines.

Western blot analysis

After stimulation, the cells were lysed in Laemmli's sample buffer (0.25 M Tris-HCl [pH 6.8], 8% SDS, 40% glycerol, and 20% 2-ME), and aliquots of extracts corresponding to 1×10^6 cells were loaded onto 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes for the detection of specific proteins. Membranes were blocked for 1 h at room temperature in 3% dry fat milk. The primary antibodies were added at a final dilution of (1:1000) in TBS-Tween 0.15%. The membranes were kept overnight at 4°C, then washed with TBS-Tween and incubated for 1h at room temperature with a goat anti-rabbit IgG HRP secondary Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) diluted 1:20,000 in TBS-Tween or a goat anti-mouse IgG HRP secondary Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluted at 1:20,000 in TBS-Tween followed by several washes. Protein expression was revealed with Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) using ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad). Membranes were stripped with ReBlot Plus Strong (Millipore) and stained with Amido-black to confirm equal loading of proteins.

Electromobility Shift Assay

Nuclear extracts from cells stimulated for 1h were prepared using NucBuster protein extraction kit from Novagen. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) reaction was done using Gel Shift Assay System from Promega, as previously described [15].

NF- κ B p50 TransFactor ELISA Assay

Assays were done according to the Colorimetric TransFactor ELISA kit Procedure (Clontech Laboratories) as previously described [15].

Proteome Profiler™ Array

Human Cytokine Array Panel A were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) and all the steps were performed within 2 weeks following experiments. Cells from 7 different donors of PMNs were stimulated for 24h with the corresponding agonists. Supernatants were

then pooled together and used to probe the membranes as previously described [15] . The chemiluminescent signal from the bound cytokines present in the supernatants was detected by chemiluminescence using ChemiDoc™ MP Imaging System.

IL-8 production

The measurement IL-8 was done using a commercially available enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

Experimental data are expressed as mean $\pm$ SEM. One-way ANOVA (Dunnett multiple-comparison test) and two-way ANOVA (Bonferroni post-test) were performed using Graph-Pad Prism (version 5.01). Differences were considered statistically significant as follows: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.005$ versus buffer or the appropriate diluent.

Results

S100A8 and S100A9 do not induce cytokine production in human neutrophils.

We recently reported that S100A8 and S100A9 induce inflammatory cytokine expression and secretion by human monocytes [15]. As both of these DAMPs are potent neutrophil activators [13-15], we investigated their effects on cytokine production. Surprisingly, neither S100A8 nor S100A9 were found to induce cytokine secretion as assessed by an antibody array assay (**Fig. 1A**). To confirm this, we next quantified the IL-8 production using a specific ELISA kit. As illustrated in **Fig. 1B**, unlike LPS, S100A8 or S100A9 did not significantly increase the IL-8 production.

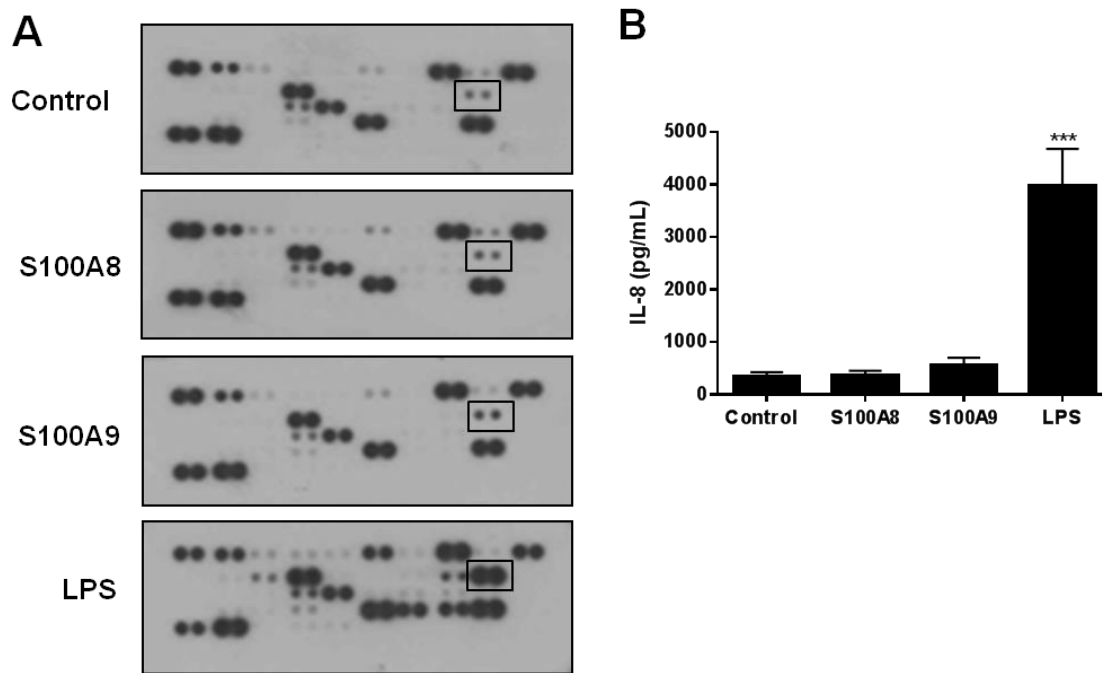


Figure 1. S100A8 and S100A9 do not induce cytokines and chemokines expression in human neutrophils. Cytokine production was evaluated using proteome profiler arrays (A) or ELISA (B). Neutrophils (10×10^6 cells/mL) were stimulated with S100A8 (10 μ g/mL), S100A9 (10 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL) or the equivalent volume of diluent (Ctrl) for 24h. Supernatants were harvested and used for experiments. Data represent supernatants pooled from 10 different blood donors (A). Data are mean $\pm$ SEM of four experiments performed on cells from different donors (B). Boxes, localization of IL-8 (duplicate) on the membrane.

Lack of NF- κ B activation by S100A8 and S100A9, although S100A9 increased IKK- γ phosphorylation.

Since we have previously shown that S100A8 and S100A9 induced NF- κ B activation in human monocytes, we next investigated the effect of S100A8 and S100A9 on NF- κ B translocation/activation in human neutrophils. EMSA analyses revealed that neither S100A8 nor S100A9 induced NF- κ B translocation/activation (**Fig. 2A**). These results were confirmed using the NF- κ B p50 TransFactor Assay (**Fig. 2B**). Curiously, S100A9, but not S100A8, significantly increased the phosphorylation of IKK- γ . However, phosphorylation of IKK- α/β and degradation of I κ B- α was not observed in S100A8 and S100A9-treated cells (**Fig. 2C**). Only the positive control LPS led to phosphorylation of all three IKK subunits, resulting in degradation of I κ B- α and translocation of NF- κ B.

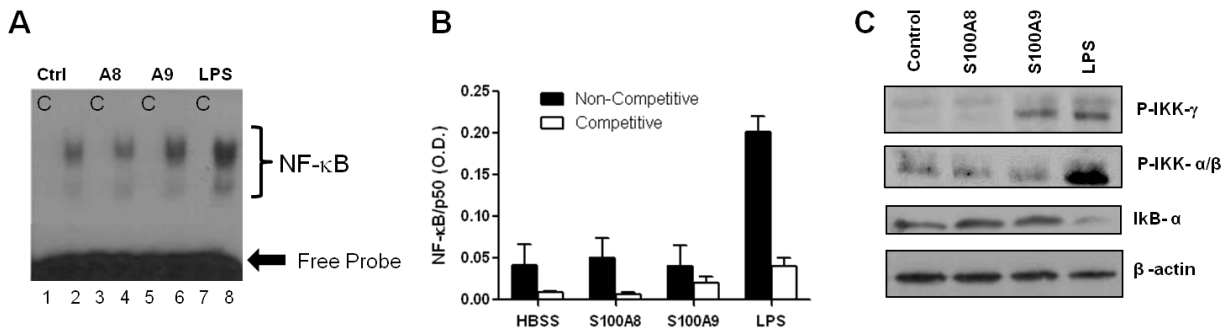


Figure 2. S100A8 and S100A9 do not increase translocation of NF- κ B in human neutrophils. Translocation and binding of NF- κ B was assessed by EMSA (A) and with a NF- κ B p50 TransFactor ELISA kit (B), as described in Materials and Methods. Nuclear proteins were isolated from cells stimulated for 1h. Lanes 1,3,5 and 7 (c, competitive assay). Lanes 2, 4, 6 and 8 (non-competitive assay). Phosphorylation of the IKK complex and degradation of I κ B- α was assessed by western blot experiments (C). Results are from one representative experiment of at least four others (A and C). Data are means $\pm$ SEM of three experiments performed on cells from different blood donors (B).

S100A9 potentiates the fMLP- or GM-CSF-induced cytokine production in neutrophils.

Because IKK- γ is the non-catalytic regulatory subunit of the IKK complex [17] and since S100A9 increased IKK- γ phosphorylation, we reasoned that this protein could be involved in the

regulation of cytokine production. S100A9 is found on endothelium near sites of extravasation and could therefore prime neutrophils to respond to cytokines found at the inflammatory site. To mimic the presence of S100A9 in inflammatory settings, neutrophils were primed with S100A9 prior to treatment with GM-CSF or fMLP. Interestingly, S100A9 although had no effect on cytokine secretion, it primed the effect of GM-CSF and fMLP on IL-8 secretion (**Fig.3**). In contrast, S100A8 did not affect the secretion of IL-8 induced by either fMLP or GM-CSF (*data not shown*).

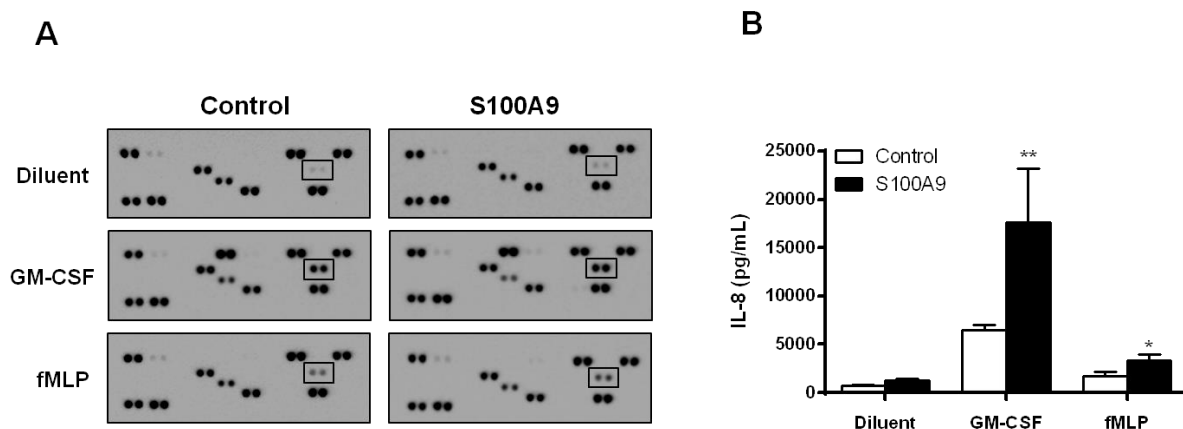


Figure 3. S100A9 potentiates the IL-8 secretion in human neutrophils treated with fMLP and GM-CSF. Cytokine production was evaluated using proteome profiler arrays (A) or ELISA (B). Neutrophils (10×10^6 cells/mL) were pre-treated S100A9 (10 μ g/mL) or the equivalent volume of diluent (Ctrl) for 30 minutes. Cells were then stimulated with fMLP (10^{-7} M) or GM-CSF (65 ng/mL) or the equivalent volume of diluent for a total of 24h. Supernatants were then harvested and used for experiments. Data represent supernatants pooled from 7 different blood donors (A). Data are mean $\pm$ SEM of four experiments performed on cells from different blood donors (B). Boxes, localization of IL-8 (duplicate) on the membrane.

Role of the transcription factors in response to GM-CSF or fMLP-induced IL-8 production in S100A9-primed neutrophils.

We next determined the effect of S100A9 on various transcription factors known to be involved in the regulation of IL-8. Priming of neutrophils with S100A9 promoted the degradation of I κ B- α and translocation of the NF- κ B p50 subunit to the nucleus in response to GM-CSF and fMLP (**Fig.4A** and **Fig.4B**). In addition, S100A9 led to the phosphorylation of CREB-1/ATF-1 (**Fig.**

4C). However, S100A9, by itself, did not induce STAT-3 or STAT-5 phosphorylation directly but induced a significant increase in the phosphorylation levels of these proteins following GM-CSF activation. Phosphorylation levels of STAT-6 remained unchanged in all tested conditions.

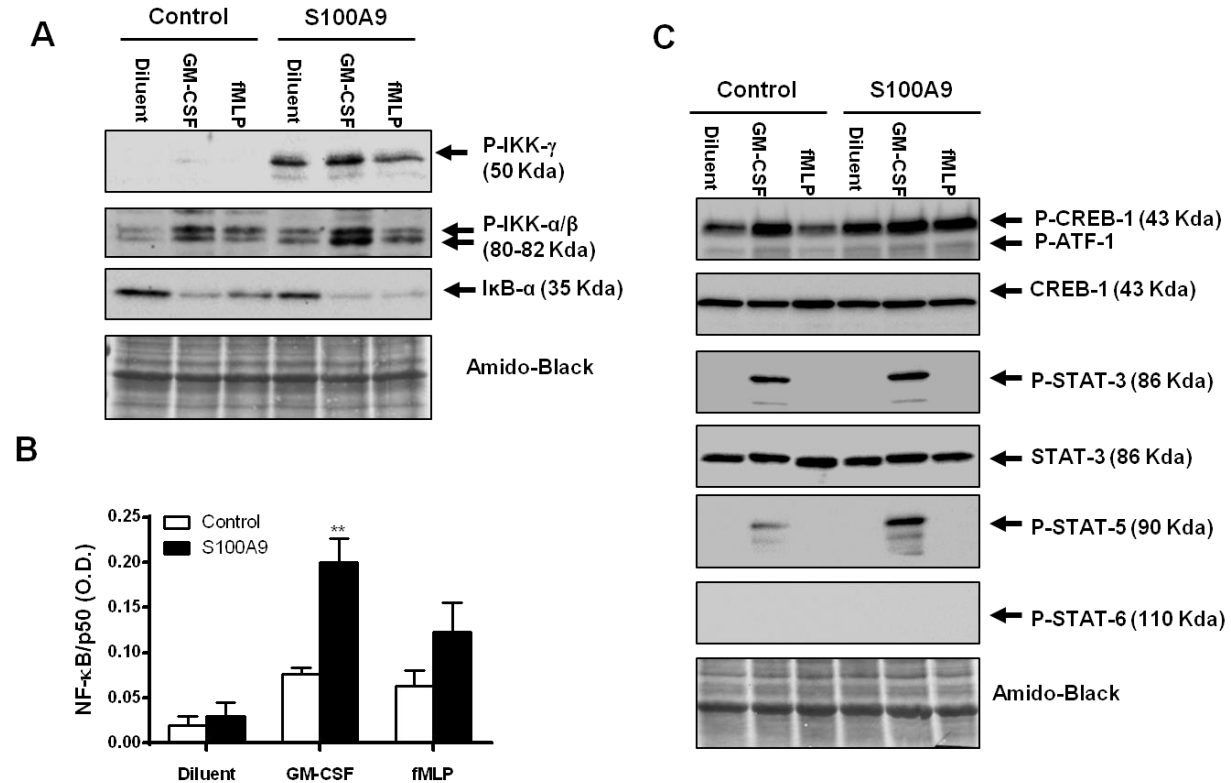


Figure 4. S100A9 potentiates the effect of fMLP or GM-CSF on transcription factors NF-κB, CREB-1/ATF-1, STAT-3 and STAT-5. Phosphorylation of the IKK complex, degradation of IκB-α, phosphorylation of CREB-1/ATF-1, STAT-3, STAT-5 and STAT-6 were assessed by western blot experiments (A and C). Translocation of NF-κB was assessed with a NF-κB p50 TransFactor ELISA kit (B), as described in Materials and Methods. Neutrophils (10×10^6 cells/mL) were pre-treated with S100A9 or the equivalent volume of diluent (Ctrl) for 30 minutes. fMLP (10^{-7} M), GM-CSF (65 ng/mL) or the diluent was then added for 30 minutes. Total proteins were then extracted for immunoblots while nuclear proteins were isolated for p50 transfactor assay, as described in Materials and Methods. Results are from one representative experiment of at least three others (A and C). Data are mean $\pm$ SEM of four experiments performed on cells from different blood donors (B).

Pharmacological inhibitors were next used to determine the importance of these transcription factors in the priming effect of S100A9 on IL-8 production. Inhibition of NF- κ B blocked almost completely the priming effect induced by S100A9 in both fMLP or GM-CSF treated neutrophils. Furthermore, while inhibition of the JAK/STAT pathway by the AG-490 inhibitor reversed specifically the effect of S100A9 on GM-CSF-induced IL-8 production, inhibition of CREB-1 by the CREB/EBP inhibitor resulted in a partial decreased level of IL-8 in response to fMLP (**Fig. 5**).

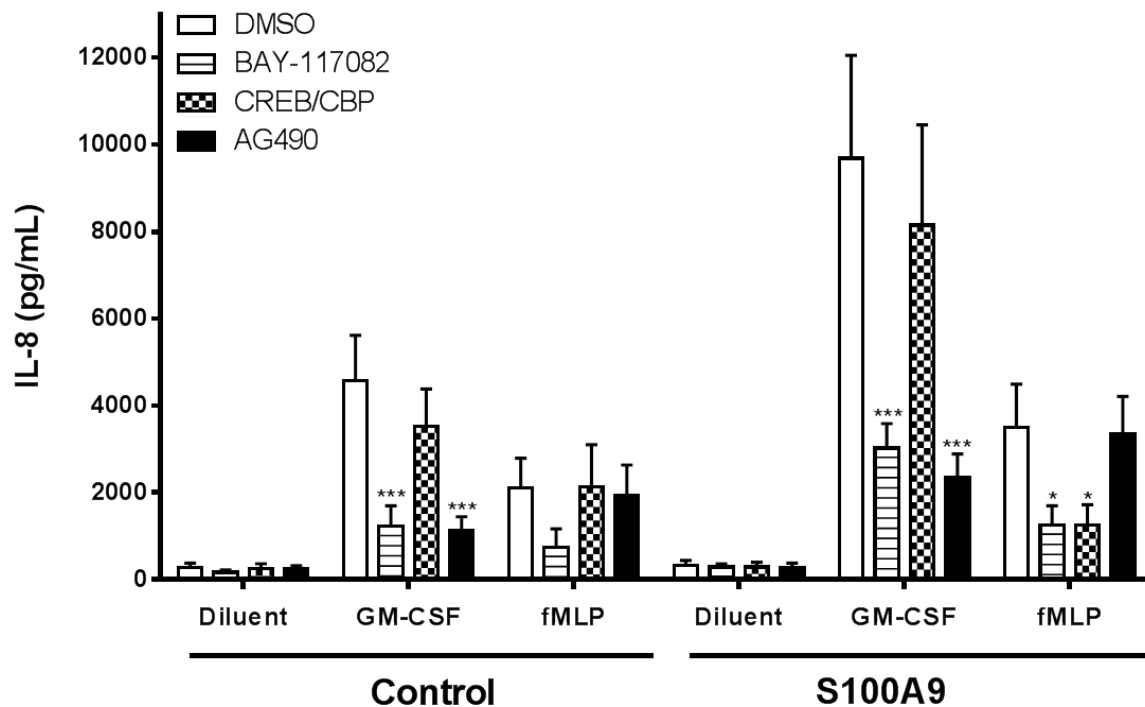


Figure 5. *S100A9 potentiates the secretion of IL-8 in fMLP and GM-CSF-treated neutrophils by two distinct mechanisms.* Cytokine production was evaluated by ELISA. Neutrophils (10×10^6 cells/mL) were incubated for 30 min with BAY-117082 (10 μ M), AG-490 (20 μ M), CREB/CBPi (5 μ M) or the equivalent volume of DMSO. Cells were then primed with S100A9 (10 μ g/mL) or the equivalent volume of diluent (Ctrl) for 30 minutes. Cells were then stimulated with fMLP (10^{-7} M), GM-CSF (65 ng/mL) or the equivalent volume of diluent for a total of 24h. Supernatants were then harvested for quantification of IL-8 by ELISA. Data are mean $\pm$ SEM of four experiments performed on cells from different blood donors.

