



Fonctions des protéines S100A8 et S100A9 dans la réponse inflammatoire associée aux maladies auto- immunes

Thèse

Joan Defrene

Doctorat en microbiologie-immunologie
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

Résumé

De nos jours, les maladies auto-immunes concernent une part grandissante de la population mondiale et s'accompagnent d'une comorbidité importante, mais aussi d'un lourd fardeau économique. Parmi ces maladies les plus courantes, on distingue l'arthrite rhumatoïde et le psoriasis affectant respectivement les articulations et la peau et qui ne possèdent toujours pas de traitements curatifs. Dans la pathogenèse de ces maladies, une forte réponse inflammatoire est notamment générée et entretenue, contribuant ainsi à la dégradation des tissus ciblés. De nombreux marqueurs de l'inflammation sont sécrétés dans ces tissus, dont les protéines S100A8 et S100A9 qui sont deux motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires. Ces deux protéines sont majoritairement exprimées par les neutrophiles et les cellules myéloïdes activées ainsi que les kératinocytes.

Plusieurs études démontrent des propriétés pro-inflammatoires pour S100A8 et S100A9. S100A9 stimule la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les neutrophiles et les monocytes. La protéine S100A8 est chimiotactique pour les neutrophiles et les monocytes et sa neutralisation *in vivo* diminue le recrutement de leucocytes dans l'inflammation aiguë. En revanche, des études suggèrent des fonctions anti-inflammatoires pour S100A8. Son expression est notamment induite par l'interleukine 10 et les glucocorticoïdes. De plus, S100A8 est sensible à l'oxydation et sa forme oxydée possède des fonctions anti-inflammatoires. Cependant, les fonctions de ces deux protéines dans le développement de l'inflammation associées aux maladies auto-immunes sont peu connues.

Nous avons effectué la première caractérisation des souris déficientes pour *S100a8* et démontré que la protéine S100A8 contrôle la différenciation des cellules myéloïdes et leur capacité à moduler la réponse inflammatoire. À l'aide du modèle d'arthrite induite par le collagène, nous avons démontré que S100A8 est anti-inflammatoire. Elle diminue l'infiltration de neutrophiles et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans les pattes. Également, nous avons démontré que S100A8 atténue l'activité des ostéoclastes *in vitro* et *in vivo*. Le traitement avec un anticorps contre la protéine S100A8 nous a permis de démontrer que les fonctions anti-inflammatoires de S100A8 sont principalement extracellulaires.

En comparant les souris déficientes pour *S100a8* et *S100a9*, nous avons étudié le rôle de S100A8 et S100A9 dans le psoriasis induit par l'imiquimod chez la souris. Dans ce modèle, S100A8 et S100A9 amoindrissent l'hyperplasie et l'inflammation de la peau. Ces travaux ont montré que S100A8 contrôle la différenciation et la prolifération des kératinocytes. Aussi, S100A8 et S100A9 contrôlent l'infiltration de

neutrophiles dans le derme ainsi que la réponse des lymphocytes T producteurs d'IL-17 dans les ganglions lymphatiques et le derme.

Les travaux de cette thèse démontrent que S100A8 est anti-inflammatoire dans l'arthrite et le psoriasis, mais que S100A9 possède des fonctions différentes dans l'inflammation dépendamment du type de réaction inflammatoire. Par ailleurs, nous avons révélé que deux alarmines peuvent étonnamment exercer des fonctions anti-inflammatoires. La compréhension de ces nouveaux rôles de modulation de l'inflammation pourrait contribuer au développement de nouvelles thérapies.

Table des matières

Résumé	ii
Table des matières	iv
Liste des figures et tableaux	viii
Liste des abréviations	x
Remerciements.....	xiv
Avant-propos	xvi
Introduction	1
1. Les maladies auto-immunes.....	1
1.1. Généralités sur les maladies auto-immunes	1
1.1.1. Rupture de la tolérance au soi	1
1.1.2. Origines génétiques et environnementales de l'auto-immunité	3
1.2. La réaction inflammatoire associée aux maladies auto-immunes.....	3
1.2.1. Les cellules de l'inflammation.....	4
1.2.1.1. L'hématopoïèse	4
1.2.1.2. Les cellules de la lignée myéloïde	6
1.2.1.2.1. Les neutrophiles	6
1.2.1.2.2. Les monocytes.....	9
1.3. La réponse des lymphocytes T effecteurs associée aux maladies auto-immunes.....	13
1.4. L'arthrite rhumatoïde.....	15
1.4.1. Généralité et épidémiologie.....	15
1.4.2. Symptômes	16
1.4.3. Étiologie	16
1.4.3.1. Génétique	16
1.4.3.2. Épigénétique.....	17
1.4.3.3. Facteurs environnementaux et interaction avec le microbiome	17
1.4.4. Mécanismes immunologiques	18
1.4.4.1. Immunité adaptative.....	18
1.4.4.2. Immunité innée	20
1.4.5. Traitements	21
1.4.6. Modèles murins de l'arthrite rhumatoïde	22
1.5. Le psoriasis.....	23
1.5.1. Généralité et épidémiologie.....	23

1.5.2.	Symptômes et diagnostic	24
1.5.3.	Étiologie	26
1.5.3.1.	Facteurs génétiques	26
1.5.3.2.	Facteurs infectieux.....	27
1.5.3.3.	Autres facteurs déclencheurs	27
1.5.4.	Mécanismes immunologiques	27
1.5.5.	Traitements	30
1.5.6.	Modèles murins du psoriasis	31
2.	La famille des protéines S100	32
2.1.	Généralités sur les protéines S100	32
2.2.	Structure des protéines S100.....	33
2.3.	Fonctions des protéines S100.....	34
3.	Les protéines S100A8 et S100A9	35
3.1.	La sous-famille des calgranulines	35
3.2.	Structures des protéines S100A8 et S100A9.....	36
3.2.1.	Généralités.....	36
3.2.2.	Modifications post-traductionnels des protéines S100A8 et S100A9	39
3.3.	Profil d'expression des protéines S100A8 et S100A9.....	40
3.3.1.	Expression à l'état embryonnaire	40
3.3.2.	Expression lors de l'hématopoïèse	40
3.3.3.	Régulation de l'expression des protéines S100A8 et S100A9	41
3.3.4.	Cellules d'origine myéloïde	41
3.3.5.	Cellules d'origine non myéloïde	42
3.4.	Fonctions des protéines S100A8 et S100A9	42
3.4.1.	Généralités	42
3.4.2.	Fonctions intracellulaires des protéines S100A8 et S100A9.....	43
3.4.2.1.	Transport des acides gras saturés.....	43
3.4.2.2.	Activation de la NADPH oxydase.....	43
3.4.2.3.	Fonctions nucléaires	43
3.4.3.	Mécanismes de sécrétion des protéines S100A8 et S100A9.....	44
3.4.4.	Fonctions extracellulaires des protéines S100A8 et S100A9.....	45
3.4.4.1.	Récepteurs des protéines S100A8 et S100A9.....	45
3.4.4.1.1.	TLR4 (<i>Toll-like Receptor 4</i>).....	45

3.4.4.1.2.	RAGE (<i>Receptor for Advanced Glycation End products</i>).....	46
3.4.4.1.3.	CD36.....	47
3.4.4.1.4.	CD33 (Siglec-3)	47
3.4.4.1.5.	EMMPRIN (Basigin, CD147) et Neuroplastin- β	47
3.4.4.2.	Propriétés antimicrobiennes	47
3.4.4.3.	Activation et production de cytokines et chimiokines	48
3.4.4.4.	Réaction allergique	48
3.4.4.5.	Contrôle de la prolifération et différenciation.....	48
3.4.5.	Fonctions liées à la migration cellulaire.....	49
3.4.6.	Fonctions liées à l'activité suppressives.....	50
3.4.7.	Les souris déficientes pour <i>S100a8</i> et <i>S100a9</i>	51
3.4.8.	Fonctions dans les pathologies auto-immunes	52
3.4.8.1.	Généralités.....	52
3.4.8.2.	La calprotectine : biomarqueur de plusieurs maladies auto-immunitaires.	53
3.4.9.	Fonctions des protéines S100A8 et S100A9 dans l'arthrite rhumatoïde	55
3.4.9.1.	Chez l'humain	55
3.4.9.2.	Chez la souris	55
3.4.10.	Fonctions des protéines S100A8 et S100A9 dans le psoriasis	57
3.4.10.1.	Chez l'humain	57
3.4.10.2.	Chez la souris	58
Chapitre 1	Hypothèse et objectifs du projet	60
1.1	Mise en contexte	60
1.2	Hypothèse du projet de recherche	61
1.3	Objectifs et méthodologie.....	61
Chapitre 2	Augmentation de la myélopoïèse et aggravation de l'arthrite chez les souris déficientes pour <i>S100a8</i>	62
1.	Résumé	62
2.	Abstract.....	63
3.	Article.....	64
Chapitre 3	La délétion de <i>S100a8</i> et <i>S100a9</i> augmente la prolifération des kératinocytes et la réponse des lymphocytes Th17 dans le psoriasis induit par l'imiquimod.	97
1.	Résumé	97
2.	Abstract.....	98
3.	Article.....	99

Chapitre 4 Discussion générale et perspectives	129
1. Contexte	129
2. Les souris déficientes pour <i>S100a8</i>	129
3. Fonctions de S100A8 et S100A9 dans le développement de l'arthrite rhumatoïde chez la souris	134
4. Fonctions de S100A8 et S100A9 dans le développement du psoriasis chez la souris.....	135
5. Autres fonctions de S100A8 et S100A9 dans la réaction inflammatoire	138
6. Conclusion sur les fonctions de S100A8 et S100A9 dans l'inflammation associée aux maladies auto-immunes	139
Conclusion générale et perspectives	142
Bibliographie	144
Annexe A	175
Annexe B	176
Annexe C	177
Annexe D	178
Annexe E	179

Liste des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : Représentation simplifiée de l'hématopoïèse.....	5
Figure 2 : Le compartiment des monocytes chez la souris.....	10
Figure 3 : Cytokines contrôlant la différenciation des lymphocytes T effecteurs et sécrétés par les différentes classes.....	14
Figure 4 : Physiopathogénèse de l'arthrite rhumatoïde.....	19
Figure 5 : Caractéristiques histopathologiques du psoriasis.....	25
Figure 6 : Immunopathogénèse du psoriasis.....	29
Figure 7 : Site d'action des thérapies biologiques du psoriasis.....	31
Figure 8 : Représentation schématique de la structure secondaire des protéines S100.....	34
Figure 9 : Cartographie des gènes S100 sur le chromosome humain 1q21 (A) et murin 3f3 (B).....	36
Figure 10 : Comparaison des séquences peptidiques de S100A8 et S100A9 chez l'humain et la souris.....	37
Figure 11 : Structure tertiaire et quaternaire des protéines humaines S100A8 et S100A9.....	38
Figure 12 : Expression des protéines S100A8 et S100A9 chez l'embryon de souris CD1 au jour 17.....	41
Figure 13 : Mécanismes d'activation des cellules endothéliales chez la souris par les protéines S100A8 et S100A9 et de l'effet chimioattracteur sur les leucocytes.....	50

Tableaux

Tableau 1 : Exemples de maladies auto-immunes communes par type d'incidence.....	1
Tableau 2 : Mécanismes de l'autotolérance des antigènes.....	2
Tableau 3 : Effets des principales cytokines pro-inflammatoires dans la membrane synoviale.....	21
Tableau 4 : Traitements biologiques utilisés pour l'arthrite rhumatoïde.....	22
Tableau 5 : Membres de la famille des protéines S100 chez l'humain et la souris.....	33
Tableau 6 : Phénotypes des souris déficientes pour en S100A9 naïves.....	52
Tableau 7 : Les protéines S100A8, S100A9, S100A12 dans les pathologies inflammatoires et immunitaires.....	54

Liste des abréviations

AA	Acide arachidonique
ACPA	Anticorps anti-protéines citrullinés
AGM	<i>Aorta-Gonad-Mesonephros</i>
AP-1	<i>Activator protéine 1</i>
ARG1	Arginase 1
ARNm	ARN messenger
BMDc	<i>Bone marrow-derived dendritic cells</i>
C/EBP- α	<i>CCAAT-enhancer-binding proteins α</i>
C/EBP- β	<i>CCAAT-enhancer-binding proteins β</i>
CD33	<i>Cluster of Differentiation 33, Siglec-3</i>
CD36	<i>Cluster of Differentiation 36</i>
cDC	<i>classical Dendritic Cell</i>
CDC42	<i>Cell Division Cycle 42</i>
CHM-II	Complexe d'histocompatibilité de classe II
CLP	<i>Common Lymphoid Progenitor</i>
CMP	<i>Common Myeloid Progenitor</i>
CREB	<i>C-AMP Response Element-binding protein</i>
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DMARD	<i>Disease-Modifying Antirheumatic Drugs</i>
ECD	<i>Epidermal Complex Differentiation</i>
EF-Hand	<i>Elongation Factor-Hand</i>
EMMPRIN	Extracellular matrix metalloproteinase inducer
EN-RAGE	<i>Extracellular newly identified RAGE binding protein</i>
Fc γ R	Fragment constant des immunoglobulines de type IgG
FGF-2	Facteur de croissance des fibroblastes 2
FMF	Fièvre méditerranéenne familiale
fMLP	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
GM-CSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages
GMP	<i>Granyocyte/Macrophage Progenitor</i>
GWAS	<i>Genome-Wide Association Studies</i>
HMGB1	<i>High Mobility Group Box-1</i>
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
IFN γ	Interféron γ
IL-10	Interleukine 10
IL-1 α	Interleukine 1 α
IL-1 β	Interleukine 1 β
IMI	Imiquimod
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IRAK1	<i>Interleukine-1 receptor-associated kinase 1</i>
IRFs	<i>Interferon Regulatory Factors</i>
LFA1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LMA	Leucémie myéloïde aiguë
LPS	Lypopolysaccharide
LPS-CIA	<i>LPS-Collagen induced Arthritis</i>
MAC1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
mBSA	<i>Methylated Bovin Serum Albumin</i>
MD2	<i>Myeloid Differentiation Protein-2</i>

MDSC	<i>Myeloid-Derived Suppressive Cells</i>
MEP	<i>Megacaryocyte Erythrocyte Progenitor</i>
MMPs	<i>Métalloprotéases matricielles</i>
MPP	<i>progéniteurs multipotents</i>
MPS	<i>Mononuclear Phagocyte System</i>
MRP	<i>Myeloid-Related Protein</i>
MSU	<i>Urate monosodique</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation primary response gene 88</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate</i>
NET	<i>Neutrophil Extracellular Trap</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NHK	<i>Normal Human Keratinocytes</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
PAMP	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
PAPA	<i>Pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum, and acne</i>
pDC	<i>Plasmacytoid dendritic cell</i>
PGE ₂	<i>Prostaglandine E2</i>
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acétate</i>
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SCA1	<i>Surface Cell Antigen 1</i>
SE	<i>Shared Epitope</i>
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
STAT-3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TET2	<i>Ten-eleven-translocation 2</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TPA	<i>12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon-β</i>
TTP	<i>Tristetraprolin</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

À ma famille

« Ayez le culte de l'esprit critique »
Louis Pasteur, 1892

Remerciements

Tout d'abord, je tiens profondément à remercier mon directeur de recherche Pr Philippe Tessier de m'avoir offert la chance de pouvoir effectuer ce doctorat et pour toute sa confiance, son optimisme et son soutien au cours de ces années. Grâce à vous, j'ai eu la chance et l'honneur de participer à plusieurs congrès internationaux et ai pu jouir d'une grande autonomie de travail. Aussi, j'ai vécu une émancipation aussi personnelle que professionnelle dans le monde de l'immunologie. Ce mentorat fut enrichissant et inoubliable. Également, je remercie chaleureusement mon codirecteur de recherche Pr Fawzi Aoudjit d'avoir accepté cette codirection et son soutien indéniable tout au long de mon doctorat.

Je remercie l'ensemble des membres du jury de cette thèse composé par les P^{re} Maria Fernandes, P^{re} Marie-Renée Blanchet et P^{re} Sylvie Lesage pour avoir accepté la révision et l'évaluation de ma thèse.

Un grand merci aux membres présents et passés de notre laboratoire. Merci à Madame Nathalie Pagé pour l'accueil et l'aide technique au début de mon doctorat. D^{re} Malika Laouedj, merci pour ton assistance indispensable et les bons souvenirs pendant ces quelques années où nous nous sommes croisés. Merci beaucoup à Madame Anne-Cécile Soufflet pour ton assistance technique précieuse et de qualité dans notre laboratoire. Enfin, merci infiniment à Madame Nayéli Esparza, pour ton aide technique sur les travaux de mon projet et je te souhaite maintenant bon courage et réussite pour ton doctorat.

J'adresse mes remerciements les plus sincères aux membres de l'équipe du Pr Fawzi Aoudjit qui ont toujours été disponibles et d'une aide précieuse tout au long de mon doctorat. Merci au Dr Marc Boivert et Dr Mohammed Amine El Azreq pour vos conseils et votre soutien. Merci à Monsieur Maleck Kadiri pour les discussions et les bons moments, je te souhaite tout le meilleur pour ton doctorat. Également, je souhaite remercier Monsieur Sofiane Berrazouane, merci infiniment pour ton assistance technique, ce fut un plaisir de travailler ensemble et je te souhaite à toi aussi une réussite bien méritée pour la fin de ton doctorat. Merci beaucoup aux laboratoires du Pr Martin Pelletier et à D^{re} Ingrid Saba pour leur aide technique et leurs conseils. Pr Pelletier, merci également pour votre passion et votre aide pour la réalisation des séminaires de recherche. A huge thank to Asmaa Lachhab for your help during those years. I would like to also thank Andrew Leong. It was a pleasure working with both of you and I wish you all the best for the future. Également, je remercie chaleureusement Monsieur Jean-François Daudelin et P^{re} Nathalie Labrecque de l'Université de Montréal pour leur accueil lors de ma formation, ainsi que pour leurs conseils techniques.

Je souhaite remercier infiniment Madame Marie-France Côté des laboratoires du Pr Stéphane Gobeil pour ton aide technique importante dans mon projet. Merci beaucoup aussi D^{re} Isabelle Allaëys des laboratoires du Pr Éric Boilard pour tes conseils. Je souhaite remercier vivement D^r Alexandre Brunet anciennement responsable à la plateforme de cytométrie et Madame Julie-Christine Lévesque responsable de la plateforme de microscopie pour leur aide technique inestimable, leurs conseils et leur gentillesse. Également, je remercie chaleureusement mon « voisin de paillasse » Monsieur Guillaume St-Pierre, professionnel de recherche dans les laboratoires du Pr^e Sachiko Sato. Merci à toi pour ton assistance, tes conseils ainsi que ton aide à la gestion de tous les jours dans le laboratoire.

I wish to express my gratitude to my friend D^{re} Prenitha Mercy Ignatius for her huge support and her prayers during those years. I wish you all the best for the future.

Merci infiniment à mon ancien collègue D^r Matthieu Dalvai. Ton soutien, tes conseils et ta gentillesse furent des alliés indispensables pour aller de l'avant dans mon aventure au Québec.

Je souhaite bien évidemment remercier une bande incroyable de collègues avec qui j'ai partagé les bons moments de la vie, mais aussi lutté contre les petits « coups de mou » du doctorat. Un grand merci à D^r Clément « Phage » (et sa sœur), D^{re} Julia Dubois, Laurine Gil, Anaïs Burgain, D^r Julien Chaillot, Karima Zarrouk, D^{re} Jessica El Khoury, D^r Rafik Menasria, Marine Queffeuilou, Sophia Bigot, D^r Kévin Patron, D^r Bruno Guedes, Flora Peillard Fiorente, Olus Uyar, Mathilde Flahaut, et Audrey Sergerie.

Où que l'on aille, la Bourgogne est là. D'un bout à l'autre de l'océan Atlantique, je souhaite remercier infiniment mon amie D^{re} Émilie Dubois (meilleure ambassadrice de la Bourgogne au Québec) et mon amie de toujours Pauline Renardet pour leur amitié sans faille et leur soutien tout au long de ces années.

Un immense merci à Madame Karelle Rheault et Ryuk, avec qui je partage ma vie. Karelle, ton soutien au quotidien est incommensurable, merci infiniment pour tout ce que tu as fait pour moi pendant mon doctorat.

Enfin, c'est avec émotion que je remercie l'ensemble de ma famille. Hommage tout d'abord à mes parents qui m'ont toujours conseillé, soutenu dans mes rêves et projets, et sans qui je n'aurais pu arriver jusque-là. Ce chapitre de vie fut long en temps et je vous remercie infiniment pour votre patience. Merci également à mes grands-parents et ma tante pour leur soutien tout aussi fort depuis toujours. Pour finir, j'ai une pensée toute particulière à la mémoire de mes grands-parents.

Avant-propos

Dans ce manuscrit vous sont présentés les travaux de ma thèse qui consiste à étudier le rôle des protéines S100A8 et S100A9 dans la réaction inflammatoire liée aux maladies auto-immunes. Cette thèse est organisée en quatre chapitres précédés par une introduction. Cette dernière aborda tout d'abord brièvement les mécanismes de la réaction inflammatoire et de la réponse immunitaire afin d'exposer les conditions conduisant aux maladies auto-immunes. Dans un second temps, l'exemple de deux maladies auto-immunes à savoir le l'arthrite rhumatoïde et le psoriasis sera présenté. Enfin, une description de la famille des protéines S100 sera abordée avec une analyse détaillée des protéines S100A8 et S100A9. Un état des connaissances concernant les fonctions de ces deux protéines notamment dans des conditions d'homéostasie et de pathologies auto-immunitaires sera effectué dans cette partie.

Le premier chapitre sera dédié à la mise en contexte des problématiques liées à l'étude des fonctions des protéines S100A8 et S100A9 dans l'arthrite rhumatoïde et le psoriasis suivi de l'énonciation de l'hypothèse et des objectifs du projet de recherche.

Le second chapitre présentera la première partie des travaux effectués au cours de cette thèse et sous forme de l'article qui a été publié dans la revue *PLOS One* en août 2019. Cet article est intitulé : "*Enhanced myelopoiesis and aggravated arthritis in S100a8-deficient mice*". Le projet de recherche qui a conduit à cet article a été élaboré et dirigé par les Pr Philippe Tessier et Pr Fawzi Aoudjit. Les expériences ont été réalisées par la Pr^e Annabelle Cesaro et moi-même avec la même contribution. Pr^e Cesaro a effectué les expériences d'arthrite chez les souris déficientes pour S100A8 ainsi qu'une partie de la caractérisation des souris déficientes pour S100A8. Mes travaux se sont orientés sur la caractérisation des souris déficientes pour S100A8 ainsi qu'une partie des analyses des protocoles d'arthrite chez la souris ainsi que l'étude *in vitro* des ostéoclastes. Madame Nathalie Pagé a effectué les quantifications de S100A8 dans les sérums de patients ainsi que les stimulations de cellules mononuclées du sang périphérique de patients et les purifications de protéines et anticorps. Les expériences pour l'étude des fonctions mitochondriales ont été réalisées par Asmaa Lachhab et moi-même. J'ai rédigé le manuscrit avec le Pr Philippe Tessier, réalisé les figures et les analyses statistiques sous la direction des Pr Philippe Tessier et Pr Fawzi Aoudjit.

Le troisième chapitre traitera des travaux réalisés au cours de cette thèse sous forme d'article tel que publié dans le journal *The Journal of Immunology*. Cette étude dans laquelle je suis le premier auteur est présentement en soumission dans le journal *The Journal of Immunology*. Ce second article est intitulé : "*Deletion of S100a8 and S100a9 enhances keratinocyte proliferation and Th17 response in imiquimod-induced*

psoriasis”. Le projet de recherche qui a conduit à cet article a été élaboré et dirigé par les Pr Philippe Tessier et Pr Fawzi Aoudjit. Madame Nathalie Pagé a contribué à la démarche scientifique, l’élaboration et la réalisation des protocoles lors du démarrage du projet ainsi que la purification des anticorps. J’ai ensuite optimisé et élaboré le reste des protocoles expérimentaux et j’ai réalisé l’ensemble des expériences *in vivo* et *in vitro*. J’ai rédigé le manuscrit, réalisé les figures ainsi que les analyses statistiques sous la direction des Pr Philippe Tessier et Pr Fawzi Aoudjit.

Le quatrième et dernier chapitre de cette thèse concernera la discussion des travaux effectués tout au long de ce doctorat ainsi que des limites et perspectives de ce projet. Il sera également abordé la discussion de projets connexes à mes objectifs de recherche. Enfin, le manuscrit se terminera par une conclusion générale.

Introduction

1. Les maladies auto-immunes

1.1. Généralités sur les maladies auto-immunes

L'auto-immunité définit les réactions aux auto-antigènes ou aux antigènes associés au microbiote qui entraînent des lésions et des maladies tissulaires. Le concept d'auto-immunité fut tout d'abord proposé en 1900 par Paul Ehrlich (1). La question du fonctionnement du système immunitaire et de la reconnaissance du soi et du non-soi fut élucidée en 1959 par Sir Frank Macfarlane Burnet décrivant que les maladies auto-immunes sont générées par des clones persistants de lymphocytes autoréactifs qui auraient dû être supprimés par une tolérance immunologique acquise (2). Il est aussi suggéré que chaque lymphocyte exprime de multiples copies d'un unique récepteur spécifique d'une entité étrangère, ce qui initie la réponse immunitaire. Ce modèle fut complété par Peter Medawar et ces travaux valurent à Burnet et Medawar le Prix Nobel en 1960. L'échappement et l'activation de lymphocytes autoréactifs peuvent conduire au développement de maladies auto-immunes. De nos jours, plus de 80 maladies auto-immunes sont recensées. Elles affectent environ 5 à 10 % de la population dans les pays développés et sont un fardeau économique et psychologique majeur pour les personnes atteintes (3). L'auto-immunité peut être classée en maladies systémiques ou spécifiques d'organe.

Maladie auto-immune	
Spécifiques d'organe	Systémiques
Diabète de type 1	Polyarthrite rhumatoïde
Sclérose en plaques	Sclérodermie
Maladie de Crohn	Lupus érythémateux disséminé
Psoriasis	Syndrome de Sjögren primaire

Tableau 1 : Classification des maladies auto-immunes. Tableau adapté de Yamamoto et al, 2016, (4)

Les maladies auto-immunes se caractérisent donc par une rupture des mécanismes de tolérance du soi et sont en général multifactorielles. Des facteurs génétiques et environnementaux peuvent prédisposer à l'auto-immunité ou la déclencher (5).

1.1.1. Rupture de la tolérance au soi

Au cours du développement lymphocytaire dans la moelle osseuse et le thymus, une première forme de tolérance centrale est induite, puis une fois que les lymphocytes ont quitté les organes lymphoïdes

primaires, la tolérance induite aux antigènes reconnus est appelée tolérance périphérique (6). Ces divers mécanismes de l'autotolérance agissant dans différents organes et à différents stades de développement sont résumés dans le **Tableau 2**.

Type de tolérance	Mécanisme	Organe	Références
Tolérance centrale	Délétion et révision	Thymus (cellules T) Moelle osseuse (cellules B)	(6, 7)
Ségrégation de l'antigène	Barrière physique	Organes périphériques (ex. thyroïde, pancréas)	(8)
Anergie périphérique	Inactivation cellulaire par faible signalisation sans costimulation	Tissus lymphoïdes secondaires	(9)
Cellules T régulatrices	Suppression par des cytokines et signaux (IL-10, TGF β)	Tissus lymphoïdes secondaires et sites d'inflammation	(10)
Déviations fonctionnelles	Différenciation en lymphocytes T régulateurs	Tissus lymphoïdes secondaires et sites d'inflammation	(10)
Mort cellulaire par activation	Apoptose	Tissu lymphoïde secondaire et sites d'inflammation	(11)

Tableau 2 : Mécanismes de l'autotolérance des antigènes.

Plusieurs niveaux de contrôle de la tolérance sont essentiels en dehors de la tolérance centrale et ceux-ci peuvent tomber en échec et générer l'auto-immunité. Des sites immunologiquement privilégiés comme le cerveau ne déclenchent généralement pas de réponse immunitaire en cas de greffe par exemple. Les autoantigènes de ces sites privilégiés peuvent être reconnus en dehors par les lymphocytes T et induire une réponse de tolérance (12). Cependant, des attaques auto-immunes peuvent être dirigées contre des autoantigènes de ces sites. L'un des exemples les plus révélateurs de ce phénomène est la réponse immunitaire contre la protéine basique de la myéline, composante du cerveau et de la moelle épinière, qui constitue une cible dans la maladie auto-immune nommée la sclérose en plaques (13). Dans certains cas, des lésions causées dans un site privilégié peuvent déclencher une réponse auto-immune.