Discussion

Neutrophils play a crucial role in host defense and immunity, contributing to pathogen clearance and to the recruitment of other leukocytes through secretion of inflammatory mediators [18]. Among these, S100A8 (MRP8) and S100A9 (MRP14) are two inflammatory proteins highly expressed by neutrophils and found at inflammatory sites. Binding of S100A8 and S100A9 to TLR-4 leads to the activation of NF- κ B and secretion of inflammatory cytokines in murine BMC and THP-1 cells [6, 19]. In addition, studies have reported important roles for S100A8, S100A8/A9 and S100A9 in the regulation of cytokine secretion by monocytes [15, 19, 20]. However, only one study reported an effect of S100A8 on the secretion of IL-8 and IL-16 by human neutrophils [21]. In this study, we demonstrate that S100A8 and S100A9 do not have a direct effect on the secretion of cytokines in human neutrophils. However, S100A9, but not S100A8, primed neutrophils to secrete IL-8 in response to GM-CSF or fMLP by partially activating NF- κ B. Intriguingly, S100A8 and S100A9 had no effect on the secretion of inflammatory cytokines or the activation of transcription factors in neutrophils, with the notable exception of S100A9 which led to the direct phosphorylation of CREB-1, without affecting IL-8 production. These results suggest that secretion of IL-8 is not solely dependent on phosphorylation of CREB-1 in neutrophils and that phosphorylation of CREB induced by S100A9 could be involved in other neutrophil functions.

Several transcription factors including CREB-1, NF- κ B and STATs regulate cytokine production in neutrophils [2, 22, 23]. A few studies reported a direct effect of MRPs on translocation of NF- κ B in murine BMC, THP-1 and human prostate cancer cells [6, 19, 24]. We have also shown that S100A8 and S100A9 induce NF- κ B translocation and activation in human monocytes [15]. The NF- κ B canonical pathway is regulated by members of the IKK family [17]. IKK- α and IKK- β are two protein kinases that mediate the phosphorylation and the degradation of I κ B- α , involved in NF- κ B inhibition [25]. The IKK complex also comprises IKK- γ , the essential modulator of this complex [26]. Our results show that S100A9 does not induce IKK- α / β phosphorylation in neutrophils, explaining the lack of I κ B- α degradation and the absence of the NF- κ B p50 subunit in the nucleus. However, S100A9 induced a strong phosphorylation of IKK- γ . Moreover, priming by S100A9 led to increased levels of NF- κ B present in the nucleus in response to GM-CSF and fMLP. Our results suggest that S100A9 regulates NF- κ B activity through regulation of the IKK- γ subunits. Results in this study also indicate that even if a potent neutrophil activator such as S100A9 does not directly induce pro-inflammatory cytokine production by itself, it can potentiate

the secretion induced by other neutrophil activators, including a cytokine like GM-CSF or bacterial products such as fMLP by recruiting a different set of transcription factors.

Previous work from our laboratory showed that S100A8 and especially S100A9 regulate various functions in neutrophils such as adhesion, degranulation, migration and phagocytosis [10, 11, 13, 14]. S100A8 and S100A9 were also shown to be potent chemoattractants for neutrophils [10, 27] and are important for host defense and clearance of various pathogens [28-30]. As IL-8 is one of the most potent chemoattractant for neutrophils and other leukocytes, data presented here suggest a new regulatory role for S100A9 by contributing to the secretion of this chemokine. IL-8 has important immunological roles other than the recruitment of neutrophils to the site of inflammation, it also contributes to the cross-talk between neutrophils and other immune cells such as Th17 highly involved in the inflammatory process [31].

Neutrophils encounter a series of stimuli as they migrate from the blood to the inflammatory site, one of the first being S100A9 deposited on the endothelium by migrating myeloid cells [32]. S100A9 would activate neutrophils, although not sufficiently to induce the secretion of cytokines in the blood. However, these primed neutrophils would secrete more IL-8 once activated by GM-CSF or fMLP in the tissue. This would in turn lead to an enhanced recruitment of neutrophils to the inflammatory site as observed in vivo in models of bacterial infection [27, 28].

References

1. McDonald, P. P. (2004) Transcriptional regulation in neutrophils: teaching old cells new tricks, *Adv Immunol.* **82**, 1-48.
2. Mayer, T. Z., Simard, F. A., Cloutier, A., Vardhan, H., Dubois, C. M. & McDonald, P. P. (2013) The p38-MSK1 signaling cascade influences cytokine production through CREB and C/EBP factors in human neutrophils, *J Immunol.* **191**, 4299-307.
3. Ehrchen, J. M., Sunderkotter, C., Foell, D., Vogl, T. & Roth, J. (2009) The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer, *J Leukoc Biol.* **86**, 557-66.
4. Yang, H., Antoine, D. J., Andersson, U. & Tracey, K. J. (2013) The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis, *J Leukoc Biol.* **93**, 865-73.
5. Schafer, B. W. & Heizmann, C. W. (1996) The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology, *Trends Biochem Sci.* **21**, 134-40.
6. 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**, 1042-9.
7. Hofmann, M. A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, 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.
8. 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**, 241-8.
9. 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**, 3658-65.
10. 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**, 3233-42.
11. Anceriz, N., Vandal, K. & Tessier, P. A. (2007) S100A9 mediates neutrophil adhesion to fibronectin through activation of beta2 integrins, *Biochem Biophys Res Commun.* **354**, 84-9.

12. Newton, R. A. & Hogg, N. (1998) The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils, *J Immunol.* **160**, 1427-35.
13. Simard, J. C., Girard, D. & Tessier, P. A. (2010) Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism, *J Leukoc Biol.* **87**, 905-14.
14. Simard, J. C., Simon, M. M., Tessier, P. A. & Girard, D. (2011) Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis, *J Immunol.* **186**, 3622-31.
15. Simard, J. C., Cesaro, A., Chapeton-Montes, J., Tardif, M., Antoine, F., Girard, D. & Tessier, P. A. (2013) S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF-kappaB(1.), *PLoS One.* **8**, e72138.
16. Ryckman, C., McColl, S. R., Vandal, K., de Medicis, R., Lussier, A., Poubelle, 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**, 2310-20.
17. Liu, F., Xia, Y., Parker, A. S. & Verma, I. M. (2012) IKK biology, *Immunol Rev.* **246**, 239-53.
18. Kolaczowska, E. & Kubes, P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation, *Nat Rev Immunol.* **13**, 159-75.
19. Riva, M., Kallberg, E., Bjork, P., Hancz, D., Vogl, T., Roth, J., Ivars, F. & Leanderson, T. (2012) Induction of nuclear factor-kappaB responses by the S100A9 protein is Toll-like receptor-4-dependent, *Immunology.* **137**, 172-82.
20. Sunahori, K., Yamamura, M., Yamana, J., Takasugi, K., Kawashima, M., Yamamoto, H., Chazin, W. J., Nakatani, Y., Yui, S. & Makino, H. (2006) The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis, *Arthritis Res Ther.* **8**, R69.
21. Katano, M., Okamoto, K., Suematsu, N., Kurokawa, M. S., Nakamura, H., Masuko, K., Yudoh, K. & Kato, T. (2011) Increased expression of S100 calcium binding protein A8 in GM-CSF-stimulated neutrophils leads to the increased expressions of IL-8 and IL-16, *Clin Exp Rheumatol.* **29**, 768-75.
22. Cloutier, A., Ear, T., Blais-Charron, E., Dubois, C. M. & McDonald, P. P. (2007) Differential involvement of NF-kappaB and MAP kinase pathways in the generation of inflammatory cytokines by human neutrophils, *J Leukoc Biol.* **81**, 567-77.

23. Al-Shami, A. & Naccache, P. H. (1999) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Involvement of Jak2 in the stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase, *J Biol Chem.* **274**, 5333-8.
24. Hermani, A., De Servi, B., Medunjanin, S., Tessier, P. A. & Mayer, D. (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**, 184-97.
25. Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M. & Karin, M. (1997) The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation, *Cell.* **91**, 243-52.
26. Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G. & Karin, M. (1998) IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex, *Nature.* **395**, 297-300.
27. 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**, 2602-9.
28. Raquil, M. A., Anceriz, N., Rouleau, P. & Tessier, P. A. (2008) Blockade of antimicrobial proteins S100A8 and S100A9 inhibits phagocyte migration to the alveoli in streptococcal pneumonia, *J Immunol.* **180**, 3366-74.
29. Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P. R. & Zychlinsky, A. (2009) Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*, *PLoS Pathog.* **5**, e1000639.
30. Achouiti, A., Vogl, T., Urban, C. F., Rohm, M., Hommes, T. J., van Zoelen, M. A., Florquin, S., Roth, J., van 't Veer, C., de Vos, A. F. & van der Poll, T. (2012) Myeloid-related protein-14 contributes to protective immunity in gram-negative pneumonia derived sepsis, *PLoS Pathog.* **8**, e1002987.
31. Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi, L., Lunardi, C., Annunziato, F., Romagnani, S. & Cassatella, M. A. (2010) Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells, *Blood.* **115**, 335-43.
32. Frosch, M., Strey, A., Vogl, T., Wulffraat, 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**, 628-37.

SECTION 3: DISCUSSION ET CONCLUSION

CHAPITRE 6: Discussion et Conclusion

6.1 Les protéines S100A8 et S100A9: des amplificateurs de la réponse innée

Les protéines S100A8 et S100A9 sont connues maintenant depuis plusieurs années comme des protéines inflammatoires associées à la migration des phagocytes. Elles sont impliquées dans toutes les étapes de la diapédèse: le chimiotactisme (Ryckman *et al.*, 2003b), l'adhésion, la dégranulation (Simard *et al.*, 2010) et la migration cellulaire (Anceriz *et al.*, 2007a). Nos résultats démontrent que S100A8 et particulièrement S100A9 modulent plusieurs autres fonctions essentielles à la réponse immunitaire. Le premier article démontre que S100A9 favorise l'internalisation de particules de façon dépendante des FcR et des CR. S100A9 induit également une accumulation de ROS en plus de potentialiser cette production de ROS en réponse à un stimulus phagocytaire. La seconde publication démontre que S100A8 et S100A9 modulent également la production de cytokines par les monocytes. Finalement, le troisième article met en évidence l'importance de S100A9 dans la potentialisation de la libération de la chimiokine IL-8 et dans l'activation de divers facteurs de transcription. L'ensemble de ces résultats suggère que ces protéines sont d'importants amplificateurs de la réponse immunitaire innée.

6.1.1 S100A9 régule la phagocytose des neutrophiles

La phagocytose est le processus d'internalisation principal employé par les phagocytes pour détruire les pathogènes. L'engagement des récepteurs phagocytaires engendre la formation d'un phagosome. La formation du phagosome provoque la fusion des granules du neutrophile ainsi que le recrutement et l'activation de la NADPH oxydase permettant la destruction des micro-organismes. L'élimination des pathogènes est un événement requis pour la résolution de l'inflammation puis la réparation des tissus et le retour à l'homéostasie (Buckley *et al.*, 2013). L'augmentation de la phagocytose par S100A9 favorise ainsi l'élimination et la destruction de pathogènes, permettant alors le retour rapide de l'homéostasie. Nos résultats démontrent également que S100A9 potentialise la production de réactifs oxygénés à la suite de

l'engagement des FcγR. En se basant sur la constante K_K , cette potentialisation ne semble pas affecter la capacité des neutrophiles à détruire les bactéries extracellulaires. Par contre, considérant le rôle des ROS dans la destruction de pathogènes internalisés, S100A9 en favoriserait leur destruction. De plus, S100A9 provoque la dégranulation des neutrophiles, un autre processus nécessaire à l'élimination de pathogènes (Simard *et al.*, 2010). Ces résultats supportent le rôle actif de S100A9 dans la clairance des infections et le retour à l'homéostasie.

En plus de permettre l'internalisation et la destruction de pathogènes, la phagocytose induit également l'activation du phagocyte. En effet, le recrutement et l'oligomérisation de récepteurs, tels que les TLR, initie une signalisation intracellulaire qui mène à une importante production de cytokines via la voie MyD88 et NF-κB. L'extension des pseudopodes permet également au phagocyte d'obtenir des informations sur la nature de la particule à phagocyter, déterminant ainsi un processus phagocytaire spécifique (Underhill *et al.*, 2012). L'internalisation des particules provoque également la sécrétion de cytokines inflammatoires (Wolf *et al.*, 2011) et régule plusieurs gènes inflammatoires à la hausse (Shimada *et al.*, 2010). Ces études suggèrent que l'augmentation de la phagocytose par S100A9 pourrait contribuer à une augmentation de plusieurs gènes inflammatoires, dont ceux de différentes cytokines.

Les protéines S100A8 et S100A9 sont de puissants activateurs des neutrophiles. Nous avons précédemment démontré que S100A9 active les MAPK p38, Erk1/2 ainsi que JNK-2 (Simard *et al.*, 2010). Les résultats présentés dans l'article 1 démontrent que S100A9 active d'autres voies signalétiques des neutrophiles, soit la voie PI3K/Akt ainsi que la tyrosine kinase Syk. L'activation de cette dernière est essentielle au processus phagocytaire (Berton *et al.*, 2005). Une déficience en Src affecte la polymérisation de l'actine au niveau de la coupe phagocytaire alors qu'une déficience en Syk résulte en l'incapacité de former complètement le phagosome. La protéine Syk est également associée à la signalisation des TLR, contribuant notamment à la sécrétion de cytokines (Ying-Cing Lin *et al.*, 2013). Nos résultats supportent l'importance de Syk dans la phagocytose et démontrent que l'augmentation de la phagocytose par S100A9 passe, entre autres, par l'activation de Syk. Il semblerait également que Syk soit impliquée dans la régulation de l'inflammasome NLRP-3, suggérant d'autres rôles potentiels à S100A9 via l'activation de Syk (Shio *et al.*, 2009).

6.1.2 S100A9 régule la libération d'IL-8 et l'activation de divers facteurs de transcription des neutrophiles

L'IL-8 est une des plus importantes chimiokines impliquées dans le recrutement massif des neutrophiles, un événement caractéristique de la réponse inflammatoire aiguë (Kolaczowska *et al.*, 2013). De plus, on retrouve évidemment une présence importante de fMLP lors d'une infection par un pathogène bactérien. Dans ce contexte, les résultats du troisième article démontrent clairement l'importance de S100A9 dans la libération d'IL-8. Ainsi, la présence de S100A9 dans l'inflammation aiguë pourrait ainsi s'avérer déterminante pour le recrutement de neutrophiles et dans l'élimination du pathogène. Dans les cas d'arthrite rhumatoïde, où le processus inflammatoire aiguë et chronique coexiste et se perpétue parfois pendant plusieurs années, on observe une accumulation de plusieurs centaines de millions de neutrophiles en partie responsables des dommages articulaires (Hollingsworth *et al.*, 1967). En effet, les neutrophiles participent à la génération d'auto-anticorps dirigés contre des protéines citrulinées (Uysal *et al.*, 2009). Or, les résultats de la troisième publication suggèrent que S100A9 régulerait le recrutement de neutrophiles via la potentialisation de la production d'IL-8, un événement indésirable chez les patients arthritiques.

L'infiltration de neutrophiles dans les tissus de patients atteints de maladies inflammatoires chroniques est bien documentée (Caielli *et al.*, 2012). Ce type cellulaire contribue activement à l'exacerbation des pathologies par la libération de plusieurs dizaines, voire centaines de médiateurs inflammatoires. Telle que mentionnée précédemment, la présence des protéines S100A8 et S100A9 est également associée aux maladies inflammatoires chroniques. Nos résultats suggèrent donc que, dans un contexte d'inflammation chronique, la présence de S100A9 s'avèrerait être un élément néfaste contribuant au recrutement de neutrophiles. De plus, la régulation de facteurs de transcription comme NF- κ B et les STAT est également un élément important. L'inhibition de ces derniers s'est d'ailleurs avérée extrêmement efficace dans le traitement de certains désordres inflammatoires (Ivanenkov *et al.*, 2011). Par conséquent, la régulation positive de ces facteurs de transcription par S100A9 démontre un nouveau rôle pour cette protéine dans le développement et l'exacerbation de pathologies inflammatoires chroniques.

6.1.3 S100A8 et S100A9 seraient des facteurs impliqués dans une boucle d'amplification inflammatoire

La résolution de l'inflammation dépend d'abord et avant tout de l'élimination de l'agent causal (Nathan *et al.*, 2010). Par contre, on s'explique parfois plutôt mal les pathologies inflammatoires chroniques, où l'on n'arrive pas nécessairement à déterminer l'exactitude de l'agent à la source de l'inflammation. De plus en plus d'études supportent l'idée que la persistance de l'inflammation est une des principales raisons responsables de pathologies comme l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, la maladie de Crohn ainsi que plusieurs formes de cancers (Mantovani *et al.*, 2008). Comme il a été mentionné précédemment, plusieurs dizaines voire centaines, de médiateurs pro- et anti-inflammatoires sont impliqués dans la persistance/résolution de l'inflammation. Les résultats présentés dans cette thèse suggèrent que S100A8 et S100A9 jouent des rôles importants dans la régulation de l'inflammation. Ainsi, la régulation de la production de cytokines chez les monocytes par S100A8 et S100A9 suggère que ces deux protéines, présentes à de fortes concentrations dans la majorité des pathologies inflammatoires, seraient impliquées dans la perpétuation de l'inflammation. De plus, les concentrations importantes de cytokines et chimiokines inflammatoires induites par ces deux protéines participeraient donc à la sécrétion de quantités encore plus importantes de S100A8 et S100A9. En effet, plusieurs cytokines sécrétées par les monocytes stimulés avec S100A8 et S100A9, comme le TNF- α et l'IL-1 β , provoque la sécrétion de calprotectine (Guignard *et al.*, 1995, Suryono *et al.*, 2003). S100A8 et S100A9 pourraient donc engendrer une boucle d'amplification inflammatoire en favorisant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β . Cette cytokine contribuerait alors à la sécrétion d'une quantité encore plus importante de S100A8 et S100A9, une théorie suggérée précédemment dans la littérature (Cesaro *et al.*, 2012).

6.2 S100A8 et S100A9 régule l'inflammasome NLRP-3

Les résultats obtenus dans la deuxième publication démontrent que S100A8 et S100A9 sont d'importants régulateurs de l'inflammasome NLRP-3. S100A8 et S100A9 induisent la synthèse de NLRP-3 et de pro-IL-1 β via une activation de NF- κ B dépendante de la production de réactifs oxygénés. En effet, l'inhibition de la production de ROS par l'utilisation du DPI ou encore

d'agents *scavenger* bloque la translocation de NF- κ B ainsi que la synthèse de NLRP-3 et de pro-IL-1 β .

6.2.1 Implication dans l'auto-immunité et l'auto-inflammation

La sécrétion d'IL-1 β demeure sous le contrôle de différents inflammasomes. L'inflammasome NLRP-3 est le mieux caractérisé et l'implication de ce dernier dans l'immunité ainsi que dans le développement de maladies auto-immunes et auto-inflammatoires est bien décrit (Franchi *et al.*, 2009). La sécrétion d'IL-1 β mature requiert la synthèse de pro-IL1 β . Nos résultats démontrent que les DAMP S100A8 et S100A9 permettent la synthèse des protéines NLRP-3 et de pro-IL1 β . La synthèse de ces deux protéines est accompagnée d'une augmentation de l'activité de la caspase-1 ainsi qu'à une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β mature.