Également, le maintien de la tolérance par les lymphocytes régulateurs sécrétant des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou le TGF- β permet d'éliminer des lymphocytes spécifiques d'auto-antigène. L'expression du gène *FOXP3* s'avère également essentielle à l'activité régulatrice des lymphocytes. Des polymorphismes dans le gène de *FOXP3* chez l'humain et la souris sont liés au développement d'une auto-immunité systémique (14).

1.1.2. Origines génétiques et environnementales de l'auto-immunité

Les maladies auto-immunes ont, dans l'ensemble, une forte composante génétique. Ces modifications génétiques entraînent des défauts dans la production de cytokines ou dans la signalisation intracellulaire. On distingue notamment des modifications sur des gènes de facteur liés à la présentation de l'antigène (C1qA, C2, C4), la signalisation cellulaire (FCGR2A), l'apoptose (Fas, FasL) ou encore les fonctions des lymphocytes T régulateur (FOXP3) qui confèrent un phénotype de type lupique. Chez l'humain, les études d'association à l'échelle du génome ou (GWAS, *Genome-Wide Association Studies*) ont démontré la prédisposition génétique aux troubles auto-immuns en raison d'un certain nombre de variantes génétiques (15). Plus particulièrement, des polymorphismes d'un seul nucléotide ou SNP (*Single-Nucleotide Polymorphisms*) ont été identifiés et bon nombre d'entre eux sont en lien avec le développement et la fonction des voies immunitaires Th1 et Th17, mais également dans les gènes du CMH (16). Les polymorphismes des gènes du CMH de classe II sont les étudiés dans les maladies auto-immunes (17, 18). Enfin, plusieurs défauts monogéniques de la tolérance immunitaire peuvent suffire pour conduire à des syndromes auto-immuns comme dans le gène *C1q* lié au développement du lupus érythémateux disséminé (LED) (19) ou encore *IL10RA* et *IL10RB* liés au développement des maladies intestinales inflammatoires (20).

Des événements externes à l'organisme sont capables de prédisposer ou déclencher une auto-immunité. Ainsi, la répartition géographique des différentes maladies auto-immunes révèle une hétérogénéité entre différents continents, pays et groupes ethniques (21). Ceci peut être en partie expliqué par le statut socioéconomique et l'alimentation (22). Également, certaines infections virales ou bactériennes créent un environnement favorisant l'auto-immunité (23).

Les réponses auto-immunitaires contre les organes ou les tissus entraînent en général l'activation et la dérégulation d'un autre mécanisme du système immunitaire, à savoir la réponse inflammatoire (24). Dans le cadre de cette thèse, nous mettrons l'accent sur les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'inflammation associés aux maladies auto-immunes.

1.2. La réaction inflammatoire associée aux maladies auto-immunes

Décrite dans la médecine antique, l'inflammation définie par Celsius (26 av.J.-C. – 50 apr.J.-C.) comprend la rougeur (*rubor*), la chaleur (*calor*), la douleur (*dolor*) et le gonflement (*tumor*). Fut ajoutée ensuite la perte de fonction (*functio laesa*) par Galien (130 apr.J.-C. – 210 apr.J.-C.) (25). L'inflammation constitue la première réponse et le mécanisme de défense du système immunitaire à de nombreux stimuli nocifs comme les pathogènes, des signaux endogènes provenant de cellules endommagées, les composés toxiques ou encore l'irradiation (26). Durant une inflammation dites aiguë, les événements cellulaires et moléculaires

agissent pour retirer les stimuli nuisibles ayant initiés l'inflammation et participent également aux processus de réparation des tissus et au rétablissement de l'homéostasie (27). L'inflammation est reconnue comme un facteur déterminant dans diverses pathologies incluant l'athérosclérose, le cancer, l'auto-immunité, ou les maladies liées au vieillissement (28). La réponse inflammatoire est donc l'activation coordonnée de voies de signalisation régulant les niveaux de différents médiateurs inflammatoires et le recrutement de cellules inflammatoires depuis la circulation sanguine (29).

1.2.1. Les cellules de l'inflammation

La réaction inflammatoire est orchestrée à la fois par des cellules qui sont à la fois originaires de l'hématopoïèse (donc présentes dans la circulation sanguine), mais aussi résidentes de différents tissus lymphoïdes ou non lymphoïdes (30, 31). Les cellules d'origine non immunitaire dans les tissus participent également à la réaction inflammatoire comme par exemple les cellules endothéliales ou épithéliales (32, 33).

1.2.1.1. L'hématopoïèse

Chez les mammifères, la production de cellules sanguines commence chez l'embryon par une première vague dans le foie fœtal puis se poursuit dans la région AGM (*Aorta-Gonad-Mesonephros*) et subséquemment dans la moelle osseuse (34). À l'âge adulte, la génération des cellules sanguines se produit dans la moelle osseuse et celles-ci sont constamment renouvelées. Parmi les leucocytes générés, nous distinguons la lignée lymphoïde, la lignée myéloïde et la lignée érythroïde. Ces cellules émanent toutes d'une population de cellules nommées cellules souches hématopoïétiques (CSH ou *HSC*). Les CSH ont la propriété unique de s'autorenouveler, entretenant leur nombre, mais aussi d'être multipotente, donc de se différencier en tous les types de cellules hématopoïétiques (35). La plasticité de ces cellules permet à l'organisme de réagir aux besoins physiologiques, dont la réponse inflammatoire. La **figure 1** présente les différentes possibilités de différenciation des CSH. Les CSH multipotentes à haute capacité d'autorenouvellement évoluent en progéniteurs multipotents (MPP) (36). Puis les MPP se séparent à leurs tours en progéniteurs des différentes lignées, CMP (*Common Myeloid Progenitor*) et GMP (*Granulocyte/Macrophage Progenitor*) pour la lignée myéloïde, MEP (*Megacaryocyte Erythrocyte Progenitor*) pour la lignée érythroïde et CLP (*Common Lymphoid Progenitor*) pour la lignée lymphoïde (37). Ces progéniteurs ont une capacité de prolifération importante et une capacité d'autorenouvellement et multipotence réduite. Chacun de ces progéniteurs va se différencier par la suite à travers différents stades de maturation et les cellules produites deviennent des précurseurs hématopoïétiques. Dans la lignée myéloïde, les GMP génèrent les granulocytes (neutrophiles, basophiles et éosinophiles), les monocytes/macrophages et certaines cellules dendritiques (37).

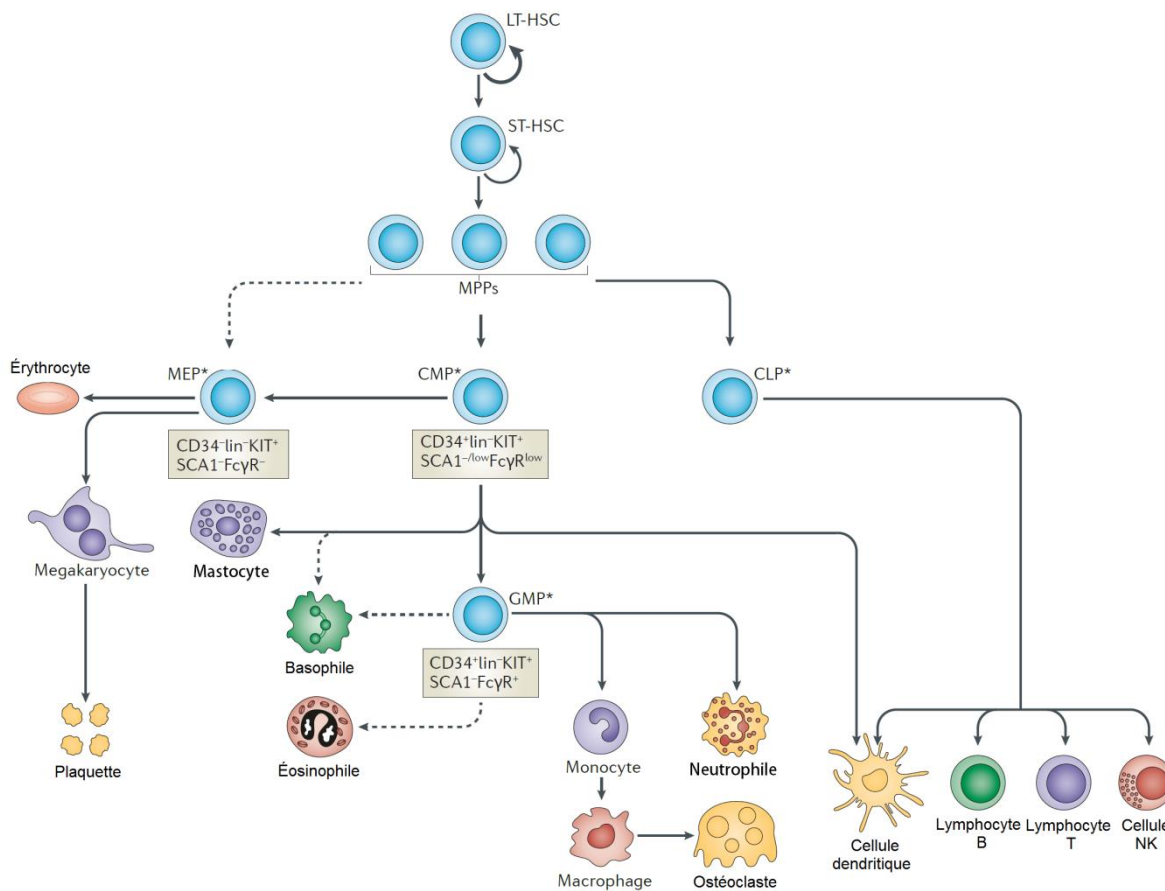


Figure 1 : Représentation simplifiée de l'hématopoïèse. Schéma adapté de la revue de Wand & Wagers de 2011, (37). Cadres gris adjacents aux progéniteurs : Profil phénotypique utilisé pour l'identification chez la souris. NK (Natural Killer), SCA1 (Surface Cell Antigen), LT-HSC (Long Term-HSC), ST-HSC (Short Term-HSC), MPPs (Multi-Potent Progenitor), MEP (Megakaryocytes Erythrocyte Progenitors), CMP (Common Myeloid Progenitor), GMP (Granulocyte/Macrophage progenitor) et CLP (Common Lymphoid Progenitor).

Les progéniteurs hématopoïétiques sont identifiables à l'aide de différents marqueurs exprimés en surface des cellules et détectés par la technique de cytométrie en flux. Chez la souris, les CSH n'expriment pas de marqueurs de lignée (lin-) matures comme les marqueurs de surfaces CD3, B220, CD11b et TER-119. Elles expriment en revanche la glycoprotéine Sca-1 et le récepteur tyrosine kinase c-Kit. Les progéniteurs GMP, CMP et MEP n'expriment pas Sca-1 et sont identifiables par leur expression du CD34 et le récepteur des fragments Fcγ le CD16/32 (38).

1.2.1.2. Les cellules de la lignée myéloïde

Les cellules myéloïdes sont une famille de cellules de l'immunité innée la plus liée à la réponse inflammatoire. Elles amorcent une réponse immunitaire effective et contrôlée qui protège l'hôte (39). Ces cellules sont par définition des leucocytes qui ne sont pas des lymphocytes. Elles sont granulocytaires et phagocytaires et ont la capacité de circuler au travers des tissus via la circulation sanguine (40). Elles sont capables de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) et aux dommages cellulaires (DAMP). De plus, elles initient et amplifient la réponse immunitaire adaptative via la présentation d'antigènes et la production de cytokines. Dans le sang, les monocytes et les granulocytes sont les cellules myéloïdes les plus abondantes. Également dans cette famille, des cellules dendritiques et différentes populations de macrophages, monocytes et cellules polymorphonuclées sont retrouvées dans les tissus solides (41).

1.2.1.2.1. Les neutrophiles

Les neutrophiles représentent la première ligne de défense contre les pathogènes et sont le sous-ensemble de leucocytes le plus abondant chez l'humain, allant de 40 % à 70 % des globules blancs du sang (de 7 % à 8 % chez la souris) (42).

- *Développement du neutrophile*

Les neutrophiles sont générés dans la moelle osseuse via les GMP et notamment sous le contrôle du G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*). La production de neutrophiles ou granulopoïèse est engagée par les myéloblastes. Ces cellules suivent par la suite un processus de maturation incluant les stades de promyélocyte, myélocyte, métamyélocyte, neutrophile non segmenté jusqu'au stade de neutrophile mature (43). Durant son développement, le neutrophile change la forme de son noyau pour une forme lobée, et l'expression de différents récepteurs de surface est modifiée. Les neutrophiles matures contiennent également des granules et vésicules de sécrétions nécessaires à leurs différentes fonctions (44).

- *Circulation du neutrophile*

Dans des conditions d'homéostasie, la majorité des neutrophiles sont stockés dans la moelle osseuse et leur conservation est en fonction de l'expression de deux récepteurs de chimiokines : le CXCR2 et CXCR4 (45). Lors d'une réaction inflammatoire, la présence de G-CSF induit la sortie des neutrophiles vers la circulation sanguine en diminuant l'expression du CXCR4. En dehors de la moelle osseuse, la production de neutrophile est régulée entre autre par l'interleukine 23 (IL-23) produite par les phagocytes et par l'interleukine 17 (IL-17) produite par les lymphocytes T (46, 47). L'IL-17 promeut la granulopoïèse et la libération des

neutrophiles dans la circulation sanguine via le G-CSF (43). Lors d'une réaction inflammatoire, l'IL-1 peut également stimuler la production de neutrophiles via l'axe IL-17/G-CSF, créant une boucle positive de recrutement (48).

Les neutrophiles en circulation dans le sang peuvent être mobilisés dans un tissu infecté ou dans un site inflammatoire par extravasation au travers de l'endothélium des vaisseaux sanguins. Ce processus s'effectue en une cascade d'étapes dans l'ordre suivant : attachement, roulement, adhésion, rampement, transmigration (49). Le recrutement des neutrophiles est initié par le contact avec la surface de l'endothélium activé. L'activation entraîne l'expression de molécules d'adhésion, des sélectines. Une fois à la surface de l'endothélium, ces sélectines vont se lier à leur ligand, les glycoprotéines (49), à la surface des neutrophiles circulants, induisant le roulement sur le vaisseau sanguin. Le neutrophile est ensuite stabilisé par l'adhésion via différentes intégrines fortement exprimées et activées à sa surface. On distingue les intégrines CD11a ou LFA1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) et CD11b ou MAC1 (*Macrophage-1 antigen*) complexées avec le CD18 (49). L'activation du neutrophile par des chimiokines de type CXC comme CXCL1 et CXCL2 augmente l'affinité à leurs ligands respectifs ICAM-1 et ICAM-2 en surface des cellules endothéliales (50). La liaison des intégrines active plusieurs voies de signalisation intracellulaire dans le neutrophile, stabilisant son adhésion et initiant la motilité. L'interaction entre MAC1 et son ligand est ensuite essentielle pour maintenir le neutrophile attaché pendant les étapes de rampement et transmigration. Pour transmigration, le neutrophile traverse avec des processus nécessitant de nouveau l'intégrine MAC1 et des molécules d'adhésion et de jonctions (49). Le neutrophile infiltré peut être soumis à la chimioattraction par des gradients de chimiokines. Il assure de nombreuses fonctions dans les tissus notamment liés à l'inflammation dans différentes maladies auto-immunes comme l'arthrite ou le psoriasis (49).

Les neutrophiles ont une courte durée de vie, bien qu'elle soit toujours sujette à débat. Dans des conditions basales, on considère que la durée de vie des neutrophiles d'environ 12 heures chez la souris et de 5 jours chez l'humain (51). Néanmoins, il est avéré que durant l'inflammation, les neutrophiles activés ont une longévité allongée par rapport à leur état basal (45, 52). En dehors des tissus qui peuvent accueillir les neutrophiles lors d'une réponse inflammatoire, ceux-ci s'accumulent notamment dans le foie, la rate et les poumons dans des conditions physiologiques (45, 53). Les neutrophiles ont aussi la capacité de revenir dans la circulation sanguine après avoir transmigré dans un tissu. Une étude a démontré la présence d'une petite population de neutrophile (1 % à 2 % des neutrophiles circulants) recirculant dans le sang de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (54).

- Fonctions liées à la réaction inflammatoire

Les neutrophiles sont les premières cellules à être recrutés à un site inflammatoire et l'un des acteurs les plus majeurs (31). Dans un tissu infecté, les neutrophiles vont détruire les pathogènes par phagocytose, dégranulation, production de dérivés réactifs de l'oxygène et production de NET (*Neutrophil Extracellular Traps*) (42). Ils expriment pour la reconnaissance un vaste répertoire de PRR (*Pattern recognition receptor*) par exemple les TLR (*Toll-Like Receptor*) (55).

Une fois un pathogène ingéré dans un phagosome, le neutrophile détruit ce pathogène à l'aide de ROS ou de protéines antimicrobiennes (cathepsines, défensines, lactoferrine et lysozyme) (44, 56). Le neutrophile produit des espèces réactives de l'oxygène ou ROS (*Reactive Oxygen Species*) via l'action de l'enzyme NADPH oxydase (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxydase) dans un processus appelé la respiration oxydative (57). Ce processus est une composante importante de l'immunité innée dans la défense contre les pathogènes (58). Les ROS amplifient également les fonctions du neutrophile en activant la dégranulation, induisant la formation de NET et en stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (59, 60). Dans les maladies auto-immunes, l'excès de ROS génère un stress oxydatif qui amplifie l'inflammation, induit l'apoptose et brise les mécanismes de la tolérance immunitaire (61).

Le cytoplasme des neutrophiles est composé en majorité par des granules de quatre types différents. Les granules primaires (azurophilique), secondaires (spécifique), tertiaires (gélatinase) et les vésicules sécrétoires. Ces granules contiennent un mélange d'enzymes antimicrobiennes, d'élastase, de myéloperoxydase, de défensines, et de métalloprotéinases. De nombreux stimuli comme le facteur 5a du complément (C5a), le LPS (lipopolysaccharide), l'IL-8 et fMLP peuvent induire la dégranulation des neutrophiles (62, 63).

En 2004, il a été découvert que les neutrophiles peuvent former des NET. Le NET est formé d'un réseau de chromatine décondensée et décoré de composantes intracellulaires telles que l'élastase, la myéloperoxydase et des DAMP comme HMGB1 (High mobility group protein B1) et S100A8/A9 (64). Les NET sont reconnus antimicrobiennes de par leur capacité à piéger les bactéries, mais cet état du neutrophile est retrouvé dans de nombreuses maladies auto-immunes dont le lupus érythémateux disséminé, l'arthrite rhumatoïde ou le psoriasis (65). Le contenu intracellulaire relâché via les NET participe à la génération des auto-antigènes notamment nucléaires (66).

Dans un contexte inflammatoire, les neutrophiles sont intégrés à l'activation, la régulation et les mécanismes effectifs de l'immunité innée et adaptative (31). La multitude des fonctions qui leur sont attribuées

fait de cette cellule un déterminant majeur dans de nombreuses pathologies. Ainsi, les neutrophiles peuvent attirer d'autres cellules myéloïdes comme les monocytes au site inflammatoire. Des protéines comme le LL37 relâchées par les granules attirent les monocytes (67). Les neutrophiles produisent et sécrètent un incroyable répertoire de cytokines pro-inflammatoires, anti-inflammatoires et immunorégulatrices, de chimiokines, de facteurs de stimulation de colonies et de membres de la superfamille du TNF (68). Lorsque recruté sur le site inflammatoire, le neutrophile est engagé dans des échanges croisés entre les cellules immunitaires et non immunitaires du tissu enflammé. Il peut notamment engager des interactions avec les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules NK, les lymphocytes T et B (56, 69). Les différentes cytokines et chimiokines sécrétées favorisent le recrutement de nouveaux neutrophiles, monocytes et lymphocytes au site inflammatoire. De plus, les neutrophiles ont la capacité de s'infiltrer dans les ganglions lymphatiques où différentes interactions avec les cellules dendritiques peuvent avoir lieu, modulant ainsi la présentation d'antigène (70).

1.2.1.2.2. Les monocytes

Les monocytes font partie d'une famille cellulaire nommée MPS (*Mononuclear Phagocyte System*) qu'ils partagent avec les macrophages et les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) (71). Environ 10 % des leucocytes circulant chez l'humain sont des monocytes et environ 4 % chez la souris. Les monocytes ont la caractéristique d'être recrutés rapidement en grand nombre vers un site inflammatoire où ils développent une forte plasticité de différenciation pouvant induire finalement une réponse autant pro-inflammatoire qu'anti-inflammatoire (72).

- Développement et circulation

Les monocytes sont continuellement générés dans la moelle osseuse depuis les MDP (*Macrophage and Dendritic cell precursor*) via les cMoP (*Common monocyte progenitor*) (**Figure 2**). Leur émergence de la moelle osseuse vers la circulation sanguine est notamment dépendante du CXCR4 et de plusieurs chimiokines (73). Le CXCR4 participe notamment au maintien des monocytes dans la moelle osseuse et la rate. En circulation, les monocytes murins exprimant fortement le marqueur de surface Ly6C (*Lymphocyte antigen 6C*) sont les précurseurs des monocytes exprimant faiblement ce même marqueur (Ly6C^{low}), mais ces deux formes coexistent en permanence et ont des fonctions distinctes (74). Les monocytes Ly6C^{hi} et Ly6C^{low} sont les équivalents des monocytes humains de phénotype CD14⁺ et CD14^{low} CD16⁺ (75, 76). Les monocytes matures Ly6C^{low} patrouillent dans les vaisseaux sanguins à la surface de l'endothélium (77) (**Figure 2**). En revanche, les monocytes Ly6C^{hi} en circulation sont considérés comme les monocytes classiques, avec comme caractéristique d'avoir une demi-vie courte d'environ 20 heures (74, 78). Ce sous-ensemble est recruté aux sites d'inflammation, puis, à la suite de l'extravasation agissent comme précurseurs des phagocytes mononucléaires résidents des tissus (79). Ces monocytes infiltrés ont la capacité de se

différencier en différent type de macrophages ou de cellules dendritiques (**Figure 2**). Cependant, les macrophages et cellules dendritiques dérivées de monocytes diffèrent en matière de phénotypes et fonctions en comparaison avec les cDC (Classical Dendritic cells) et les macrophages résidents des tissus (74, 80, 81). De plus, il a été proposé qu'une partie des monocytes Ly6C^{hi} conserve leur phénotype une fois infiltré dans les tissus et a la capacité de revenir dans la circulation sanguine et transporter des antigènes jusqu'aux ganglions lymphatiques (82).

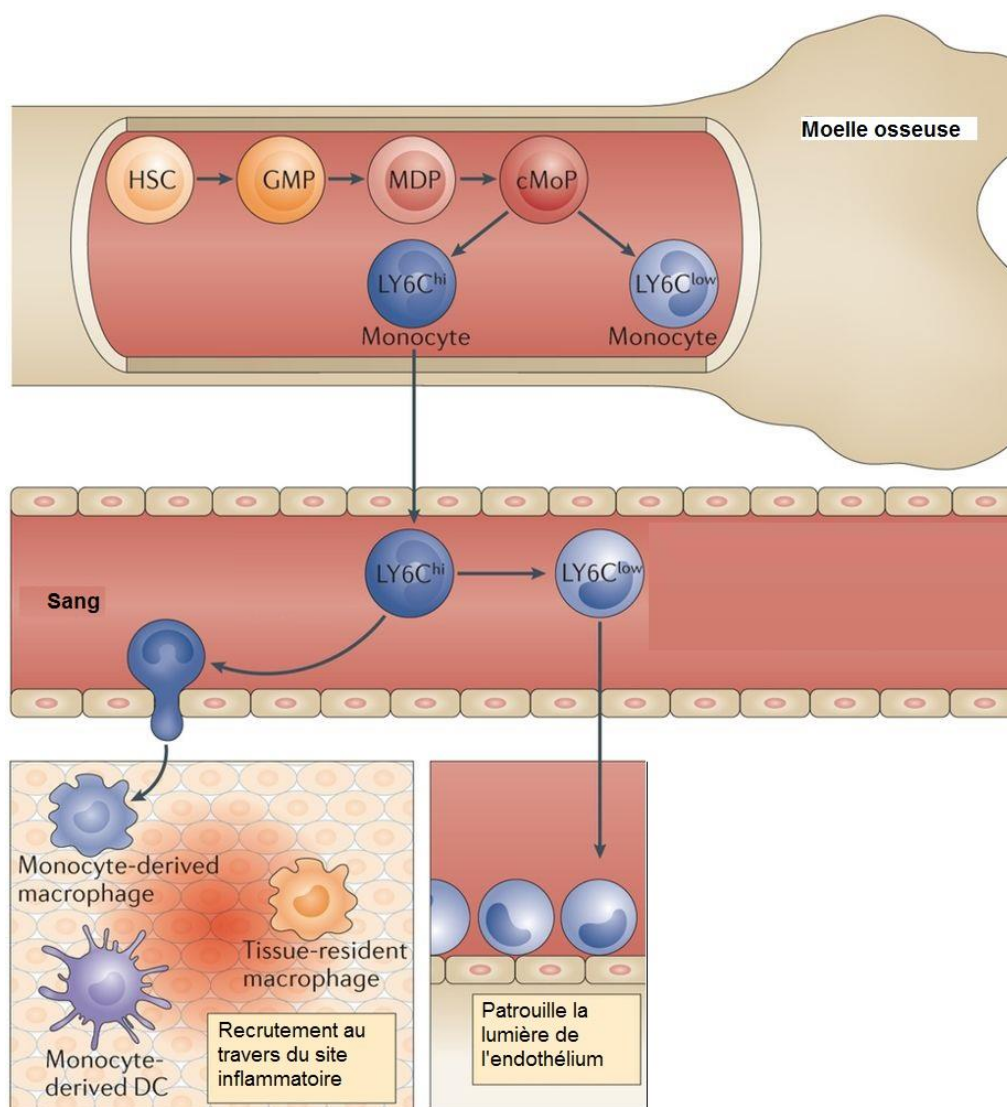


Figure 2 : Le compartiment des monocytes chez la souris. Schéma tiré et adapté de la revue de Ginhoux et Jung, 2014 (83). Les monocytes Ly6C^{hi} et Ly6C^{low} sont générés en continu dans la moelle osseuse et constituent un continuum dans la circulation sanguine où ils exercent des fonctions distinctes.

- Fonctions liées à la réaction inflammatoire

Bien que les monocytes assurent principalement le renouvellement de certaines populations de macrophages, les monocytes Ly6C^{hi} dit « inflammatoires » sont abondamment recrutés au site inflammatoire où ils se différencieront notamment en macrophages. Les macrophages dérivés de monocytes répondent aux stimuli du microenvironnement en entretenant la réponse inflammatoire ou en induisant sa résolution à la suite de leur polarisation (84). Les macrophages sont également des cellules présentatrices d'antigène au côté des lymphocytes B et des cellules dendritiques (41). Malgré la plasticité de ces cellules, deux grandes sous-populations de macrophages sont identifiées : les macrophages inflammatoires dits M1 et les macrophages anti-inflammatoires dits M2. Les macrophages M1 produisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et génèrent de grandes quantités de ROS, tandis que les macrophages M2 produisent de grandes quantités de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF- β (85). Les macrophages inflammatoires sont reliés à la pathogenèse de nombreuses maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques ou encore les maladies inflammatoires de l'intestin (85). Dans ces maladies, les macrophages sont une source importante de plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, IL-18, IL-1 β , IL-23 ou le TNF qui jouent un rôle clef dans le maintien de l'inflammation liée à l'auto-immunité (86). Chez la souris, les macrophages sont facilement identifiables en raison de leur expression du récepteur F4/80 (un récepteur couplé aux protéines G) (87).

In vitro, les macrophages peuvent être générés à partir des cellules de moelle osseuse en présence de GM-CSF (*Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor*) ou de M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*). La différenciation avec du GM-CSF, produit un phénotype de macrophage M1 et avec du M-CSF, un phénotype de macrophage M2. De plus, en réponse au LPS et au fMLP, les macrophages différenciés avec M-CSF produisent une plus grande quantité d'acide arachidonique (AA) et expriment plus fortement le CD14 qui est lié à la signalisation des TLR2 et 4 (88, 89).