Dans un contexte d'auto-immunité et même d'auto-inflammation, où la cause exacte de l'inflammation demeure souvent inconnue, la synthèse de pro-IL-1 β demeure sans doute un événement indésirable. En effet, l'IL-1 β est maintenant ciblée de façon thérapeutique pour le traitement de plusieurs maladies inflammatoires chroniques et auto-inflammatoires (Dinarello, 2011). Pour ces pathologies, la neutralisation de l'IL-1 β provoque une réduction marquée de la sévérité des symptômes, démontrant l'implication de cette cytokine dans la pathologie (Goldbach-Mansky *et al.*, 2006, Hoffman *et al.*, 2004). S100A8 et S100A9 favoriseraient ainsi la synthèse et la sécrétion d'IL-1 β , contribuant au développement ou à l'exacerbation des pathologies. Il est intéressant de noter qu'on retrouve des concentrations élevées de S100A8 et S100A9 dans presque toutes les pathologies auto-inflammatoires également associées avec de fortes teneurs en IL-1 β (Kessel *et al.*, 2013). Par exemple, les syndromes périodiques associés à cryopyrine (CAPS) sont un groupe de maladies auto-inflammatoires, incluant le syndrome Muckle-Wells et le syndrome *Neonatal-Onset Multiorgan Inflammatory Disease* (NOMID), associé à une sécrétion incontrôlée d'IL-1 β (Agostini *et al.*, 2004, Janssen *et al.*, 2004). On retrouve chez ces patients des concentrations élevées de S100A8 et S100A9 (Wittkowski *et al.*, 2011). De plus, le traitement des patients CAPS avec des bloquants IL-1 démontre une amélioration de la condition des patients associée avec une normalisation des comptes de neutrophiles. En considérant le nouveau rôle de S100A8 et S100A9 dans la synthèse d'IL-1 β , nos résultats suggèrent que la présence élevée de calgranulines contribue activement à ces pathologies auto-inflammatoires. D'autres pathologies auto-inflammatoires, comme la fièvre

familiale méditerranéenne, l'arthrite idiopathique juvénile, le syndrome PAPA et l'hypercalprotectinémie, sont toutes associées à la présence d'IL-1 β et à de fortes concentrations de calgranulines (D Holzinger *et al.*, 2013b, Kallinich *et al.*, 2010, Sampson *et al.*, 2002, Tasher *et al.*, 2006, Wittkowski *et al.*, 2008).

En plus de tous les autres rôles dans l'inflammation, l'IL-1 β contribue également à la sécrétion de S100A8/A9 par les neutrophiles et les monocytes (Guignard *et al.*, 1995, Suryono *et al.*, 2003). S100A8 et S100A9 pourraient donc engendrer une boucle d'amplification inflammatoire en favorisant la synthèse d'IL-1 β . Cette cytokine contribuerait alors à la sécrétion d'une quantité encore plus importante de S100A8 et S100A9, une théorie suggérée précédemment dans la littérature (Cesaro *et al.*, 2012).

6.2.2 L'hypercalprotectinémie: un syndrome auto-inflammatoire associé aux protéines S100A8 et S100A9

Les syndromes auto-inflammatoires, aussi appelés syndromes de fièvre périodique, sont une classe de désordres immunitaires dans lesquels on observe, entre autres, une dérégulation des processus inflammatoires et une absence d'auto-anticorps (Galon *et al.*, 2000). Dans ces pathologies, la dérégulation de l'inflammation mène à une inflammation systémique associée à des épisodes inflammatoires aigus au niveau des articulations et de la peau combinée à des fièvres intenses (Stojanov *et al.*, 2005). Les syndromes auto-inflammatoires regroupent plusieurs désordres inflammatoires génétiques comme la FFM, le CAPS, le TRAPS, le PAPA, le *Periodic Fever, Aphthous stomatis, Pharyngitis and Adenitis* (PFAPA) et l'hypercalprotectinémie (D Holzinger *et al.*, 2013b). L'hypercalprotectinémie fut d'abord identifiée par la présence de concentrations anormalement élevées de calprotectine et de zinc au niveau du sérum (Sampson *et al.*, 2002). Les déficiences sévères en zinc sont connues depuis maintenant plusieurs années (Failla *et al.*, 1982, Smith *et al.*, 1976). Par contre, ce n'est que depuis récemment que l'on connaît réellement les causes de ce désordre. Ce dernier est dû à deux mutations dans le gène *PSTPIP1* E250K et E275K. Ces mutations engendrent l'augmentation de l'affinité de la calprotectine pour PSTPIP-1 (D Holzinger *et al.*, 2013b). PSTPIP-1 est une protéine associée au cytosquelette d'actine et permet la formation de filopodes (Spencer *et al.*, 1997). Il est intéressant de noter que la formation des filaments par PSTPIP1 est dépendante d'un réseau intact de tubuline et suggère une association directe ou indirecte avec les

microtubules (Waite *et al.*, 2009), un événement possiblement régulé par S100A8 et S100A9 (Vogl *et al.*, 2004). De plus, les mutations sur cette protéine (A230T et E250Q) favorisent l'association de cette dernière avec le domaine pyrine présent sur les protéines ASC et NLRP-3 (Shoham *et al.*, 2003). Cette association provoque une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β chez les patients PAPA et hypercalprotectinémique (Yu *et al.*, 2007). Nos résultats supportent donc l'implication de S100A8 et S100A9 dans la production d'IL-1, en partie responsable des épisodes d'inflammation et de fièvre chez les patients atteints de syndromes auto-inflammatoires, en particulier chez les patients hypercalprotectinémiques.

6.2.3 Rôles dans la réponse inflammatoire aiguë et l'immunité

Tel que mentionné précédemment, la régulation de l'inflammasome NLRP-3 par S100A8 et S100A9 s'avère un événement indésirable dans l'auto-immunité et l'auto-inflammation puisque dans ce contexte, la réponse inflammatoire est généralement incontrôlée. Par contre, l'état inflammatoire pathologique que l'on retrouve dans les désordres inflammatoires reflète nécessairement une contrepartie physiologique (Medzhitov, 2008). Autrement dit, la présence de médiateurs de l'inflammation, comme les protéines S100A8 et S100A9, joue d'abord et avant tout, un rôle bénéfique pour la défense contre les pathogènes. En effet, considérant l'importance de l'IL-1 β dans la résistance aux pathogènes, la régulation de l'inflammasome NLRP-3 s'avère certainement bénéfique pour l'organisme. En effet, cette cytokine permet, entre autres, l'activation des COX, l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion des leucocytes en plus de l'induction de la synthèse de ROS et de iNOS par les phagocytes (Dinarello, 2009). Ainsi, nos résultats suggèrent que, dans un contexte d'infections par des pathogènes, la régulation de l'inflammasome NLRP-3 par S100A8 et S100A9 serait un événement favorable en contribuant à l'élimination des pathogènes.

6.3 Limitations du projet de recherche

Le projet de recherche associé à cette thèse possède plusieurs limites et contraintes. Les prochaines lignes tentent de remettre en perspectives les résultats obtenus.

6.3.1 La calprotectine

Comme mentionné précédemment, l'absence d'ions Ca^{2+} favorise le réarrangement des protéines S100A8 et S100A9 en homodimères alors que la présence d'ions divalents favorise la formation d'hétérodimères et même d'hétérotétramères (Korndorfer *et al.*, 2007, Vogl *et al.*, 2006) . De plus, la calprotectine demeure la forme la plus abondante physiologiquement. Par conséquent, la plupart des études sur les protéines S100A8 et S100A9 traitent généralement de la calprotectine. Toutefois, il s'avère qu'une quantité assez importante de S100A8 et S100A9 est présente physiologiquement. Nos résultats traitent uniquement des S100A8 et S100A9 séparément. Ceci nous permet, entre autres, de déterminer les fonctions spécifiques de chacune des protéines. Par contre, nos études auraient eu avantage à traiter des différentes formes physiologiques afin de connaître les différentes fonctions associées aux réarrangements des protéines. Ceci aurait permis un portrait plus général des fonctions associées aux protéines S100A8 et S100A9. La purification du complexe calprotectine recombinant a cependant été une étape limitante dans ce travail.

Nos travaux n'ont pas non plus traité des différentes modifications post-traductionnelles des protéines S100A8 et S100A9 comme l'oxydation, la phosphorylation, la glutathionylation ou la nitrosylation. Bien que l'étude de ces modifications permettrait sans doute de dresser un portrait plus complet des fonctions associées avec S100A8 et S100A9, l'accès difficile à ces appareils dispendieux, comme un appareil de spectroscopie de masse, nous a obligés à négliger volontairement cet aspect.

6.3.2 Les autres médiateurs solubles et les facteurs de transcription

Nos résultats suggèrent que S100A8 et S100A9 ne provoquent pas directement la libération de cytokines. Ces résultats ont été démontrés dans le troisième article à l'aide de microréseaux d'anticorps. Cependant, plusieurs autres médiateurs inflammatoires libérés par les neutrophiles ne se retrouvaient pas sur ces membranes comme LTB-4 ou PGE-2. Par conséquent, il est possible que S100A8 et S100A9 provoquent une libération de médiateurs inflammatoires autres que ceux testés à l'aide du microréseau d'anticorps.

Nos résultats indiquent également que S100A9 potentialise la sécrétion d'IL-8 chez le neutrophile humain en réponse au fMLP et au GM-CSF. Il aurait cependant été très intéressant de vérifier la potentialisation de cette chimiokine en réponse à d'autres agents endogènes ou exogènes jouant un rôle dans le processus inflammatoire. Nous nous sommes également limités à l'étude de certains facteurs de transcriptions spécifiques comme NF- κ B. Plusieurs autres facteurs de transcription comme AP-1 ou SP-1 jouent aussi un rôle dans la régulation de cytokines inflammatoires. Il aurait donc été intéressant de pousser davantage nos études en regardant également le rôle de ces autres facteurs de transcription dans la libération de cytokines observées notamment chez les PBMCs.

6.3.3 L'effet de S100A8 et S100A9 sur les cellules mononuclées du sang périphérique

Nos résultats suggèrent que les monocytes répondent fortement à la stimulation par les protéines S100A8 et S100A9 en libérant plusieurs cytokines pro-inflammatoires. En effet, les membranes de microréseaux d'anticorps des purifications de monocytes sont presque identiques à celles provenant de surnageants des PBMCs. De plus, les membranes incubées avec les surnageants de lymphocytes T suggèrent que ce type cellulaire ne produit pas significativement de cytokines en réponse à S100A8 et S100A9. Les lymphocytes B ne répondent visiblement pas non plus à cette stimulation si on observe les ELISA spécifiques pour l'IL-6 et l'IL-8 (Annexe). Plusieurs autres expériences supplémentaires afin de confirmer la libération de cytokines, uniquement par les monocytes, auraient été nécessaires afin de s'assurer de l'exactitude de ces résultats. De plus, les résultats de translocation du facteur de transcription NF- κ B obtenus par EMSA et par l'essai TransFactor NF- κ B p50 ont été réalisés sur l'ensemble des cellules mononuclées. Nous ne pouvons donc pas déterminer avec exactitude dans quel(s) type(s) cellulaire(s) on retrouve une translocation de NF- κ B. Encore une fois, une ultrapurification des sous-types cellulaires aurait été nécessaire afin de vérifier ces données.

6.3.4 La courte demi-vie des neutrophiles

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques pour les expériences avec les neutrophiles a été préconisée. Par contre, l'utilisation de ceux-ci provoque parfois une inhibition non spécifique de certaines voies signalétiques sur les cellules. Il aurait donc été important de confirmer les résultats à l'aide d'autres techniques d'inhibition plus spécifique comme les ARN interférents. Or, la courte durée de vie des neutrophiles demeure un facteur extrêmement limitant de nos études avec les neutrophiles nous empêchant ainsi d'utiliser l'option des ARN interférents.

6.3.5 La réalisation d'expériences in vivo

Les trois articles présentés dans cette thèse ont été rédigés à partir d'expériences réalisées *in vitro*. Des expériences complémentaires *in vivo* auraient définitivement renforcé l'impact des résultats obtenus. Par exemple, il aurait été extrêmement intéressant d'utiliser un modèle d'abcès bactérien suivi d'une injection locale de protéines recombinantes S100A8 ou S100A9 afin de vérifier si ces protéines pourraient contribuer à l'élimination de l'abcès. Ce type d'expériences aurait permis de confirmer ou d'infirmer le rôle de S100A9 dans le processus phagocytaire des neutrophiles. Avec plus de temps, plusieurs autres expériences *in vivo* auraient également permis de confirmer les résultats obtenus. Par exemple, l'utilisation de la technologie IVIS (*in vivo imaging system*) aurait permis de mesurer les niveaux d'activations de NF- κ B en réponse à une injection locale de S100A8 ou S100A9. Cette technique aurait également permis de visualiser l'activation du facteur de transcription dans une pathologie inflammatoire où l'utilisation d'anticorps neutralisant permettrait de confirmer ou d'infirmer le rôle des protéines dans l'activation du facteur de transcription ainsi que dans le développement de la pathologie.

6.3.6 Le(s) récepteur(s)

Comme il a été mentionné précédemment, plusieurs récepteurs possibles de S100A8 et S100A9 ont été décrits dans la littérature. Parmi ceux-ci, on retrouve RAGE, TLR-4 et CD36. L'absence de données claires sur le ou les récepteurs de ces protéines complique grandement

l'étude de celles-ci. Nos données sur la production de cytokines des monocytes démontrent que S100A8 et S100A9 induisent une réponse très similaire au LPS. Dans cette optique, il est donc permis de croire que le TLR-4 soit un récepteur potentiel. Quoique la réponse à la suite d'une stimulation par S100A8 et S100A9 soit généralement moins puissante que celle au LPS, il est possible que la liaison des protéines S100 au TLR-4 ne soit pas aussi spécifique. Autrement dit, le signal transmis par la liaison de S100A8 et S100A9 pourrait être que partiel comparativement à celui provoqué par la liaison du LPS.

6.4 Conclusions et perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse permettent de mieux comprendre l'effet des protéines S100A8 et S100A9 dans l'inflammation. Ainsi, il a été démontré que la protéine S100A9 possède une activité inflammatoire beaucoup plus importante que la protéine S100A8 sur les neutrophiles humains. La protéine S100A9 semble réguler la plupart des fonctions des neutrophiles, incluant la phagocytose et la potentialisation de la production d'IL-8. Cette protéine active également plusieurs voies signalétiques importantes telles que les protéines kinases Syk, Erk1/2 et Akt en plus de réguler la phosphorylation et l'activation des facteurs de transcription NF- κ B, STAT-3, STAT-5 et CREB-1. Ces facteurs de transcription demeurent extrêmement importants dans la régulation des fonctions inflammatoires des neutrophiles, suggérant d'autres rôles de régulation à la protéine S100A9. L'activité de S100A8 sur la libération de cytokines des monocytes s'avèrerait également extrêmement importante dans la régulation de l'inflammation.

L'identification des récepteurs de S100A8 et S100A9 demeure nécessairement une avenue de recherche des plus pertinentes dans l'étude de ces protéines. Plusieurs techniques biochimiques permettraient nécessairement d'arriver à répondre à nos interrogations. Par exemple, l'utilisation de protéines S100A8 et S100A9 couplées à la Glutathione S-Transférase (GST) permettrait sans doute d'identifier des partenaires d'interactions à la suite d'un essai de type *pull-down*. D'autres techniques plus archaïques, comme le marquage de protéines par des radio-isotopes pourrait également permettre de répondre à cette question.

Nos résultats supportent également l'implication de S100A8 et en particulier de S100A9 dans le développement de maladie inflammatoire chronique. La neutralisation de la calprotectine, en particulier via l'utilisation d'anti-S100A9, s'est avérée extrêmement efficace dans la réduction de symptôme associé à l'arthrite induite au collagène chez la souris (Cesaro *et al.*, 2012). De plus, des expériences préliminaires dans un modèle de colite ulcéreuse induite par l'ingestion de dextran sodium sulfate, suggèrent également qu'une neutralisation de S100A9 pourrait aider à l'amélioration des conditions pathologiques. Par contre, la neutralisation de certaines autres cibles thérapeutiques comme le TNF- α se sont montrées plus efficace dans ce modèle. Les prochains travaux portant sur les protéines S100A8 et S100A9 devraient donc s'attarder à vérifier les effets de leur neutralisation dans différentes maladies inflammatoires. Mis en communs, ces résultats nous permettent donc de croire que ces protéines pourraient être des cibles thérapeutiques de prédilection dans le traitement de maladies inflammatoires chroniques. Ainsi, la neutralisation de ces protéines, en combinaison avec d'autres molécules anti-inflammatoires connues, comme le TNF- α , permettrait possiblement d'avoir un meilleur contrôle de la boucle d'amplification inflammatoire retrouvée dans les pathologies inflammatoires chroniques.

Bibliographie

- Abdulahad DA, Westra J, Limburg PC, Kallenberg CG & Bijl M (2010) HMGB1 in systemic lupus Erythematosus: Its role in cutaneous lesions development. *Autoimmun Rev* 9(10):661-665.
- Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG & Segal AW (1991) Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 353(6345):668-670.
- Abo A, Webb MR, Grogan A & Segal AW (1994) Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem J* 298 Pt 3:585-591.
- Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN & Tschopp J (2004) NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20(3):319-325.
- Akgul C, Moulding DA & Edwards SW (2001) Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS letters* 487(3):318-322.
- Alcamo E, Hacohen N, Schulte LC, Rennert PD, Hynes RO & Baltimore D (2002) Requirement for the NF-kappaB family member RelA in the development of secondary lymphoid organs. *The Journal of experimental medicine* 195(2):233-244.
- Alloul N, Gorzalczany Y, Itan M, Sigal N & Pick E (2001) Activation of the superoxide-generating NADPH oxidase by chimeric proteins consisting of segments of the cytosolic component p67(phox) and the small GTPase Rac1. *Biochemistry* 40(48):14557-14566.
- Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA & Miller SI (1994) Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *The Journal of experimental medicine* 179(2):601-608.
- Anceriz N, Raquil MA & Tessier PA (Édit) (2007a) *The proinflammatory functions of S100A8, S100A9 and S100A12*. Research Signpost, Pointe-Claire. 134 p.

- Anceriz N, Vandal K & Tessier PA (2007b) S100A9 mediates neutrophil adhesion to fibronectin through activation of beta2 integrins. *Biochemical and biophysical research communications* 354(1):84-89.
- Anderson CL, Shen L, Eicher DM, Wewers MD & Gill JK (1990) Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. *The Journal of experimental medicine* 171(4):1333-1345.
- Ang CW, Nedjadi T, Sheikh AA, Tweedle EM, Tonack S, Honap S, Jenkins RE, Park BK, Schwarte-Waldhoff I, Khattak I, Azadeh B, Dodson A, Kalirai H, Neoptolemos JP, Rooney PS & Costello E (2010) Smad4 loss is associated with fewer S100A8-positive monocytes in colorectal tumors and attenuated response to S100A8 in colorectal and pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* 31(9):1541-1551.
- Arai K, Teratani T, Kuruto-Niwa R, Yamada T & Nozawa R (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, Teratani T, Nozawa R & Yamada T (2001) Immunohistochemical investigation of S100A9 expression in pulmonary adenocarcinoma: S100A9 expression is associated with tumor differentiation. *Oncology reports* 8(3):591-596.
- Arai K, Yamada T & Nozawa R (2000) Immunohistochemical investigation of migration inhibitory factor-related protein (MRP)-14 expression in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* 17(3):183-188.
- Assari T (2006) Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. *Med Immunol* 5:4.
- Babior BM (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* 93(5):1464-1476.
- Baeuerle PA & Baltimore D (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell* 87(1):13-20.
- Baggiolini M, Dewald B & Moser B (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55:97-179.