Les monocytes matures et les macrophages participent à l'équilibre du développement osseux en se différenciant en ostéoclaste (90). Les ostéoclastes sont des cellules de type syncytial c'est-à-dire possédant plusieurs noyaux issus de la fusion de plusieurs cellules. Ces cellules possèdent une activité de résorption osseuse qui est un mécanisme essentiel pour entretenir une masse osseuse optimale et une homéostasie minérale. Les ostéoclastes sont générés de concert avec les ostéocytes (forme mature des ostéoblastes) chargés de la formation du tissu osseux. La différenciation en ostéoclaste est activée par RANKL (*Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*) en présence de M-CSF (91). Les ostéoclastes produisent de nombreux facteurs dégradant la matrice osseuse parmi lesquels nous retrouvons des sécrétions acides et des

enzymes protéolytiques comme la cathepsine K, des MMP (metalloprotéinase) et aussi la phosphatase acide tartrate-résistante (*TRAP*) (92).

- Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques, découvertes dans les années 1970 par Ralf Steinmann, qui fut lauréat du Prix Nobel pour cette découverte (93), ont des fonctions associées à l'immunité innée et adaptative et assurent le lien entre ces deux immunités grâce à la présentation d'antigène (94). En présence de signaux inflammatoires, les cellules dendritiques peuvent polariser les lymphocytes T naïfs en différents types de lymphocytes effecteurs pro-inflammatoires que nous aborderons plus tard dans ce chapitre (95). Dans les maladies auto-immunes, les cellules dendritiques présentent des auto-antigènes et peuvent entretenir la réponse immunitaire contre les tissus touchés via le mécanisme dit ES (*Epitope Spreading*) qui correspond à la diversification et l'augmentation des épitopes à partir d'un unique épitope (96).

Les cellules dendritiques comptent différentes sous-familles qui ont toutes comme origine les MDP (*Monocyte/Macrophage and Dendritic cell Progenitor*) (97). Les MDP se différencient ensuite en CDP (*Common Dendritic Cell Progenitor*) qui génère à leur tour les précurseurs de sous-catégorie de DC, les pDC (*plasmacytoid Dendritic Cell*) et les cDC (*conventional DC*) (98). Ces précurseurs migrent de la moelle osseuse jusqu'aux tissus où le microenvironnement local influence la différenciation. Elles diffèrent notamment dans leur phénotype, leurs fonctions et dans leurs facteurs de transcription selon qu'elles migrent dans les muqueuses ou les tissus non muqueux (81). La sous-famille des cDC se distingue en deux types : les cDC1 exprimant le CD8 et le CD103 et les cDC2 exprimant le CD4 et le CD11b. On distingue les cDC par leur dépendance à des facteurs de transcription comme IRF8 pour les cDC1 et IRF4 pour les cDC2 (99). Ensuite, les DC CD11b⁺ sont connus notamment pour induire les lymphocytes T auxiliaires 2 (Th2) et 17 (Th17) via la sécrétion d'IL-6 et IL-23 (100, 101). Elles expriment également de nombreux PRR comme les TLR 5, 6, 7, 9 et 13. Les DC CD103⁺ ont quant à eux un rôle important dans la reconnaissance des antigènes viraux, car ils expriment le TLR 3, mais aussi les TLR 4, 11 et 13 (102). De plus, de nombreuses études ont démontré chez la souris que les DC CD103⁺ ont un rôle important dans la maintenance immunitaire et l'induction de la tolérance dans la peau, prévenant ainsi l'auto-immunité en induisant la polarisation des lymphocytes T naïfs en T régulateurs via la sécrétion de TGF- β et acide rétinoïque (103).

Les monocytes Ly-6C^{hi} peuvent aussi se différencier en cellules dendritiques et elles se distinguent des cDC CD103⁺ et des cDC CD11b⁺ (71). Ces cellules ont une plus grande plasticité et partagent de nombreuses fonctions communes au cDC (71). Lors d'une réaction inflammatoire, les cellules dendritiques dérivées de monocytes ou moDC se caractérisent d'une façon simplifiée par l'expression de l'intégrine α X

(CD11c), du complexe d'histocompatibilité de classe II (CHM-II) et du CD11b. De plus, elles expriment fortement le CD64 et le Ly6C (*Lymphocyte Antigen 6C*) de façon variable (104). Le développement des monocytes en moDC est dépendant du CSF-1R (*Colony Stimulating Factor-1 receptor*), mais pas du GM-CSFR (*Granulocyte and Macrophage – Colony Stimulating Factor Receptor*) (105). Ces cellules sont pro-inflammatoires dans les maladies auto-immunes chez l'humain. Dans l'arthrite rhumatoïde, les moDC activent les lymphocytes T mémoire et induisent la polarisation en Th17 (106). Également, un autre type de moDC retrouvé dans les lésions psoriasiques, les SLAN⁺ DC exprimant le 6-sulfo LacNAc (SLAN), produisent du TNF et de l'iNOS et dirigent également la polarisation en Th17 (107).

In vitro, les cellules dendritiques peuvent être générées en présence de différentes cytokines et facteur de croissance (108). On distingue le GM-CSF qui induit le développement et l'homéostasie des phagocytes mononucléaires (109, 110). Les cellules dendritiques formées ou BMDC (*Bone Marrow-derived Dendritic Cells*) se caractérisent par l'expression du CD11c et CMHII. L'origine ontogénique de ces cellules semble être majoritairement les monocytes Ly6C⁺ plutôt que les CDP (108). De nombreuses études ajoutent l'IL-4 au GM-CSF pour la production de BMDC (111). Cette méthode génère un mélange hétérogène de BMDC majoritairement originaire des cMoP mais aussi des CDP (112). De plus, les gènes exprimés par ces cellules correspondent aux cellules dendritiques migratoires (112, 113). Une autre molécule, le ligand de tyrosine kinase 3 de type FMS ou FLT3-L permet le développement des cDC et pDC *in vitro* à partir des CDP et pré-cDC (108). Les études montrent que les cellules dendritiques générées *in vitro* sont hétérogènes et dépendantes des facteurs présents dans les cultures (114).

1.3. La réponse des lymphocytes T effecteurs associée aux maladies auto-immunes

Les lymphocytes T naïfs concentrés dans les ganglions lymphatiques sont sensibilisés par les cellules présentatrices d'antigène et cette sensibilisation dépend d'une combinaison de cytokines spécifiant vers quelle lignée le lymphocyte va se différencier (115). Les lymphocytes T auxiliaires ou Th (*T helper*) expriment le CD4 et produisent des cytokines qui activent les cellules de l'immunité innée, les cellules stromales mésenchymateuses et les cellules épithéliales (116).

À ce jour, 5 grands types de lymphocytes T effecteurs ont été identifiés, présentés dans la **figure 3**. On distingue tout d'abord les Th1 et Th2, les premiers découverts en 1986 (117). Sous l'action de l'IFN- γ et de l'IL-12, les lymphocytes T naïfs forment des Th1 qui sont producteurs principalement d'IFN- γ et de TNF et jouent un rôle important dans la défense contre les bactéries intracellulaires et les virus, mais aussi dans la pathogenèse des maladies auto-immunes (118). L'IL-4 favorise le développement en Th2, producteur d'IL-4, IL-5 et IL-13. Ces cellules sont liées à la réponse contre l'infection à l'helminthe et aux allergies (119). Le

développement des Th1 est contrôlé par le facteur de transcription T-bet tandis que le facteur GATA-3 contrôle le développement des Th2 (120, 121). Ensuite, les lymphocytes Th17 ont été identifiés en 2005 (122). Les Th17 se différencient sous le contrôle du TGF- β , de l'IL-6, de l'IL-1 β et de l'IL-23 et sécrètent de nombreuses cytokines dont les cytokines de la famille de l'IL-17 comme l'IL-17A et IL-17F, de l'IL-22 et du GM-CSF. Ces cellules ont des fonctions cruciales dans l'homéostasie des muqueuses notamment dans le tractus gastro-intestinal et les voies respiratoires. Les lymphocytes Th17 résidents de ces tissus interagissent avec les bactéries commensales et maintiennent l'homéostasie et se distinguent des lymphocytes Th17 inflammatoires qui se différencient en réponse à des pathogènes (123). La transcription dans les Th17 inflammatoires peut être contrôlée par le facteur de transcription ROR γ , mais la littérature démontre que ces cellules ont une certaine plasticité et peuvent par exemple co-exprimer de l'IFN- γ et se différencier en Th1 ou dans un autre phénotype de Th (124). Dans certaines conditions, les lymphocytes T naïfs peuvent se différencier en lymphocyte T folliculaire via l'IL-6 sécrétée par les cellules dendritiques. L'expression de CXCR5 dirige le lymphocyte T folliculaire à la bordure des follicules de lymphocytes B et sécrète notamment de l'IL-21 favorisant la production d'anticorps des lymphocytes B (125). Enfin, la stimulation par le TGF- β et l'IL-2 oriente les lymphocytes T naïfs vers un phénotype de lymphocytes T régulateur (Treg). Les Treg sont une famille hétérogène avec des fonctions suppressives permettant la tolérance aux antigènes du soi, non toxiques ou non pathologiques, et aussi la prévention des maladies auto-immunes. On distingue les Treg générés dans le thymus qualifié de Treg naturels et les Treg différenciés dans les organes périphériques à partir des lymphocytes T naïfs que l'on nomme Treg induit (iTreg). Le facteur de transcription FOXP3 promeut la différenciation des Treg (126).

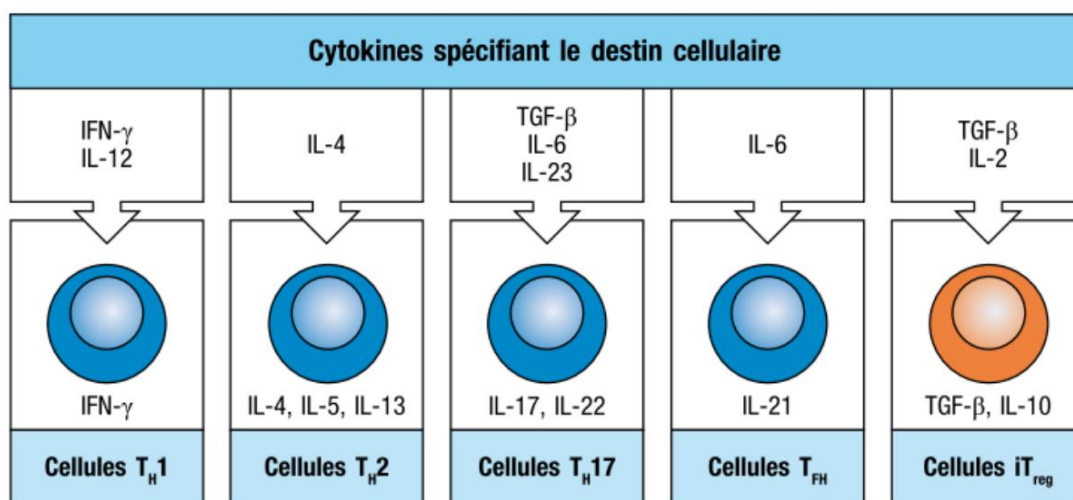


Figure 3 : Cytokines contrôlant la différenciation des lymphocytes T effecteurs et sécrétées par les différentes classes. Schéma tiré de Murphy, Kenneth (2018) (12)

Les lymphocytes effecteurs différenciés se divisent lors de l'expansion clonale et migrent des ganglions lymphatiques jusqu'à la circulation sanguine pour rejoindre le site inflammatoire (127). Les Th17 et Th1 ont été identifiés pathogéniques dans plusieurs maladies incluant l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, la sclérose en plaque ou la maladie de Crohn (116). Également, la plasticité des lymphocytes Th17 a été découverte récemment dans différentes maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (128-130). Au site inflammatoire, ces lymphocytes évoluent vers un phénotype de lymphocyte Th1 producteurs d'IFN- γ et perdent la production d'IL-17. Ces lymphocytes Th1 dit « non classiques » sont peu sensibles à la suppression par les lymphocytes Treg (130). De nouveaux phénotypes de lymphocytes T effecteurs pathogéniques ont été identifiés grâce à de nouvelles méthodes d'analyse des phénotypes comme la cytométrie de masse qui permet d'analyser un plus grand nombre de marqueurs de surface à la fois. Cette méthode met en lumière l'incroyable hétérogénéité des populations de lymphocytes effecteurs et leur spécificité (131).

Ainsi, la réaction inflammatoire associée aux maladies auto-immunes dépend majoritairement d'une réponse coordonnée entre les différentes cellules myéloïdes, les lymphocytes T effecteurs et leurs interactions avec les cellules résidentes des tissus concernés. Dans cette thèse, nous limiterons l'attention sur l'arthrite rhumatoïde et le psoriasis qui sont deux maladies auto-immunes de forte incidence. Deux modèles murins de ces maladies ont été utilisés dans les articles attachés à ce manuscrit.

1.4. L'arthrite rhumatoïde

1.4.1. Généralité et épidémiologie

L'arthrite rhumatoïde est une maladie chronique inflammatoire et auto-immunitaire, fréquemment progressive qui atteint principalement les articulations et ayant comme conséquences la dégradation des articulations et un déficit musculo-squelettique (132). Cette maladie fut décrite par Augustin Jacob Landré-Beauvais en 1800 (133) et se caractérise également par de nombreuses manifestations extra-articulaires comme les nodules, des vascularites et une comorbidité systémique comme des maladies cardiovasculaire, de l'ostéoporose ou encore la dépression (134). L'arthrite rhumatoïde affecte 0,24 % de la population mondiale (135) et l'incidence est plus forte dans les pays industrialisés et les zones urbaines (136, 137). Au Québec, l'arthrite rhumatoïde touche 0,8 % de la population et la prévalence est forte chez les femmes que les hommes dans toutes les tranches d'âge concernées (138). La présence d'arthrite chez un membre antérieur de la famille augmente le risque de développer l'arthrite rhumatoïde de 3 à 5 fois (137). De plus, les taux de concordance chez les jumeaux sont augmentés ce qui suggère un rôle de facteurs génétiques dans la pathogenèse de cette maladie (139). L'arthrite rhumatoïde est toujours un fardeau socio-économique majeur avec notamment des coûts médicaux majeurs, des conséquences douloureuses sur l'état psychologique et la

capacité à être actif (140). C'est une maladie auto-immune et la réactivité des cellules du système immunitaire contre les cellules articulaires joue un rôle central dans sa physiopathologie (132). Également, la maladie est associée à une inflammation systémique qui est un des phénomènes importants dans le développement et la progression des symptômes (141).

1.4.2. Symptômes

L'arthrite rhumatoïde se caractérise comme une affection polyarticulaire symétrique où les personnes atteintes présentent de la douleur et des gonflements aux articulations des mains et des pieds (142). Le gonflement se retrouve principalement aux poignets, aux articulations métacarpo-phalangienne et métatarsophalangienne et à l'articulation interphalangienne. À cela s'accompagne le développement de raideur matinale des articulations qui peuvent durer jusqu'à plusieurs heures (142). Les symptômes peuvent également se développer aux articulations plus larges comme les chevilles, les genoux, les coudes et épaules (142). L'érosion osseuse se développe tôt dans la maladie, elle affecte 80 % des patients dès la première année après le diagnostic et est associée à une augmentation de l'inflammation (143, 144).

Les patient(e)s arthritiques peuvent être affecté(e)s par une comorbidité multiple comme le développement de maladies cardiovasculaires incluant l'infarctus du myocarde, des accidents vasculaires cérébraux et de l'insuffisance cardiaque qui sont la cause principale de mortalité des personnes arthritiques (145). L'inflammation associée à l'arthrite affecte le cerveau par la fatigue, et d'autres organes comme le foie, les poumons (132).

1.4.3. Étiologie

L'arthrite rhumatoïde est une maladie multifactorielle dont l'étiologie reste inconnue. L'interaction entre l'environnement et le génotype est un facteur déterminant dans le déclenchement de la maladie (141).

1.4.3.1. Génétique

Des études d'association pangénomique utilisant les polymorphismes nucléotidiques ont identifié plus d'une centaine de loci associés avec un risque de développer l'arthrite rhumatoïde, la plupart étant liés aux mécanismes immunitaires et également partagés avec d'autres maladies inflammatoires chroniques comme le psoriasis (132, 146). Le risque de développer l'arthrite rhumatoïde est associé aux allèles HLA-DRB1 : HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*01 et HLA-DRB1*10. Chacun de ces épitopes contient une séquence conservée de 5 acides aminés nommée SE (*Shared Epitope*) ou épitope partagé dans la région hypervariable de la chaîne DRB1 du CMH de classe II qui est associée avec un risque de développer l'arthrite rhumatoïde (147, 148). Cependant, certains haplotypes sont associés avec une arthrite plus agressive, érosive et un risque accru de mortalité (149).

D'autres loci génétiques contribuent avec une moindre intensité au développement de l'arthrite. Ces loci altèrent par exemple les voies de co-stimulation des lymphocytes T et B (CD40, CD28), les cytokines (IL-2, IL-6R) ou l'activation de l'immunité innée (132). La présence d'épitopes partagés chez les patient(e)s est liée à la séropositivité pour les auto-anticorps contre les peptides citrulinés (ACPA) et les anticorps contre les immunoglobulines de type G (IgG) appelés aussi facteur rhumatoïde (RF). La séropositivité pour ces auto-anticorps est recherchée pour diagnostiquer les patient(e)s (150, 151).

1.4.3.2. Épigénétique

Une étude récente d'association épigénomique a identifié 10 positions de méthylation qui peuvent augmenter le risque d'arthrite rhumatoïde (152). De plus, l'altération de l'acétylation des histones et de la méthylation de l'ADN peut réguler les processus biologiques des fibroblastes synoviaux et des leucocytes (153).

Également, de nombreux micro-ARN sont associés à la pathogenèse de l'arthrite rhumatoïde. Les micro-ARN ciblent l'ARN messager et contrôlent leur dégradation, ce qui a pour conséquence de contrôler la réponse cellulaire (154). Plusieurs micro-ARN régulant les lymphocytes, macrophages et fibroblastes synoviaux ont été identifiés comme par exemple miR155 qui augmente la génération de lymphocytes T et B autoréactifs dans le modèle d'arthrite induite par le collagène chez la souris (155).

1.4.3.3. Facteurs environnementaux et interaction avec le microbiome

De nombreux facteurs environnementaux peuvent influencer le développement de l'arthrite rhumatoïde. Particulièrement, le tabagisme et plus largement l'hygiène de vie associée au contexte socio-économique sont des facteurs à risque (156, 157).

Également, plusieurs études montrent un lien entre l'arthrite rhumatoïde et les maladies parodontales, mais plusieurs hypothèses subsistent quant à la causalité de ce lien (158). Notamment, la présence de *Porphyromonas gingivalis* dans la parodontite augmenterait la citrullination des protéines et provoquerait une rupture de la tolérance immunitaire (159). D'autres agents infectieux comme *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* et le virus d'Epstein-Barr (VEB) sont suspectés d'être lié au développement de l'arthrite rhumatoïde (160). Également, des études du microbiome chez l'humain ont montré un lien entre la dysbiose intestinale et l'arthrite rhumatoïde notamment aux prémices de la maladie (161).

1.4.4. Mécanismes immunologiques

La pathophysiologie de l'arthrite rhumatoïde est hétérogène et se caractérise initialement par la perte de la tolérance immunitaire, la génération d'une réponse immunitaire associée à réponse inflammatoire chronique (132). Dans des conditions physiologiques de remodelage osseux, l'activité ostéoblastique et ostéoclastique est équilibrée. L'inflammation liée à l'arthrite crée un déséquilibre en faveur de la dégradation osseuse médiée par les ostéoclastes présents en forte quantité dans la membrane synoviale (162).

1.4.4.1. Immunité adaptative

Tout d'abord, la génération de complexes immuns d'ACPA et la liaison dans certains cas de facteurs rhumatoïdes peuvent entraîner une hyper activation du complément (163-165). Les ACPA peuvent être d'isotype IgG, IgM ou IgA (166) et dirigées contre différentes protéines du soi comme la vimentine, la fibronectine, le fibrinogène, les histones ou le collagène de type II (167). Les lymphocytes B autoréactifs producteurs d'ACPA sont présents dans le liquide synovial et en circulation et les ACPA peuvent être pathogéniques en activant les macrophages ou les ostéoclastes (168, 169). Les macrophages peuvent être activés par la liaison de l'antigène aux TLR ou aux récepteurs des fragments Fc des immunoglobulines (170). La présence du facteur rhumatoïde renforce la réponse inflammatoire et la destruction des tissus (170).

Le gonflement des articulations dans l'arthrite rhumatoïde reflète l'inflammation de la membrane synoviale. L'inflammation dans la membrane synoviale se caractérise par l'infiltration de leucocytes (**Figure 4**). Lors de la réponse inflammatoire arthritique, la membrane synoviale est infiltrée par des cellules de l'immunité innée (neutrophiles, monocytes/macrophages, cellules dendritiques, mastocytes et cellules lymphoïdes innées) et de l'immunité adaptative (notamment lymphocyte Th1 et Th17, lymphocytes B et plasmocytes).

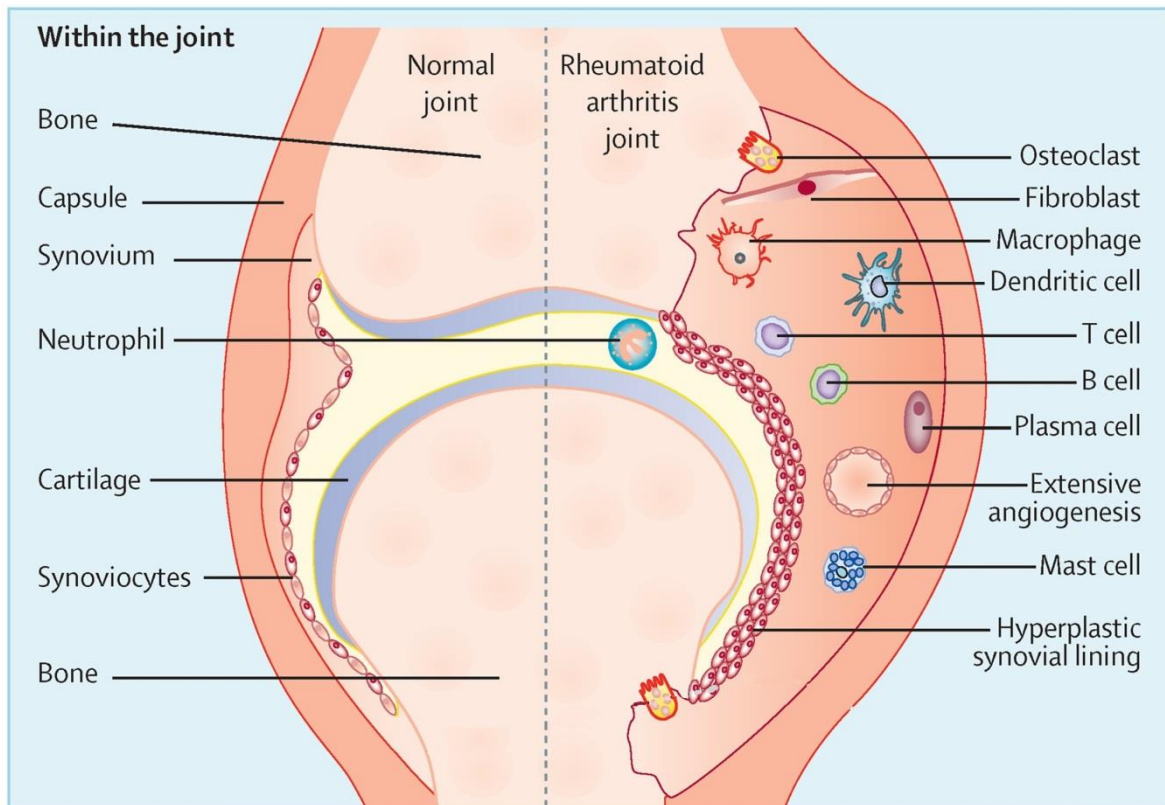


Figure 4 : Physiopathogénèse de l'arthrite rhumatoïde. Schéma tiré et adapté de Smolen MD, 2016 (132).

À cela, s'ajoute une réponse inflammatoire tissulaire orchestrée par les fibroblastes synoviaux, les chondrocytes et les ostéoclastes lesquels favorisant la dégradation du cartilage et du tissu osseux respectivement.

L'inflammation au travers du compartiment synovial est régulée par un complexe réseau de cytokines et chimiokines. On distingue notamment le TNF, l'IL-6 et l'IL-1 β . Ces facteurs peuvent induire ou aggraver la réponse inflammatoire dans le tissu et contribuent à l'activation des cellules endothéliales ce qui a pour conséquence l'attraction de monocytes, neutrophiles et lymphocytes au sein du tissu synovial (171). La membrane synoviale dans l'arthrite rhumatoïde contient un nombre abondant en cellules myéloïdes et de cellules dendritiques exprimant des cytokines (IL-12, IL-15, IL-18 et IL-23), des molécules HLA de classe II et les molécules de co-stimulations nécessaires à l'activation des lymphocytes T et la présentation d'antigènes. Dans les ganglions lymphatiques et les centres germinaux synoviaux, l'inflammation conduit à la polarisation de lymphocytes T naïfs en Th1 et Th17. La production de TGF- β , d'IL-1 β , IL-6 et IL-23 par les macrophages et cellules dendritiques favorisent le développement des Th17 et suppriment la différenciation des Treg (171). Malgré la présence de lymphocytes T régulateurs exprimant FOXP3 chez les patient(e)s arthritiques, ceux-ci

ont une activité inhibée par le TNF et l'IL-17 (172). De plus, une forte communication entre les lymphocytes T et B est observée dans la membrane synoviale au travers d'agrégats et entretient la réponse adaptative (173).

1.4.4.2. Immunité innée

La présence de monocytes/macrophages dans la membrane synoviale joue un rôle important dans le maintien de la réponse inflammatoire. Les macrophages sous l'activation de différents récepteurs TLR et NLR par de nombreuses PAMP et DAMP sécrètent un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-6, IL-1, IL-12, IL-23) et des ROS en plus de phagocyter et présenter des antigènes (174) ce qui suggère donc un phénotype M1. Les macrophages sont également activés par des cytokines (IFN- γ , IL-17), les complexes immuns et l'interaction avec les lymphocytes T (175).

Dans les articulations, les neutrophiles sont principalement localisés dans le liquide synovial. Ils produisent et sécrètent notamment des prostaglandines, des protéases, des DAMP et des ROS. De plus, ils expriment RANK et son ligand RANK-L et peuvent avoir la capacité d'induire directement la résorption osseuse via l'expression de plusieurs enzymes comme la cathepsine (176).

La stimulation des chondrocytes, cellules du cartilage d'origine mésenchymateuse, par des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 ou le TNF génère des effets cataboliques dans le cartilage induisant sa dégradation (177). L'IL-1 et le TNF suppriment également la synthèse de la matrice du cartilage et induisent la synthèse de plusieurs MMP ainsi que la production de médiateurs inflammatoires comme l'oxyde nitrique (NO) et la PGE₂ (178).

La présence de macrophages inflammatoires et l'infiltration de monocytes dans la membrane synoviale constituent un réservoir de cellules pour la formation d'ostéoclaste (90). Les cytokines M-CSF et RANKL en concentration importante dans la membrane synoviale induisent la différenciation des ostéoclastes et leur invasion de l'articulation à partir des monocytes/macrophages, cellules dendritiques (179). Également, le TNF, l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-17 amplifient la différenciation et l'activation des ostéoclastes en activant l'expression de RANKL (180) (**Tableau 3**). De plus, les lymphocytes T activés plus particulièrement les lymphocytes Th17 et les fibroblastes synoviaux sont une source alternative de RANKL et participent à l'ostéoclastogénèse que l'on observe chez l'humain et dans les modèles murins (181, 182). Les ostéoclastes s'adhèrent aux protéines de la matrice osseuse, sécrètent des protéinases et génèrent un micro-environnement acide qui dégrade les tissus minéralisés du cartilage et de l'os et génèrent des trous de résorption qui sont infiltrés par des cellules inflammatoires (180). Dans les formes sévères d'arthrite, l'inflammation du tissu synovial peut atteindre la moelle osseuse et provoque l'infiltration d'agrégats de lymphocytes B amplifiant potentiellement la réponse auto-immune (183).

Cytokine	Effets sur les ostéoclastes	Effets sur les ostéoblastes
RANKL	Activation et différenciation	Inhibe la différenciation
TNF	Stimule la différenciation des précurseurs des ostéoclastes; synergie avec RANKL Augmente le nombre de précurseurs d'ostéoclastes exprimant le CD11b	Inhibe la différenciation Induit l'expression de RANKL et du M-CSF Induit l'apoptose
IL-1(α et β)	Augmente l'ostéoclastogénèse avec le TNF Réduit l'apoptose des ostéoclastes	IL-1 α : inhibe la différenciation in vitro IL-1 β : inhibe la synthèse de collagène d'os in vitro
IL-6	Stimule la différenciation	Stimule la différenciation
IL-17	Augmente l'ostéoclastogénèse et induit RANKL et RANK	Augmente l'expression d'IL-6 avec le TNF Augmente l'expression de RANKL in vitro

Tableau 3 : Effets des principales cytokines pro-inflammatoires dans la membrane synoviale sur les ostéoclastes et ostéoblastes. Adapté de Dulshara et al., 2018 (184) et Karmakar et al., 2011 (162).

1.4.5. Traitements

La cible privilégiée des stratégies de traitement de l'arthrite rhumatoïde est son inflammation qui comme nous l'avons vu génère les symptômes cliniques, les dégâts aux articulations et la comorbidité associée (185). La stratégie thérapeutique comporte plusieurs volets. On définit les traitements de fond comme étant des DMARD (*Disease-modifying anti-rheumatic drugs*) qui ciblent l'inflammation et doivent réduire la progression des dommages aux tissus (142).

Nous distinguons tout d'abord les traitements de première ligne comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens (acétylsalicylate et ibuprofène) mais ceux-ci ne diminuent pas les dégâts aux articulations (132). Les glucocorticoïdes peuvent être également utilisés en première ligne (186).

Ensuite, les traitements de fond avec des DMARD sont les plus utilisés. Ils doivent commencer en général par l'administration d'une DMARD synthétique conventionnelle comme le méthotrexate accompagnée d'une faible dose de glucocorticoïdes (187). Le méthotrexate est un antimétabolite inhibiteur du métabolisme de l'acide folique utilisé dans le traitement de certains cancers, mais dont l'un des mécanismes majeurs dans l'arthrite rhumatoïde est l'inhibition du métabolisme des purines (188). Les glucocorticoïdes sont des anti-inflammatoires stéroïdiens qui offrent des effets rapides de modification des symptômes et de la maladie

(189). Il existe la cortisone et le cortisol comme glucocorticoïdes naturels et d'autres composés synthétiques comme le prednisone (190). Si les stratégies de traitement avec le méthotrexate sont inefficaces d'autres DMARD conventionnels synthétiques peuvent être utilisés en remplacement du méthotrexate ou en combinaison comme : sulfasalazine, leflunomide ou l'hydroxychloroquine (aux propriétés antimalariales) (191).

Lorsque les premières lignes de traitements n'apportent peu ou pas d'améliorations des symptômes, plusieurs options de thérapies biologiques ont été approuvées pour l'arthrite rhumatoïde (132). Ces traitements ont des cibles variées (**Tableau 4**).

Effet biologique	Nom	Type moléculaire
Inhibiteur du TNF	Adalimumab	Anticorps monoclonal humain
	Certolizumab pegol	Fragment Fab d'un anticorps monoclonal humain
	Etanercept	Protéine de fusion (IgG-Fc-récepteur)
	Golimumab	Anticorps monoclonal humain
	Infliximab	Anticorps monoclonal chimérique
Anti-CD20	Rituximab	Anticorps monoclonal chimérique
Inhibiteur de la co-stimulation des lymphocytes T	Abatacept	Protéine de fusion (IgG-Fc-récepteur)
Anti-IL-6R	Tocilizumab	Anticorps monoclonal humain

Tableau 4 : Traitements biologiques utilisés pour l'arthrite rhumatoïde. Tableau adapté de la revue de Smolen et al. 2016, (132)

Enfin, des DMARD synthétiques comme les inhibiteurs des JAK (*Janus Kinase*) montrent une efficacité similaire à certains traitements biologiques quand associés au méthotrexate (192). En 2019, l'upadacitinib qui est un inhibiteur sélectif de la JAK-1 produit par AbbVie a été approuvé pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde (193).

1.4.6. Modèles murins de l'arthrite rhumatoïde

Ils existent des modèles d'arthrite rhumatoïde dans différentes espèces animales, mais les rongeurs sont utilisés le plus souvent (141). Chez la souris, on distingue deux types de modèles à savoir les modèles induits et les modèles génétiques. L'arthrite rhumatoïde peut être induite par l'injection de différents antigènes (collagène de type II, albumine bovine, ovalbumine, protéoglycane) ou des adjuvants (adjuvant de Freund, pristane) (194). Certaines modifications génétiques chez la souris induisent le développement d'arthrite spontanée. Ces souris sont en général déficientes ou transgéniques pour des gènes d'intérêts (195). Parmi les

modèles les plus utilisés on recense les souris K/BxN (196), les souris transgéniques pour le TNF α humain (197) ou encore les souris déficientes pour l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 β (198).

L'arthrite induite par le collagène de type II chez la souris est un des modèles les plus étudiés (194). La méthode consiste en l'immunisation de souris de génotype susceptible (DBA/1, B10.Q, et B10.RIII DBA/1) avec du collagène de type II émulsifié dans l'adjuvant de Freund. Les premiers signes cliniques de la maladie apparaissent une vingtaine de jours plus tard. De façon semblable à l'humain, on peut observer une inflammation du liquide synovial, une destruction du cartilage et une érosion osseuse (199). La méthode peut également être améliorée par l'injection de LPS qui accélère le développement de la maladie et une meilleure synchronisation des symptômes cliniques (200, 201). Cependant ce modèle possède plusieurs limites. L'arthrite induite par le collagène demeure un modèle aigu possédant une phase de rémission. De plus l'inflammation dans les articulations est très dépendante des lymphocytes Th17 dans ce modèle tandis que dans la pathogénèse de l'arthrite chez l'humain, les lymphocytes Th1 et Th17 participent à l'inflammation et ces cellules ont une forte plasticité (202-204).

1.5. Le psoriasis

1.5.1. Généralité et épidémiologie

Le psoriasis est maladie inflammatoire chronique et auto-immunitaire qui se manifeste dans la peau et aussi dans les articulations ou les deux associées. Lorsque les articulations sont touchées, on définit la maladie comme l'arthrite psoriasique, qui touche 30% des patient(e)s atteint(e)s de psoriasis (205, 206). Le psoriasis est associé à un véritable fardeau physique et psychologique (207). En 2013, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) considère le psoriasis comme un problème de santé majeur et global (208). La prévalence du psoriasis en Amérique-du-Nord et en Europe est d'environ 2 % avec une prévalence maximale en Norvège de 8,5 % (209). Du point de vue du genre, la prévalence semble similaire chez les hommes et les femmes, mais une étude montre que le psoriasis semble se développer plus précocement chez les femmes (210). Le psoriasis peut se développer à n'importe quelle tranche d'âge et se subdivise en deux types. Le type 1 décrit les cas de psoriasis se développant avant l'âge de 40 ans et représente 70 % des cas. Le type 2 représente les cas tardifs démarrant au-delà de 40 ans et dont le pic est entre 57 et 60 ans (211). Également, le psoriasis est commun chez les enfants, la prévalence allant de 0.5 à 2.0 % selon les études (212). Le psoriasis est une maladie multiforme parmi laquelle cinq types sont observés : le psoriasis *vulgaris* (ou psoriasis en plaque) qui constitue la forme la plus commune de la maladie dans 90 % des cas, le psoriasis en gouttes, le psoriasis inversé, le psoriasis pustuleux et le psoriasis érythrodermique (207). Le psoriasis érythrodermique est une forme rare et la complication la plus sévère de la maladie (213).

Les personnes atteintes de psoriasis ont un risque fort de développer d'autres maladies notamment chroniques. La comorbidité inclut l'arthrite psoriasique, le syndrome métabolique, des maladies cardiovasculaires ainsi que de l'anxiété et de la dépression (214).

1.5.2. Symptômes et diagnostic

Le symptôme caractéristique du psoriasis en plaque est la formation de plaques rouges couvertes de squames blanchâtres. Ces plaques peuvent varier en nombre et en taille, et peuvent s'étendre sur de large surface. Le psoriasis peut atteindre n'importe quelle zone de la peau, mais plusieurs sites de prédilection sont identifiés comme les coudes et avant-bras, les régions périombilicale et périanale ainsi que les régions rétroauriculaires et le scalp (207). Dans environ 50 % des cas de psoriasis, les symptômes peuvent apparaître sous les ongles des mains et des pieds et 90 % des personnes développant l'arthrite psoriasique ont des symptômes aux ongles (215).

Le diagnostic s'effectue sur la base des observations cliniques, les biopsies de peau sont rarement utilisées pour le diagnostic. Les observations cliniques sont le plus souvent rassemblées sous le score PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*) qui quantifie l'érythème, l'infiltration ou l'épaisseur, l'écaillage de la peau et l'extension des lésions (216). Il existe aussi des scores plus récents et plus simples comme le PGA (*Psoriasis Global Assessment*) et le LS-PGA (*Lattice System-physician's global assessment*) (217).

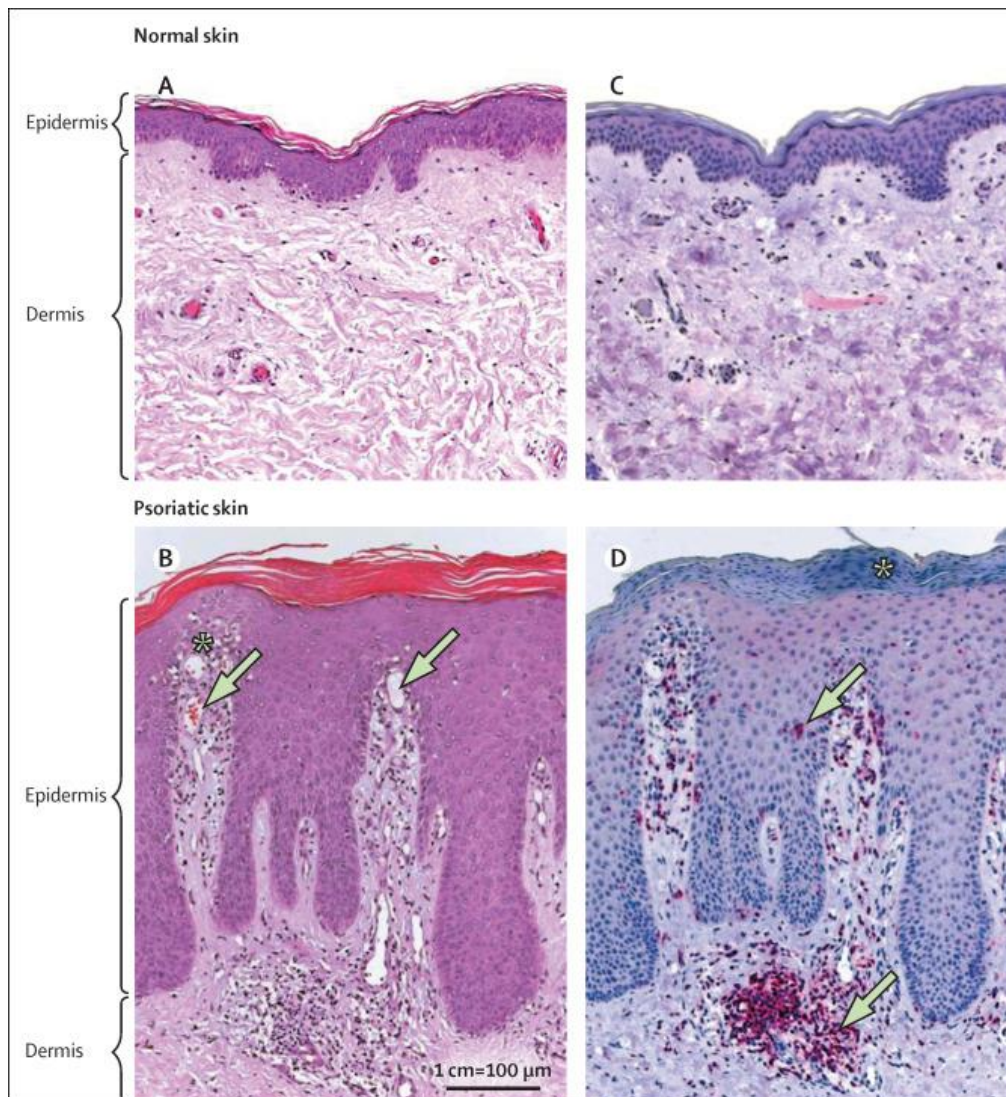


Figure 5 : Caractéristiques histopathologiques du psoriasis. Schéma tiré de la revue de Boehncke et Schön, 2015. (207) A & B : coloration à l'hématoxyline et éosine de coupes transversales de peaux de sujets sain et psoriasique. * : accumulation de leucocytes dans l'épiderme. Flèches : dilation des vaisseaux sanguins. C & D : Détection du marqueur CD3 par immunohistochimie dans des coupes transversales de peaux de sujets sain et psoriasique. * : présence de noyaux cellulaires. Flèches : présence de cellules CD3⁺ dans le derme et l'épiderme.

L'observation de biopsies colorées de peaux de patient(e)s psoriasiques montre de nombreuses caractéristiques histopathologiques dans les différents types cellulaires de la peau (**Figure 5**) (207). En comparaison avec une peau saine, la peau psoriasique présente un épaissement de couches viables de l'épiderme (nommée l'acanthose), un épaissement de la couche cornée de l'épiderme (l'hyperkératose), ainsi que la présence de noyau cellulaire dans la couche cornée (parakératose) et la perte de la couche

granuleuse. Également, on observe un l'allongement des crêtes formées par l'épiderme basal au travers du derme. Le développement des kératinocytes se trouve également altéré. Les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme prolifèrent puis s'organisent en différentes couches représentant différents stades de différenciation. Ces différents stades de différenciation se caractérisent notamment par l'expression spécifique de plusieurs dizaines de kératines différentes. Leurs expressions sont contrôlées notamment par la concentration intracellulaire en calcium (218). L'épiderme psoriasique présente une différenciation altérée des kératinocytes. Les kératinocytes en hyper prolifération expriment fortement les kératines 6, 16 et 17 (219). Dans le derme psoriasique, on distingue une augmentation du nombre de vaisseaux sanguins et de leur dilation. De plus, il y a une importante infiltration de leucocytes au travers du derme et de l'épiderme. L'accumulation de leucocytes au travers de l'épiderme peut prendre la forme de microabcès de Munro et ceux-ci sont majoritairement composés de neutrophiles (220).

1.5.3.Étiologie

1.5.3.1. Facteurs génétiques

Les études sur les populations ont montré une forte incidence du psoriasis chez la première et deuxième génération de parenté avec les patient(e)s par rapport à la population générale (221). De plus, les taux de concordances chez les jumeaux monozygotes sont trois fois plus importants que chez les jumeaux hétérozygotes suggérant un rôle important du facteur génétique dans la maladie (221). Les formes les plus sévères de la maladie corrélerent avec un historique familial positif alors que les formes moins sévères sont plus souvent liées à une absence d'historique familial (222). Plusieurs loci putatifs de susceptibilité ont été identifié pour le psoriasis chez l'humain. L'allèle le plus concerné est le HLA-Cw6 sur le locus PSOR1 (Psoriasis susceptibility locus 1) dans le chromosome 6p retrouvé dans presque 50% des psoriasis héréditaires (223, 224). De plus, une dizaine de loci (PSOR1 à PSOR10) ont été identifié comme étant des régions de susceptibilité au psoriasis (225). Les gènes compris dans ces loci sont pour la plupart connectés aux voies de pathogenèse du psoriasis et jouent un rôle central dans l'immunité innée et acquise (226). On distingue notamment les gènes codant pour les calgranulines S100A8 et S100A9 dans le loci PSOR4 du chromosome 1p21 (227).

Les études d'associations de génomes ont identifié 41 loci génétiques associés au psoriasis (225). On retrouve notamment dans ces loci les gènes de NF- κ B, du TNF et de l'axe IL-23/Th17 et beaucoup de ces gènes sont liés à d'autres processus auto-immuns (225).

1.5.3.2. Facteurs infectieux

Également, le psoriasis goutteux est souvent précédé d'une infection aux streptocoques dans le tractus respiratoire supérieur. Des études ont montré la similarité entre certaines protéines des streptocoques et des antigènes de kératinocytes ce qui pourrait expliquer le déclenchement du psoriasis par l'infection (228). De plus un tiers des enfants développant le psoriasis goutteux vont développer du psoriasis en plaque plus tard dans leur vie (229). D'autres infections au *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ou au VPH (Virus du papillome humain) peuvent conduire au déclenchement du psoriasis (230).

1.5.3.3. Autres facteurs déclencheurs

Le psoriasis peut être déclenché par différents éléments non spécifiques comme des traumatismes locaux (égratignure, perçage, tatouage), les rayons ultraviolets, une irritation chimique, les périodes de stress, la consommation excessive d'alcool et de tabac (231). Des médicaments systémiques comme les β -bloquants, le lithium, les antipaludéens ou des anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent exacerber la maladie (232). Il est montré que les patients infectés par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humain) et qui ont un psoriasis préexistant vont développer des poussées de lésions complexes à traiter (230).

1.5.4. Mécanismes immunologiques

Initialement considéré comme un dysfonctionnement de la barrière cutanée, le psoriasis est avant tout une altération du système immunitaire. Le psoriasis est présenté comme une maladie associée aux lymphocytes T avec une forte interaction entre les cellules de l'immunité innée et adaptative (231).

La pathogenèse peut notamment démarrer par l'activation des cellules dendritiques de l'immunité innée. Dans les plaques psoriasiques, les cellules dendritiques du derme (**Figure 6**) d'origine principalement myéloïde sont présentes en quantité importante (233). Plusieurs études ont proposé par quels mécanismes les cellules dendritiques initieraient la réponse immunitaire liée au psoriasis. Ces études suggèrent que les kératinocytes activés et les neutrophiles en NETose produisent le peptide antimicrobien LL-37 qui a la capacité de se lier avec les ARN et ADN du soi (234-236). Dans des conditions d'homéostasie, les ADN et ARN du soi ne sont pas directement reconnus par les cellules dendritiques, de par la présence de nucléases qui dégradent l'ADN et les TLR reconnaissant les acides nucléiques sont localisés dans des endosomes non exposés aux acides nucléiques. Le peptide LL-37, forme clivée et active de la protéine cathélicidine, se lie à l'ADN et ARN et permet leur diffusion au travers de la membrane des cellules dendritiques et ces complexes stimulent respectivement le TLR9 et TLR7/TLR8 (236).

De plus, une étude récente a identifié des auto-anticorps dans les sérums de patient(e)s atteint(e)s de psoriasis et d'arthrite psoriasique (237, 238) soulignant ainsi le caractère auto-immunitaire du psoriasis. Deux de ces auto-anticorps sont de type IgG et dirigés contre les protéines LL-37 et ADAMTS-L5.

Également, les kératinocytes peuvent être une source de néo-lipides via la PLA₂ (Phospholipase A₂) qui est fortement exprimée dans les lésions psoriasiques. Les autoantigènes lipidiques sont présentés par les cellules de Langerhans de l'épiderme via le CD1a à des lymphocytes T réactifs au CD1a (239). Les cellules de Langerhans sont principalement retrouvées dans l'épiderme et s'auto-renouvellent. L'activation des kératinocytes environnant altère les fonctions de ces cellules en favorisant leur migration dans le derme, la sécrétion d'IL-23 et de chimiokines et la présentation d'antigènes (240). Un autre type de cellules dendritiques, les pDC (*plasmacytoid dendritic cells*) présentent dans le derme, mais absentes dans la peau saine peuvent être activées par les complexes de LL-37-ADN/ARN et produisent de l'IFN- α , ce qui a pour conséquence d'activer notamment les cellules dendritiques résidentes du derme (241). Les cellules dendritiques activées dans la peau produisent de nombreuses cytokines donc l'IL-12 et l'IL-23 (242). L'IL-12 promeut l'expansion des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th1 producteur d'IFN- γ et du TNF. L'IL-23 induit l'expansion des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th17 producteur d'IL-17 et d'IL-22. De plus, d'autres types de cellules dendritiques entretiennent la chronicité de l'activation des lymphocytes T auxiliaires. L'infiltration de monocytes au travers de la peau génère des cellules dendritiques d'origine myéloïde ainsi que des macrophages pro-inflammatoires (243-245).

Les Th17 sont les cellules pro-inflammatoires au centre de l'immunopathogenèse du psoriasis (**Figure 6**). Ces cellules produisent de l'IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26, IL-6, IL-21, du TNF et de l'IFN- γ (242). Des récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-17 sont retrouvés à la surface des kératinocytes (246). Les homodimères d'IL-17A et IL-17F partagent approximativement 50% de leur structure protéique (247).

L'ensemble de ces processus à savoir l'activation des cellules dendritiques, la polarisation des lymphocytes T et la sécrétion de cytokines ainsi que l'activation des kératinocytes constitue une boucle dans laquelle les facteurs produits par les kératinocytes agissent à leur tour en activant les cellules dendritiques et créés une boucle inflammatoire autoalimentée (246).

D'autres cellules de l'immunité innée et adaptative viennent alimenter cette boucle inflammatoire (**Figure 6**). Les kératinocytes activés induisent le recrutement de neutrophiles au travers de l'épiderme chez les patients psoriasiques notamment via la sécrétion des chimiokines CXCL1 et CXCL8 (248). Les granulocytes neutrophiles, en plus de libérer et sécréter de nombreux médiateurs pro-inflammatoires sont

également producteurs d'IL-17A dans l'épiderme et ils perpétuent l'activation des kératinocytes (249). D'autres cellules comme les macrophages, les lymphocytes T CD8⁺ et des cellules T Natural Killer (NK T cells) infiltrent le derme et sécrètent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires affectant l'activation des kératinocytes, des fibroblastes et des cellules immunitaires infiltrantes (243, 250-252).

Enfin, les kératinocytes activés sont une importante source de facteurs angiogéniques comme le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) favorisant le développement de capillaires dans le derme et *in fine* l'infiltration de leucocytes (253).

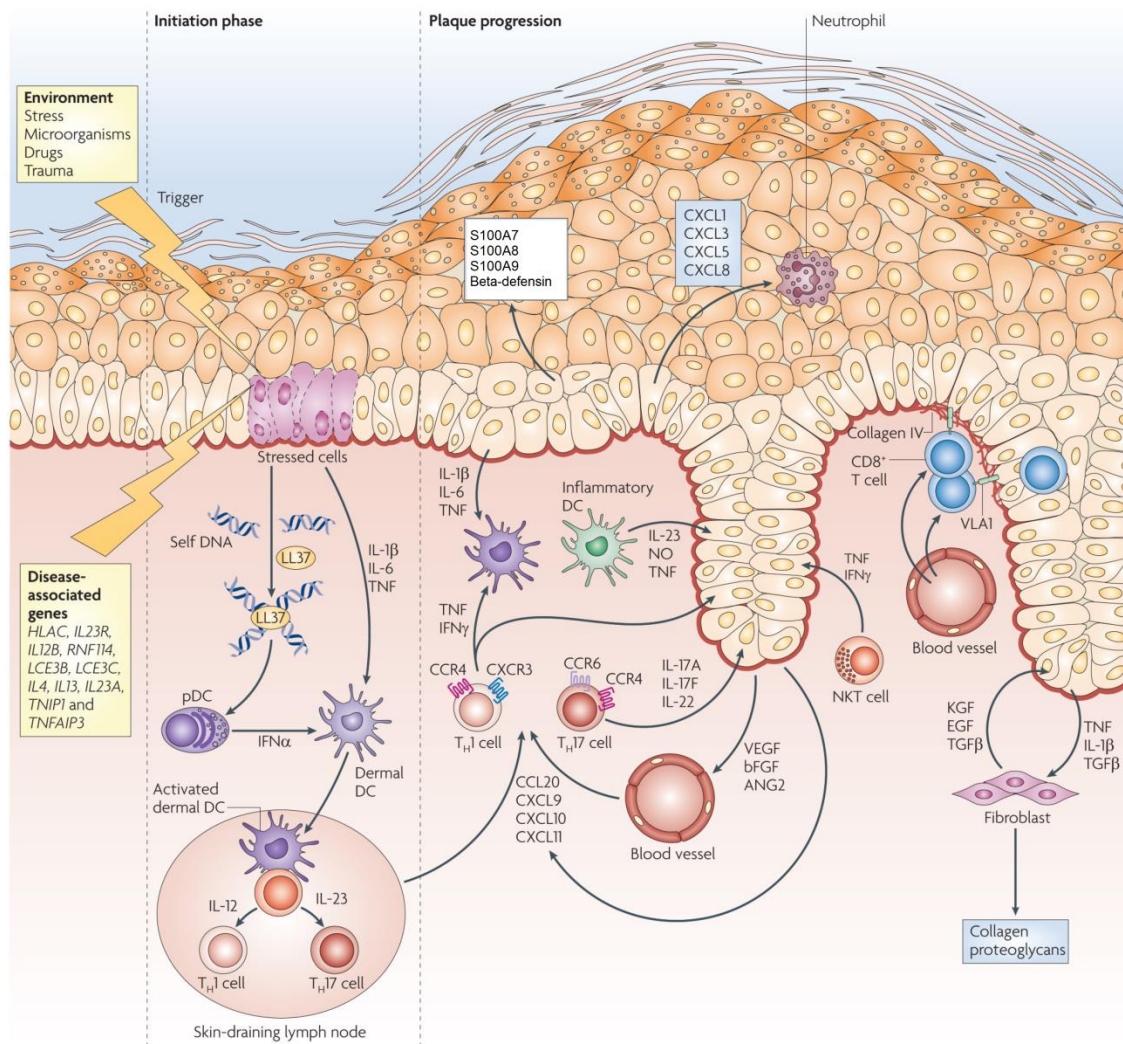


Figure 6 : Immunopathogénèse du psoriasis. Schéma tiré de la revue de Nestle et al., 2009, (254).

1.5.5. Traitements

Environ 70 à 80 % des patient(e)s ont un psoriasis dont les symptômes sont modérés et ces symptômes peuvent être contrôlés par la prescription de thérapies topiques (255) comme des glucocorticoïdes et des dérivés de la vitamine D seuls ou en combinaison (256).

Également, une combinaison de photothérapie et d'un traitement systémique est utilisée pour les personnes souffrantes de forme modérée à sévère de psoriasis. La photothérapie consiste à irradier la peau avec soit des rayons UVB à spectre étroit ou sinon engager une photochimiothérapie nommée PUVA. La thérapie PUVA est une administration d'une molécule phototoxique le psoralens suivi d'une exposition aux rayons UVA (256). Ce traitement aux rayons UVA est limité dans le temps à cause du potentiel carcinogène des rayons. Les thérapies systémiques pour le traitement du psoriasis incluent aussi les antimétabolites comme le méthotrexate, des immunosuppresseurs comme la ciclosporine, ou encore des dérivés de la vitamine A comme l'acitrétine (256). Également, un autre immunosuppresseur, l'apremilast, a été récemment autorisé aux États-Unis et en Europe pour le traitement de l'arthrite psoriasique et le traitement du psoriasis modéré à sévère (257).

Plusieurs thérapies biologiques sont utilisées dans le traitement des formes sévères de psoriasis et quand plusieurs options de thérapies systémiques ou la photothérapie échouent (256). Ces thérapies ciblent plusieurs cytokines clefs de la boucle inflammatoire liée au psoriasis comme le TNF, l'IL12 et l'IL-23 ainsi que l'IL-17A (**Figure 7**). Les inhibiteurs du TNF comme l'etanercept, adalimumab et infliximab sont approuvés pour le traitement du psoriasis et de l'arthrite psoriasique. Le golimumab est utilisé pour l'arthrite psoriasique. L'ustekinumab est un anticorps bloquant l'IL-12 et l'IL-23, altérant ainsi le développement des lymphocytes Th17. Enfin, le secukinumab est le premier anticorps ciblant l'IL-17A utilisé en biothérapie pour le psoriasis. Un autre anticorps ciblant l'IL-17A, l'ixekizumab est aussi utilisé et également le brodalumab qui est un anticorps ciblant le récepteur de l'IL-17A (258). Les traitements biologiques peuvent être également utilisés au long terme et ne présentent pas de toxicité. Ces traitements peuvent cependant augmenter légèrement les risques d'infections opportunistes chez les personnes traitées (207).