- Baker VS, Imade GE, Molta NB, Tawde P, Pam SD, Obadofin MO, Sagay SA, Egah DZ, Iya D, Afolabi BB, Baker M, Ford K, Ford R, Roux KH & Keller TC, 3rd (2008) Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. *Malar J* 7:41.
- Bando M, Hiroshima Y, Kataoka M, Herzberg MC, Ross KF, Shinohara Y, Yamamoto T, Nagata T & Kido J (2010) Modulation of calprotectin in human keratinocytes by keratinocyte growth factor and interleukin-1alpha. *Immunol Cell Biol* 88(3):328-333.
- Bargagli E, Olivieri C, Cintonino M, Refini RM, Bianchi N, Prasse A & Rottoli P (2011) Calgranulin B (S100A9/MRP14): a key molecule in idiopathic pulmonary fibrosis? *Inflammation* 34(2):85-91.
- 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. *Biochimica et biophysica acta* 1096(2):175-177.
- Batliwalla FM, Li W, Ritchlin CT, Xiao X, Brenner M, Laragione T, Shao T, Durham R, Kemsheiti S, Schwarz E, Coe R, Kern M, Baechler EC, Behrens TW, Gregersen PK & Gulko PS (2005) Microarray analyses of peripheral blood cells identifies unique gene expression signature in psoriatic arthritis. *Mol Med* 11(1-12):21-29.
- Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, Gaudiosi D, Mirolo M, Mori L, Tamassia N, Mantovani A, Cassatella MA & Locati M (2009) Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(13):5282-5287.
- Beg AA & Baltimore D (1996) An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274(5288):782-784.
- Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S & Baltimore D (1995) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376(6536):167-170.
- Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A & Henriques-Normark B (2006) An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 16(4):401-407.

Ben-Neriah Y & Karin M (2011) Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nat Immunol* 12(8):715-723.

Benedyk M, Sopalla C, Nacken W, Bode G, Melkonyan H, Banfi B & Kerkhoff C (2007) HaCaT keratinocytes overexpressing the S100 proteins S100A8 and S100A9 show increased NADPH oxidase and NF-kappaB activities. *J Invest Dermatol* 127(8):2001-2011.

Bengis-Garber C & Gruener N (1993) Calcium-binding myeloid protein (P8,14) is phosphorylated in fMet-Leu-Phe-stimulated neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 54(2):114-118.

Bennouna S, Bliss SK, Curiel TJ & Denkers EY (2003) Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol* 171(11):6052-6058.

Benoit S, Toksoy A, Ahlmann M, Schmidt M, Sunderkotter C, Foell D, Pasparakis M, Roth J & Goebeler M (2006) Elevated serum levels of calcium-binding S100 proteins A8 and A9 reflect disease activity and abnormal differentiation of keratinocytes in psoriasis. *The British journal of dermatology* 155(1):62-66.

Berntzen HB, Fagerhol MK, Ostensen M, Mowinckel P & Hoyeraal HM (1991a) The L1 protein as a new indicator of inflammatory activity in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 18(1):133-138.

Berntzen HB, Olmez U, Fagerhol MK & Munthe E (1991b) The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 20(2):74-82.

Berton G, Fumagalli L, Laudanna C & Sorio C (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.

Berton G, Mocsai A & Lowell CA (2005) Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. *Trends in immunology* 26(4):208-214.

Bianchi M, Niemiec MJ, Siler U, Urban CF & Reichenbach J (2011) Restoration of anti-Aspergillus defense by neutrophil extracellular traps in human chronic

- granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *The Journal of allergy and clinical immunology* 127(5):1243-1252 e1247.
- Bianchi ME (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81(1):1-5.
- Binet F, Chiasson S & Girard D (2010a) Arsenic trioxide induces endoplasmic reticulum stress-related events in neutrophils. *International immunopharmacology* 10(4):508-512.
- Binet F, Chiasson S & Girard D (2010b) Evidence that endoplasmic reticulum (ER) stress and caspase-4 activation occur in human neutrophils. *Biochemical and biophysical research communications* 391(1):18-23.
- Bjork P, Bjork A, Vogl T, Stenstrom M, Liberg D, Olsson A, Roth J, Ivars F & Leanderson T (2009) Identification of human S100A9 as a novel target for treatment of autoimmune disease via binding to quinoline-3-carboxamides. *PLoS Biol* 7(4):e97.
- Bober LA, Rojas-Triana A, Jackson JV, Leach MW, Manfra D, Narula SK & Grace MJ (2000) Regulatory effects of interleukin-4 and interleukin-10 on human neutrophil function ex vivo and on neutrophil influx in a rat model of arthritis. *Arthritis and rheumatism* 43(12):2660-2667.
- Bogdan C (2001a) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2(10):907-916.
- Bogdan C (2001b) Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol* 11(2):66-75.
- Bonizzi G & Karin M (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology* 25(6):280-288.
- Borregaard N (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33(5):657-670.
- Borregaard N, Heiple JM, Simons ER & Clark RA (1983) Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *The Journal of cell biology* 97(1):52-61.

- Bouzidi F & Doussiere J (2004) Binding of arachidonic acid to myeloid-related proteins (S100A8/A9) enhances phagocytic NADPH oxidase activation. *Biochemical and biophysical research communications* 325(3):1060-1065.
- Boyden ED & Dietrich WF (2006) Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nature genetics* 38(2):240-244.
- Brandt E, Woerly G, Younes AB, Loiseau S & Capron M (2000) IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 68(1):125-130.
- Brandt ER, Linnane AW & Devenish RJ (1994) Expression of IFN A genes in subpopulations of peripheral blood cells. *British journal of haematology* 86(4):717-725.
- Brewer JM, Pollock KG, Tetley L & Russell DG (2004) Vesicle size influences the trafficking, processing, and presentation of antigens in lipid vesicles. *J Immunol* 173(10):6143-6150.
- Brinar M, Cleyne I, Coopmans T, Van Assche G, Rutgeerts P & Vermeire S (2010) Serum S100A12 as a new marker for inflammatory bowel disease and its relationship with disease activity. *Gut* 59(12):1728-1729; author reply 1729-1730.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y & Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303(5663):1532-1535.
- Broome AM, Ryan D & Eckert RL (2003) S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis. *J Histochem Cytochem* 51(5):675-685.
- Broz P, Newton K, Lamkanfi M, Mariathasan S, Dixit VM & Monack DM (2010) Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella. *The Journal of experimental medicine* 207(8):1745-1755.
- Brun JG, Cuida M, Jacobsen H, Kloster R, Johannesen AC, Hoyeraal HM & Jonsson R (1994a) 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 JG, Haga HJ, Boe E, Kallay I, Lekven C, Berntzen HB & Fagerhol MK (1992) Calprotectin in patients with rheumatoid arthritis: relation to clinical and laboratory variables of disease activity. *The Journal of rheumatology* 19(6):859-862.
- Brun JG, Jonsson R & Haga HJ (1994b) Measurement of plasma calprotectin as an indicator of arthritis and disease activity in patients with inflammatory rheumatic diseases. *The Journal of rheumatology* 21(4):733-738.
- Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Aimaniananda V, Nietzsche S, Thywissen A, Jeron A, Latge JP, Brakhage AA & Gunzer M (2010) Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS pathogens* 6(4):e1000873.
- Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, Feramisco J & Nizet V (2006) DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 16(4):396-400.
- Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN, Stockinger B & Tak PP (2013) The resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology* 13(1):59-66.
- Bullard DC, Kunkel EJ, Kubo H, Hicks MJ, Lorenzo I, Doyle NA, Doerschuk CM, Ley K & Beaudet AL (1996) Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *The Journal of experimental medicine* 183(5):2329-2336.
- Caamano J & Hunter CA (2002) NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 15(3):414-429.
- Caamano JH, Rizzo CA, Durham SK, Barton DS, Raventos-Suarez C, Snapper CM & Bravo R (1998) Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *The Journal of experimental medicine* 187(2):185-196.
- Caielli S, Banchereau J & Pascual V (2012) Neutrophils come of age in chronic inflammation. *Curr Opin Immunol* 24(6):671-677.

- Canturk NZ, Esen N, Vural B, Canturk Z, Kirkali G, Oktay G & Solakoglu S (2001) The relationship between neutrophils and incisional wound healing. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14(2):108-116.
- Caron E & Hall A (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282(5394):1717-1721.
- Caron E, Self AJ & Hall A (2000) The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin α M β 2 by LPS and other inflammatory mediators. *Curr Biol* 10(16):974-978.
- Cauwe B, Martens E, Proost P & Opdenakker G (2009) Multidimensional degradomics identifies systemic autoantigens and intracellular matrix proteins as novel gelatinase B/MMP-9 substrates. *Integr Biol (Camb)* 1(5-6):404-426.
- Cesaro A, Anceriz N, Plante A, Page N, Tardif MR & Tessier PA (2012) An Inflammation Loop Orchestrated by S100A9 and Calprotectin Is Critical for Development of Arthritis. *PLoS one* 7(9):e45478.
- Champion JA & Mitragotri S (2006) Role of target geometry in phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(13):4930-4934.
- Chang KA, Kim HJ & Suh YH (2012) The role of S100a9 in the pathogenesis of Alzheimer's disease: the therapeutic effects of S100a9 knockdown or knockout. *Neurodegener Dis* 10(1-4):27-29.
- Chang M, Jin W, Chang JH, Xiao Y, Brittain GC, Yu J, Zhou X, Wang YH, Cheng X, Li P, Rabinovich BA, Hwu P & Sun SC (2011) The ubiquitin ligase Peli1 negatively regulates T cell activation and prevents autoimmunity. *Nat Immunol* 12(10):1002-1009.
- Charmoy M, Brunner-Agten S, Aebischer D, Auderset F, Launois P, Milon G, Proudfoot AE & Tacchini-Cottier F (2010) Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS pathogens* 6(2):e1000755.
- Chekeni FB & Ravichandran KS (2011) The role of nucleotides in apoptotic cell clearance: implications for disease pathogenesis. *J Mol Med (Berl)* 89(1):13-22.

- Chen GY & Nunez G (2010a) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature reviews. Immunology* 10(12):826-837.
- Chen J & Chen ZJ (2013) Regulation of NF-kappaB by ubiquitination. *Current opinion in immunology* 25(1):4-12.
- Chen LF, Mu Y & Greene WC (2002) Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *The EMBO journal* 21(23):6539-6548.
- Chen M & Kallenberg CG (2010b) ANCA-associated vasculitides--advances in pathogenesis and treatment. *Nat Rev Rheumatol* 6(11):653-664.
- Chen ZJ, Parent L & Maniatis T (1996) Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell* 84(6):853-862.
- Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, Ortiz M, Nacken W, Sorg C, Vogl T, Roth J & Gabrilovich DI (2008) Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *The Journal of experimental medicine* 205(10):2235-2249.
- Clark K, Nanda S & Cohen P (2013) Molecular control of the NEMO family of ubiquitin-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(10):673-685.
- Clark RA (1999) Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis* 179 Suppl 2:S309-317.
- Clohessy PA & Golden BE (1995) Calprotectin-mediated zinc chelation as a biostatic mechanism in host defence. *Scand J Immunol* 42(5):551-556.
- Clohessy PA & Golden BE (1996) Elevated plasma levels of L1L and L1H in CF patients. *Biochem Soc Trans* 24(2):310S.
- Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S & Mantovani A (1992) Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80(8):2012-2020.

- Colucci-Guyon E, Niedergang F, Wallar BJ, Peng J, Alberts AS & Chavrier P (2005) A role for mammalian diaphanous-related formins in complement receptor (CR3)-mediated phagocytosis in macrophages. *Curr Biol* 15(22):2007-2012.
- Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, Torres VJ, Anderson KL, Dattilo BM, Dunman PM, Gerads R, Caprioli RM, Nacken W, Chazin WJ & Skaar EP (2008) Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science* 319(5865):962-965.
- Cormier K, Harquail J, Ouellette RJ, Tessier PA, Guerrette R & Robichaud GA (2013) Intracellular expression of inflammatory proteins S100A8 and S100A9 leads to epithelial-mesenchymal transition and attenuated aggressivity of breast cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem*.
- Costa F, Mumolo MG, Bellini M, Romano MR, Ceccarelli L, Arpe P, Sterpi C, Marchi S & Maltinti G (2003) Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 35(9):642-647.
- Cross SS, Hamdy FC, Deloulme JC & Rehman I (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.
- Cua DJ & Tato CM (2010) Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature reviews. Immunology* 10(7):479-489.
- Cuida M, Brun JG, Johannessen AC & Jonsson R (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.
- Dalli J & Serhan CN (2012) Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood* 120(15):e60-72.
- Dang PM, Babior BM & Smith RM (1999) NADPH dehydrogenase activity of p67PHOX, a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. *Biochemistry* 38(18):5746-5753.

- Dang PM, Johnson JL & Babior BM (2000) Binding of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate to the tetratricopeptide repeat domains at the N-terminus of p67PHOX, a subunit of the leukocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Biochemistry* 39(11):3069-3075.
- de Jong NS, Leach ST & Day AS (2006) Fecal S100A12: a novel noninvasive marker in children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 12(7):566-572.
- De Santo C, Arscott R, Booth S, Karydis I, Jones M, Asher R, Salio M, Middleton M & Cerundolo V (2010) Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat Immunol* 11(11):1039-1046.
- Decker P (2011) Neutrophils and interferon-alpha-producing cells: who produces interferon in lupus? *Arthritis research & therapy* 13(4):118.
- Delhase M, Hayakawa M, Chen Y & Karin M (1999) Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science* 284(5412):309-313.
- Desjardins M, Huber LA, Parton RG & Griffiths G (1994) Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *The Journal of cell biology* 124(5):677-688.
- Dewey CF, Jr., Bussolari SR, Gimbrone MA, Jr. & Davies PF (1981) The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng* 103(3):177-185.
- Diekmann D, Abo A, Johnston C, Segal AW & Hall A (1994) Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* 265(5171):531-533.
- Diep BA, Chan L, Tattavin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, Mai TT, Marbach H, Braughton KR, Whitney AR, Gardner DJ, Fan X, Tseng CW, Liu GY, Badiou C, Etienne J, Lina G, Matthay MA, DeLeo FR & Chambers HF (2010) Polymorphonuclear leukocytes mediate Staphylococcus aureus Pantone-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(12):5587-5592.

- Dinarello CA (2009) Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27:519-550.
- Dinarello CA (2011) Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117(14):3720-3732.
- Dinauer MC, Orkin SH, Brown R, Jesaitis AJ & Parkos CA (1987) The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature* 327(6124):717-720.
- Disis ML (2010) Immune regulation of cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28(29):4531-4538.
- Dong C (2008) TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nature reviews. Immunology* 8(5):337-348.
- Dore M, Korthuis RJ, Granger DN, Entman ML & Smith CW (1993) P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood* 82(4):1308-1316.
- Dorseuil O, Vazquez A, Lang P, Bertoglio J, Gacon G & Leca G (1992) Inhibition of superoxide production in B lymphocytes by rac antisense oligonucleotides. *The Journal of biological chemistry* 267(29):20540-20542.
- Doshi N & Mitragotri S (2010) Macrophages recognize size and shape of their targets. *PloS one* 5(4):e10051.
- Dostert C, Guarda G, Romero JF, Menu P, Gross O, Tardivel A, Suva ML, Stehle JC, Kopf M, Stamenkovic I, Corradin G & Tschopp J (2009) Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PloS one* 4(8):e6510.
- Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT & Tschopp J (2008) Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320(5876):674-677.
- Doussiere J, Bouzidi F & Vignais PV (2001) A phenylarsine oxide-binding protein of neutrophil cytosol, which belongs to the S100 family, potentiates NADPH oxidase activation. *Biochemical and biophysical research communications* 285(5):1317-1320.

- Doussiere J, Bouzidi F & Vignais PV (2002) The S100A8/A9 protein as a partner for the cytosolic factors of NADPH oxidase activation in neutrophils. *Eur J Biochem* 269(13):3246-3255.
- Drayton DL, Liao S, Mounzer RH & Ruddle NH (2006) Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol* 7(4):344-353.
- Duan L, Wu R, Ye L, Wang H, Yang X, Zhang Y, Chen X, Zuo G, Zhang Y, Weng Y, Luo J, Tang M, Shi Q, He T & Zhou L (2013) S100A8 and S100A9 are associated with colorectal carcinoma progression and contribute to colorectal carcinoma cell survival and migration via Wnt/beta-catenin pathway. *PloS one* 8(4):e62092.
- Dunican A, Grutkoski P, Leuenroth S, Ayala A & Simms HH (2000a) Neutrophils regulate their own apoptosis via preservation of CXC receptors. *The Journal of surgical research* 90(1):32-38.
- Dunican AL, Leuenroth SJ, Grutkoski P, Ayala A & Simms HH (2000b) TNFalpha-induced suppression of PMN apoptosis is mediated through interleukin-8 production. *Shock* 14(3):284-288; discussion 288-289.
- Dunn GP, Old LJ & Schreiber RD (2004) The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22:329-360.
- Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G & Chen ZJ (2006) Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Molecular cell* 22(2):245-257.
- Ebihara T, Endo R, Kikuta H, Ishiguro N, Ma X, Shimazu M, Otoguro T & Kobayashi K (2005) Differential gene expression of S100 protein family in leukocytes from patients with Kawasaki disease. *Eur J Pediatr* 164(7):427-431.
- Ehlermann P, Eggers K, Bierhaus A, Most P, Weichenhan D, Greten J, Nawroth PP, Katus HA & Remppis A (2006) Increased proinflammatory endothelial response to S100A8/A9 after preactivation through advanced glycation end products. *Cardiovasc Diabetol* 5:6.

- Ehrchen JM, Sunderkotter C, Foell D, Vogl T & Roth J (2009) The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *Journal of leukocyte biology* 86(3):557-566.
- El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, Marie JC & Braut-Boucher F (2009) p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med* 41(4):217-225.
- El Benna J, Dang PM, Andrieu V, Vergnaud S, Dewas C, Cachia O, Fay M, Morel F, Chollet-Martin S, Hakim J & Gougerot-Pocidalo MA (1999) P40phox associates with the neutrophil Triton X-100-insoluble cytoskeletal fraction and PMA-activated membrane skeleton: a comparative study with P67phox and P47phox. *Journal of leukocyte biology* 66(6):1014-1020.
- Ellson CD, Gobert-Gosse S, Anderson KE, Davidson K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Thuring JW, Cooper MA, Lim ZY, Holmes AB, Gaffney PR, Coadwell J, Chilvers ER, Hawkins PT & Stephens LR (2001) PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox). *Nature cell biology* 3(7):679-682.
- Endoh Y, Chung YM, Clark IA, Geczy CL & Hsu K (2009) IL-10-dependent S100A8 gene induction in monocytes/macrophages by double-stranded RNA. *J Immunol* 182(4):2258-2268.
- Epling-Burnette PK, Zhong B, Bai F, Jiang K, Bailey RD, Garcia R, Jove R, Djeu JY, Loughran TP, Jr. & Wei S (2001) Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils. *J Immunol* 166(12):7486-7495.
- Ermert D, Urban CF, Laube B, Goosmann C, Zychlinsky A & Brinkmann V (2009) Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *Journal of innate immunity* 1(3):181-193.
- Ethuin F, Delarche C, Benslama S, Gougerot-Pocidalo MA, Jacob L & Chollet-Martin S (2001) Interleukin-12 increases interleukin 8 production and release by human polymorphonuclear neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 70(3):439-446.
- Ethuin F, Delarche C, Gougerot-Pocidalo MA, Eurin B, Jacob L & Chollet-Martin S (2003) Regulation of interleukin 12 p40 and p70 production by blood and alveolar

- phagocytes during severe sepsis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 83(9):1353-1360.
- Ethuin F, Gerard B, Benna JE, Boutten A, Gougereot-Pocidalo MA, Jacob L & Chollet-Martin S (2004) Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 84(10):1363-1371.
- Eue I, Pietz B, Storck J, Klempt M & Sorg C (2000) Transendothelial migration of 27E10+ human monocytes. *Int Immunol* 12(11):1593-1604.
- Failla ML, van de Veerdonk M, Morgan WT & Smith JC, Jr. (1982) Characterization of zinc-binding proteins of plasma in familial hyperzincemia. *J Lab Clin Med* 100(6):943-952.
- Fan B, Zhang LH, Jia YN, Zhong XY, Liu YQ, Cheng XJ, Wang XH, Xing XF, Hu Y, Li YA, Du H, Zhao W, Niu ZJ, Lu AP, Li JY & Ji JF (2012) Presence of S100A9-positive inflammatory cells in cancer tissues correlates with an early stage cancer and a better prognosis in patients with gastric cancer. *BMC Cancer* 12:316.
- Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C & De Laurenzi V (2012) Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)* 4(5):330-349.
- Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE & Trifilieff A (2003) IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol* 170(4):2106-2112.
- Fessatou S, Fagerhol MK, Roth J, Stamoulakatou A, Kitra V, Hadarean M, Paleologos G, Chandrinou H, Sampson B & Papassotiriou I (2005) Severe anemia and neutropenia associated with hyperzincemia and hypercalprotectinemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 27(9):477-480.
- Fichtner-Feigl S, Strober W, Geissler EK & Schlitt HJ (2008) Cytokines mediating the induction of chronic colitis and colitis-associated fibrosis. *Mucosal Immunol* 1 Suppl 1:S24-27.
- Filep JG & El Kebir D (2009) Neutrophil apoptosis: a target for enhancing the resolution of inflammation. *J Cell Biochem* 108(5):1039-1046.

- Fitzner-Attas CJ, Lowry M, Crowley MT, Finn AJ, Meng F, DeFranco AL & Lowell CA (2000) Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn. *The Journal of experimental medicine* 191(4):669-682.
- Flannagan RS, Jaumouille V & Grinstein S (2012) The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* 7:61-98.
- Floris S, van der Goes A, Killestein J, Knol DL, Barkhof F, Polman CH, Dijkstra CD, de Vries HE & Meilof JF (2004) Monocyte activation and disease activity in multiple sclerosis. A longitudinal analysis of serum MRP8/14 levels. *J Neuroimmunol* 148(1-2):172-177.
- Flower RJ (1988) Eleventh Gaddum memorial lecture. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. *Br J Pharmacol* 94(4):987-1015.
- Foell D, Ichida F, Vogl T, Yu X, Chen R, Miyawaki T, Sorg C & Roth J (2003a) S100A12 (EN-RAGE) in monitoring Kawasaki disease. *Lancet* 361(9365):1270-1272.
- Foell D, Kane D, Bresnihan B, Vogl T, Nacken W, Sorg C, Fitzgerald O & Roth J (2003b) Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 42(11):1383-1389.
- Foell D & Roth J (2004a) Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis and rheumatism* 50(12):3762-3771.
- Foell D, Wittkowski H, Hammerschmidt I, Wulffraat N, Schmeling H, Frosch M, Horneff G, Kuis W, Sorg C & Roth J (2004b) Monitoring neutrophil activation in juvenile rheumatoid arthritis by S100A12 serum concentrations. *Arthritis and rheumatism* 50(4):1286-1295.
- Foell D, Wittkowski H, Ren Z, Turton J, Pang G, Daebritz J, Ehrchen J, Heidemann J, Borody T, Roth J & Clancy R (2008) Phagocyte-specific S100 proteins are released from affected mucosa and promote immune responses during inflammatory bowel disease. *J Pathol* 216(2):183-192.
- Foell D, Wittkowski H & Roth J (2007) Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3(7):382-390.

Fournier BM & Parkos CA (2012) The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* 5(4):354-366.

Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C & Rossi AG (2010) Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *Journal of innate immunity* 2(3):216-227.

Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R & Nunez G (2009) The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 10(3):241-247.

Franzoso G, Carlson L, Poljak L, Shores EW, Epstein S, Leonardi A, Grinberg A, Tran T, Scharton-Kersten T, Anver M, Love P, Brown K & Siebenlist U (1998) Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *The Journal of experimental medicine* 187(2):147-159.

Fridovich I (1997) Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *The Journal of biological chemistry* 272(30):18515-18517.

Fridovich I (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 201(Pt 8):1203-1209.

Frosch M, Foell D, Ganser G & Roth J (2003) Arthrosonography of hip and knee joints in the follow up of juvenile rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 62(3):242-244.

Frosch M, Strey A, Vogl T, Wulffraat NM, 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(3):628-637.

Frosch M, Vogl T, Waldherr R, Sorg C, Sunderkotter C & Roth J (2004) Expression of MRP8 and MRP14 by macrophages is a marker for severe forms of glomerulonephritis. *Journal of leukocyte biology* 75(2):198-206.

Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V & Zychlinsky A (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176(2):231-241.

Gabrilovich D (Édit) (2013a) *The Neutrophils : New Outlook for Old Cells*. London, 3rd edition Éd.

Gabrilovich D (Édit) (2013b) *The Neutrophils: New Outlook for Old Cells*. Imperial College Press, 3rd Edition Éd.

Gabrilovich DI & Nagaraj S (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews. Immunology* 9(3):162-174.

Galli SJ, Borregaard N & Wynn TA (2011) Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol* 12(11):1035-1044.

Galon J, Aksentijevich I, McDermott MF, O'Shea JJ & Kastner DL (2000) TNFRSF1A mutations and autoinflammatory syndromes. *Current opinion in immunology* 12(4):479-486.

Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, Punaro M, Baisch J, Guiducci C, Coffman RL, Barrat FJ, Banchereau J & Pascual V (2011) Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 3(73):73ra20.

Garrett WS, Lord GM, Punit S, Lugo-Villarino G, Mazmanian SK, Ito S, Glickman JN & Glimcher LH (2007) Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell* 131(1):33-45.

Gasperini S, Calzetti F, Russo MP, De Gironcoli M & Cassatella MA (1995) Regulation of GRO alpha production in human granulocytes. *J Inflamm* 45(3):143-151.

Gasperini S, Marchi M, Calzetti F, Laudanna C, Vicentini L, Olsen H, Murphy M, Liao F, Farber J & Cassatella MA (1999) Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J Immunol* 162(8):4928-4937.

Gay NJ, Gangloff M & O'Neill LA (2011) What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends in immunology* 32(3):104-109.

- Gebhardt C, Nemeth J, Angel P & Hess J (2006) S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol* 72(11):1622-1631.
- Ghazizadeh S, Bolen JB & Fleit HB (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.
- Ghosh S & Hayden MS (2008) New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nature reviews. Immunology* 8(11):837-848.
- Gilroy DW (2010) Eicosanoids and the endogenous control of acute inflammatory resolution. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42(4):524-528.
- Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M & Rossi AG (2004) Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 3(5):401-416.
- Girard D, Paquin R & Beaulieu AD (1997) Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem J* 325 (Pt 1):147-153.
- Goepel F, Weinmann P, Schymeinsky J & Walzog B (2004) Identification of caspase-10 in human neutrophils and its role in spontaneous apoptosis. *Journal of leukocyte biology* 75(5):836-843.
- Goldbach-Mansky R, Dailey NJ, Canna SW, Gelabert A, Jones J, Rubin BI, Kim HJ, Brewer C, Zalewski C, Wiggs E, Hill S, Turner ML, Karp BI, Aksentijevich I, Pucino F, Penzak SR, Haverkamp MH, Stein L, Adams BS, Moore TL, Fuhlbrigge RC, Shaham B, Jarvis JN, O'Neil K, Vehe RK, Beitz LO, Gardner G, Hannan WP, Warren RW, Horn W, Cole JL, Paul SM, Hawkins PN, Pham TH, Snyder C, Wesley RA, Hoffmann SC, Holland SM, Butman JA & Kastner DL (2006) Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. *The New England journal of medicine* 355(6):581-592.
- Golden BE, Clohessy PA, Russell G & Fagerhol MK (1996) Calprotectin as a marker of inflammation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 74(2):136-139.
- Gopal R, Monin L, Torres D, Slight S, Mehra S, McKenna KC, Junecko BAF, Reinhart TA, Kolls J, Baez-Saldana R, Cruz-Lagunas A, Rodriguez-Reyna TS, Kumar NP, Tessier P, Roth J, Selman M, Becerril-Villanueva E, Baquera-Heredia J,

- Cumming B, Kasprowicz VO, Steyn AJC, Babu S, Kaushal D, Zuniga J, Vogl T, Rangel-Moreno J & Khader SA (2013) S100A8/A9 Proteins Mediate Neutrophilic Inflammation and Lung Pathology during Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 188(9):1137-1146.
- Grigoriadis G, Zhan Y, Grumont RJ, Metcalf D, Handman E, Cheers C & Gerondakis S (1996) The Rel subunit of NF-kappaB-like transcription factors is a positive and negative regulator of macrophage gene expression: distinct roles for Rel in different macrophage populations. *The EMBO journal* 15(24):7099-7107.
- Gu H, Botelho RJ, Yu M, Grinstein S & Neel BG (2003) Critical role for scaffolding adapter Gab2 in Fc gamma R-mediated phagocytosis. *The Journal of cell biology* 161(6):1151-1161.
- Guignard F, Mauel J & Markert M (1995) Identification and characterization of a novel human neutrophil protein related to the S100 family. *Biochem J* 309 (Pt 2):395-401.
- Guignard F, Mauel J & Markert M (1996) Phosphorylation of myeloid-related proteins MRP-14 and MRP-8 during human neutrophil activation. *Eur J Biochem* 241(1):265-271.
- Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceicao-Silva F & Saraiva EM (2009) Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(16):6748-6753.
- Guma M, Ronacher L, Liu-Bryan R, Takai S, Karin M & Corr M (2009) Caspase 1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation. *Arthritis and rheumatism* 60(12):3642-3650.
- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS & Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466(7308):835-840.
- Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG & Baldwin AS, Jr. (1999) NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Molecular and cellular biology* 19(8):5785-5799.

- Hamada F, Aoki M, Akiyama T & Toyoshima K (1993) Association of immunoglobulin G Fc receptor II with Src-like protein-tyrosine kinase Fgr in neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(13):6305-6309.
- Hammer GE, Turer EE, Taylor KE, Fang CJ, Advincula R, Oshima S, Barrera J, Huang EJ, Hou B, Malynn BA, Reizis B, DeFranco A, Criswell LA, Nakamura MC & Ma A (2011) Expression of A20 by dendritic cells preserves immune homeostasis and prevents colitis and spondyloarthritis. *Nat Immunol* 12(12):1184-1193.
- Hammer HB, Odegard S, Fagerhol MK, Landewe R, van der Heijde D, Uhlig T, Mowinckel P & Kvien TK (2007) Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 66(8):1093-1097.
- Han H, Stessin A, Roberts J, Hess K, Gautam N, Kamenetsky M, Lou O, Hyde E, Nathan N, Muller WA, Buck J, Levin LR & Nathan C (2005) Calcium-sensing soluble adenylyl cyclase mediates TNF signal transduction in human neutrophils. *The Journal of experimental medicine* 202(3):353-361.
- Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A & Nagata S (2002) Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417(6885):182-187.
- Harrison CA, Raftery MJ, Walsh J, Alewood P, Iismaa SE, Thliveris S & Geczy CL (1999) Oxidation regulates the inflammatory properties of the murine S100 protein S100A8. *The Journal of biological chemistry* 274(13):8561-8569.
- Hart SP, Rossi AG, Haslett C & Dransfield I (2012) Characterization of the effects of cross-linking of macrophage CD44 associated with increased phagocytosis of apoptotic PMN. *PloS one* 7(3):e33142.
- Hashemi FB, Mollenhauer J, Madsen LD, Sha BE, Nacken W, Moyer MB, Sorg C & Spear GT (2001) Myeloid-related protein (MRP)-8 from cervico-vaginal secretions activates HIV replication. *AIDS* 15(4):441-449.
- Hatano Y, Kasama T, Iwabuchi H, Hanaoka R, Takeuchi HT, Jing L, Mori Y, Kobayashi K, Negishi M, Ide H & Adachi M (1999) Macrophage inflammatory protein 1 alpha expression by synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 58(5):297-302.

- Hayden MS & Ghosh S (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132(3):344-362.
- Hayden MS & Ghosh S (2012) NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development* 26(3):203-234.
- Hayward C, Glass S, van Heyningen V & Brock DJ (1987) Serum concentrations of a granulocyte-derived calcium-binding protein in cystic fibrosis patients and heterozygotes. *Clin Chim Acta* 170(1):45-55.
- Hench PS, Kendall EC & et al. (1949) The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 24(8):181-197.
- Herlaar E & Brown Z (1999) p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today* 5(10):439-447.
- Hermani A, De Servi B, Medunjanin S, Tessier PA & Mayer D (2006) S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells. *Experimental cell research* 312(2):184-197.
- Herndon BL, Abbasi S, Bennett D & Bamberger D (2003) Calcium-binding proteins MRP 8 and 14 in a Staphylococcus aureus infection model: role of therapy, inflammation, and infection persistence. *J Lab Clin Med* 141(2):110-120.
- Herre J, Gordon S & Brown GD (2004a) Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. *Mol Immunol* 40(12):869-876.
- Herre J, Willment JA, Gordon S & Brown GD (2004b) The role of Dectin-1 in antifungal immunity. *Crit Rev Immunol* 24(3):193-203.
- Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S & Zychlinsky A (1999) The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(5):2396-2401.

- Hessian PA, Edgeworth J & Hogg N (1993) MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *Journal of leukocyte biology* 53(2):197-204.
- Heyworth PG, Bohl BP, Bokoch GM & Curnutte JT (1994) Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558. *The Journal of biological chemistry* 269(49):30749-30752.
- Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S, Yamamoto M, Motoyama A, Hosoi J, Shimokata T, Ito T, Tsuboi R & Huh NH (2013) S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cancer research* 73(1):172-183.
- Higgs GA, Salmon JA, Henderson B & Vane JR (1987) Pharmacokinetics of aspirin and salicylate in relation to inhibition of arachidonate cyclooxygenase and antiinflammatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(5):1417-1420.
- Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H & Maru Y (2006) Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nature cell biology* 8(12):1369-U1331.
- Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, Miyake K, Shibuya M, Akira S, Aburatani H & Maru Y (2008) The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nature cell biology* 10(11):1349-1355.
- Hirono K, Foell D, Xing Y, Miyagawa-Tomita S, Ye F, Ahlmann M, Vogl T, Futatani T, Rui C, Yu X, Watanabe K, Wanatabe S, Tsubata S, Uese K, Hashimoto I, Ichida F, Nakazawa M, Roth J & Miyawaki T (2006) Expression of myeloid-related protein-8 and -14 in patients with acute Kawasaki disease. *Journal of the American College of Cardiology* 48(6):1257-1264.
- Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, Brown GD & Fitzgerald KA (2009) An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell host & microbe* 5(5):487-497.
- Hodge-Dufour J, Marino MW, Horton MR, Jungbluth A, Burdick MD, Strieter RM, Noble PW, Hunter CA & Pure E (1998) Inhibition of interferon gamma induced interleukin 12 production: a potential mechanism for the anti-inflammatory

activities of tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(23):13806-13811.

Hoesel B & Schmid JA (2013) The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 12:86.

Hoffman HM, Rosengren S, Boyle DL, Cho JY, Nayar J, Mueller JL, Anderson JP, Wanderer AA & Firestein GS (2004) Prevention of cold-associated acute inflammation in familial cold autoinflammatory syndrome by interleukin-1 receptor antagonist. *Lancet* 364(9447):1779-1785.

Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D & Schmidt AM (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97(7):889-901.

Holland SM (2010) Chronic granulomatous disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 38(1):3-10.

Holland SM & Gallin JI (1998) Evaluation of the patient with recurrent bacterial infections. *Annu Rev Med* 49:185-199.

Hollingsworth JW, Siegel ER & Creasey WA (1967) Granulocyte survival in synovial exudate of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory joint diseases. *Yale J Biol Med* 39(5):289-296.

Holzinger D, Lohse P, Faßl S, Austermann J, Vogl T, de Jager W, Holland S, Gattorno M, Rodriguez-Gallego C, Arostegui J, Fessatou S, Isidor B, Ito K, Eppe HJ, Bernstein J, Jeng M, Lionetti G, Ong P, Hinze C, Sampson B, Sunderkoetter C, Foell D, Chae J, Ombrello A, Brady J, Aksentijevich I & Roth J (2013a) PW02-018 - Impact of PSTPIP1 mutations on clinical phenotype. *Pediatric Rheumatology* 11(Suppl 1):A158.

Holzinger D, Lohse P, Faßl S, Austermann J, Vogl T, de Jager W, Holland S, Gattorno M, Rodriguez-Gallego C, Arostegui J, Fessatou S, Isidor B, Ito K, Eppe HJ, Bernstein J, Jeng M, Lionetti G, Ong P, Hinze C, Sampson B, Sunderkoetter C, Foell D, Chae J, Ombrello A, Brady J, Aksentijevich I & Roth J (2013b) PW02-018 - Impact of PSTPIP1 mutations on clinical phenotype. *Pediatric Rheumatology* 11(Suppl 1):A158.

- Hoppe AD & Swanson JA (2004) Cdc42, Rac1, and Rac2 display distinct patterns of activation during phagocytosis. *Molecular biology of the cell* 15(8):3509-3519.
- Hoppmann S, Steinbach J & Pietzsch J (2010) Scavenger receptors are associated with cellular interactions of S100A12 in vitro and in vivo. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42(5):651-661.
- Hsieh HL, Schafer BW, Sasaki N & Heizmann CW (2003) Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays. *Biochemical and biophysical research communications* 307(2):375-381.
- Hsu K, Champaiboon C, Guenther BD, Sorenson BS, Khammanivong A, Ross KF, Geczy CL & Herzberg MC (2009) Anti-Infective Protective Properties of S100 Calgranulins. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 8(4):290-305.
- Hsu K, Passey RJ, Endoh Y, Rahimi F, Youssef P, Yen T & Geczy CL (2005) Regulation of S100A8 by glucocorticoids. *J Immunol* 174(4):2318-2326.
- Huang B, Yang XD, Lamb A & Chen LF (2010) Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway. *Cellular signalling* 22(9):1282-1290.
- Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grunert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H & Wirth T (2004) NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *The Journal of clinical investigation* 114(4):569-581.
- Hummerich L, Muller R, Hess J, Kokocinski F, Hahn M, Furstenberger G, Mauch C, Lichter P & Angel P (2006) Identification of novel tumour-associated genes differentially expressed in the process of squamous cell cancer development. *Oncogene* 25(1):111-121.
- Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N & Jones SA (2001) Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 14(6):705-714.
- Ichikawa M, Williams R, Wang L, Vogl T & Srikrishna G (2011) S100A8/A9 activate key genes and pathways in colon tumor progression. *Mol Cancer Res* 9(2):133-148.

- InVivogen (2013) *Inflammasomes Review.*, <http://www.invivogen.com/review-inflammasome>
- Ito Y, Arai K, Ryushi, Nozawa, Yoshida H, Tomoda C, Uruno T, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Kuma K, Kakudo K & Miyauchi A (2005) S100A9 expression is significantly linked to dedifferentiation of thyroid carcinoma. *Pathol Res Pract* 201(8-9):551-556.
- Ivanenkov YA, Balakin KV & Lavrovsky Y (2011) Small molecule inhibitors of NF- κ B and JAK/STAT signal transduction pathways as promising anti-inflammatory therapeutics. *Mini Rev Med Chem* 11(1):55-78.
- Jamaluddin M, Wang S, Boldogh I, Tian B & Brasier AR (2007) TNF- α -induced NF- κ B/RelA Ser(276) phosphorylation and enhanceosome formation is mediated by an ROS-dependent PKAc pathway. *Cellular signalling* 19(7):1419-1433.
- Janssen R, Verhard E, Lankester A, Ten Cate R & van Dissel JT (2004) Enhanced interleukin-1 β and interleukin-18 release in a patient with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome. *Arthritis and rheumatism* 50(10):3329-3333.
- Jin FY, Nathan C, Radzioch D & Ding A (1997) Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell* 88(3):417-426.
- Johnson SA, Pleiman CM, Pao L, Schneringer J, Hippen K & Cambier JC (1995) Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J Immunol* 155(10):4596-4603.
- Johnston JB, Barrett JW, Nazarian SH, Goodwin M, Ricciuto D, Wang G & McFadden G (2005) A poxvirus-encoded pyrin domain protein interacts with ASC-1 to inhibit host inflammatory and apoptotic responses to infection. *Immunity* 23(6):587-598.
- Juffermans NP, Florquin S, Camoglio L, Verbon A, Kolk AH, Speelman P, van Deventer SJ & van Der Poll T (2000) Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 182(3):902-908.
- Kaiser T, Langhorst J, Wittkowski H, Becker K, Friedrich AW, Rueffer A, Dobos GJ, Roth J & Foell D (2007) Faecal S100A12 as a non-invasive marker distinguishing

- inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. *Gut* 56(12):1706-1713.
- Kallenberg CG (2010) Pathophysiology of ANCA-associated small vessel vasculitis. *Curr Rheumatol Rep* 12(6):399-405.
- Kallinich T, Wittkowski H, Keitzer R, Roth J & Foell D (2010) Neutrophil-derived S100A12 as novel biomarker of inflammation in familial Mediterranean fever. *Annals of the rheumatic diseases* 69(4):677-682.
- Kamohara H, Matsuyama W, Shimozaoto O, Abe K, Galligan C, Hashimoto S, Matsushima K & Yoshimura T (2004) Regulation of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptor expression in human neutrophils. *Immunology* 111(2):186-194.
- Kane D, Roth J, Frosch M, Vogl T, Bresnihan B & FitzGerald O (2003) Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis and rheumatism* 48(6):1676-1685.
- Kanneganti TD, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Whitfield J, Franchi L, Taraporewala ZF, Miller D, Patton JT, Inohara N & Nunez G (2006a) Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *The Journal of biological chemistry* 281(48):36560-36568.
- Kanneganti TD, Ozoren N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, Whitfield J, Barchet W, Colonna M, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Akira S & Nunez G (2006b) Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 440(7081):233-236.
- Kasibhatla S, Genestier L & Green DR (1999) Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *The Journal of biological chemistry* 274(2):987-992.
- Keller M, Ruegg A, Werner S & Beer HD (2008) Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132(5):818-831.
- Kerkhoff C, Eue I & Sorg C (1999a) The regulatory role of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9) in the transendothelial migration of human leukocytes. *Pathobiology* 67(5-6):230-232.