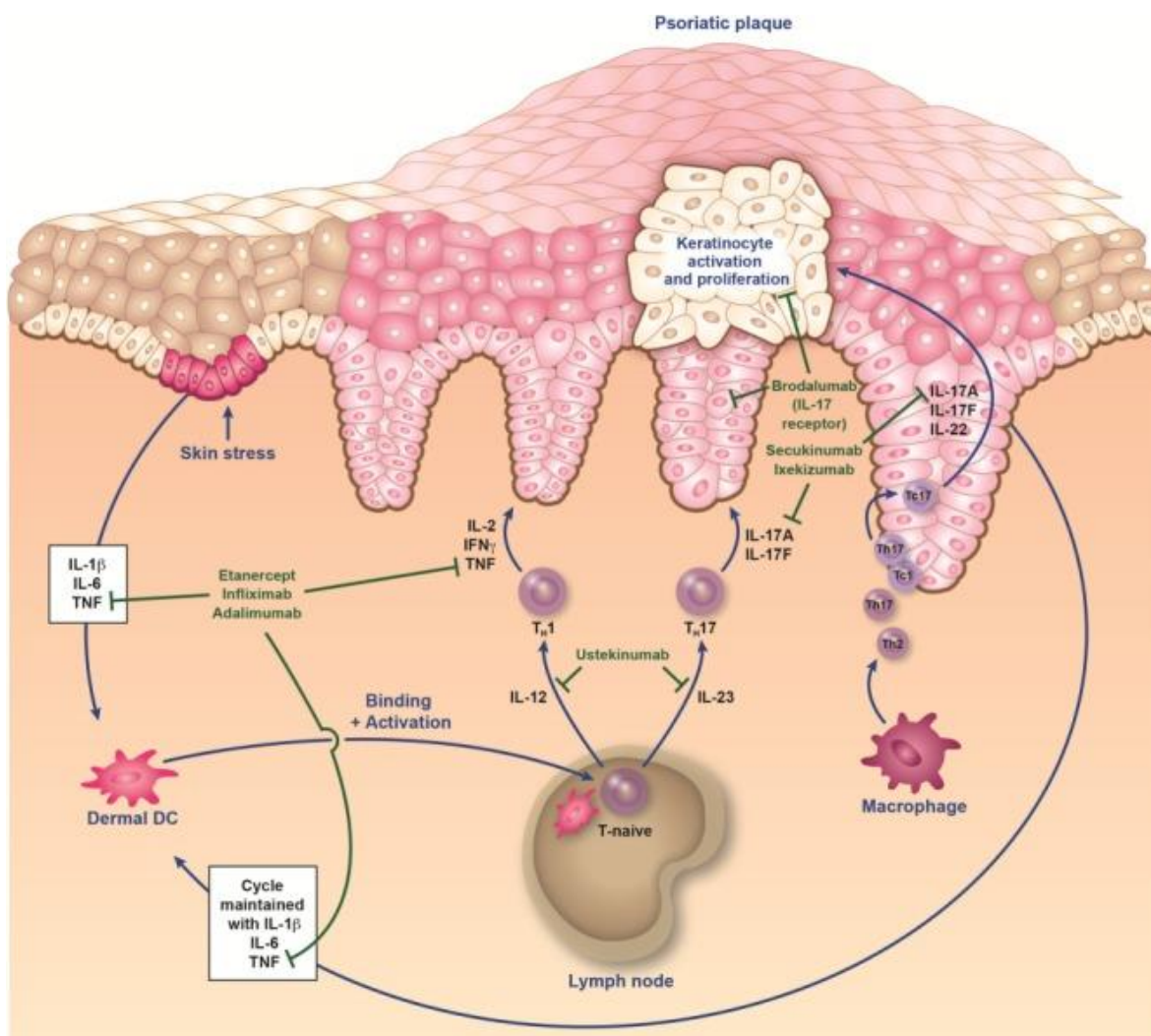


Figure 7 : Site d'action des thérapies biologiques du psoriasis. Schéma tiré de la revue de Gaspari et Tying, 2015, (258).

1.5.6. Modèles murins du psoriasis

Différents modèles murins ont été développés pour l'étude du psoriasis. Plusieurs types de modèles existent incluant des souris déficientes, des transgènes ou encore des modèles de reconstitutions. L'ensemble des modèles reproduisent en général les caractéristiques du psoriasis comme l'hyperplasie de l'épiderme, une forte vascularisation de la peau et une forte réponse immunitaire (259). Une étude des profils transcriptionnels dans la peau de différents modèles a identifié cinq modèles les plus représentatifs (260). On distingue 4 modèles de transgènes (K5.Stat3C, K14-amphiregulin, K5.Tie2, K5.TGF-β1) et un modèle inducible, le psoriasis induit par l'imiquimod (IMI). Le modèle de psoriasis induit par l'IMI est la méthode la plus utilisée dans les études précliniques sur le psoriasis (259). Dans ce modèle, l'application quotidienne d'une crème contenant de l'IMI sur la peau de souris induit une réponse inflammatoire localisée avec les traits

caractéristiques du psoriasis observés chez l'humain (261-265). L'IMI est un ligand du TLR7 et TLR8 et un activateur du système immunitaire (261). Bien que la crème contenant de l'imiquimod génère une réponse inflammatoire localisée dans la peau, une étude a récemment montré que l'application journalière sur la peau de la crème contenant de l'imiquimod génère une réponse inflammatoire systémique et plus tardivement au bout de quelques jours dans le cerveau (266).

2. La famille des protéines S100

2.1. Généralités sur les protéines S100

Les premiers membres des protéines S100 ont été découverts par Moore and McGregor en 1965 lors d'une étude d'identification de protéines spécifiques du système nerveux. Les protéines identifiées sont solubles dans une solution saturée à 100% en sulfate d'ammonium à pH neutre ce qui leur a valu le nom de S100 (267, 268). Il a été ensuite déterminé que les protéines isolées sont en réalité un mélange de deux membres de cette famille à savoir S100A1 et S100B et que l'expression de ces protéines n'est pas restreinte au cerveau (269-271). Également, il a été trouvé que ces protéines possèdent deux motifs de liaison au calcium de type EF-Hand (*Elongation Factor-Hand*) (269, 270). Depuis cette période, plus de vingt protéines S100 ont été détectées. Toutes ont une taille moléculaire comprise entre 10 et 14 kDa et ne se retrouvent que chez les vertébrés (272). Le profil d'expression de ces protéines peut être spécifique à certaines espèces, tissus, certains types cellulaires ou au cycle cellulaire. Elles possèdent une multitude de fonctions intracellulaires et extracellulaires dont certaines restent controversées. De plus, certaines de ces protéines peuvent former des structures complexes (273-275).

Chez l'humain, un cluster d'environ 2 mégabases dans le chromosome 1q21 appelé complexe de différenciation épidermique (ECD, *Epidermal Complex Differentiation*) contient au moins 16 gènes de la famille S100 qui sont annotés de S100A1 à S100A16 cependant S100A7A est absent chez l'humain. Les autres gènes en dehors de ce cluster sont annotés avec une seule lettre (S100B, S100G, S100P, S100Z) (**Tableau 5**). Chez la souris, les gènes codants pour les protéines S100 se localisent sur le chromosome 3f2. Les gènes codants pour S100A7, S100A7L2, S100A7L3, S100A12 ainsi que S100P sont absents chez la souris (**Tableau 5**). Enfin, l'organisation des gènes des S100 sur les chromosomes humains et murins est similaire (275).

	Humain	Souris
S100A1	X	X
S100A2	X	X
S100A3	X	X
S100A4	X	X
S100A5	X	X
S100A6	X	X
S100A7A	-	X
S100A7	X	-
S100A7L2	X	-
S100A7L3	X	-
S100A8	X	X
S100A9	X	X
S100A10	X	X
S100A11	X	X
S100A12	X	-
S10013	X	X
S100A14	X	X
S100A16	X	X
S100B	X	X
S100G	X	X
S100P	X	-
S100Z	X	X

Tableau 5 : Membres de la famille des protéines S100 chez l'humain et la souris. Tableau adapté de Zimmer, Eubanks, Ramakrishnan, and Criscitiello. 2013 (276). X, présent dans les contigs génomiques; -, absence du gène.

2.2. Structure des protéines S100

La structure des monomères de protéines S100 est composée de deux domaines EF-Hand constitués d'une hélice-boucle-hélice et ces deux domaines sont reliés par une région charnière flexible (**Figure 8**). Le domaine N-terminal contient l'hélice I et II et est connecté par une boucle dite atypique différente du motif EF-Hand habituel. Ce motif EF-Hand « non-classique » de 14 acides aminés possède 2 acides aminés supplémentaires comparés au domaine classique. Cette différence structurale dans le motif EF-Hand est caractéristique des protéines S100 et confère une plus faible affinité au calcium ($K_d \approx 200-500$ nM) comparé à la forme classique. Le domaine C-terminal (Hélice III-Boucle-Hélice IV) contient un motif EF-Hand classique possédant une plus forte affinité pour le calcium ($K_d \approx 10-50$ nM) (277). Lorsque les ions Ca^{2+} se lient aux EF-Hand, il y a rotation de l'hélice III, libérant ainsi une zone hydrophobique qui s'avère nécessaire aux interactions avec des protéines cibles (278).

L'homologie de séquence la plus forte chez les protéines S100 se retrouve dans les domaines de liaison des ions Ca^{2+} , cependant la région charnière et l'extension en C-terminal présentent la moins forte homologie de séquence. Cette variabilité suggère un rôle sur l'attribution d'activité biologique individuelle aux protéines S100 (279). Les protéines S100 sont également capables de lier des ions bivalents d'autres métaux comme les ions Zn^{2+} (280), Cu^{2+} (281), Mn^{2+} (282), Ni^{2+} (283).

Enfin ces protéines dimériques sont capables de former dans certains cas des oligomères (284, 285). Cet état d'oligomérisation suscite un intérêt majeur notamment en neurobiologie (286) et en immunologie (287).

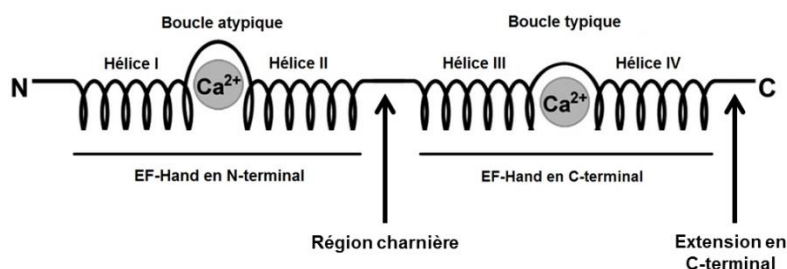


Figure 8 : Représentation schématique de la structure secondaire des protéines S100. Adapté de Ji *et al.*, 2014, (277).

2.3. Fonctions des protéines S100

Les protéines S100 ont en général des fonctions aussi bien intracellulaires qu'extracellulaires. De par leur capacité à lier les ions Ca^{2+} , les protéines S100 participent tout d'abord à l'homéostasie du calcium au niveau intracellulaire (288). Également de nombreuses fonctions liées à la prolifération cellulaire (289), la différenciation cellulaire (289-291), l'apoptose (292), le métabolisme énergétique (274), la migration cellulaire (289) ont été identifiées. Par exemple, la protéine S100B régule la différenciation et la prolifération des myoblastes (290). La protéine S100A6 limite l'apoptose des cellules musculaires cardiaques induite par le TNF (293). Certaines protéines S100 comme S100A8 et S100A9 sont sécrétées ou relâchées et régulent des fonctions cellulaires d'une manière autocrine et paracrine *via* l'interaction avec des récepteurs comme le TLR4 (*Toll-Like receptor 4*) (294). Les protéines S100 peuvent interagir avec de nombreux types de cibles protéiques incluant des enzymes comme des kinases (295), des sous-unités du cytosquelette comme les microtubules et les filaments intermédiaires (296, 297), des récepteurs (298-301), des facteurs de transcriptions comme p53 (291, 302) ou encore la chromatine des kératinocytes (303).

Plus généralement, de nombreuses fonctions des protéines S100 sont associées à de multiples maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (304), le syndrome métabolique (305, 306) et de nombreux cancers comme le cancer du sein, de la prostate, colorectal, du cerveau ou encore les leucémies myéloïdes aiguës (307).

Les protéines S100 comme S100A8 et S100A9 sont enfin liées à un nombre important de maladies inflammatoires (notamment l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, la maladie de Crohn) (308, 309) et sont utilisées en clinique comme des biomarqueurs (310-312). Cette thèse est consacrée exclusivement à l'étude des protéines S100A8 et S100A9.

3. Les protéines S100A8 et S100A9

3.1. La sous-famille des calgranulines

Les calgranulines sont une sous-famille des protéines S100 appelées également MRP pour « *Myeloid-Related Protein* » nommées pour leur expression majoritairement observée chez les cellules myéloïdes de type granulocytaire. Cette sous-famille contient chez l'humain S100A8 (calgranulin A, MRP-8), S100A9 (calgranulin-B, MRP-14) et S100A12 (calgranulin C, MRP-6 ou *extracellular newly identified RAGE binding protein* (EN-RAGE)) et chez la souris seulement S100A8 et S100A9 sont retrouvées. Les gènes de S100A8 et S100A9 sont regroupés et ce rassemblement est conservé entre l'humain et la souris (**Figure 9**). Une des particularités relatives à l'expression des protéines S100 entre différentes espèces est retrouvée pour la protéine S100A12, car les séquences codantes du gène *S100a12* sont absentes chez la souris et le rat probablement perdu par délétion au cours de l'évolution (313). La protéine S100A12 humaine possède 46% d'homologie avec S100A9 et 40% avec S100A8 (314). Dans ce manuscrit, l'importance sera donc mise seulement sur les protéines S100A8 et S100A9.

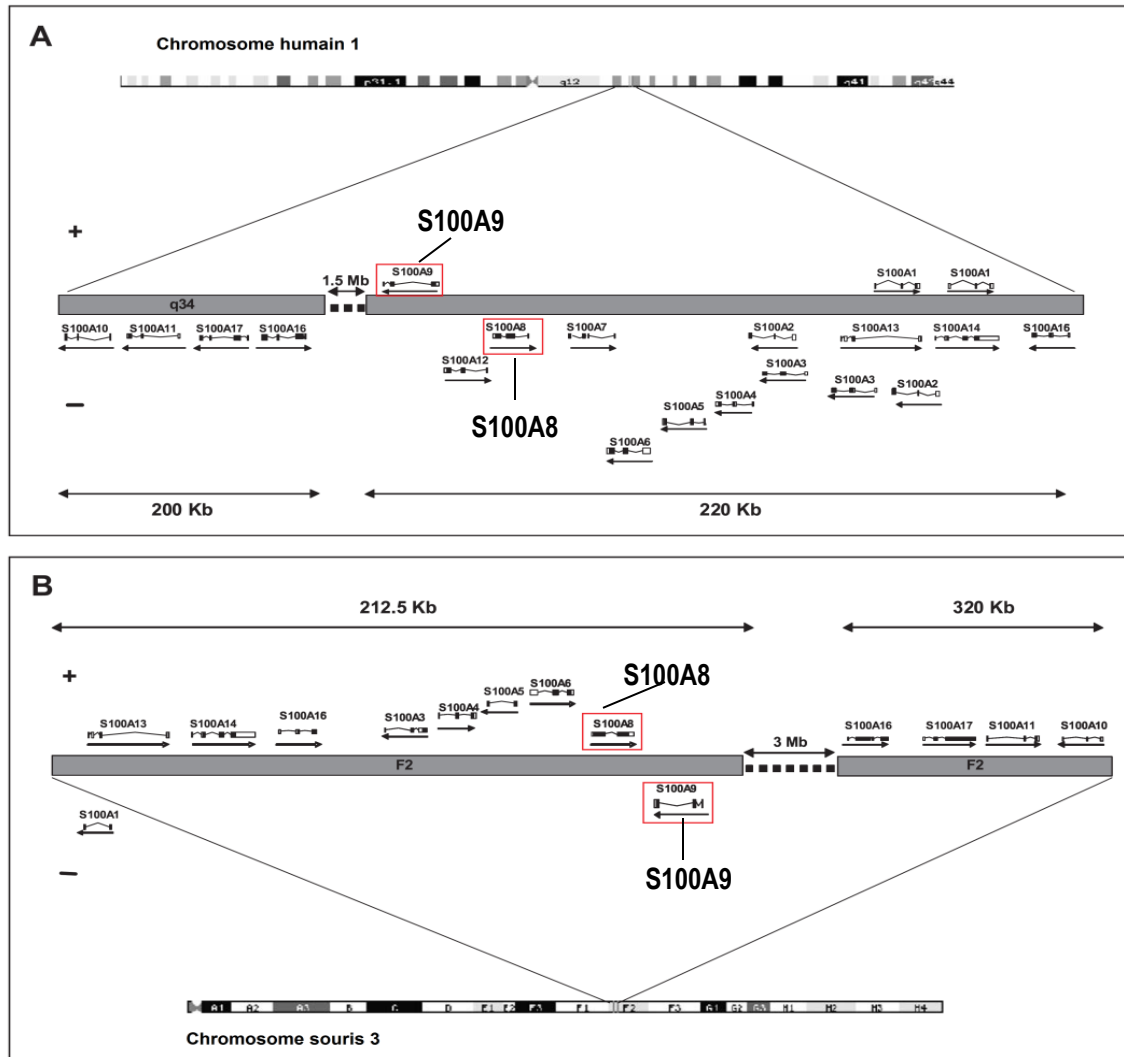


Figure 9 : Cartographie des gènes S100 sur le chromosome humain 1q21 (A) et murin 3f3 (B). Adaptée de Ravasi *et al.*, 2004; (315).

3.2. Structures des protéines S100A8 et S100A9

3.2.1. Généralités

Les gènes *S100a8* et *S100a9* possèdent trois exons et deux introns chez l'homme tout comme chez la souris. Le premier exon en 5' code pour une région non traduite, le motif EF-Hand non canonique N-terminale est codé par l'exon 2 et le motif EF-Hand classique par l'exon 3 (316).

Chez l'humain, deux isoformes de la protéine S100A9 sont générées. Une traduction alternative démarant à la méthionine 5 (Met⁵) génère une forme tronquée de la protéine S100A9 nommée S100A9* de

12,7kDa. Cet isoforme ne représenterait que 30% du contenu de l'ensemble de la protéine S100A9 chez le neutrophile (317). Également, lors de l'épissage alternatif, l'unique cystéine de la protéine S100A9 est perdue rendant possiblement la protéine insensible à certaines modifications post-traductionnelles (318). Le variant S100A9* n'est pas retrouvé chez la souris et il peut former un homodimère et aussi l'hétérodimère avec la protéine S100A8, mais sa stabilité est diminuée (319).

Les premières analyses de séquences peptidiques de S100A8 et S100A9 chez la souris montrent un fort pourcentage de similarité entre ces deux protéines (72.8%). Les protéines murines partagent respectivement 59% et 57% de similarité avec leurs homologues humains et malgré cette modeste similarité elles possèdent des fonctions similaires (**Figure 10**) (320-322). Le segment C-terminal de la protéine S100A9 est plus long que celui des autres protéines S100. De plus, chez l'humain une partie de cette séquence (de l'acide aminé 88 à 109) s'avère équivalente à la séquence du « *neutrophil immobilizing factors* » (NIF-1) isolé du neutrophile humain (**Figure 10**), (322).



Figure 10 : Comparaison des séquences peptidiques de S100A8 et S100A9 chez l'humain et la souris. Les séquences du haut correspondent à MRP8 (S100A8) et les séquences du bas à MRP14 (S100A9). Légendes : O (acides aminés EDQNST contenant de l'oxygène), L (acides aminés LVIFM hydrophobiques), + (acide aminé inséré), * (élément supprimé), les acides aminés identiques sont indiqués par une barre verticale, les charges conservées sont indiquées par un ou deux points. Adapté de Lagasse et Weissman, 1992, (322).

Ces protéines sont capables de former des homodimères *in vitro* (323) et *in vivo* (319, 324). Les premières structures tridimensionnelles des protéines humaines S100A8 et S100A9 publiées au début des années 2000 ont montré que leur structure est relativement similaire (284, 325, 326). Les 2 hélices en N- et C-terminale de chaque monomère sont organisées de façon antiparallèle et le complexe hétérodimérique est maintenu par des interactions hydrophobes entre les hélices (325). Le mélange le plus optimal de S100A8 et S100A9 favorisant le mieux l'hétérodimérisation *in vitro* est un ratio 10:1 (323). En présence de forte concentration de calcium, la liaison du calcium à l'hétérodimère favoriserait la formation d'un hétérotétramère de calprotectine lié de façon non covalente. La formation de l'hétérodimère est indépendante de la présence

de calcium (**Figure 11**) (327, 328). Les études structurales suggèrent que chez l'humain et la souris la forme hétérodimérique est plus stable que les homodimères et constitue la forme majoritaire que l'on retrouve de façon physiologique (316, 324). En outre, les constantes de dissociation des formes homo et hétérodimériques de S100A8 et S100A9 n'ont toujours pas été étudiées (316). De plus l'homodimère de S100A8 serait plus stable que l'homodimère de S100A9 (329). En revanche, aucune structure tridimensionnelle des protéines S100A8 ou S100A9 murines n'est actuellement disponible. Par conséquent, une certaine précaution est à avoir par rapport à la comparaison des interactions des protéines S100A8 et S100A9 entre l'humain et la souris. La protéine S100A9 chez la souris ne possède pas de thréonine qui puisse être phosphorylée. De plus l'homologie du domaine C-terminal de la protéine S100A9 chez la souris est très faible comparée à l'humain, par conséquent le rôle physiologique de S100A9 pourrait être différent de chez l'humain (322). Chez la souris, la région charnière entre les deux domaines EF-Hand de S100A8 possède une faible similarité (21%) par rapport à l'humain, et la région murine est chimiotactique pour les neutrophiles et les monocytes (330).

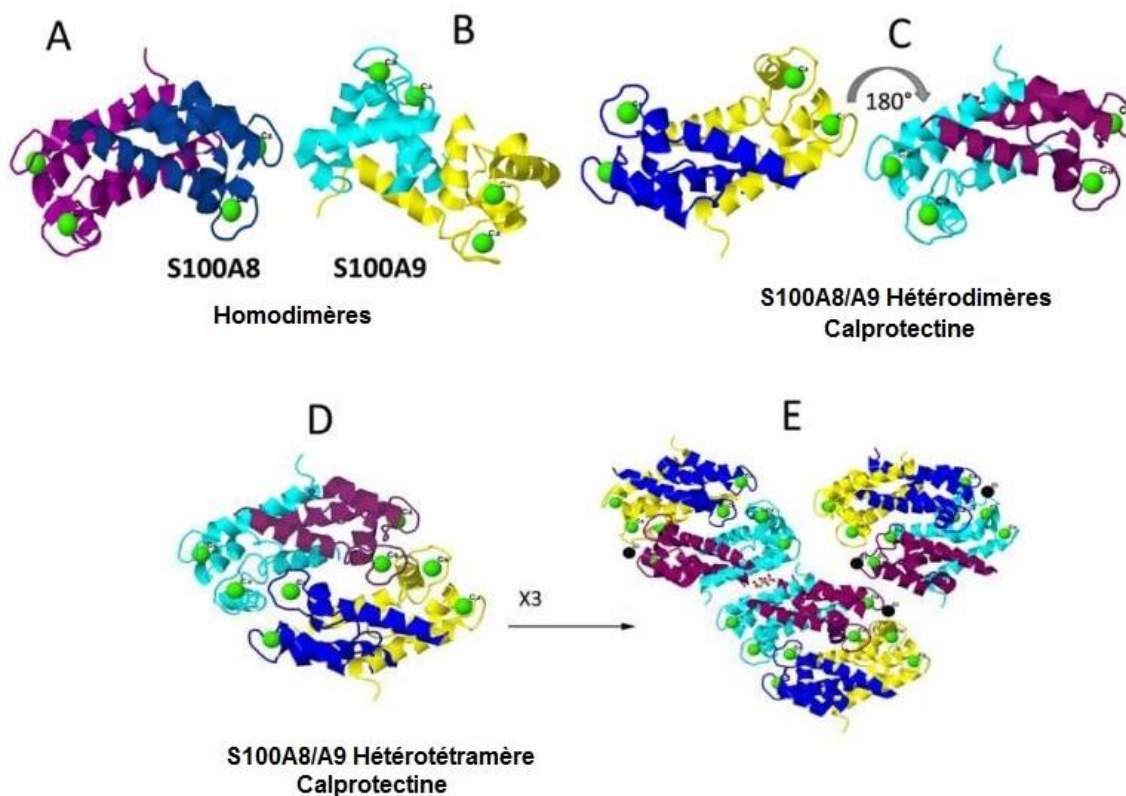


Figure 11: Structure tertiaire et quaternaire des protéines humaines S100A8 et S100A9. Représentation en ruban. Légendes : (A) Homodimère de S100A8, sous-unités représentées en violet et bleu ; (B) Homodimère de S100A9, sous-unités représentées en bleu et jaune ; (C) Hétérodimère S100A8/A9 visualise en deux projections par rotation de 180° ; (D) Hétérotétramère S100A8/A9 et (E) Dodecamère de S100A8/A9 formé de l'assemblage de trois calprotectines. Les ions calcium Ca^{2+} sont représentés par des sphères (A-E). Adaptée de la revue de Vogl *et al.*, 2012, (316).

En résumé, les différences majeures entre l'humain et la souris dans la sous-famille des calgranulines sont l'absence de S100A12 et de la forme tronquée de S100A9 chez la souris, la différence de séquence de la région charnière de S100A8 et la queue en C-terminal de S100A9, ainsi que la différence de potentiel électrostatique de l'hétérodimère de calprotectine (331). Néanmoins, les deux espèces contiennent simultanément des homodimères et l'hétérodimère. En présence de fortes concentrations de calcium, on observe la formation de l'hétérotétramère de calprotectine (332). Les différentes possibilités d'assemblage des protéines S100A8 et S100A9 complexifient une étude détaillée des fonctions de chacune de ces formes.

3.2.2. Modifications post-traductionnels des protéines S100A8 et S100A9

Les protéines S100A8 et S100A9 humaines et murines peuvent subir différentes modifications post-traductionnelles. S100A8 et S100A9 peuvent être S-glutathionylées *in vitro* et la protéine S100A9 liée au S-Glutathion a été détectée dans les neutrophiles et diminue leur adhésion (318). La S-nitrosylation de S100A9 est dépendante du calcium alors que celle de S100A8 ne l'est pas (333). La protéine S100A8 S-nitrosylée et sécrétée par le neutrophile a des propriétés anti-inflammatoires comme l'inhibition de l'activation des mastocytes et elle altère l'interaction des leucocytes en circulation avec les cellules endothéliales (333). La protéine iNOS se lie à S100A9 et à l'hétérodimère de S100A8/S100A9 intracellulaire et assure le transfert de NO à la GAPDH, l'annexine V, la moésine et la vimentine. Ces protéines sont importantes pour la migration cellulaire dans la réaction inflammatoire (334).

Une des modifications les plus étudiées est l'oxydation, générée lors de l'inflammation quand les concentrations de ROS et RNS (*Reactive Nitrogen Species*) sont élevées dans le milieu intracellulaire ou dans le microenvironnement inflammatoire. Chez l'humain et la souris, la protéine S100A8 est oxydée sur les cystéines 41 et 42 par les ions Cu^{2+} et des concentrations faibles de H_2O_2 générant des dimères de S100A8 liés par des ponts disulfures (335). Les formes oxydées de S100A8 chez la souris ne possèdent plus d'activité chimiotactique (335, 336). Chez la souris, la protéine S100A8 a la capacité de piéger deux électrons provenant des ROS (*Reactive Oxygen Species*) et peut piéger l'oxyde nitrique (NO) (335). Chez l'humain, plusieurs études ont fait état de la phosphorylation de la protéine S100A9 sur la Thréonine 113 par la p38MAPK chez les neutrophiles et monocytes activés (337) ayant plusieurs fonctions dans la réorganisation du cytosquelette (338), la migration cellulaire, la régulation de la NADPH oxydase (339) et plus récemment la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (340).

De nouvelles modifications ont été récemment identifiées chez l'humain, ayant des conséquences sur la stabilité de l'hétérodimère de calprotectine. En l'absence de liaison d'ions de métaux transitoires sur la

calprotectine, l'oxydation par le H_2O_2 de la méthionine 81 de S100A9 ou de la cystéine 42 de S100A8 conduit à la dégradation du tétramère de calprotectine (341). L'acide hypochloreux et l'acide hypothiocyanique génèrent également des ponts disulfure entre S100A8-S100A9 et S100A9-S100A9 au travers de l'hétérotétramère de calprotectine et rendent sensible cette structure à la dégradation protéique chez les neutrophiles (342). Dernièrement, il a été démontré que la protéine S100A8 est un substrat de l'E3 ubiquitin ligase RNF5 dans les cellules épithéliales intestinales de souris. S100A8 peut être ubiquitinée par RNF5 et de ce fait dégradée par le protéasome permettant le maintien de l'homéostasie intestinale (343).