- Kerkhoff C, Klempt M, Kaefer V & Sorg C (1999b) The two calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, are involved in the metabolism of arachidonic acid in human neutrophils. *The Journal of biological chemistry* 274(46):32672-32679.
- Kerkhoff C, Nacken W, Benedyk M, Dagher MC, Sopalla C & Doussiere J (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, Sorg C, Tandon NN & 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(1):241-248.
- Kerr JF, Wyllie AH & Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26(4):239-257.
- Kessel C, Holzinger D & Foell D (2013) Phagocyte-derived S100 proteins in autoinflammation: putative role in pathogenesis and usefulness as biomarkers. *Clin Immunol* 147(3):229-241.
- Khoshnan A, Tindell C, Laux I, Bae D, Bennett B & Nel AE (2000) The NF-kappa B cascade is important in Bcl-xL expression and for the anti-apoptotic effects of the CD28 receptor in primary human CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 165(4):1743-1754.
- Kido J, Hayashi N, Kataoka M & Nagata T (2005) Calprotectin expression in human monocytes: induction by porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1beta. *J Periodontol* 76(3):437-442.
- Kido J, Kido R, Suryono, Kataoka M, Fagerhol MK & Nagata T (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.
- Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, Grinstein S & Pawson T (1998) The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc gamma receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Molecular and cellular biology* 18(7):4209-4220.

- Kiernan R, Bres V, Ng RW, Coudart MP, El Messaoudi S, Sardet C, Jin DY, Emiliani S & Benkirane M (2003) Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *The Journal of biological chemistry* 278(4):2758-2766.
- Kim HJ, Kang HJ, Lee H, Lee ST, Yu MH, Kim H & Lee C (2009) Identification of S100A8 and S100A9 as serological markers for colorectal cancer. *Journal of proteome research* 8(3):1368-1379.
- Kim JH, Oh SH, Kim EJ, Park SJ, Hong SP, Cheon JH, Kim TI & Kim WH (2012) The role of myofibroblasts in upregulation of S100A8 and S100A9 and the differentiation of myeloid cells in the colorectal cancer microenvironment. *Biochemical and biophysical research communications* 423(1):60-66.
- Kitano M, Nakaya M, Nakamura T, Nagata S & Matsuda M (2008) Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation. *Nature* 453(7192):241-245.
- Klebanoff SJ (1999) Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians* 111(5):383-389.
- Klein JB, Rane MJ, Scherzer JA, Coxon PY, Kettritz R, Mathiesen JM, Buridi A & McLeish KR (2000) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J Immunol* 164(8):4286-4291.
- Kligman D & Hilt DC (1988) The S100 protein family. *Trends Biochem Sci* 13(11):437-443.
- Knapp S, Leemans JC, Florquin S, Branger J, Maris NA, Pater J, van Rooijen N & van der Poll T (2003) Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine* 167(2):171-179.
- Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT & Bokoch GM (1991) Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* 254(5037):1512-1515.
- Kobayashi N, Karisola P, Pena-Cruz V, Dorfman DM, Jinushi M, Umetsu SE, Butte MJ, Nagumo H, Chernova I, Zhu B, Sharpe AH, Ito S, Dranoff G, Kaplan GG, Casasnovas JM, Umetsu DT, Dekruyff RH & Freeman GJ (2007) TIM-1 and TIM-

4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity* 27(6):927-940.

Kolaczowska E, Grzybek W, van Rooijen N, Piccard H, Plytycz B, Arnold B & Opdenakker G (2009) Neutrophil elastase activity compensates for a genetic lack of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in leukocyte infiltration in a model of experimental peritonitis. *Journal of leukocyte biology* 85(3):374-381.

Kolaczowska E & Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 13(3):159-175.

Kolly L, Busso N, von Scheven-Gete A, Bagnoud N, Moix I, Holzinger D, Simon G, Ives A, Guarda G, So A, Morris MA & Hofer M (2013) Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, cervical adenitis syndrome is linked to dysregulated monocyte IL-1 β production. *The Journal of allergy and clinical immunology* 131(6):1635-1643.

Kool M, van Loo G, Waelput W, De Prijck S, Muskens F, Sze M, van Praet J, Branco-Madeira F, Janssens S, Reizis B, Elewaut D, Beyaert R, Hammad H & Lambrecht BN (2011) The ubiquitin-editing protein A20 prevents dendritic cell activation, recognition of apoptotic cells, and systemic autoimmunity. *Immunity* 35(1):82-96.

Korndorfer IP, Brueckner F & Skerra A (2007) The crystal structure of the human (S100A8/S100A9)₂ heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting alpha-helices can determine specific association of two EF-hand proteins. *Journal of molecular biology* 370(5):887-898.

Krinsky NI (1974) Singlet excited oxygen as a mediator of the antibacterial action of leukocytes. *Science* 186(4161):363-365.

Kruijthof E, De Rycke L, Vandooren B, De Keyser F, FitzGerald O, McInnes I, Tak PP, Bresnihan B, Veys EM & Baeten D (2006) Identification of synovial biomarkers of response to experimental treatment in early-phase clinical trials in spondylarthritis. *Arthritis and rheumatism* 54(6):1795-1804.

Krump E, Sanghera JS, Pelech SL, 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. *The Journal of biological chemistry* 272(2):937-944.

- Krysko DV, D'Herde K & Vandenabeele P (2006) Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis* 11(10):1709-1726.
- Kunkel EJ & Ley K (1996) Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circ Res* 79(6):1196-1204.
- Kunkel SL, Lukacs N & Strieter RM (1995) Expression and biology of neutrophil and endothelial cell-derived chemokines. *Semin Cell Biol* 6(6):327-336.
- Kurosaki T, Johnson SA, Pao L, Sada K, Yamamura H & Cambier JC (1995) Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling. *The Journal of experimental medicine* 182(6):1815-1823.
- Kwon CH, Moon HJ, Park HJ, Choi JH & Park do Y (2013) S100A8 and S100A9 promotes invasion and migration through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent NF-kappaB activation in gastric cancer cells. *Molecules and cells* 35(3):226-234.
- La Rosa FA, Pierce JW & Sonenshein GE (1994) Differential regulation of the c-myc oncogene promoter by the NF-kappa B rel family of transcription factors. *Molecular and cellular biology* 14(2):1039-1044.
- Labbe K & Saleh M (2008) Cell death in the host response to infection. *Cell death and differentiation* 15(9):1339-1349.
- Labow MA, Norton CR, Rumberger JM, Lombard-Gillooly KM, Shuster DJ, Hubbard J, Bertko R, Knaack PA, Terry RW, Harbison ML & et al. (1994) Characterization of E-selectin-deficient mice: demonstration of overlapping function of the endothelial selectins. *Immunity* 1(8):709-720.
- Lachmann HJ, Lowe P, Felix SD, Rordorf C, Leslie K, Madhoo S, Wittkowski H, Bek S, Hartmann N, Bosset S, Hawkins PN & Jung T (2009) In vivo regulation of interleukin 1beta in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. *The Journal of experimental medicine* 206(5):1029-1036.
- Lackmann M, Rajasekariah P, Iismaa SE, Jones G, Cornish CJ, Hu S, Simpson RJ, Moritz RL & Geczy CL (1993) Identification of a chemotactic domain of the pro-inflammatory S100 protein CP-10. *J Immunol* 150(7):2981-2991.

- Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, Meller S, Chamilos G, Sebasigari R, Ricciari V, Bassett R, Amuro H, Fukuhara S, Ito T, Liu YJ & Gilliet M (2011) Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 3(73):73ra19.
- Lara-Tejero M, Sutterwala FS, Ogura Y, Grant EP, Bertin J, Coyle AJ, Flavell RA & Galan JE (2006) Role of the caspase-1 inflammasome in *Salmonella typhimurium* pathogenesis. *The Journal of experimental medicine* 203(6):1407-1412.
- Laudanna C, Constantin G, Baron P, Scarpini E, Scarlato G, Cabrini G, Dehecchi C, Rossi F, Cassatella MA & Berton G (1994) Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule. *The Journal of biological chemistry* 269(6):4021-4026.
- Lawrance IC, Fiocchi C & Chakravarti S (2001) Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet* 10(5):445-456.
- Ley K, Bullard DC, Arbones ML, Bosse R, Vestweber D, Tedder TF & Beaudet AL (1995) Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *The Journal of experimental medicine* 181(2):669-675.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI & Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology* 7(9):678-689.
- Li L, Huang L, Vergis AL, Ye H, Bajwa A, Narayan V, Strieter RM, Rosin DL & Okusa MD (2010) IL-17 produced by neutrophils regulates IFN- γ -mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *The Journal of clinical investigation* 120(1):331-342.
- Liao H, Wu J, Kuhn E, Chin W, Chang B, Jones MD, O'Neil S, Clauser KR, Karl J, Hasler F, Roubenoff R, Zolg W & Guild BC (2004) Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 50(12):3792-3803.

- Lim SY, Raftery MJ & Geczy CL (2011) Oxidative modifications of DAMPs suppress inflammation: the case for S100A8 and S100A9. *Antioxidants & redox signaling* 15(8):2235-2248.
- Lim SY, Raftery MJ, Goyette J & Geczy CL (2010) S-glutathionylation regulates inflammatory activities of S100A9. *The Journal of biological chemistry* 285(19):14377-14388.
- Lim SY, Raftery MJ, Goyette J, Hsu K & Geczy CL (2009) Oxidative modifications of S100 proteins: functional regulation by redox. *Journal of leukocyte biology* 86(3):577-587.
- Lin XY, Choi MS & Porter AG (2000) Expression analysis of the human caspase-1 subfamily reveals specific regulation of the CASP5 gene by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *The Journal of biological chemistry* 275(51):39920-39926.
- Lin Y-C, Huang D-Y, Chu C-L, Lin Y-L & Lin W-W (2013) The Tyrosine Kinase Syk Differentially Regulates Toll-like Receptor Signaling Downstream of the Adaptor Molecules TRAF6 and TRAF3. *Sci. Signal.* 6(289):ra71-.
- Linden A (2003) Rationale for targeting interleukin-17 in the lungs. *Curr Opin Investig Drugs* 4(11):1304-1312.
- Ling L, Cao Z & Goeddel DV (1998) NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(7):3792-3797.
- Lo EH (2009) T time in the brain. *Nat Med* 15(8):844-846.
- Lo YC, Lin SC, Rospigliosi CC, Conze DB, Wu CJ, Ashwell JD, Eliezer D & Wu H (2009) Structural basis for recognition of diubiquitins by NEMO. *Molecular cell* 33(5):602-615.
- Loffler B, Hussain M, Grundmeier M, Bruck M, Holzinger D, Varga G, Roth J, Kahl BC, Proctor RA & Peters G (2010) Staphylococcus aureus panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS pathogens* 6(1):e1000715.

- Lominadze G, Rane MJ, Merchant M, Cai J, Ward RA & McLeish KR (2005) Myeloid-related protein-14 is a p38 MAPK substrate in human neutrophils. *J Immunol* 174(11):7257-7267.
- Lood C, Stenstrom M, Tyden H, Gullstrand B, Kallberg E, Leanderson T, Truedsson L, Sturfelt G, Ivars F & Bengtsson AA (2011) Protein synthesis of the pro-inflammatory S100A8/A9 complex in plasmacytoid dendritic cells and cell surface S100A8/A9 on leukocyte subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy* 13(2):R60.
- Lorenz E, Muhlebach MS, Tessier PA, Alexis NE, Duncan Hite R, Seeds MC, Peden DB & Meredith W (2008) Different expression ratio of S100A8/A9 and S100A12 in acute and chronic lung diseases. *Respir Med* 102(4):567-573.
- Lorenzi R, Brickell PM, Katz DR, Kinnon C & Thrasher AJ (2000) Wiskott-Aldrich syndrome protein is necessary for efficient IgG-mediated phagocytosis. *Blood* 95(9):2943-2946.
- Loser K, Vogl T, Voskort M, Lueken A, Kupas V, Nacken W, Klenner L, Kuhn A, Foell D, Sorokin L, Luger TA, Roth J & Beissert S (2010) The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8(+) T cells. *Nat Med* nm.2150 [pii]
- 10.1038/nm.2150.
- Lugering N, Kucharzik T, Lugering A, Winde G, Sorg C, Domschke W & Stoll R (1997) Importance of combined treatment with IL-10 and IL-4, but not IL-13, for inhibition of monocyte release of the Ca(2+)-binding protein MRP8/14. *Immunology* 91(1):130-134.
- Lugering N, Stoll R, Kucharzik T, Schmid KW, Rohlmann 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(5):406-414.
- Madland TM, Hordvik M, Haga HJ, Jonsson R & Brun JG (2002) Leukocyte protein calprotectin and outcome in rheumatoid arthritis. A longitudinal study. *Scand J Rheumatol* 31(6):351-354.
- Makam M, Diaz D, Laval J, Gernez Y, Conrad CK, Dunn CE, Davies ZA, Moss RB, Herzenberg LA, Herzenberg LA & Tirouvanziam R (2009) Activation of critical,

- host-induced, metabolic and stress pathways marks neutrophil entry into cystic fibrosis lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(14):5779-5783.
- Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV & Wallach D (1997) MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385(6616):540-544.
- Mansfield PJ, Shayman JA & Boxer LA (2000) Regulation of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis by myosin light chain kinase after activation of mitogen-activated protein kinase. *Blood* 95(7):2407-2412.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A & Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454(7203):436-444.
- Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S & Dixit VM (2004) Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430(6996):213-218.
- Mariathasan S, Weiss DS, Dixit VM & Monack DM (2005) Innate immunity against *Francisella tularensis* is dependent on the ASC/caspase-1 axis. *The Journal of experimental medicine* 202(8):1043-1049.
- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM & Dixit VM (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440(7081):228-232.
- Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ & Rankin SM (2003) Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity* 19(4):583-593.
- Martinon F, Burns K & Tschopp J (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell* 10(2):417-426.
- Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A & Tschopp J (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440(7081):237-241.

- Master SS, Rampini SK, Davis AS, Keller C, Ehlers S, Springer B, Timmins GS, Sander P & Deretic V (2008) Mycobacterium tuberculosis prevents inflammasome activation. *Cell host & microbe* 3(4):224-232.
- Matsunaga H & Ueda H (2006) Evidence for serum-deprivation-induced co-release of FGF-1 and S100A13 from astrocytes. *Neurochemistry international* 49(3):294-303.
- May RC, Caron E, Hall A & Machesky LM (2000) Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nature cell biology* 2(4):246-248.
- Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO & Wagner DD (1993) Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 74(3):541-554.
- McCormick MM, Rahimi F, Bobryshev YV, Gaus K, Zreiqat H, Cai H, Lord RS & Geczy CL (2005) S100A8 and S100A9 in human arterial wall. Implications for atherogenesis. *The Journal of biological chemistry* 280(50):41521-41529.
- McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, Beck PL, Muruve DA & Kubersky P (2010) Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 330(6002):362-366.
- McKiernan E, McDermott EW, Evoy D, Crown J & Duffy MJ (2011) The role of S100 genes in breast cancer progression. *Tumour Biol* 32(3):441-450.
- Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203):428-435.
- Medzhitov R & Janeway CA, Jr. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91(3):295-298.
- Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI & Aderem A (2006) Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1β via Ipaf. *Nat Immunol* 7(6):569-575.
- Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, Warren SE, Wewers MD & Aderem A (2010) Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol* 11(12):1136-1142.

- Mirmohammadsadegh A, Tschakarjan E, Ljoljic A, Bohner K, Michel G, Ruzicka T, Goos M & Hengge UR (2000) Calgranulin C is overexpressed in lesional psoriasis. *J Invest Dermatol* 114(6):1207-1208.
- Miyanishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T & Nagata S (2007) Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 450(7168):435-439.
- Mocsai A, Jakus Z, Vantus T, Berton G, Lowell CA & 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(8):4321-4331.
- Mosser DM & Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8(12):958-969.
- Moulding DA, Akgul C, Derouet M, White MR & Edwards SW (2001) BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *Journal of leukocyte biology* 70(5):783-792.
- Muller F, Froland SS, Aukrust P & Fagerhol MK (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, Haug U, Rothenbacher D, Stegmaier C & Brenner H (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.
- Murphy BM, O'Neill AJ, Adrain C, Watson RW & Martin SJ (2003) The apoptosome pathway to caspase activation in primary human neutrophils exhibits dramatically reduced requirements for cytochrome C. *The Journal of experimental medicine* 197(5):625-632.
- Murray J, Barbara JA, Dunkley SA, Lopez AF, Van Ostade X, Condliffe AM, Dransfield I, Haslett C & Chilvers ER (1997) Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood* 90(7):2772-2783.

- Murray SE, Polesso F, Rowe AM, Basak S, Koguchi Y, Toren KG, Hoffmann A & Parker DC (2011) NF-kappaB-inducing kinase plays an essential T cell-intrinsic role in graft-versus-host disease and lethal autoimmunity in mice. *The Journal of clinical investigation* 121(12):4775-4786.
- Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Imanishi M, Tsuno NH, Matsushima K, Yamamoto K, Morita Y & Hirai K (2002) Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 71(4):711-717.
- Nakano H, Shindo M, Sakon S, Nishinaka S, Mihara M, Yagita H & Okumura K (1998) Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(7):3537-3542.
- Nakatani Y, Yamazaki M, Chazin WJ & Yui S (2005) Regulation of S100A8/A9 (calprotectin) binding to tumor cells by zinc ion and its implication for apoptosis-inducing activity. *Mediators of inflammation* 2005(5):280-292.
- Nakhaei P, Genin P, Civas A & Hiscott J (2009) RIG-I-like receptors: sensing and responding to RNA virus infection. *Semin Immunol* 21(4):215-222.
- Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420(6917):846-852.
- Nathan C (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews. Immunology* 6(3):173-182.
- Nathan C & Ding A (2010) Nonresolving inflammation. *Cell* 140(6):871-882.
- Nauseef WM (2007) How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological reviews* 219:88-102.
- Nemeth J, Stein I, Haag D, Riehl A, Longerich T, Horwitz E, Breuhahn K, Gebhardt C, Schirmacher P, Hahn M, Ben-Neriah Y, Pikarsky E, Angel P & Hess J (2009) S100A8 and S100A9 are novel nuclear factor kappa B target genes during malignant progression of murine and human liver carcinogenesis. *Hepatology* 50(4):1251-1262.

- Neumann M, Fries H, Scheicher C, Keikavoussi P, Kolb-Maurer A, Brocker E, Serfling E & Kampgen E (2000) Differential expression of Rel/NF-kappaB and octamer factors is a hallmark of the generation and maturation of dendritic cells. *Blood* 95(1):277-285.
- Newton RA & Hogg N (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, Andersson R, Patarroyo M & Andersson T (1991) Calcium signaling capacity of the CD11b/CD18 integrin on human neutrophils. *Experimental cell research* 195(2):504-508.
- Ng LG, Qin JS, Roediger B, Wang Y, Jain R, Cavanagh LL, Smith AL, Jones CA, de Veer M, Grimbaldston MA, Meeusen EN & Weninger W (2011) Visualizing the neutrophil response to sterile tissue injury in mouse dermis reveals a three-phase cascade of events. *J Invest Dermatol* 131(10):2058-2068.
- Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z & Matsumoto K (1999) The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398(6724):252-256.
- Noguchi E, Homma Y, Kang X, Netea MG & Ma X (2009) A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. *Nat Immunol* 10(5):471-479.
- Nunoi H, Rotrosen D, Gallin JI & Malech HL (1988) Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. *Science* 242(4883):1298-1301.
- O'Neill LA & Bowie AG (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* 7(5):353-364.
- O'Neill LA & Bowie AG (2010) Sensing and signaling in antiviral innate immunity. *Curr Biol* 20(7):R328-333.
- O'Neill LA, Sheedy FJ & McCoy CE (2011) MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* 11(3):163-175.

- Ocuin LM, Bamboat ZM, Balachandran VP, Cavnar MJ, Obaid H, Plitas G & DeMatteo RP (2011) Neutrophil IL-10 suppresses peritoneal inflammatory monocytes during polymicrobial sepsis. *Journal of leukocyte biology* 89(3):423-432.
- Odink K, Cerletti N, Bruggen J, Clerc RG, Tarcsay L, Zwadlo G, Gerhards G, Schlegel R & Sorg C (1987) Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature* 330(6143):80-82.
- Olazabal IM, Caron E, May RC, Schilling K, Knecht DA & Machesky LM (2002) Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcgammaR, phagocytosis. *Curr Biol* 12(16):1413-1418.
- Ott HW, Lindner H, Sarg B, Mueller-Holzner E, Abendstein B, Bergant A, Fessler S, Schwaerzler P, Zeimet A, Marth C & Illmensee K (2003) Calgranulins in cystic fluid and serum from patients with ovarian carcinomas. *Cancer research* 63(21):7507-7514.
- Pacher P, Beckman JS & Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87(1):315-424.
- Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18(49):6853-6866.
- Pai S & Thomas R (2008) Immune deficiency or hyperactivity-Nf-kappab illuminates autoimmunity. *J Autoimmun* 31(3):245-251.
- Papayannopoulos V & Zychlinsky A (2009) NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in immunology* 30(11):513-521.
- Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, Sohn JW, Yamada S, Maruyama I, Banerjee A, Ishizaka A & Abraham E (2006) High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *American journal of physiology. Cell physiology* 290(3):C917-924.
- Park JW, Ma M, Ruedi JM, Smith RM & Babior BM (1992) The cytosolic components of the respiratory burst oxidase exist as a M(r) approximately 240,000 complex that acquires a membrane-binding site during activation of the oxidase in a cell-free system. *The Journal of biological chemistry* 267(24):17327-17332.

- Park SY, Jung MY, Kim HJ, Lee SJ, Kim SY, Lee BH, Kwon TH, Park RW & Kim IS (2008) Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell death and differentiation* 15(1):192-201.
- Parsons SA, Sharma R, Roccamatysi DL, Zhang H, Petri B, Kubes P, Colarusso P & Patel KD (2012) Endothelial paxillin and focal adhesion kinase (FAK) play a critical role in neutrophil transmigration. *European journal of immunology* 42(2):436-446.
- Peiser L, Gough PJ, Kodama T & Gordon S (2000) Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of Escherichia coli: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. *Infection and immunity* 68(4):1953-1963.
- Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, Cosmi L, Lunardi C, Annunziato F, Romagnani S & Cassatella MA (2010) Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 115(2):335-343.
- Peng B, Ling J, Lee AJ, Wang Z, Chang Z, Jin W, Kang Y, Zhang R, Shim D, Wang H, Fleming JB, Zheng H, Sun SC & Chiao PJ (2010) Defective feedback regulation of NF-kappaB underlies Sjogren's syndrome in mice with mutated kappaB enhancers of the IkappaBalpha promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(34):15193-15198.
- Peng Q, Li K, Sacks SH & Zhou W (2009) The role of anaphylatoxins C3a and C5a in regulating innate and adaptive immune responses. *Inflammation & allergy drug targets* 8(3):236-246.
- Perretti M & D'Acquisto F (2009) Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology* 9(1):62-70.
- Petersson S, Shubbar E, Enerback L & Enerback C (2009) Expression patterns of S100 proteins in melanocytes and melanocytic lesions. *Melanoma Res* 19(4):215-225.
- Petri B, Phillipson M & Kubes P (2008) The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol* 180(10):6439-6446.
- Phillipson M, Kaur J, Colarusso P, Ballantyne CM & Kubes P (2008) Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration. *PloS one* 3(2):e1649.

- Phillipson M & Kubes P (2011) The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* 17(11):1381-1390.
- Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K & Koenderman L (2010) In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116(4):625-627.
- Pitt A, Mayorga LS, Stahl PD & Schwartz AL (1992) Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *The Journal of clinical investigation* 90(5):1978-1983.
- Postler E, Lehr A, Schluesener H & Meyermann R (1997) Expression of the S-100 proteins MRP-8 and -14 in ischemic brain lesions. *Glia* 19(1):27-34.
- Quinn MT, Evans T, Loetterle LR, Jesaitis AJ & Bokoch GM (1993) Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *The Journal of biological chemistry* 268(28):20983-20987.
- Quinn MT, Parkos CA & Jesaitis AJ (1989) The lateral organization of components of the membrane skeleton and superoxide generation in the plasma membrane of stimulated human neutrophils. *Biochimica et biophysica acta* 987(1):83-94.
- Raad H, Paclet MH, Boussetta T, Kroviarski Y, Morel F, Quinn MT, Gougerot-Pocidalo MA, Dang PM & El-Benna J (2009) Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J* 23(4):1011-1022.
- Radhakrishnan SK & Kamalakaran S (2006) Pro-apoptotic role of NF-kappaB: implications for cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta* 1766(1):53-62.
- Rafii S & Lyden D (2006) S100 chemokines mediate bookmarking of premetastatic niches. *Nature cell biology* 8(12):1321-1323.
- Raftery MJ, Yang Z, Valenzuela SM & Geczy CL (2001) Novel intra- and inter-molecular sulfonamide bonds in S100A8 produced by hypochlorite oxidation. *The Journal of biological chemistry* 276(36):33393-33401.

- Rahighi S, Ikeda F, Kawasaki M, Akutsu M, Suzuki N, Kato R, Kensche T, Uejima T, Bloor S, Komander D, Randow F, Wakatsuki S & Dikic I (2009) Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. *Cell* 136(6):1098-1109.
- Rajakariar R, Yaqoob MM & Gilroy DW (2006) COX-2 in inflammation and resolution. *Mol Interv* 6(4):199-207.
- 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. *The Journal of biological chemistry* 272(14):9496-9502.
- Ramos-Kichik V, Mondragon-Flores R, Mondragon-Castelan M, Gonzalez-Pozos S, Muniz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, Chacon-Salinas R, Estrada-Parra S & Estrada-Garcia I (2009) Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 89(1):29-37.
- Raquil MA, Anceriz N, Rouleau P & Tessier PA (2008) Blockade of antimicrobial proteins S100A8 and S100A9 inhibits phagocyte migration to the alveoli in streptococcal pneumonia. *J Immunol* 180(5):3366-3374.
- Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, Vanaja SK, Monks BG, Ganesan S, Latz E, Hornung V, Vogel SN, Szomolanyi-Tsuda E & Fitzgerald KA (2010) The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 11(5):395-402.
- Raupach B, Peuschel SK, Monack DM & Zychlinsky A (2006) Caspase-1-mediated activation of interleukin-1beta (IL-1beta) and IL-18 contributes to innate immune defenses against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infection and immunity* 74(8):4922-4926.
- Ravasi T, Hsu K, Goyette J, Schroder K, Yang Z, Rahimi F, Miranda LP, Alewood PF, Hume DA & Geczy C (2004) Probing the S100 protein family through genomic and functional analysis. *Genomics* 84(1):10-22.
- Ravichandran KS & Lorenz U (2007) Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nature reviews. Immunology* 7(12):964-974.

- Razani B, Reichardt AD & Cheng G (2011) Non-canonical NF-kappaB signaling activation and regulation: principles and perspectives. *Immunological reviews* 244(1):44-54.
- Regier DS, Greene DG, Sergeant S, Jesaitis AJ & McPhail LC (2000) Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. Correlation of NADPH oxidase activity and p22phox phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 275(37):28406-28412.
- Regier DS, Waite KA, Wallin R & McPhail LC (1999) A phosphatidic acid-activated protein kinase and conventional protein kinase C isoforms phosphorylate p22(phox), an NADPH oxidase component. *The Journal of biological chemistry* 274(51):36601-36608.
- Remijnsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P & Vanden Berghe T (2011a) Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell death and differentiation* 18(4):581-588.
- Remijnsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, Noppen S, Delforge M, Willems J & Vandenabeele P (2011b) Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res* 21(2):290-304.
- Renaud W, Merten M & Figarella C (1994) Increased coexpression of CFTR and S100 calcium binding proteins MRP8 and MRP14 mRNAs in cystic fibrosis human tracheal gland cells. *Biochemical and biophysical research communications* 201(3):1518-1525.
- Rescigno M, Martino M, Sutherland CL, Gold MR & Ricciardi-Castagnoli P (1998) Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *The Journal of experimental medicine* 188(11):2175-2180.
- Rettig L, Haen SP, Bittermann AG, von Boehmer L, Curioni A, Kramer SD, Knuth A & Pascolo S (2010) Particle size and activation threshold: a new dimension of danger signaling. *Blood* 115(22):4533-4541.
- Ricca A, Biroccio A, Trisciuglio D, Cippitelli M, Zupi G & Del Bufalo D (2001) relA over-expression reduces tumorigenicity and activates apoptosis in human cancer cells. *British journal of cancer* 85(12):1914-1921.

- Roberts AW, Kim C, Zhen L, Lowe JB, Kapur R, Petryniak B, Spaetti A, Pollock JD, Borneo JB, Bradford GB, Atkinson SJ, Dinanuer MC & Williams DA (1999) Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. *Immunity* 10(2):183-196.
- Robinson MJ, 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. *The Journal of biological chemistry* 277(5):3658-3665.
- Rock KL & Kono H (2008) The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol* 3:99-126.
- Rodrigue-Gervais IG & Saleh M (2010) Genetics of inflammasome-associated disorders: a lesson in the guiding principals of inflammasome function. *European journal of immunology* 40(3):643-648.
- Rosen H & Klebanoff SJ (1979) Bactericidal activity of a superoxide anion-generating system. A model for the polymorphonuclear leukocyte. *The Journal of experimental medicine* 149(1):27-39.
- Russell DG (2008) Staphylococcus and the healing power of pus. *Cell host & microbe* 3(3):115-116.
- Ryan KM, Ernst MK, Rice NR & Voutsden KH (2000) Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 404(6780):892-897.
- Ryckman C, Gilbert C, de Medicis R, Lussier A, Vandal K & Tessier PA (2004) Monosodium urate monohydrate crystals induce the release of the proinflammatory protein S100A8/A9 from neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 76(2):433-440.
- Ryckman C, McColl SR, Vandal K, de Medicis R, Lussier A, Poubelle PE & Tessier PA (2003a) 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 and rheumatism* 48(8):2310-2320.
- Ryckman C, Robichaud GA, Roy J, Cantin R, Tremblay MJ & Tessier PA (2002) HIV-1 transcription and virus production are both accentuated by the proinflammatory

- myeloid-related proteins in human CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 169(6):3307-3313.
- Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M & Tessier PA (2003b) Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* 170(6):3233-3242.
- Rydell-Tormanen K, Uller L & Erjefalt JS (2006) Neutrophil cannibalism--a back up when the macrophage clearance system is insufficient. *Respir Res* 7:143.
- Saito Y, Saito K, Hirano Y, Ikeya K, Suzuki H, Shishikura K, Manno S, Takakuwa Y, Nakagawa K, Iwasa A, Fujikawa S, Moriya M, Mizoguchi N, Golden BE & Osawa M (2002) Hyperzincemia with systemic inflammation: a heritable disorder of calprotectin metabolism with rheumatic manifestations? *J Pediatr* 140(2):267-269.
- Sampson B, Fagerhol MK, Sunderkotter C, Golden BE, Richmond P, Klein N, Kovar IZ, Beattie JH, Wolska-Kusnierz B, Saito Y & Roth J (2002) Hyperzincaemia and hypercalprotectinaemia: a new disorder of zinc metabolism. *Lancet* 360(9347):1742-1745.
- Savill J, Dransfield I, Gregory C & Haslett C (2002) A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2(12):965-975.
- Savill J & Fadok V (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407(6805):784-788.
- Savill J, Gregory C & Haslett C (2003) Cell biology. Eat me or die. *Science* 302(5650):1516-1517.
- Scapini P, Carletto A, Nardelli B, Calzetti F, Roschke V, Merigo F, Tamassia N, Pieropan S, Biasi D, Sbarbati A, Sozzani S, Bambara L & Cassatella MA (2005) Proinflammatory mediators elicit secretion of the intracellular B-lymphocyte stimulator pool (BLyS) that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases. *Blood* 105(2):830-837.
- Scapini P, Nardelli B, Nadali G, Calzetti F, Pizzolo G, Montecucco C & Cassatella MA (2003) G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLyS. *The Journal of experimental medicine* 197(3):297-302.

Schenten V, Brechard S, Plancon S, Melchior C, Fripiat JP & Tschirhart EJ (2010) iPLA2, a novel determinant in Ca²⁺- and phosphorylation-dependent S100A8/A9 regulated NOX2 activity. *Biochimica et biophysica acta* 1803(7):840-847.

Schierbeek A (Édit) (1962) *Antoni Van Leuwenhoek on the circulation of blood*. Nieuwkoup.

Schmid JA & Birbach A (2008) IkappaB kinase beta (IKKbeta/IKK2/IKBKB)--a key molecule in signaling to the transcription factor NF-kappaB. *Cytokine Growth Factor Rev* 19(2):157-165.

Schmid KW, Luger N, Stoll R, Brinkbaumer P, Winde G, Domschke W, Bocker W & Sorg C (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.

Schonthaler HB, Guinea-Viniegra J, Wculek SK, Ruppen I, Ximenez-Embun P, Guio-Carrion A, Navarro R, Hogg N, Ashman K & Wagner EF (2013) S100A8-S100A9 Protein Complex Mediates Psoriasis by Regulating the Expression of Complement Factor C3. *Immunity* 39(6):1171-1181.

Schroder K & Tschopp J (2010) The inflammasomes. *Cell* 140(6):821-832.

Schwab JM, Chiang N, Arita M & Serhan CN (2007) Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447(7146):869-874.

Scott CC, Dobson W, Botelho RJ, Coady-Osberg N, Chavrier P, Knecht DA, Heath C, Stahl P & Grinstein S (2005) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. *The Journal of cell biology* 169(1):139-149.

Segal AW & Jones OT (1978) Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* 276(5687):515-517.

Semprini S, Capon F, Tacconelli A, Giardina E, Orecchia A, Mingarelli R, Gobello T, Zambruno G, Botta A, Fabrizi G & Novelli G (2002) Evidence for differential S100 gene over-expression in psoriatic patients from genetically heterogeneous pedigrees. *Hum Genet* 111(4-5):310-313.

- Sen R & Baltimore D (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46(5):705-716.
- Serhan CN (2007) Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol* 25:101-137.
- Serhan CN (2010) Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *The American journal of pathology* 177(4):1576-1591.
- Serhan CN & Chiang N (2008a) Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S200-215.
- Serhan CN, Chiang N & Van Dyke TE (2008b) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature reviews. Immunology* 8(5):349-361.
- Serhan CN & Savill J (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 6(12):1191-1197.
- Serhan CN, Ward PA & Gilroy DW (Édit) (2010a) *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press, New York. 473 p.
- Serhan CN, Ward PA & Gilroy DW (Édit) (2010b) *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press, New York. 473 p.
- Serhan CN, Ward PA & Gilroy DW (Édit) (2010c) *Fundamentals of Inflammation*. New York, Vol 4A. 473 p.
- Serhan CN, Yacoubian S & Yang R (2008c) Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol* 3:279-312.
- Sheikh AA, Vimalachandran D, Thompson CC, Jenkins RE, Nedjadi T, Shekouh A, Campbell F, Dodson A, Prime W, Crnogorac-Jurcevic T, Lemoine NR & Costello E (2007) The expression of S100A8 in pancreatic cancer-associated monocytes is associated with the Smad4 status of pancreatic cancer cells. *Proteomics* 7(11):1929-1940.

- Shepherd CE, Goyette J, Utter V, Rahimi F, Yang Z, Geczy CL & Halliday GM (2006) Inflammatory S100A9 and S100A12 proteins in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 27(11):1554-1563.
- Shi Y, Tohyama Y, Kadono T, He J, Miah SM, Hazama R, Tanaka C, Tohyama K & Yamamura H (2006) Protein-tyrosine kinase Syk is required for pathogen engulfment in complement-mediated phagocytosis. *Blood* 107(11):4554-4562.
- Shimada T, Park BG, Wolf AJ, Brikos C, Goodridge HS, Becker CA, Reyes CN, Miao EA, Aderem A, Gotz F, Liu GY & Underhill DM (2010) Staphylococcus aureus evades lysozyme-based peptidoglycan digestion that links phagocytosis, inflammasome activation, and IL-1 β secretion. *Cell host & microbe* 7(1):38-49.
- Shio MT, Eisenbarth SC, Savaria M, Vinet AF, Bellemare MJ, Harder KW, Sutterwala FS, Bohle DS, Descoteaux A, Flavell RA & Olivier M (2009) Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS pathogens* 5(8):e1000559.
- Shoham NG, Centola M, Mansfield E, Hull KM, Wood G, Wise CA & Kastner DL (2003) Pyrin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(23):13501-13506.
- Siegenthaler G, Roulin K, Chatellard-Gruaz D, Hotz R, Saurat JH, Hellman U & Hagens G (1997) A heterocomplex formed by the calcium-binding proteins MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9) binds unsaturated fatty acids with high affinity. *The Journal of biological chemistry* 272(14):9371-9377.
- Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, Woehl B, Leung H, Groom J, Batten M, Harvey RP, Martinez AC, Mackay CR & Mackay F (2007) Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(37):14759-14764.
- Sies H & de Groot H (1992a) Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicol Lett* 64-65 Spec No:547-551.
- Sies H & Menck CF (1992b) Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat Res* 275(3-6):367-375.

- Simard JC, Girard D & Tessier PA (2010) Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. *Journal of leukocyte biology* 87(5):905-914.
- Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S & Srikrishna G (2008) Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 181(7):4666-4675.
- Sipponen T (2013) Diagnostics and Prognostics of Inflammatory Bowel Disease with Fecal Neutrophil-Derived Biomarkers Calprotectin and Lactoferrin. *Digestive Diseases* 31(3-4):336-344.
- Skeldon A & Saleh M (2011) The inflammasomes: molecular effectors of host resistance against bacterial, viral, parasitic, and fungal infections. *Frontiers in microbiology* 2:15.
- Smith JC, Zeller JA, Brown ED & Ong SC (1976) Elevated plasma zinc: a heritable anomaly. *Science* 193(4252):496-498.
- Smyth MJ, Dunn GP & Schreiber RD (2006) Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 90:1-50.
- Soehnlein O & Lindbom L (2010) Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology* 10(6):427-439.
- Sollberger G, Strittmatter GE, Kistowska M, French LE & Beer HD (2012) Caspase-4 is required for activation of inflammasomes. *J Immunol* 188(4):1992-2000.
- Sopalla C, Leukert N, Sorg C & Kerkhoff C (2002) Evidence for the involvement of the unique C-tail of S100A9 in the binding of arachidonic acid to the heterocomplex S100A8/A9. *Biol Chem* 383(12):1895-1905.
- Spencer S, Dowbenko D, Cheng J, Li W, Brush J, Utzig S, Simanis V & Lasky LA (1997) PSTPIP: a tyrosine phosphorylated cleavage furrow-associated protein that is a substrate for a PEST tyrosine phosphatase. *The Journal of cell biology* 138(4):845-860.