3.3. Profil d'expression des protéines S100A8 et S100A9

3.3.1. Expression à l'état embryonnaire

Les ARN messager des gènes de *S100a8* et *S100a9* chez la souris sauvage sont retrouvés dans le foie fœtal dès le stade E11, mais pas à des stades plus précoces dans le tissu embryonnaire (322, 344). En revanche, l'ARN messager de *S100a8* est retrouvé en forte quantité dans le tissu maternel entourant le tissu fœtal, quand à l'ARN messager de *S100a9*, il est ponctuellement retrouvé dans des neutrophiles maternels distribués à l'interface du tissu maternel et fœtal au stade E8,5. Les travaux de Lichanska *et al.* ont montré qu'au jour 11,5 post-fécondation, l'ARN messager de *S100a8* est localisé dans des petites cellules regroupées tandis que les cellules positives pour l'ARN messager de *S100a9* sont moins nombreuses, plus larges et qui contiennent des inclusions, ce qui suggère que ces dernières auraient la capacité de phagocyter.

L'ensemble de ces études démontrent donc une expression indépendante et/ou différentielle des gènes de S100A8 et S100A9 dans le tissu maternel et fœtal. L'expression des gènes de S100A8 et S100A9 dans l'embryon ne s'avère cependant pas indispensable à son développement du fait de la génération dans un premier temps de souris déficientes pour *S100a9* (345, 346).

3.3.2. Expression lors de l'hématopoïèse

Au cours de l'hématopoïèse, les protéines S100A8 et S100A9 sont exprimées constitutivement par certaines cellules myéloïdes comme les neutrophiles et les monocytes. Elles représentent respectivement environ 45 % du contenu cytosolique chez le neutrophile et entre 1 % et 5 % du contenu cytosolique chez le monocyte (347). Lors de la différenciation des cellules myéloïdes en macrophages ou cellules dendritiques, l'expression de ces protéines est diminuée (322, 348, 349). Chez l'humain, l'expression de ces protéines est absente chez les cellules souches et progéniteurs des cellules myéloïdes, cependant leur expression est observée chez les précurseurs de monocytes et neutrophiles à un stade avancé (350). De plus, des observations internes à notre laboratoire (effectuées dans le cadre de ma thèse de doctorat) de coupes

d'embryons de souris sauvages marquées simultanément pour S100A8 et S100A9 ont montré l'expression des protéines S100A8 et S100A9 dans le foie fœtal notamment au jour 17 et la présence de cellules n'exprimant que S100A8, S100A9 où les deux protéines co-exprimées (**Figure 12**). En outre, au jour 14 après fécondation, les cellules positives pour S100A8 et S100A9 dans le foie fœtal sont des cellules myéloïdes matures (322).

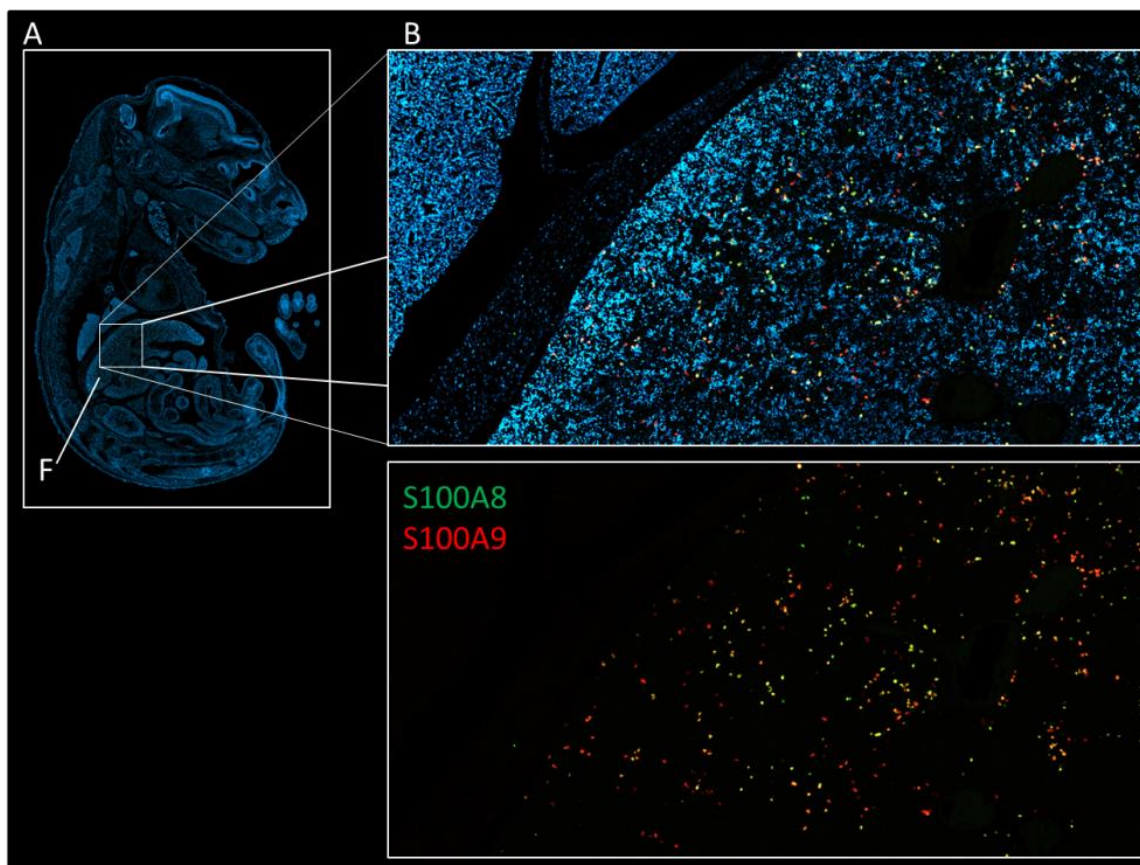


Figure 12 : Expression des protéines S100A8 et S100A9 chez l'embryon de souris CD1 au jour 17. Embryon marqué avec DAPI (bleu), S100A8 (vert) et S100A9 (rouge). F, foie. A et B, Observation magnitude 20x avec vue d'ensemble (A) et zoom sur une zone du foie (B).

3.3.3. Régulation de l'expression des protéines S100A8 et S100A9

L'expression de S100A8 et S100A9 est finement régulée et peut-être induite chez des cellules (d'origine myéloïde ou non) par différents stimuli ou lors de certaines pathologies.

3.3.4. Cellules d'origine myéloïde

Chez les macrophages et les cellules dendritiques d'origine myéloïde, de nombreux signaux peuvent induire la production de S100A8 et S100A9. Étonnamment, la production individuelle de S100A8 a été rapportée dans différents contextes. L'équipe du Prof. Geczy a notamment démontré que, dans les

macrophages murins, la production de S100A8 peut être induite par différentes cytokines pro- ou anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Interleukine 10), le TNF (*Tumor Necrosis Factor*), l'IFN γ (*interféron γ*) et le TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) (351-355). Lors de dommages cellulaires ou à la suite de la détection de pathogènes comme des bactéries ou des virus, l'expression des gènes de *S100a8* et *S100a9* est induite par plusieurs facteurs de transcription comme PU.1, C/EBP- α , C/EBP- β et STAT-3 (273). Également, la production de S100A8 et S100A9 est induite par l'IL-10 dans les cellules dendritiques humaines (356).

3.3.5. Cellules d'origine non myéloïde

Longtemps considérées comme spécifiques des cellules d'origine myéloïdes, les protéines S100A8 et S100A9 sont inductibles dans un grand nombre de cellules d'origine non myéloïdes. (357). Par exemple, la déshydratation de l'épiderme entraîne l'expression de *S100a8* et *S100a9* par les kératinocytes humains (358). La protéine S100A8 est inductible chez les cellules épithéliales humaines par l'IL-1 α (Interleukine 1 α) (359). Elle est également induite par PGE2 dans les cellules de cancer de la prostate (357).

Plusieurs études font également état de l'expression individuelle de S100A8 et S100A9. Les rayons UVA induisent l'expression de seulement *S100a8* chez les kératinocytes murins (360). À la suite de l'activation par le LPS ou l'IL-1, les cellules endothéliales produisent seulement S100A8 chez la souris (361). Les fibroblastes murins peuvent également produire S100A8 en l'absence de S100A9 à la suite de la stimulation par FGF-2 et l'IL-1 β (362).

Les différentes régulations de l'expression suggèrent que les protéines S100A8 et S100A9 peuvent avoir des activités pro- et anti-inflammatoires et également que les homodimères de S100A8 et S100A9 ont des fonctions distinctes.

3.4. Fonctions des protéines S100A8 et S100A9

3.4.1. Généralités

Comme évoqué précédemment, les protéines S100A8 et S100A9 sont présentes sous différentes formes, exprimées constitutivement ou non par différents types cellulaires et sécrétées dans le milieu extracellulaire (273). De nombreuses fonctions intracellulaires et extracellulaires ont été identifiées depuis plusieurs décennies. Les cellules produisant S100A8 et S100A9 ainsi que les processus cellulaires affectés par ces protéines sont résumés dans l'**Annexe A**.

3.4.2. Fonctions intracellulaires des protéines S100A8 et S100A9

3.4.2.1. Transport des acides gras saturés

L'hétérodimère de S100A8/A9 a la capacité de lier des acides gras comme l'acide arachidonique (AA) intracellulaire lorsque la concentration en calcium augmente chez le neutrophile et le kératinocyte (363, 364). La liaison de l'AA se situe à l'extrémité C-terminale de S100A9 et plusieurs études ont montré l'importance de la thréonine 113 et du motif histidine (103 à 105) dans l'interaction de S100A9 avec l'AA et ses précurseurs. La liaison de l'AA est inhibée par la liaison de zinc à l'hétérodimère S100A8/A9 (347, 364-366). En raison de son abondance chez le neutrophile, S100A8/A9 est la protéine la plus disponible pour l'association de l'AA. Le complexe S100A8/A9-AA est ensuite transporté vers la membrane plasmique, et libéré dans le milieu extracellulaire. L'AA sert de médiateur lipidique ayant des fonctions pro-inflammatoires. Le complexe S100A8/A9-AA peut se lier à divers types cellulaires (présenté dans le **paragraphe 3.4.4.1.3**).

3.4.2.2. Activation de la NADPH oxydase

Via la liaison de l'AA, l'hétérodimère S100A8/A9 peut participer à l'activation de la NADPH oxydase (367). Le complexe de la NADPH oxydase permet la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) chez les phagocytes comme les neutrophiles. Ceci confère une activité antimicrobienne ainsi qu'immunosuppressive à cette enzyme. Le complexe NADPH oxydase est actif à la suite de la liaison de protéines cytosoliques (p47phox, p67phox et p40phox) avec une protéine membranaire le cytochrome b558 (368). Le complexe S100A8/A9-AA se lie aux protéines p67phox et Rac2 et facilite la translocation de l'AA à la NADPH oxydase ce qui active la respiration oxydative et la production des anions superoxydes (367, 369-371).

3.4.2.3. Fonctions nucléaires

Les protéines S100A8 et S100A9 ne possèdent pas de séquence pour une translocation dans le noyau, néanmoins de multiples études font état de la présence de ces protéines dans le compartiment nucléaire. De petite taille (inférieure à 14kDa), ces protéines seraient tolérées pour un transport au travers des pores nucléaires (372). Plusieurs études ont rapporté leur présence nucléaire dans les kératinocytes murins et humains (303, 360). À la suite de l'exposition à de fortes doses d'UVA, S100A8 est fortement produite par les kératinocytes chez la souris et localisée dans le cytosol et fortement dans le noyau (360). Également, dans un modèle génétique de psoriasis chez la souris, S100A8 et majoritairement S100A9 sont retrouvées dans le noyau des kératinocytes et S100A9 peut interagir avec les histones suggérant une possible régulation ou influence sur la transcription de gènes notamment de la protéine C3 (composante du système du complément) (303). S100A9 se fixe en amont du site de départ de la transcription de ce gène. Une autre étude a démontré la forte présence nucléaire de S100A8 et S100A9 dans les carcinomes épidermoïdes de patient(e) et suggère

des fonctions associées au contrôle du cycle cellulaire et la prolifération (373). Enfin, S100A9 passerait du cytosol au noyau chez les cellules myéloïdes Gr1⁺ dans un contexte de septicémie et favoriserait l'expression des micro-ARN miR-21 et miR181b aux capacités immunosuppressives, voir partie 3.4.5 (374). La présence individuelle ou non de S100A8 ou de S100A9 rapportées dans le noyau des kératinocytes suggère donc des fonctions intracellulaires différentes pour S100A8 et S100A9 et indépendantes de l'hétérodimère.

3.4.3.Mécanismes de sécrétion des protéines S100A8 et S100A9

L'ensemble des protéines de la famille S100 ne possèdent pas de peptide signal pour la sécrétion via la voie conventionnelle mobilisant le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (375). Leur libération dans le milieu extracellulaire se produit de différentes façons notamment par voie passive lors de la nécrose cellulaire. Ce phénomène a majoritairement été observé chez le neutrophile pour S100A8 et S100A9 (376).

Les protéines S100A8 et S100A9 sont sécrétées par les phagocytes activés (375). Des travaux réalisés au sein de notre équipe ont démontré que la stimulation par le GM-CSF, le LPS (Lipopolysaccharide), les cristaux d'urate monosodique (MSU) et la PMA augmente la sécrétion des protéines S100A8 et S100A9 et de l'hétérodimère de S100A8/A9 (377, 378). La sécrétion est précédée par le transfert de S100A8 et S100A9 du cytosol au cytosquelette et à la membrane de la cellule. De plus et de façon similaire à la stimulation par l'IL-1 β , cette voie de sécrétion alternative utilisée par S100A8 et S100A9 est dépendante de la production de ROS et de l'efflux de potassium (375). Dans ce contexte, la sécrétion n'est pas associée à la formation de NET ou à la formation de vésicules extracellulaires, les protéines sécrétées étant notamment retrouvées dans leur forme soluble une fois sécrétées (375). De plus, les protéines S100A8, S100A9 et l'hétérodimère de S100A8/A9 ne sont pas toujours sécrétés de façon simultanée chez le neutrophile (375). Cette observation renforce l'idée que les calgranulines S100A8, S100A9 et leur hétérodimère ont des fonctions spécifiques et dépendantes des stimuli. D'autres travaux récents montrent, dans une lignée monocyttaire (THP-1) stimulée avec du TNF, que S100A8 et S100A9 sont sécrétées via des lysosomes sécrétoires et leur sécrétion est augmentée en présence d'IL-10 (379, 380). D'autres études ont montré que S100A8 et S100A9 sont associées au cytosquelette dans les cellules monocytaires via les filaments intermédiaires ou les microtubules (322, 338).

L'ensemble des travaux analysant les mécanismes de sécrétion des calgranulines mettent en lumière que les formes de ces protéines sont sécrétées par différentes voies alternatives dépendantes du type cellulaire ainsi que des nombreux stimuli induisant ces voies. En outre, leur sécrétion est sensible aux stimuli pro- et anti-inflammatoires. Ces observations suggèrent encore que les protéines S100A8 et S100A9 participent indépendamment à la régulation de la réponse inflammatoire. Cependant l'ensemble des

mécanismes précis reste encore non démontré et leur étude est complexifiée par les possibles mécanismes de régulation autocrine de S100A8 et S100A9 sur ces voies de sécrétion.

3.4.4. Fonctions extracellulaires des protéines S100A8 et S100A9

Les protéines S100A8 et S100A9 sont des DAMP activement sécrétées dans différents compartiments lors de diverses pathologies dont une majorité de pathologies auto-immunes et auto-inflammatoires (voir **Tableau 7**). Ces protéines peuvent coexister en permanence sous forme d'homodimères, d'hétérodimère et d'oligomères. Une fois sécrétées, ces DAMP, sous leurs différentes formes, sont capables d'activer l'immunité innée et adaptative, et de promouvoir la réparation tissulaire (381). Les modifications post-traductionnelles abordées précédemment sont également un vecteur de modifications des fonctions extracellulaires de S100A8 et S100A9.

3.4.4.1. Récepteurs des protéines S100A8 et S100A9

Les protéines S100A8 et S100A9 aux fonctions systémiques, comme le démontrent les nombreux contextes pathologiques dans lesquels elles sont exprimées et sécrétées, sont capables de se lier à de nombreux récepteurs dépendamment du tissu et du type cellulaire. L'affinité à ces récepteurs peut-être très différente, des concentrations très faibles sont suffisantes pour certains alors que certaines activations requièrent de fortes concentrations (382).

3.4.4.1.1. TLR4 (*Toll-like Receptor 4*)

Le récepteur TLR4 est un membre des dix récepteurs de la famille des TLR (*Toll-like Receptor*) et en est le premier découvert et l'un des plus étudié à ce jour (383). Ce récepteur reconnaît des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs ou *pathogen-associated molecular patterns*) ainsi que des motifs moléculaires associés au danger (DAMPs ou *damage-associated molecular patterns*). Il est composé d'un domaine membranaire (assurant la reconnaissance et la liaison des ligands) et d'un domaine cytoplasmique, ce dernier effectuant la transduction du signal. L'un des principaux ligands du TLR4 est une endotoxine de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, le lipopolysaccharide (LPS), qu'il lie avec l'aide de ses co-récepteurs MD2 et CD14. La liaison du ligand provoque la dimérisation du TLR4, facilitant le recrutement intracellulaire des protéines adaptatrices MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response gene 88*) et TRIF (*TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β*) qui participent à la transduction du signal. Par la suite, des facteurs de transcription comme IRFs (*Interferon Regulatory Factors*), NF- κ B, CREB et AP-1 sont activés et contrôlent l'expression de gènes immunomodulateurs (384, 385).

S100A8 et S100A9 sont des ligands endogènes du complexe TLR4-MD2 (386). Les travaux de Roth ont démontré que l'hétérodimère, mais non l'hétérotétramère de calprotectine est capable de fixer le TLR4 grâce à S100A8 qui, via la translocation de MyD88, active les facteurs de transcription IRAK1 (*Interleukine-1 receptor-associated kinase 1*) et NF- κ B conduisant à une augmentation d'expression du TNF (287, 299). Chez les monocytes humains, la liaison de S100A8 sur le TLR4 active les monocytes de façon similaire au LPS et les protège contre l'apoptose (387). Une seconde publication plus récente a présenté *a contrario* la liaison de S100A9 au TLR4 et son mécanisme d'activation impliquant le co-récepteur CD14 (388). Cette étude affirme que l'affinité des liaisons entre S100A8 et l'hétérodimère de calprotectine avec le TLR4 sont plus faibles que pour S100A9-TLR4. D'autres travaux ont finalement démontré, chez les cellules THP-1, que la liaison de S100A9 au TLR4 induit l'expression des gènes de l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et du TNF avec une cinétique légèrement plus courte que l'activation via le LPS (389).

Également, la liaison de S100A9 au TLR4 s'avère très importante dans le contrôle de la différenciation des cellules de leucémies myéloïdes aiguës de sous-type 4/5 (390). Globalement, la liaison de S100A8 et S100A9 au TLR4 est liée à de nombreuses maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis ou la maladie de Crohn (303, 391, 392).

3.4.4.1.2. RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End products*)

Le récepteur RAGE appartient à la superfamille des immunoglobulines (393). De nature membranaire, ce récepteur possède 3 variants d'épissage et une forme soluble (394). Ce récepteur possède de nombreux ligands endogènes à savoir les produits de glycation avancée (395), HMGB1 (*High Mobility Group Box-1*) (396) et les protéines de la famille des protéines S100 (298). La liaison de S100A8 et S100A9 à RAGE a été découverte chez les cellules cardiaques primaires de souris. Les travaux de Turoskaya *et al* ont démontré que la glycosylation de RAGE est importante pour la liaison de S100A8 et S100A9.

Ce récepteur est exprimé chez les cellules endothéliales, les monocytes, les macrophages, les neutrophiles ou encore les plaquettes. L'activation du récepteur RAGE par S100A8 et S100A9 est liée à divers cancers et maladies inflammatoires.

Lorsque S100A8 et S100A9 se lient à RAGE, il y a activation des voies de signalisations p38 MAPK et NF- κ B. Cela conduit à la production de S100A8 et S100A9, créant une boucle de rétroaction positive liée à l'inflammation chronique (397, 398). Les fonctions de la liaison de S100A8 et S100A9 à RAGE dans les maladies inflammatoires comme l'arthrite ou le psoriasis sont peu connues (399). Les liaisons à TLR4 et à RAGE sont à l'heure actuelle les mieux caractérisées, mais d'autres interactions ont été découvertes.

3.4.4.1.3. CD36

Le CD36 est une glycoprotéine transmembranaire que l'on retrouve à la surface des cellules adipocytaires (400), les macrophages (401) ou les cellules endothéliales (402). L'AA se lie à S100A8/A9, et S100A8/A9 interagit avec le CD36 pour faciliter la prise en charge de l'AA par les cellules endothéliales (363). Une autre étude de Wang *et al* témoigne de l'interaction de S100A9 et du CD36 en lien avec la thrombose où S100A9 sécrétée par les plaquettes favoriserait le développement de thrombus (403).

3.4.4.1.4. CD33 (Siglec-3)

Le CD33 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée par la majorité des cellules myéloïdes matures à savoir les neutrophiles, éosinophiles, monocytes, macrophages et cellules dendritiques et leurs progénitrices hématopoïétiques (404). Une seule étude fait part de l'interaction de S100A9 avec le CD33 qui participerait à l'induction et l'accumulation de cellules myéloïdes immunosuppressives dites MDSC (*Myeloid-Derived Suppressive Cells*) en lien avec le syndrome myélodysplasique (405).

3.4.4.1.5. EMMPRIN (Basigin, CD147) et Neuroplastin-β

Récemment, Hibino *et al* ont proposé deux nouveaux récepteurs pour S100A8 et S100A9 liés à la dermatite atopique et le développement des mélanomes (406). Une première étude a identifié EMMPRIN (*Extracellular matrix metalloproteinase inducer*), qui est une glycoprotéine exprimée par les mélanomes. S100A9, mais non S100A8 se lie à EMMPRIN et favoriserait la migration des cellules cancéreuses. Dans un second temps, ils ont identifié la glycoprotéine neuroplastin-β, un récepteur membranaire coexprimé avec EMMPRIN chez les kératinocytes humains, comme étant un nouveau récepteur de S100A8. La Neuroplastin-β est capable de s'hétérodimériser avec EMMPRIN, permettant ainsi à la calprotectine de se lier à ce complexe. L'activation de l'hétérodimère neuroplastin-β-EMMPRIN activerait la prolifération des kératinocytes et l'inflammation de la peau (407).

3.4.4.2. Propriétés antimicrobiennes

Les protéines S100A8 et S100A9 sont fortement retrouvées au lieu d'inflammation, mais aussi dans le cadre d'une infection. La concentration de calprotectine sécrétée dans ce type de microenvironnement est suffisante pour pouvoir lier les ions divalents comme notamment le manganèse, le zinc. L'activité antimicrobienne et antifongique de la calprotectine proviendrait de la chélation de ces ions (332, 408, 409). La formation de NET (*Neutrophil Extracellular Trap*) favoriserait aussi la fixation des ions par la calprotectine (409). Indépendamment de la fixation d'ions divalents manganèse et zinc, la calprotectine inhiberait la

croissance du pathogène de la maladie de Lyme par un autre mécanisme méconnu (410). Ces propriétés antimicrobiennes de S100A8/S100A9 sont en outre rapportées dans les kératinocytes (411).

3.4.4.3. Activation et production de cytokines et chimiokines

La présence de S100A8 et S100A9 dans le milieu extracellulaire induit également l'activation des cellules immunitaires, la dégranulation des neutrophiles ainsi que la sécrétion de cytokines et chimiokines par les cellules de l'immunité innée (63, 299). En circulation, ces protéines activent l'expression d'intégrines (CD11b/CD18) chez les neutrophiles et monocytes afin de faciliter la migration au travers de la membrane endothéliale jusqu'au site de l'inflammation (412). De plus, S100A9 active la phagocytose via les récepteurs aux compléments et aux FcγR (Récepteur des fragments constants des immunoglobulines de type IgG) chez le neutrophile ainsi que la dégranulation de leurs granules secondaires et tertiaires (63, 413). En outre, S100A8 et S100A9 activent la production et sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1β, TNF, IL-8) et chimiokines (CXCL1, MIP-α et β) chez le monocyte via l'activation du facteur NF-κB (414). La forme phosphorylée de S100A9 en association avec S100A8 active l'expression des gènes de l'IL-1β, l'IL-6 ou encore du TNF via le TLR4 dans une lignée humaine de neutrophile (340). Enfin, ces calgranulines activent et induisent la sécrétion de cytokines et chimiokines d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales (412), les synoviocytes (415), les cellules NK (416) ainsi que la prolifération des kératinocytes (417).

3.4.4.4. Réaction allergique

S100A9 protège contre la réponse inflammatoire des lymphocytes CD4⁺ auxiliaires de type 2 dans un modèle d'asthme induit par l'injection intranasale d'extrait de l'allergène *Alternaria alternata*. Dans ce modèle les souris déficientes pour *S100a9* ont une réaction allergique plus forte dans les poumons, caractérisée d'abord par une augmentation de la résistance des voies aériennes, puis par une plus importante production d'IL-13, d'IgE ainsi qu'un recrutement plus intense d'éosinophiles et de lymphocytes Th2. De plus, l'accumulation de lymphocytes T CD4⁺ régulateurs dans le poumon est diminuée (418). Malgré les fonctions pro-inflammatoires identifiées pour la protéine S100A9, celle-ci peut orienter vers une réponse adaptative régulatrice et diminuer l'inflammation possiblement via un mécanisme mettant en jeu les fonctions des cellules dendritiques (419).

3.4.4.5. Contrôle de la prolifération et différenciation

Les protéines S100A8 et S100A9 ont la capacité d'agir sur la prolifération et la différenciation de différents types cellulaires, myéloïdes et non myéloïdes. La délétion de *S100a9* augmente la prolifération cellulaire dans la peau traitée avec le TPA dans un modèle de carcinome de la peau (420). L'hétérodimère de S100A8/A9 induit la prolifération des kératinocytes humains normaux jusqu'à environ 100ng/mL, mais des concentrations plus fortes diminuent la prolifération (421).

Les travaux de Laouedj *et al.* publiés avec le Pr Frédéric Barabé ont montré que liaison S100A9-TLR4 augmente la différenciation des cellules LMA murines et de patients, mais cette fonction est inhibée par des concentrations faibles de S100A8 extracellulaire (390). S100A8 induit par ce biais la prolifération des cellules LMA et aussi possiblement par une voie alternative en interagissant avec un autre récepteur qui, activé, inhiberait la voie de signalisation du TLR4.

D'autres travaux concernant la myélopoïèse chez des souris sauvages naïves ont montré que la stimulation de cellules souches hématopoïétiques de phénotype LSK (Lineage⁻ Sca1⁺ c-Kit⁺) avec S100A8 promeut le développement des cellules myéloïdes (422).

3.4.5. Fonctions liées à la migration cellulaire

S100A8 et S100A9, protéines constitutives du cytosol des monocytes et neutrophiles, possèdent la capacité de lier de nombreuses composantes du cytosquelette comme la kératine, la vimentine ou encore l'actine, participant ainsi à la stabilisation du cytosquelette (337, 338, 378, 423, 424). La protéine S100A9 phosphorylée en thréonine 113 peut favoriser la migration cellulaire en se fixant aux microtubules et permettant leur dépolymérisation. Cette action faciliterait la migration transendothéliale des cellules vers un site d'infection ou inflammatoire (337, 338), une fonction confirmée par la diminution des capacités de migration des neutrophiles de souris déficiente pour *S100a9* en réponse à l'interleukine 8 (IL-8) (345).

S100A8 et S100A9 sont deux signaux de danger sécrétés ayant également une activité chimioattractante pour les leucocytes à des concentrations de l'ordre de 10^{-8} et 10^{-10} M (**Figure 13**). Chez l'humain, les protéines S100A8 et S100A9 possèdent une activité chimioattractante cependant pour l'attraction des neutrophiles cela reste controversé et l'oxydation des protéines contrôle ce processus (425, 426). Dans un contexte cancéreux, les protéines S100A8 et S100A9 sont chimioattractantes pour des lignées cellulaires de mélanomes (407). La protéine S100A9 est connue pour faciliter l'adhésion des phagocytes comme les granulocytes et monocytes à la fibronectine, le fibrinogène et aux cellules endothéliales par l'induction de l'expression du CD11b et CD18 (427). *In vivo* chez la souris, l'injection de S100A8 ou S100A9 dans le modèle de poche d'air induit l'infiltration de cellules myéloïdes principalement de neutrophiles et monocytes (330, 427, 428). En réponse à divers stimuli pro-inflammatoires comme les cristaux d'urate monosodique, le LPS ou à la suite de l'infection par *Streptococcus pneumoniae*, l'injection d'anticorps dirigés contre S100A8 et S100A9 réduit le recrutement de neutrophiles, monocytes et macrophages (377, 427).