- Sroussi HY, Berline J & Palefsky JM (2007) Oxidation of methionine 63 and 83 regulates the effect of S100A9 on the migration of neutrophils in vitro. *Journal of leukocyte biology* 81(3):818-824.
- Sroussi HY, Lu Y, Zhang QL, Villines D & Marucha PT (2010) S100A8 and S100A9 inhibit neutrophil oxidative metabolism in-vitro: Involvement of adenosine metabolites. *Free Radic Res* 44(4):389-396.
- Stables MJ & Gilroy DW (2011) Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog Lipid Res* 50(1):35-51.
- Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS & Ley K (2005) Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 22(3):285-294.
- Stasakova J, Ferko B, Kittel C, Sereinig S, Romanova J, Katinger H & Egorov A (2005) Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. *The Journal of general virology* 86(Pt 1):185-195.
- Steinckwich N, Schenten V, Melchior C, Brechard S & Tschirhart EJ (2011) An essential role of STIM1, Orai1, and S100A8-A9 proteins for Ca²⁺ signaling and FcgammaR-mediated phagosomal oxidative activity. *J Immunol* 186(4):2182-2191.
- Stenmark H (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(8):513-525.
- Sternlicht MD & Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516.
- Stojanov S & Kastner DL (2005) Familial autoinflammatory diseases: genetics, pathogenesis and treatment. *Current opinion in rheumatology* 17(5):586-599.
- Strasser F, Gowland PL & Ruef C (1997) Elevated serum macrophage inhibitory factor-related protein (MRP) 8/14 levels in advanced HIV infection and during disease exacerbation. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 16(4):230-238.

Stroncek DF, Shankar RA & Skubitz KM (2005) The subcellular distribution of myeloid-related protein 8 (MRP8) and MRP14 in human neutrophils. *J Transl Med* 3:36.

Stulik J, Osterreicher J, Koupilova K, Knizek, Macela A, Bures J, Jandik P, Langr F, Dedic K & Jungblut PR (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.

Sun SC, Chang JH & Jin J (2013) Regulation of nuclear factor-kappaB in autoimmunity. *Trends in immunology* 34(6):282-289.

Sundd P, Gutierrez E, Koltsova EK, Kuwano Y, Fukuda S, Pospieszalska MK, Groisman A & Ley K (2012) 'Slings' enable neutrophil rolling at high shear. *Nature* 488(7411):399-403.

Sundd P, Pospieszalska MK, Cheung LS, Konstantopoulos K & Ley K (2011) Biomechanics of leukocyte rolling. *Biorheology* 48(1):1-35.

Suryono, Kido J, Hayashi N, Kataoka M & Nagata T (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.

Sutterwala FS, Mijares LA, Li L, Ogura Y, Kazmierczak BI & Flavell RA (2007) Immune recognition of Pseudomonas aeruginosa mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *The Journal of experimental medicine* 204(13):3235-3245.

Szymkowiak CH, Csernok E, Reinhold D, Bank U, Gross WL & Kekow J (2000) Neutrophils synthesize and activate TGFbeta2. *Cytokine* 12(4):397-400.

Takeuchi O & Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140(6):805-820.

Tamassia N, Calzetti F, Ear T, Cloutier A, Gasperini S, Bazzoni F, McDonald PP & Cassatella MA (2007) Molecular mechanisms underlying the synergistic induction of CXCL10 by LPS and IFN-gamma in human neutrophils. *European journal of immunology* 37(9):2627-2634.

- Tan P, Fuchs SY, Chen A, Wu K, Gomez C, Ronai Z & Pan ZQ (1999) Recruitment of a ROC1-CUL1 ubiquitin ligase by Skp1 and HOS to catalyze the ubiquitination of I kappa B alpha. *Molecular cell* 3(4):527-533.
- Tasher D, Somekh E & Dalal I (2006) PFAPA syndrome: new clinical aspects disclosed. *Arch Dis Child* 91(12):981-984.
- Theofilopoulos AN (1995) The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition. *Immunology today* 16(2):90-98.
- Thorey IS, Roth J, Regenbogen J, Halle JP, Bittner M, Vogl T, Kaesler S, Bugnon P, Reitmaier B, Durka S, Graf A, Wockner M, Rieger N, Konstantinow A, Wolf E, Goppelt A & Werner S (2001) The Ca²⁺-binding proteins S100A8 and S100A9 are encoded by novel injury-regulated genes. *J Biol Chem* 276(38):35818-35825.
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J & et al. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356(6372):768-774.
- Tirkos S, Newbigging S, Nguyen V, Keet M, Ackerley C, Kent G & Rozmahel RF (2006) Expression of S100A8 correlates with inflammatory lung disease in congenic mice deficient of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Respir Res* 7:51.
- Tortorella C, Piazzolla G, Spaccavento F, Pece S, Jirillo E & Antonaci S (1998) Spontaneous and Fas-induced apoptotic cell death in aged neutrophils. *J Clin Immunol* 18(5):321-329.
- Tsai CY, Wu TH, Yu CL, Tsai YY & Chou CT (2002) Decreased IL-12 production by polymorphonuclear leukocytes in patients with active systemic lupus erythematosus. *Immunol Invest* 31(3-4):177-189.
- Tsuji NM, Tsutsui H, Seki E, Kuida K, Okamura H, Nakanishi K & Flavell RA (2004) Roles of caspase-1 in Listeria infection in mice. *Int Immunol* 16(2):335-343.
- Umei T, Takeshige K & Minakami S (1986) NADPH binding component of neutrophil superoxide-generating oxidase. *The Journal of biological chemistry* 261(12):5229-5232.

- Underhill DM & Goodridge HS (2012) Information processing during phagocytosis. *Nature reviews. Immunology* 12(7):492-502.
- Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR & Zychlinsky A (2009) Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS pathogens* 5(10):e1000639.
- Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR & Verma IM (1996) Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 274(5288):787-789.
- van den Bos C, Roth J, Koch HG, Hartmann M & Sorg C (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 PL, Grevers L, Blom AB, Sloetjes A, Mort JS, Vogl T, Nacken W, van den Berg WB & Roth J (2008a) Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 67(12):1750-1758.
- van Lent PL, Grevers LC, Blom AB, Arntz OJ, van de Loo FA, van der Kraan P, Abdollahi-Roodsaz S, Srikrishna G, Freeze H, Sloetjes A, Nacken W, Vogl T, Roth J & van den Berg WB (2008b) Stimulation of chondrocyte-mediated cartilage destruction by S100A8 in experimental murine arthritis. *Arthritis and rheumatism* 58(12):3776-3787.
- van Oostrom AJ, van Wijk JP, Sijmonsma TP, Rabelink TJ & Castro Cabezas M (2004) Increased expression of activation markers on monocytes and neutrophils in type 2 diabetes. *Neth J Med* 62(9):320-325.
- Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM & Dixit VD (2011) The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 17(2):179-188.
- Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T & Kroemer G (2010) Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(10):700-714.

- Vane JR (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231(25):232-235.
- Vane JR (1987) Antiinflammatory drugs and the many mediators of inflammation. *Int J Tissue React* 9(1):1-14.
- Vasiliu IM, Petri MA & Baer AN (2006) Therapy with granulocyte colony-stimulating factor in systemic lupus erythematosus may be associated with severe flares. *The Journal of rheumatology* 33(9):1878-1880.
- Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, Rubin CJ, Zhao W, Olsen SH, Klinker M, Shealy D, Denny MF, Plumas J, Chaperot L, Kretzler M, Bruce AT & Kaplan MJ (2011) Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 187(1):538-552.
- Villard J, Dayer-Pastore F, Hamacher J, Aubert JD, Schlegel-Haueter S & Nicod LP (1995) GRO alpha and interleukin-8 in *Pneumocystis carinii* or bacterial pneumonia and adult respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 152(5 Pt 1):1549-1554.
- Vogl T, Leukert N, Barczyk K, Strupat K & Roth J (2006) Biophysical characterization of S100A8 and S100A9 in the absence and presence of bivalent cations. *Biochimica et biophysica acta* 1763(11):1298-1306.
- Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, Strey A, Thorey IS, Reichelt R, Foell D, Gerke V, Manitz MP, Nacken W, Werner S, Sorg C & Roth J (2004) MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood* 104(13):4260-4268.
- Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, 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(9):1042-1049.
- Volpp BD, Nauseef WM & Clark RA (1988) Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science* 242(4883):1295-1297.

- von Kockritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M & Medina E (2008) Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood* 111(6):3070-3080.
- Waite AL, Schaner P, Richards N, Balci-Peynircioglu B, Masters SL, Brydges SD, Fox M, Hong A, Yilmaz E, Kastner DL, Reinherz EL & Gumucio DL (2009) Pyrin Modulates the Intracellular Distribution of PSTPIP1. *PloS one* 4(7):e6147.
- Wang AV, Scholl PR & Geha RS (1994a) 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 CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV & Baldwin AS, Jr. (1998a) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281(5383):1680-1683.
- Wang L, Chang EW, Wong SC, Ong SM, Chong DQ & Ling KL (2013) Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins. *J Immunol* 190(2):794-804.
- Wang P, Wu P, Anthes JC, Siegel MI, Egan RW & Billah MM (1994b) Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils. *Blood* 83(9):2678-2683.
- Wang S, Miura M, Jung YK, Zhu H, Li E & Yuan J (1998b) Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* 92(4):501-509.
- Ward C, Chilvers ER, Lawson MF, Pryde JG, Fujihara S, Farrow SN, Haslett C & Rossi AG (1999) NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. *The Journal of biological chemistry* 274(7):4309-4318.
- Waugh N, Cummins E, Royle P, Kandala NB, Shyangdan D, Arasaradnam R, Clar C & Johnston R (2013) Faecal calprotectin testing for differentiating amongst inflammatory and non-inflammatory bowel diseases: Systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment* 17(55):a-212.
- Weih DS, Yilmaz ZB & Weih F (2001) Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines. *J Immunol* 167(4):1909-1919.

- Weih F, Carrasco D, Durham SK, Barton DS, Rizzo CA, Ryseck RP, Lira SA & Bravo R (1995) Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell* 80(2):331-340.
- Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF & Segal AW (1993) p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J* 296 (Pt 3):557-561.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P & Halbwachs-Mecarelli L (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80(5):617-653.
- Witowski J, Ksiazek K & Jorres A (2004) Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61(5):567-579.
- Wittkowski H, Frosch M, Wulffraat N, Goldbach-Mansky R, Kallinich T, Kuemmerle-Deschner J, Fruhwald MC, Dassmann S, Pham TH, Roth J & Foell D (2008) S100A12 is a novel molecular marker differentiating systemic-onset juvenile idiopathic arthritis from other causes of fever of unknown origin. *Arthritis and rheumatism* 58(12):3924-3931.
- Wittkowski H, Kuemmerle-Deschner JB, Austermann J, Holzinger D, Goldbach-Mansky R, Gramlich K, Lohse P, Jung T, Roth J, Benseler SM & Foell D (2011) MRP8 and MRP14, phagocyte-specific danger signals, are sensitive biomarkers of disease activity in cryopyrin-associated periodic syndromes. *Annals of the rheumatic diseases* 70(12):2075-2081.
- Wolf AJ, Arruda A, Reyes CN, Kaplan AT, Shimada T, Shimada K, Arditi M, Liu G & Underhill DM (2011) Phagosomal degradation increases TLR access to bacterial ligands and enhances macrophage sensitivity to bacteria. *J Immunol* 187(11):6002-6010.
- Wong D, Teixeira A, Oikonomopoulos S, Humburg P, Lone IN, Saliba D, Siggers T, Bulyk M, Angelov D, Dimitrov S, Udalova IA & Ragoussis J (2011) Extensive characterization of NF-kappaB binding uncovers non-canonical motifs and advances the interpretation of genetic functional traits. *Genome Biol* 12(7):R70.
- Wu CJ, Conze DB, Li T, Srinivasula SM & Ashwell JD (2006) Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nature cell biology* 8(4):398-406.

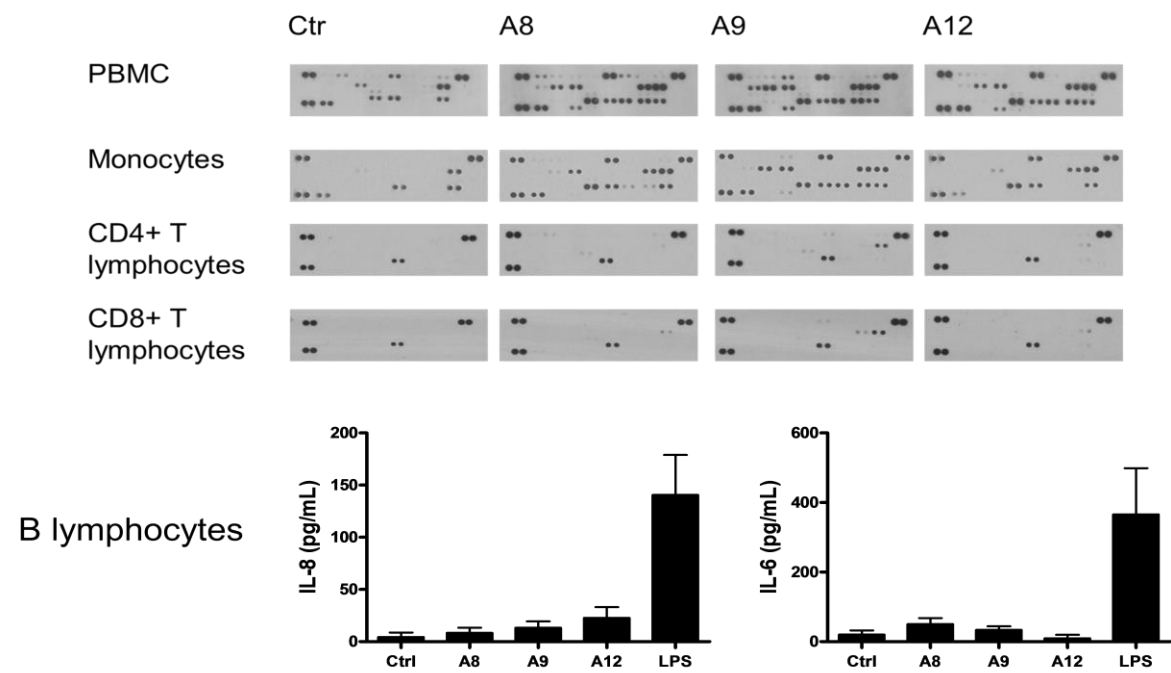
- Wu K, Fuchs SY, Chen A, Tan P, Gomez C, Ronai Z & Pan ZQ (2000) The SCF(HOS/beta-TRCP)-ROC1 E3 ubiquitin ligase utilizes two distinct domains within CUL1 for substrate targeting and ubiquitin ligation. *Molecular and cellular biology* 20(4):1382-1393.
- Wu R, Duan L, Ye L, Wang H, Yang X, Zhang Y, Chen X, Zhang Y, Weng Y, Luo J, Tang M, Shi Q, He T & Zhou L (2013) S100A9 promotes the proliferation and invasion of HepG2 hepatocellular carcinoma cells via the activation of the MAPK signaling pathway. *Int J Oncol* 42(3):1001-1010.
- Xie TX, Xia Z, Zhang N, Gong W & Huang S (2010) Constitutive NF-kappaB activity regulates the expression of VEGF and IL-8 and tumor angiogenesis of human glioblastoma. *Oncol Rep* 23(3):725-732.
- Xu K, Yen T & Geczy CL (2001) IL-10 up-regulates macrophage expression of the S100 protein S100A8. *J Immunol* 166(10):6358-6366.
- Yan SF, Barile GR, D'Agati V, Du Yan S, Ramasamy R & Schmidt AM (2007) The biology of RAGE and its ligands: uncovering mechanisms at the heart of diabetes and its complications. *Curr Diab Rep* 7(2):146-153.
- Yang Z, Yan WX, Cai H, Tedla N, Armishaw C, Di Girolamo N, Wang HW, Hampartzoumian T, Simpson JL, Gibson PG, Hunt J, Hart P, Hughes JM, Perry MA, Alewood PF & Geczy CL (2007) S100A12 provokes mast cell activation: a potential amplification pathway in asthma and innate immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 119(1):106-114.
- Yeaman GR, Collins JE, Currie JK, Guyre PM, Wira CR & Fanger MW (1998) IFN-gamma is produced by polymorphonuclear neutrophils in human uterine endometrium and by cultured peripheral blood polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* 160(10):5145-5153.
- Yen T, Harrison CA, Devery JM, Leong S, Iismaa SE, Yoshimura T & Geczy CL (1997) Induction of the S100 chemotactic protein, CP-10, in murine microvascular endothelial cells by proinflammatory stimuli. *Blood* 90(12):4812-4821.
- Yin CG, Li HL, Zhang BG, Liu YQ, Lu GH, Lu SJ, Sun L, Qi YL, Li XL & Chen WY (2013) RAGE-binding S100A8/A9 promotes the migration and invasion of human breast cancer cells through actin polymerization and epithelial-mesenchymal transition. *Breast cancer research and treatment* 142(2):297-309.

- Yin J & Ferguson TA (2009) Identification of an IFN-gamma-producing neutrophil early in the response to *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 182(11):7069-7073.
- Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytnuik LD, Pittman K, Asaduzzaman M, Wu K, Meijndert HC, Malawista SE, de Boisleury Chevance A, Zhang K, Conly J & Kubes P (2012) Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med* 18(9):1386-1393.
- Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, Schmid I, Straumann A, Reichenbach J, Gleich GJ & Simon HU (2008) Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med* 14(9):949-953.
- Youssef P, Roth J, Frosch M, Costello P, Fitzgerald O, Sorg C & Bresnihan B (1999) Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane. *The Journal of rheumatology* 26(12):2523-2528.
- Yu JW, Fernandes-Alnemri T, Datta P, Wu J, Juliana C, Solorzano L, McCormick M, Zhang Z & Alnemri ES (2007) Pyrin activates the ASC pyroptosome in response to engagement by autoinflammatory PSTPIP1 mutants. *Molecular cell* 28(2):214-227.
- Yui S, Mikami M, Tsurumaki K & Yamazaki M (1997) Growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities of calprotectin derived from inflammatory exudate cells on normal fibroblasts: regulation by metal ions. *Journal of leukocyte biology* 61(1):50-57.
- Yui S, Mikami M & Yamazaki M (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. *Journal of leukocyte biology* 58(6):650-658.
- Yui S, Nakatani Y, Hunter MJ, Chazin WJ & Yamazaki M (2002) Implication of extracellular zinc exclusion by recombinant human calprotectin (MRP8 and MRP14) from target cells in its apoptosis-inducing activity. *Mediators of inflammation* 11(3):165-172.

- Yui S, Nakatani Y & Mikami M (2003) Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biological & pharmaceutical bulletin* 26(6):753-760.
- Zarbock A, Ley K, McEver RP & Hidalgo A (2011) Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* 118(26):6743-6751.
- Zhao F, Hoechst B, Duffy A, Gamrekelashvili J, Fioravanti S, Manns MP, Greten TF & Korangy F (2012) S100A9 a new marker for monocytic human myeloid-derived suppressor cells. *Immunology* 136(2):176-183.
- Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P & Ghosh S (1997) The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* 89(3):413-424.
- Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I & Littman DR (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393(6685):595-599.
- Zreiqat H, Belluoccio D, Smith MM, Wilson R, Rowley LA, Jones K, Ramaswamy Y, Vogl T, Roth J, Bateman JF & Little CB (2010) S100A8 and S100A9 in experimental osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 12(1):R16.
- Zwadlo 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(3):510-515.

Annexe 1

Libération de cytokines en réponse à une stimulation par 10 µg/mL de S100A8 (A8), S100A9 (A9) et S100A12 (A12). La libération de cytokines a été mesurée par microréseaux d'anticorps (PBMCs, Monocytes, Lymphocytes T) ou par ELISA spécifiques pour IL-6 et IL-8 (Lymphocytes B)



Expériences réalisées par Annabelle Cesaro et Jean-Christophe Simard, 2012.