Plusieurs groupes ont étudié le lien entre les protéines S100A8 et S100A9 et l'expression des métalloprotéases matricielles (MMPs) qui sont des enzymes protéolytiques ayant la capacité de dégrader les

composantes de la matrice extracellulaire comme le collagène. La sécrétion de MMPs est liée à la migration cellulaire et au remodelage tissulaire. Chez les macrophages murins, les protéines S100A8 et S100A9 peuvent induire l'expression de MMP-2, 3, 9, 12 et 13 (429-431). Cependant, l'hétérodimère de S100A8/A9 serait capable d'inhiber l'activité des MMPs via la séquestration des ions zinc essentiels à leur activité (432).

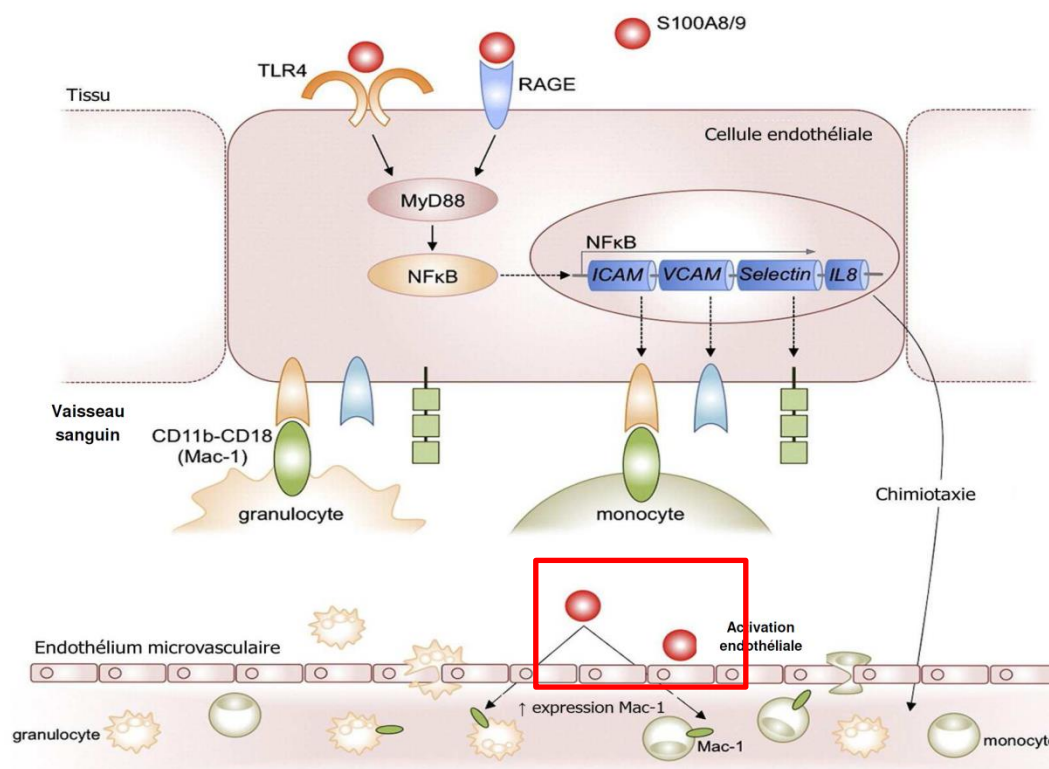


Figure 13 : Mécanismes d'activation des cellules endothéliales chez la souris par les protéines S100A8 et S100A9 et de l'effet chimioattracteur sur les leucocytes. Schéma issu de la revue de Kessel, Holzinger et Foell, 2013 (433).

3.4.6. Fonctions liées à l'activité suppressives

Depuis quatre décennies des cellules myéloïdes capables de supprimer la réponse immunitaire ont été observées en réponse à la progression de tumeurs cancéreuses (434). En 2007, ces cellules ont été classifiées sous l'appellation MDSC (*Myeloid-derived suppressor cells*) et le phénotype de ces cellules myéloïdes chez la souris est CD11b⁺ Gr-1⁺ (435). Les MDSC sont une famille hétérogène contenant des PMN-MDSC (*Polymorphonuclear-MDSC*) phénotypiquement et morphologiquement similaires aux neutrophiles et M-MDSC (*Monocytic-MDSC*) similaires de la même manière aux monocytes. Ces cellules sont identifiées lors de la stimulation permanente du système immunitaire innée par des infections chroniques, de l'inflammation

ou lors du développement de cancers. Cette stimulation entraîne une myélopoïèse persistante et le développement de cellules aux propriétés suppressives notamment en exprimant une multitude de facteurs parmi lesquels on retrouve ARG1, iNOS, le TGF β , et l'IL-10 (434). Les protéines S100A8 et S100A9 sont reconnues dans plusieurs études comme des marqueurs de caractérisation et comme des facteurs de l'activité suppressives des MDSC. La protéine S100A9 présente à la surface des MDSC est utilisée comme cible thérapeutique par des « peptibodies » et sa neutralisation entraîne une suppression des MDSC et une diminution du développement tumoral chez la souris (436). Également, dans un modèle de choc septique chez la souris, une équipe démontre que la forme non phosphorylée de S100A9 dans les cellules CD11b⁺ Gr-1⁺ passe du cytosol au noyau et joue un rôle de cofacteur de la transcription des micro-ARN miR-21 et miR-181B par son interaction avec les facteurs de transcription Stat3 et C/EBP β (374, 437). Leurs études montrent que l'expression de miR-21 et miR-181B favorise le développement des MDSC dans les phases précoce et tardive du choc septique et le processus de translocation de S100A9 au noyau est dépendant de l'IL-10.

3.4.7. Les souris déficientes pour *S100a8* et *S100a9*

La génération de modèles déficients pour ces protéines fut nécessaire afin de déterminer avec précision comment S100A8 et S100A9 régulent la réponse inflammatoire. Les souris déficientes pour *S100a9* ont été les premières générées au début des années 2000 par deux équipes avec des stratégies de délétions similaires (345, 346). Elles ont été intensément caractérisées depuis, voir le **Tableau 6** regroupant les phénotypes. Les souris déficientes pour *S100a9* ont été utilisées dans plusieurs modèles d'inflammation chronique et aiguë et ces études démontrent des mécanismes différents de S100A9 dans le contrôle de l'inflammation (303, 420). Dans certains cas, les souris déficientes pour *S100a9* à l'état naïf ne présentent pas de différences dans leur nombre de leucocytes circulants, mais une étude plus récente démontre une augmentation du nombre de monocytes et neutrophiles dans la moelle osseuse (**Tableau 6**). Des études montrent aussi une altération de la migration des phagocytes et une diminution de la polymérisation du cytosquelette (**Tableau 6**).

Deux études ont démontré que la délétion de l'exon 2 du gène codant pour S100A8 est létale à l'état embryonnaire (344, 438). Cependant, nous avons développé des souris déficientes pour *S100a8* viable grâce à la délétion des deux exons codants de ce gène. La caractérisation des souris déficientes pour *S100a8* sera abordée et discutée dans le **chapitre 2** de ce manuscrit.

Processus	Phénotype	Références
Différenciation des cellules myéloïdes	Nombre de leucocytes circulant similaire aux souris sauvages	(345, 346)
	Différenciation des progéniteurs hématopoïétiques amoindris avec G-CSF et M-CSF	(345)
	Nombre de monocytes et granulocytes dans la moelle osseuse augmenté	(439)
Cytosquelette	Aucune différence de taille et granulosité des neutrophiles Accumulation augmentée d'actine F dans les pseudopodes des neutrophiles non stimulés	(346)
	Diminution de la polymérisation des microtubules Diminution de l'activation des GTPases CDC42 et Rac	(338)
Migration des cellules myéloïdes	Diminution <i>in vitro</i> de la migration induite par l'IL8 et leucotriène B4	(345)
	Absence d'augmentation de l'expression du CD11b en présence d'IL-8	
	Pas de différence de migration des neutrophiles <i>in vivo</i>	(338)
	Diminution de la migration des granulocytes <i>in vitro</i>	
	Expression du CD11b diminuée chez les neutrophiles	(440)
Phagocytose	Phagocytose d' <i>E.Coli</i> similaire aux souris sauvages chez les monocytes et neutrophiles	(346)
Métabolisme du calcium	Similaire aux souris sauvages Altérer en réponse aux chimiokines CXCL2 et CXCL1	(346), (441)
Apoptose	Taux d'apoptose similaire aux souris sauvages	(346)
Expression d'autres calgranulines	Présence d'ARN de S100A8, mais absence d'expression de la protéine S100A8 dans les cellules myéloïdes matures Expression de S100A1 et S100A4 similaires aux souris sauvages	(346)

Tableau 6 : Phénotypes des souris déficientes pour *S100a9* naïves.

3.4.8. Fonctions dans les pathologies auto-immunes

3.4.8.1. Généralités

Depuis leur découverte, la présence de S100A8 et S100A9 est relevée dans de nombreuses affections inflammatoires et auto-immunes (399). Le **Tableau 7** présente l'ensemble des maladies inflammatoires où ces protéines sont détectées.

Dans le cadre de cette thèse, nous porterons notre attention sur les fonctions de S100A8 et S100A9 dans l'arthrite rhumatoïde et le psoriasis.

3.4.8.2. La calprotectine : biomarqueur de plusieurs maladies auto-immunitaires.

La mesure de la concentration de calprotectine sécrétée, est utilisée comme biomarqueur en clinique pour les maladies inflammatoires de l'intestin (MII) et proposée comme biomarqueur dans d'autres maladies auto-immunes. Tout d'abord, chez les patient(e)s arthritiques, la concentration de la calprotectine dans le sérum est élevée dans les phases actives et diminue lors de thérapies efficaces (311). La mesure permet également de prédire de futurs dommages aux articulations chez les patient(e)s arthritiques et atteint(e)s d'arthrite psoriasique (311, 442). Ensuite, dans un contexte d'inflammation intestinale la calprotectine est sécrétée au niveau de la lumière intestinale et retrouvée dans les selles des patients (443). La mesure de la calprotectine fécale corrèle avec les symptômes des patients atteints de la maladie de Crohn et colite ulcéreuse (444). Tout comme chez les patients arthritiques, la calprotectine mesurée dans les selles permet de prévenir une rechute des symptômes après traitement (445). Enfin, la mesure de la calprotectine sérique des patient(e)s atteint(e)s de psoriasis corrèle avec la sévérité de la maladie et l'efficacité des traitements (446).

Pathologies	Protéines S100 retrouvées	Sources	Références
Inflammation articulaire			
Polygénique			
Arthrite rhumatoïde	S100A8/A9, S100A12	Sérum, fluide synovial	(447) (448)
Arthrite psoriasique	S100A8/A9, S100A12	Sérum, fluide synovial	(447)
Arthrite idiopathique juvénile (AJI)	S100A8/A9, S100A12	Sérum, fluide synovial	(449)
Goutte	S100A8/A9, S100A12	Sérum, fluide synovial	(450) (451)
Spondylarthrite	S100A8/A9, S100A12	Sérum, fluide synovial	(452)
Monogénique			
FMF	S100A8/A9, S100A12	Sérum	(453, 454)
PAPA	S100A8/A9	Sérum	(453)
Inflammation parodontale et intestinale			
Maladie de Crohn	S100A8/A9	Sérum, fèces, tissu	(455)
Colite ulcéreuse	S100A8/A9, S100A12	Sérum, fèces, tissu	(456, 457)
Parodontite	S100A8/A9	Fluide gingival, Tissu	(458)
Inflammation du cerveau			
Maladie d'Alzheimer	S100A9, S100A12	Cerveau	(459)
Maladie de Parkinson	S100A9	Cerveau	(460)
Sclérose en plaque	S100A8, S100A9, S100A8/A9	Sérum, lésions	(461)
Ischémie	S100A8/A9	Microglie	(462)
Inflammation de la peau			
Psoriasis	S100A8/A9, S100A12	Sérum, Peau	(446)
Dermatite de contact	S100A8, S100A9, S100A12	Peau	(463)
Lichen plan	S100A8, S100A9, S100A12	Peau	(464)
Inflammation pulmonaire			
Fibrose kystique	S100A8/A9, S100A12	Sérum. Expectoration	(465-467)
Syndrôme de détresse respiratoire aiguë	S100A8/A9, S100A12	Tissu, BALF	(468)
Asthme	S100A8, S100A9, S100A12	Expectoration, tissu	(469, 470)
Bronchite chronique	S100A8/A9	BALF	(471)
Pneumonie	S100A8/A9, S100A12	Macrophages alvéolaires	(472)
Fibrose pulmonaire idiopathique	S100A9	BALF, tissu	(473)
Inflammation vasculaire			
Athérosclérose	S100A8, S100A9, S100A12	Sérum, Plasma, Plaque	(474, 475)
Diabète de type II	S100A8/A9, S100A12	Sérum	(476, 477)
Obésité	S100A8/A9	Sérum	(478)
Maladies auto-immunes			
Lupus systémique érythémateux	S100A8/A9	Sérum, rein	(479)
Maladie de Kawasaki	S100A8/A9, S100A12	Sérum	(480, 481)
Syndrôme de Sjögren	S100A8/A9	Sérum, salive	(482)

Tableau 7 : Les protéines S100A8, S100A9, S100A12 dans les pathologies inflammatoires et immunitaires.

3.4.9. Fonctions des protéines S100A8 et S100A9 dans l'arthrite rhumatoïde

3.4.9.1. Chez l'humain

Une première étude de 1987 a démontré la présence de S100A9 et l'hétérodimère de S100A8/A9 dans les monocytes et neutrophiles infiltrant la membrane synoviale (483), et que ces protéines sont retrouvées en forte concentration à la jonction du cartilage et du pannus là où la dégradation du cartilage et l'érosion osseuse sont maximales (484, 485). La concentration des protéines S100A8 et S100A9 est augmentée dans le sérum et elles sont surexprimées dans le liquide synovial de patient(e)s atteint(e)s d'arthrite rhumatoïde (**Tableau 7**). De plus, les taux corréleront avec la sévérité de la maladie (309, 486-488). La production de S100A8, S100A9 et de l'hétérodimère dans l'arthrite rhumatoïde s'avère être concentrée majoritairement aux articulations concernées et ces protéines contribuent aux mécanismes de l'immunité innée favorisant l'inflammation articulaire. Il a été montré que la calprotectine sécrétée par les macrophages tissulaires amplifie la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires via l'activation des voies NF- κ B et p38 MAPK (489). Il est également important de noter que les protéines S100A8 et S100A9 sont produites par les ostéoblastes et ostéoclastes ainsi que les chondrocytes chez la souris naïve (348). S100A8 et S100A9, mais pas la calprotectine, stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires et de métalloprotéases par les chondrocytes, favorisant ainsi la dégradation du cartilage (490). Récemment, une étude a démontré la présence de S100A9 phosphorylée en Thr113 dans le liquide synovial de patients arthritiques (340, 491). Leurs travaux ont montré que la forme phosphorylée de S100A9 induit la sécrétion de cytokines comme l'IL-1, le TNF, l'IL-6 et CXCL8 chez une lignée neutrophilique différenciée HL-60 via l'activation du TLR4 (340).

La calgranuline S100A12 est également présente chez l'humain dans un contexte arthritique. Sa concentration dans le liquide synovial est en général 10 fois moindre que l'hétérodimère de S100A8/A9 (492). Récemment, il a été montré que S100A12 facilite la différenciation des monocytes humains en ostéoclastes *in vitro* (493).

3.4.9.2. Chez la souris

L'utilisation de différents modèles d'arthrite rhumatoïde chez la souris a conduit à l'identification de nombreuses fonctions pour S100A8 et S100A9, parfois controversées. Plusieurs études ont eu recours aux souris déficientes pour *S100a9* dans différents modèles d'arthrite. L'arthrite induite par l'injection de mBSA (*Methylated Bovin Serum Albumin*) est moins sévère chez les souris *S100a9*^{-/-} notamment par une réduction de la destruction du cartilage par les métalloprotéases MMP3, 9 et 13 (429). Cette même étude montre que la stimulation de macrophages *in vitro* avec S100A8 et S100A8/A9 active la transcription des gènes de ces mêmes métalloprotéases. *In vivo*, l'injection intra-articulaire de la protéine S100A8 chez les souris de type C57BL/6 induit une inflammation des articulations (429).

Cependant, la délétion de *S100a9* dans le modèle d'arthrite K/BxN ne présente aucune différence de score clinique ou de gonflement des articulations comparées aux souris sauvages (494). Cette même étude compare également le modèle d'arthrite induite par le collagène. Dans ce modèle les souris déficientes pour *S100a9* présentent une légère augmentation non significative du gonflement des articulations et du score clinique (494). Cela suggère que différentes fonctions de S100A9 sont observées dépendamment du modèle utilisé.

Il faut également prendre en compte l'absence de production de la protéine S100A8 chez les souris déficientes pour *S100a9*. S100A8 et S100A9 ayant en outre des fonctions à la fois intracellulaires et extracellulaires, la délétion de *S100a9* entraîne la perte de toutes ces fonctions. Afin d'étudier spécifiquement les fonctions extracellulaires de S100A9 dans l'arthrite, notre laboratoire a neutralisé S100A9 à l'aide d'un anticorps bloquant dans le modèle d'arthrite induite par le collagène (495). Les travaux de Cesaro *et al.* démontrent que le traitement de l'arthrite induite par le collagène par un anticorps anti-S100A9 améliore les symptômes de la maladie en diminuant l'infiltration cellulaire et la présence de cytokines pro-inflammatoires dans le sérum et les articulations. La diminution de l'infiltration des neutrophiles et des monocytes dans les souris traitées avec l'anti-S100A9 confirme l'importance de S100A9 et de l'hétérodimère de S100A8/A9 dans l'adhésion et la transmigration au travers de la barrière endothéliale lorsque déposée sur l'endothélium au site inflammatoire (496, 497).

Ces travaux sont en accord avec le modèle selon lequel S100A9 et la calprotectine sont deux facteurs pro-inflammatoires liés au développement de l'arthrite et de l'inflammation dans le synoviale. Ces protéines auraient des fonctions autocrines et paracrines. Une fois sécrétées dans l'articulation, elles favoriseraient l'infiltration de leucocytes, la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoire et l'activation des cellules environnantes (immunitaires ou non) notamment les fibroblastes (498).

Quelques études ont exploré les fonctions de S100A8 dans l'arthrite chez la souris. Dans le modèle d'arthrite K/BxN, une première étude suggère que S100A8 promeut l'engagement des cellules souches hématopoïétiques et des cellules progénitrices vers la myélogenèse (422). Chez ces souris arthritiques, l'expression des gènes *S100a8* et *S100a9* est augmentée dans les cellules souches hématopoïétiques et les cellules progénitrices. De plus, le traitement des cellules souches hématopoïétiques LSK de ces souris arthritiques avec de la protéine S100A8 recombinante augmente la production de cellules Gr1⁺CD11b⁺ et d'ostéoclastes via un mécanisme possiblement dépendant de l'interaction avec le récepteur TLR4. De plus, dans différentes études *in vitro*, Van Lent *et al.* ont montré que S100A8 augmente l'expression des récepteurs

d'IgG chez les macrophages via la liaison au TLR4 ainsi que la différenciation des monocytes en ostéoclastes (439, 499). Enfin, l'inhibition de S100A8 avec un anticorps bloquant réduit le recrutement de leucocytes au site inflammatoire induit par S100A8 (428, 500).

Même si plusieurs études réalisées *in vitro* ont identifié des fonctions pro-inflammatoires pour S100A8, l'absence d'une souris déficiente pour *S100a8* viable a limité le champ d'études du rôle de S100A8 dans l'inflammation chronique. Il est essentiel de rappeler que des fonctions anti-inflammatoires ont été rapportées pour S100A8 et ces fonctions sont dépendantes notamment de l'oxydation de S100A8 (voir 3.2.2.2). L'expression du gène de S100A8 par les macrophages est induite par les glucocorticoïdes et l'IL-10 (353, 354) et S100A8 extracellulaire peut induire l'expression d'IL-10 (501). Également, la protéine S100A8 oxydée réduit la dégranulation des mastocytes induite par la liaison d'IgE et la sécrétion de cytokines (502, 503).

Au regard de l'ensemble des travaux, il apparaît que les protéines S100A8 et S100A9 ont des rôles importants dans l'inflammation chronique arthritique et les études chez la souris présentent des fonctions pro-inflammatoires claires pour S100A9 et l'hétérodimère de S100A8/A9. Cependant, les fonctions de S100A8 demeurent controversées.

3.4.10. Fonctions des protéines S100A8 et S100A9 dans le psoriasis

3.4.10.1. Chez l'humain

Les protéines S100A8 et S100A9 sont présentes dans les biopsies de peaux psoriasiques de patient(e)s atteint(e)s d'arthrite psoriasique (243, 504-506). Dans les plaques psoriasiques, S100A8 et S100A9 sont fortement concentrées dans le cytoplasme et le noyau des cellules de l'épiderme. Chez les patient(e)s psoriasiques, les protéines S100A8 et S100A9 sont fortement retrouvées dans les zones lésionnelles, alors qu'elles sont faiblement produites par la peau non lésionnelle de ces patient(e)s (507). Similairement aux patient(e)s arthritiques, la concentration de l'hétérodimère S100A8/A9 est élevée dans le sérum des patient(e)s psoriasiques, et la concentration est proportionnelle au degré de la maladie (508). Les gènes codants pour S100A8 et S100A9 se situent dans une région de susceptibilité du psoriasis, à savoir le locus PSORS4 sur le chromosome 1q21 regroupant également des gènes de marqueurs de la différenciation de l'épiderme comme la profilaggrine et l'involucrine (227, 509, 510). Il a été montré que le gène *S100a9* est anormalement méthylé dans la peau de patient(e)s contenant des lésions psoriasiques (511). Les kératinocytes sont les principales cellules productrices de S100A8 et S100A9 dans la peau en réponse à des stimuli pro-inflammatoires comme l'IL-1 α , le TNF, l'IFN- γ , l'IL-1 β , l'IL-22 et l'IL-17 (512-514). L'oncostatine M (OSM), qui est une cytokine de la famille de l'IL-6, est retrouvée dans la peau psoriasique. L'OSM supprime

l'expression des marqueurs de différenciation des kératinocytes, mais induit l'expression des gènes de S100A8 et S100A9 (515). L'ensemble des études chez l'humain montre les protéines S100A8 et S100A9 comme médiateurs potentiels dans le psoriasis.

3.4.10.2. Chez la souris

Plusieurs fonctions ont été identifiées pour S100A8 et S100A9 à l'aide des différents modèles murins reproduisant les symptômes du psoriasis. Tout comme chez l'humain, les gènes des protéines S100A8 et S100A9 sont surexprimés dans l'épiderme de souris psoriasiques (303) et les protéines sont observées dans différents modèles comme les souris déficientes pour *Jun* et *Junb* dans l'épiderme (ou modèle DKO*) (303), les souris déficientes pour la tristetraproline (*TTP*^{-/-}) (287), les souris K14-Angptl6 transgéniques (516) ou encore les souris traitées avec l'imiquimod (517, 518). Une étude s'est intéressée à la méthylation du gène *S100a9* et a montré que l'expression du gène *S100a9* est régulée par l'hydroxyméthylation via l'enzyme TET2 (*Ten-eleven translocation 2*) dans le modèle de psoriasis induit par l'imiquimod (511). De façon analogue à l'humain, les protéines S100A8 et S100A9 sont retrouvées fortement exprimées dans l'épiderme psoriasique et se localisent dans le cytosol, la membrane plasmique et le noyau (303). De plus, les cellules immunitaires qui s'infiltrant au travers du derme et l'épiderme produisent S100A8 et S100A9, notamment les neutrophiles (516, 519).

À ce jour, seule la délétion de *S100a9* a été étudiée chez la souris dans différents modèles de psoriasis. La délétion de *S100a9* dans le modèle DKO* diminue les concentrations d'IL17A, IL-17F, IL-23, IL-23R et IL-12p40 dans le sérum (303). La présence de macrophages, neutrophiles et lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ dans le derme s'en trouve amoindris. Enfin, l'épaississement de l'épiderme est également réduit. La même étude décrit les conséquences de la délétion de *S100a9* sur le psoriasis induit par l'imiquimod en comparant les souris *S100a9*^{+/-} et *S100a9*^{-/-}, mais non au souris sauvage (303). Les souris homozygotes traitées à l'imiquimod ont une hyperplasie de l'épiderme moins importante que les souris hétérozygotes. De plus, l'étude mentionne une faible détection de l'ARNm de S100A8 dans les souris *S100a9*^{-/-} et attribue ainsi le phénotype des souris *S100a9*^{-/-} à l'absence de l'hétérodimère S100A8/A9. La protéine S100A9 est capable de passer du cytosol au noyau des kératinocytes où elle interagit avec la région promotrice du gène codant pour C3 (Complément 3) et active son expression (303). La sécrétion accrue du C3 en plus de S100A8-S100A9 chez les kératinocytes entretiendrait l'inflammation au sein de l'épiderme ainsi que l'hyperplasie, et cette fonction est conservée chez l'humain.

D'autres travaux de Vogl *et al* ont révélé un phénotype différent à la délétion de *S100a9*. Dans les souris *TTP*^{-/-} surexprimant le TNF et développant spontanément des symptômes de dermatite, la délétion de *S100a9* augmente la gravité des symptômes de type psoriasique avec une réponse inflammatoire et une hyperprolifération de l'épiderme dès les premiers jours suivant la naissance. En outre, l'expression des

marqueurs de différenciation K10 et loricrine est remarquablement réduite (287). En absence de S100A9, les souris psoriasiques expriment de nouveau l'homodimère de S100A8. Les auteurs expliquent que l'homodimère actif de S100A8 est pro-inflammatoire et qu'en l'absence de S100A9, il n'y a pas de formation d'un tétramère composé de deux hétérodimères de calprotectine. Ils affirment que la formation du tétramère est liée à un mécanisme d'auto-inhibition de l'inflammation qui, lorsque formée, empêche la liaison de S100A8/A9 au TLR4/MD2 (287). Ces travaux mettent en avant l'importance des fonctions de l'hétérodimère de calprotectine *in vivo* et démontreraient une contribution négligeable aux homodimères de S100A8 et S100A9.

Ainsi, l'ensemble des études mentionnées présentent différentes fonctions pour S100A8 et S100A9 dans plusieurs modèles de psoriasis. L'utilisation des souris déficientes pour *S100a9* montre des phénotypes différents selon le modèle animal utilisé. Malgré des fonctions pro-inflammatoires et anti-inflammatoires identifiés pour l'hétérodimère de S100A8/A9, les fonctions de S100A8 et S100A9 dans la pathogenèse du psoriasis restent donc controversées.

Chapitre 1 Hypothèse et objectifs du projet

1.1 Mise en contexte

Les protéines S100A8 et S100A9 sont deux petites protéines fixatrices des ions Ca^{2+} . Elles existent sous forme d'homodimères non covalents et peuvent former un hétérodimère, la calprotectine (520). Ces protéines sont des DAMP et ont de nombreuses fonctions liées à l'inflammation (399). Nous avons pu apprécier dans l'introduction de cette thèse que ces fonctions sont plus largement associées à de nombreuses maladies dont les maladies auto-immunitaires parmi lesquelles figurent l'arthrite rhumatoïde et le psoriasis (489, 504). S100A8 et S100A9 sont fortement retrouvées dans le liquide synovial et le sérum des patients arthritiques ainsi que dans les plaques psoriasiques (399).

Ces protéines agissent sur différents processus de l'inflammation. S100A8 et S100A9 activent la production et sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et chimiokines chez le monocyte (414). S100A8 possède en outre une très forte activité chimioattractante pour les neutrophiles et monocytes (425). Cependant, plusieurs études démontrent des fonctions anti-inflammatoires pour S100A8 liées à son oxydation (333, 354). Les protéines S100A8 et S100A9 ont également la capacité d'agir sur la prolifération et la différenciation des cellules. Une étude dans nos laboratoires a montré que S100A9 augmente la différenciation des cellules LMA murines et de patients et cette fonction est inhibée par des concentrations faibles de S100A8 extracellulaire. S100A8 induit également la prolifération des cellules LMA (390). D'autres travaux ont cependant montré que la stimulation de cellules souches hématopoïétiques avec S100A8 promeut le développement des cellules myéloïdes *in vitro* (422).

Nous avons également présenté les fonctions connues de S100A9 dans différents modèles de maladie auto-immune. Notre laboratoire a notamment démontré que S100A9 contribue au développement de l'arthrite rhumatoïde induite chez la souris (495). De plus, les souris déficientes pour *S100a9* ont été étudiées dans différents fonds génétiques et différents modèles de maladies auto-immunes comme le psoriasis et ces travaux démontrent des fonctions pro-inflammatoires, mais aussi anti-inflammatoires (287, 303). L'absence d'une souris déficiente pour *S100a8* ne permet pas à ces études de conclure et comparer les fonctions de ces protéines. En outre, les fonctions distinctes de l'hétérodimère de S100A8/A9 et des homodimères de S100A8 et S100A9 *in vivo* sont toujours peu connues.

Notre laboratoire avait développé la première souris *S100a8*^{-/-} et obtenu des résultats préliminaires démontrant que S100A8 est protectrice dans le modèle d'arthrite induite par le collagène et de psoriasis induit par l'imiquimod. La caractérisation des fonctions précises de S100A8 à l'aide de cette souris déficiente s'avère

essentielle pour identifier et différencier les fonctions de S100A8 et S100A9. Des expériences préliminaires de caractérisation des souris déficientes pour *S100a8* étaient déjà réalisées à mon arrivée et ces travaux devaient être approfondis. De plus, la comparaison des phénotypes des souris déficientes pour *S100a8* et *S100a9*, qui n'avait pas été encore faite, était évidemment primordiale pour comparer les fonctions de S100A8 et S100A9 et disséquer les rôles de ces protéines dans le développement des maladies auto-immunes.

1.2 Hypothèse du projet de recherche

Au regard des nombreuses observations présentées, j'ai fait l'hypothèse que les protéines S100A8 et S100A9 ont des fonctions distinctes et antagonistes dans la réaction inflammatoire associée aux maladies auto-immunes. De ce fait, S100A8 protégerait contre l'inflammation et S100A9 augmenterait l'inflammation.

1.3 Objectifs et méthodologie

Le premier objectif fut d'approfondir l'étude des fonctions de S100A8 dans la réaction inflammatoire ainsi que dans le développement de l'arthrite rhumatoïde chez la souris. Pour cela, les fonctions de S100A8 ont été étudiées à l'aide des souris déficientes pour *S100a8*. Des expériences de quantification et phénotypage des leucocytes en circulation et dans les différents compartiments lymphoïdes primaire et secondaire par cytométrie en flux ont été développées dans le but de comprendre les fonctions de S100A8 dans la myélopoïèse. Également, des expériences de différenciation des monocytes issus de la moelle osseuse *in vitro* ont été réalisées afin d'étudier les fonctions de S100A8 sur la différenciation des cellules myéloïdes en cellules dendritiques et macrophages. Des études fonctionnelles des neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques ont également été réalisées *in vitro*. Dans un second temps, afin d'analyser les fonctions de S100A8 dans l'arthrite chez la souris, nous avons analysé l'infiltration cellulaire et la dégradation du cartilage et de l'os chez les souris déficientes pour *S100a8* à l'aide du modèle d'arthrite par le collagène. Enfin, je me suis intéressé aux fonctions de *S100a8* liées à l'activité ostéoclastique *in vivo* et *in vitro*.

Afin de déterminer si les fonctions de S100A8 et S100A9 dans l'inflammation sont similaires entre différentes maladies auto-immunes, notre deuxième objectif a été d'étudier les fonctions de S100A8 et S100A9 dans le modèle de psoriasis induit par l'imiquimod. Le psoriasis a été induit à des souris déficientes pour *S100a8* et *S100a9* et constitue la première comparaison de ces deux génotypes. Également, afin de déterminer les fonctions extracellulaires de S100A8 et S100A9 dans le psoriasis, des souris sauvages ont été traitées à l'aide d'anticorps contre les protéines S100A8 et S100A9. Pour résoudre cet objectif, j'ai comparé les fonctions de S100A8 et S100A9 dans l'hyperplasie de l'épiderme, et la réponse inflammatoire dans la peau et les ganglions lymphatiques.

Chapitre 2 Augmentation de la myélopoïèse et aggravation de l'arthrite chez les souris déficientes pour *S100a8*.

1. Résumé

Les protéines S100A8 et S100A9 sont des motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires retrouvés dans le sérum des patients auto-immuns ou infectés. Contrairement à S100A9, les fonctions de S100A8 sont controversées. Nous avons étudié son activité biologique dans l'arthrite induite par le collagène à l'aide de la première souris viable et fertile déficiente pour *S100a8*. Les souris *S100a8*^{-/-} comparées aux souris sauvages ne présentent pas de différences dans leur population de lymphocytes en circulation dans le sang ou dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires. Cependant, nous avons observé une augmentation du nombre de neutrophiles, monocytes et cellules dendritiques dans le sang et dans la moelle osseuse associée à une plus forte expression de marqueurs de cellules myéloïdes comme le CD11b, le Ly6G et le CD86. De plus, les précurseurs communs de granulocytes et macrophages sont également augmentés dans la moelle osseuse et entraînent un plus grand nombre de macrophages et cellules dendritiques en culture. Les souris *S100a8*^{-/-} ont développé une arthrite plus sévère conduisant à une plus grande activité ostéoclastique et une plus grande dégradation osseuse. Ces symptômes corrélaient avec une augmentation de l'infiltration de cellules inflammatoires et la sécrétion de cytokines dans les pattes. Ainsi, cette étude suggère que S100A8 est un motif anti-inflammatoire régulant la différenciation des cellules myéloïdes et mitigeant le développement de l'arthrite rhumatoïde.

2. Abstract

Expressed strongly by myeloid cells, damage-associated molecular pattern (DAMP) proteins S100A8 and S100A9 are found in the serum of patients with infectious and autoimmune diseases. Compared to S100A9, the role of S100A8 is controversial. We investigated its biological activity in collagen-induced arthritis using the first known viable and fertile S100a8-deficient (*S100a8^{-/-}*) mouse. Although comparable to the wild type (WT) in terms of lymphocyte distribution in blood and in the primary and secondary lymphoid organs, *S100a8^{-/-}* mice had increased numbers of neutrophils, monocytes and dendritic cells in the blood and bone marrow, and these all expressed myeloid markers such as CD11b, Ly6G and CD86 more strongly. Granulocyte-macrophage common precursors were increased in *S100a8^{-/-}* bone marrow and yielded greater numbers of macrophages and dendritic cells in culture. The animals also developed more severe arthritic disease leading to aggravated osteoclast activity and bone destruction. These findings were correlated with increased inflammatory cell infiltration and cytokine secretion in the paws. This study suggests that S100A8 is an anti-inflammatory DAMP that regulates myeloid cell differentiation, thereby mitigating the development of experimental arthritis.

3. Article

Enhanced myelopoiesis and aggravated arthritis in *S100a8*-deficient mice

Annabelle Cesaro^{1,#a¶}, Joan Defrêne^{1¶}, Asmaa Lachhab¹, Nathalie Pagé¹, Mélanie R. Tardif¹, Amin Al-Shami^{2,#b}, Tamas Oravecz^{2,#c}, Paul R. Fortin^{1,3}, Jean-François Daudelin⁴, Nathalie Labrecque^{4,5}, Fawzi Aoudjit^{1,6}, Martin Pelletier^{1,6} and Philippe A. Tessier^{1,6*}

¶¶These authors contributed equally to this work

Introduction

Analogous to pathogen-associated molecular patterns, damage-associated molecular patterns or DAMPs, also known as alarmins, are endogenous molecules released passively by cells undergoing non-programmed cell death as well as actively through normal secretion pathways [1]. They are believed to play key roles in the progression of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis [2], systemic lupus erythematosus [3] and inflammatory bowel disease [4]. The DAMPs S100A8 and S100A9 belong to a subset of S100 proteins called myeloid related proteins (MRPs) because they are predominantly expressed in neutrophils and monocytes [5]. These include S100A8 and S100A9, which are expressed constitutively in myeloid cells and are inducible in synoviocytes [6], keratinocytes [7], epithelial cells [8], endothelial cells [9] and other cell types. S100A8 and S100A9 form non-covalently bonded homodimers and a heterodimer called S100A8/A9 or calprotectin [10]. The three dimers are not always co-expressed [9] and are secreted independently during inflammatory responses through alternative secretion pathways independent of Golgi and secretion vesicles [11, 12]. It is therefore presumed that they have different activities.

While S100A9 has been studied extensively, the activities of S100A8 remain controversial. S100A9 stimulates pro-inflammatory cytokine secretion [13, 14], neutrophil phagocytosis [15], degranulation of secretory and specific/gelatinase granules [16] and phagocyte migration [13, 17] and promotes the differentiation of acute myeloid leukemia cells [18]. *S100a9^{-/-}* mice have been found resistant to adjuvant-induced arthritis and systemic lupus erythematosus, the latter resistance being due at least in part to reduced CD8⁺ T cell activation [19, 20]. Thus, studies using these mice have shown the importance of S100A9 as an alarmin in immune cell crosstalk and in the establishment of persistent inflammation. S100A8 is found at heightened levels in chronic inflammation, but its role therein remains uncertain. S100A8 is a chemotactic factor for neutrophils and monocytes [21], and injecting it into live animals leads to accumulation of phagocytes at the inflammatory site [22, 23]. Inhibiting it with antibodies reduces leukocyte recruitment in models of acute inflammation [24, 25], which is consistent with pro-inflammatory activity. However, its expression by macrophages is induced by glucocorticoids and IL-10 [26, 27], and S100A8 itself induces IL-10 expression [28], suggesting an anti-inflammatory function. S100A8 is easily oxidized [29-32] and provides some protection against the harmful effects of reactive oxygen species (ROS) released in chronic inflammation [33]. Oxidized S100A8 is anti-inflammatory [34] and reduces IgE-mediated mast cell degranulation and cytokine secretion [33]. It is thus safe to say that both pro-inflammatory and anti-inflammatory activities have been reported for S100A8.

S100A8 has been shown to promote the commitment of hematopoietic stem cells and progenitor cells to myelogenesis in experimental arthritis [18, 35]. Its expression is increased in hematopoietic stem cells and

early progenitors in arthritic mice, and treating Kit⁺Sca1⁺Lin⁻ cells from such mice with recombinant S100A8 increases production of Gr1⁺CD11b⁺ cells and osteoclasts. However, S100A8 inhibits the differentiation of acute myeloid leukemia cells into mature neutrophils and monocytes [18, 35]. As is the case for inflammation, the exact role of S100A8 in the production and maturation of myeloid cells remains unknown.

Levels of S100A8/A9 in the serum and synovium of rheumatoid arthritis patients have been found to correlate with disease severity [36]. Both proteins are also expressed constitutively in bone and cartilage cells [37]. While blocking S100A9 prevents inflammation and joint destruction by reducing leukocyte migration as well as cytokine secretion [6, 13, 38], the functions of S100A8 in chronic inflammation are unknown, in part due to the lethality of the deleted S100a8 gene in embryonic mice [39, 40]. In this study, we characterized the first viable *S100a8* knockout mouse strain and investigated the role of S100A8 in the differentiation of myeloid cells. We report that its absence is strongly associated with increased numbers of circulating myeloid cells and aggravated collagen-induced arthritis, suggesting that it has a mitigating effect on the immune response in arthritis. We therefore propose that DAMPs can exert inhibitory activities in inflammatory diseases.

Material and methods

Generation of S100a8-deficient mice. The animal protection committee at Université Laval (Quebec City, QC, Canada) approved the experimental protocols (approval numbers 2012103 and 2013006). The *S100a8* targeting vector was derived using the Lambda KOS system [41]. The Lambda KOS phage library was screened by PCR using primers specific for exons 2 and 3 (Table 1). The PCR-positive phage super-pools were plated and screened by filter hybridization. Three pKOS genomic clones, pKOS-18, pKOS-23 and pKOS-64, were isolated from the screened library and confirmed by sequence and restriction analysis. Gene-specific arms 5'-GCGACTTTTCCTTTCAGTTGAAAGGAAATCTTTCGTGACA-3' and 5'-AGGACCAAAACAAGACAGTTCTTTCAGTTTTTCATCCC-3' were appended by PCR to a yeast selection cassette containing the URA3 marker. The yeast selection cassette and pKOS-18 were co-transformed into yeast, and clones that had undergone homologous recombination to replace a 529 bp region containing exons 2 and 3 with the yeast selection cassette were isolated. The yeast cassette was subsequently replaced with a LacZ/Neo selection cassette to complete the *S100a8* targeting vector. The NotI linearized targeting vector was electroporated into 129/SvEvBrd (Lex-1) ES cells. G418/FIAU-resistant ES cell clones were isolated and correctly targeted clones were identified and confirmed by Southern blot analysis (data not shown). Three targeted ES cell clones were identified and microinjected into C57BL/6 (albino) blastocysts to generate chimeric animals that were bred to C57BL/6 (albino) females, and the resulting heterozygous offspring were interbred to produce homozygous *S100a8*-deficient mice. The genotype at the *S100a8* locus was determined

by screening DNA from tail biopsies using quantitative PCR for the Neo cassette. This strategy allowed discrimination of 0, 1, or 2 gene disruptions representing respectively *S100a8*^{+/+}, *S100a8*^{+/-} and *S100a8*^{-/-} mice.

Table 1

PCR primers used for *S100a8*^{-/-} mice generation and mRNA study

Targeted gene	Primers	
	Foward	Reverse
<i>S100a8</i> in Lambda KOS phage library	a8-1 [5'-GAAATCTTTCGTGACAATGCCG-3']	a8-7 [5'-GGAAC TCC TCGAAGTTAATTG-3']
	a8-32 [5'-AGGGGCC TAGACATGGACTTATTG-3']	a8-33 [5'-TACGCCATTCCACTTCC TTTATCC-3']
5' internal probe 32/33	a8-40 [5'-GCTTTGCC TTTGTGGAGATC-3']	a8-41 [5'-GGTTGTAAAC TACATCCAG-3']
	3' external probe 40/41	
<i>S100a8</i> ^{+/+}	<i>S100a8</i> -46 [5'-CAGGGGCC TAGACATGGACTTAT-3']	<i>S100a8</i> -4 [5' GTGGTAGACATCAATGAGGTTG-3']
	<i>S100a8</i> ^{-/-}	GT-IRES [5'- GCTAGACTAGTCTAGCTAGAGCGG-3']
<i>S100a9</i>	<i>S100a9</i> -F [5'-GCCAACAACCTGTGTAGTACTGTGC-3']	<i>S100a9</i> -R [5'-GGGTGAAATAGAGGAGGCTGTTAGG-3']
<i>S100A8</i> cDNA	<i>S100A8</i> -F [5'-GGAAATCACCATGCCCTCTA-3']	<i>S100A8</i> -R [5'-TGCTGTCTTTGTGAGATGC-3']
	<i>S100A9</i> -F [5'-TCATCGACACCTTCCATCAA-3']	<i>S100A9</i> -R [5'-GTCTGGTTGTGTCCAGGT-3']
18S cDNA	18S-F [5'-TGCAAGCTTATGACCTGCAC- 3']	18S-R [5'-CAAGTGGCGTTGAGCAATAA-3']

S100a8^{-/-} mice (mixed 129/SvEvBrd and C57BL/6J genetic background) were backcrossed to DBA/1 and C57BL/6 backgrounds (Jackson Laboratories) for 10 generations. Routine genotyping for screening was carried out by PCR with tail biopsy samples (Table 1).

Expression analysis of S100a8 and S100a9 by RT-PCR. Total RNA was extracted from bone marrow cells with Trizol, followed by reverse transcription (RT) carried out according to the manufacturer's instructions (Promega). PCR amplifications of *S100a8*, *S100a9* and *18S* cDNA were performed using primers described in Table 1.

Protein and Antibody production. Recombinant murine S100A8 (mS100A8), rat monoclonal anti-mS100A9 (clone 2A5) and rabbit polyclonal anti-mS100A8 and anti-mS100A9 IgG were generated as described previously [13, 22, 23]. The absence of endotoxin contamination in antibody and protein preparations was confirmed using the Limulus amebocyte assay (Cambrex).

Flow cytometry. Mice were sacrificed at the age of 6–8 weeks by cervical dislocation, and the blood and femurs were recovered. Bone marrow cells were collected from the femurs by flushing with RPMI medium supplemented with 5% foetal calf serum. Erythrocytes were lysed by suspending the cells in 0.15 M NH₄Cl for 5 min followed quickly by centrifugation. Leukocytes were stained with Live/Dead Fixable Blue Dead Cell Stain (Invitrogen, Paisley, UK) and Fc receptors on cells were blocked by incubation with Fc block (eBioscience/Thermo Fisher, San Diego, CA, USA). Cell labelling was performed using a combination of monoclonal antibodies (S1 Table). Intracellular antigen was detected inside permeabilized cells using the FOXP3/Transcription factor staining buffer set (eBioscience) and labelling with monoclonal antibodies. Cell fluorescence was then analyzed on a BD LSR/LSRII (BD Biosciences, Mississauga, ON, CA) and data was analyzed using the FlowJo 10 (Tree Star Inc.) and Cytobank software (Cytobank, Santa Clara, CA). The viSNE was run using default Cytobank parameters (iterations = 1000, perplexity = 30, θ = 0.5). The number of live cells analyzed ranged from 30,000 to 100,000 per sample. Samples were down-sampled randomly and analysis was run on equal numbers of events per sample. The range of events was determined from the sample with the fewest events acquired. The viSNE heat maps are shown as fluorescent intensity of each marker for each event.

Acute inflammation models. Air pouches were raised on the dorsum of 10–12-week-old mice by subcutaneous injection of 3 mL of sterile air on days 0 and 3 (427). On day 7, 1 mL of LPS (1 μ g/mL) or its diluent (PBS) was injected into the air pouches. Six hours after injection, the mice were sacrificed by asphyxiation with CO₂. The air pouches were washed with 5 mL of PBS-5 mM EDTA and the exudates were

centrifuged at $500 \times g$ for 5 min at 4°C . For thioglycollate-elicitation, 1 mL of 4% Brewer's thioglycollate broth (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) was injected into the abdomen. The mice were euthanized 4 h later and peritoneal cells were recovered by lavage with 5 mL of PBS-5 mM EDTA. Cells were counted with a hemacytometer following acetic blue staining. Leukocyte subpopulations were characterized on the basis of Wright-Giemsa staining of cytopins.

Isolation and culture of bone marrow cells. Bone-marrow-derived dendritic cells and macrophages were prepared as described previously [42, 43]. Briefly, bone marrow cells were isolated from femurs and cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum, 1X non-essential amino acids, $50 \mu\text{M}$ β -mercaptoethanol and 0.2% primocin. The dendritic cells were cultured in the presence of murine GM-CSF (15 ng/mL) and murine IL-4 (15 ng/mL). On day 6, non-adherent cells were collected and cultured for a further 48 h in the presence of 50 ng/mL each of GM-CSF and IL-4. Non-adherent cells were then harvested and cultured for 24 h in the presence or not of LPS (300 ng/mL). Macrophages were cultured in the presence of GM-CSF (10 ng/mL) for 4 days, and non-adherent cells were then harvested and cultured in fresh media for an additional 3 days. Adherent cells were detached with trypsin and harvested for analysis at day 7.

Mixed lymphocyte reaction. CD4^{+} T cells were purified from the spleens of B10.BR mice (Jackson Laboratory) using the EasySep™ Mouse CD4^{+} T Cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies) following the manufacturer's instructions. Cells were then labelled with $5 \mu\text{M}$ CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) according to the manufacturer's instructions (Invitrogen) before being co-cultured with bone-marrow-derived dendritic cells at different T-cell/dendritic cell ratios (1:5, 1:10, 1:20) for 72 h in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum, $50 \mu\text{M}$ β -mercaptoethanol and 0.2% primocin. Cells were then harvested and lymphocytes were labelled for flow cytometry analysis.

ROS and phagocytosis assays. Neutrophils were purified from bone marrow using the Neutrophil Isolation Kit according to the manufacturer's instructions (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) then exposed to $1 \mu\text{M}$ CellROX™ reagent (Invitrogen) and diphenyleneiodonium (DPI; $5 \mu\text{M}$) and/or rotenone/antimycin A ($0.5 \mu\text{M}$) for 30 minutes followed by PMA (100 nM) for 1 h. Cells were then washed with PBS and analyzed by flow cytometry. Phagocytosis was measured using the Vybrant™ Phagocytosis Assay Kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The cells were incubated for 2 h at 37°C with particles diluted 1:3 in RPMI medium supplemented with 10% foetal calf serum then washed with PBS and analyzed by flow cytometry.

Oxygen consumption. Bone marrow neutrophils were seeded in XF96 culture plates (3×10^5 cells per well) in XF media (Seahorse Bioscience/Agilent Technologies). The plate was centrifuged for 1 min at 600 rpm to allow adherence of neutrophils. PMA (10^{-7} M) and DPI (5 μ M) were injected at the time points indicated in the figures. Measurements were made in real-time in the extracellular flux analyzer as described previously [44]. The Wave 2.3 software provided automatic calculation of the oxygen consumption rate.

Osteoclast culture and resorption assay. Bone marrow cells were cultured for 7 days in RPMI + 10% foetal bovine serum + 30 ng/mL rmM-CSF + 30 ng/mL rmRANK-L + 0.2% primocin at 37°C in osteoassay plates (Corning). The medium was then acidified with HCl to maintain the pH at 7.1 for 3 days. The cells were then lysed with 10% NaClO for 5 min and washed 2 times with distilled water. Resorption pits were counted and measured by microscopy.

Induction of collagen-induced arthritis. Female mice (WT and *S100a8*^{-/-} DBA/1) aged 6–8 weeks were immunized subcutaneously at the base of the tail with chicken collagen type II (100 μ g/mouse, Chondrex Inc.) emulsified in complete Freund's adjuvant then 26 days later received an intra-peritoneal injection of LPS (25 μ g/mouse). Disease activity was monitored every other day on a scale of 0 to 4 per paw for a maximum score of 16 per mouse as described previously [13]. For antibody treatment, mice received rabbit polyclonal anti-S100A8 or control IgG three times per week (10 mg/kg of body weight, intra-peritoneal) starting on the day of LPS injection.

Histopathological assessment of collagen-induced arthritis. Paws were fixed in 4% paraformaldehyde, decalcified in Surgipath (Leica Biosystems) for 10 days and embedded in paraffin. Sections were stained with H&E (Thermo Fisher Scientific) or safranin/fast green colorations (VWR International). Bone destruction, collagen integrity and cell infiltration were evaluated by two impartial observers as described previously [13] according to the following scales: 0–3 for bone destruction; 0–2 for collagen; 0–2 for cell infiltration.

Micro-Computed Tomography (μ CT) analysis. Paws fixed in 10% formalin were scanned in a μ CT device (SkyScan) at the McGill University Centre for Bone and Periodontal Research Core Facility. The astragalus and calcaneum bone (ankle) volumes were measured. Total porosity and the bone volume to tissue volume ratio (BV/TV) were used to estimate the overall bone loss.

Stimulation of human neutrophils and quantification of S100A8 homodimers. This study was approved by the CHU de Quebec – Université Laval ethics review board. Written informed content has been

obtained from blood donors after the nature and possible consequences of the studies were explained. Patients from the CHU de Québec SARD Biobank Repository Database (SBRD) were included in the study. Plasma from 19 patients suffering from rheumatoid arthritis was obtained between September 2014 and July 2017 at the time of diagnostic (S2 Table). Ten healthy donors were used as controls. Peripheral blood from healthy adult volunteers was collected in heparinized tubes. Neutrophils were isolated as described previously [45] and re-suspended in HBSS supplemented with 10 mM HEPES, pH 7.4 (HBSS-H) containing 1.3 mM Ca^{2+} and 0.8 mM Mg^{2+} . Cell purity and viability were consistently > 98% based on acetic blue staining and trypan blue exclusion. Neutrophils (10^7 cells/mL) were stimulated for 30 min with LPS (100 ng/mL) or its diluent (PBS), then centrifuged and S100A8 homodimers were quantified in the plasma and supernatant by an in-house ELISA described previously [46].

ELISA. Blood was collected 4 h and 5 days after LPS injection and centrifuged. Serum anti-collagen II antibody titer was measured using an anti-collagen detection kit according to the manufacturer's instructions (Chondrex inc). Calprotectin, S100A8 and S100A9 were quantified by ELISA as described previously [13]. Murine IL-12, IL-27, IL-6, CXCL1/KC, IL-1 β , IL-10 were quantified by multiplex analyses using the mouse cytokine custom premix kit systems according to the manufacturer's instructions (R&D systems).

Statistical analyses. S100A8/A9, S100A8, S100A9 concentrations, cartilage, bone destruction, cell infiltration, BV/TV, total porosity, cytokine secretion, cell counts, marker expression, and osteoclastic activity were compared using the unpaired Student t-test in GraphPad Prism version 7.00. Clinical arthritic scores were compared using a Mann-Whitney test. A p value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Data Availability. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the Open Science Framework repository (DOI 10.17605/OSF.IO/Y4UWZ).

Results

Deletion of *S100a8*^{-/-} promotes myeloid cell differentiation. Mice with all *S100a8* coding exons (2 and 3) deleted (S1A Fig) were viable and had normal litter sizes and male-to-female ratios in both the C57BL/6 and the DBA-1 background. Southern blot analyses and DNA sequencing confirmed a single insertion of the DNA cassette (as revealed by the KO probe) and that deletion was restricted to *S100a8*, whereas *S100a9* was not affected (S1B Fig). No *S100A8* mRNA was detected in bone marrow cells (S1C Fig) and *S100A9* mRNA was present at reduced levels compared to WT. As expected, deletion of *S100a8* led to complete abrogation of *S100A8* expression in peripheral blood neutrophils (Fig 1A). Although *S100a9* mRNA was detected in leukocytes, the protein was undetectable (based on ELISA and western blot) and the absence of *S100A8* ensured a lack of *S100A8/A9* heterodimer in the serum.

Since myeloid cells express *S100A8* strongly, we first performed a 13-parameter single-cell flow cytometry analysis combined with visualization using t-distributed stochastic neighbour embedding (viSNE) to study the leukocyte phenotypic diversity that develops in *S100a8*^{-/-} mice. Two-dimensional visualization of the multidimensional cytometry data using viSNE revealed an altered geography of the neutrophil cluster in peripheral blood of *S100a8*^{-/-} mice. This corresponded to more abundant neutrophils with a higher expression of the myeloid markers CD11b and Ly6G in *S100a8*^{-/-} mice (Fig 1B). We thus found altered neutrophil cluster topology in the peripheral blood of *S100a8*^{-/-} mice, specifically increased counts of cells with heightened expression of these and other myeloid markers. An increase in the numbers of circulating CD11b⁺ myeloid cells was observed (Fig 1C and S2A Fig), including granulocytes (Ly6C^{med}Ly6G^{hi}; Fig 1D), non-classical monocytes (Ly6C-CD115⁺; Fig 1E), and dendritic cells (CD11c⁺MHC class II⁺; Fig 1F). Expression of CD45, CD11b and Ly6G was heightened in *S100a8*^{-/-} neutrophils (Fig 1G), as expression of CD45 and CD11b was in *S100a8*^{-/-} monocytes (S2B Fig). CD4⁺ and CD8⁺ T cells were not affected in the lymphoid organs of these mice (S2C Fig).

The integrin CD11b is involved in myeloid cell migration and acts as a major opsonin receptor. To investigate the effect of *S100a8* gene deletion on neutrophil and monocyte migration, bacterial lipopolysaccharide (LPS) was injected into air pouches raised on the dorsum of WT and *S100a8*^{-/-} mice. This induced unequivocal neutrophil migration to the air pouch, although the responses of the two mouse strains did not differ significantly (Fig 2A). Intra-peritoneal injection of thioglycolate also induced similar inflammatory responses in both strains (S2D Fig). This suggests that CD11b up-regulation in *S100a8*^{-/-} mice does not affect intrinsic migration of myeloid cells. We next examined the effect of heightened expression of CD11b on phagocytosis in *S100a8*^{-/-} myeloid cells. *S100a8*^{-/-} monocytes were slightly more inclined than WT monocytes

to engulf bacteria (Fig 2B), but cells from both genetic backgrounds engulfed similar numbers. The heightened expression of CD11b thus affords a slight improvement of myeloid cell phagocytic activity.

A hallmark of neutrophils and monocytes is ROS production, and it has been suggested that S100A8/A9 regulates ROS accumulation. Since S100A8 is easily oxidized, it could scavenge ROS [47]. In addition, S100A8/A9 activates phagocyte NADPH oxidase by transferring to it the co-factor arachidonic acid [48]. We therefore analyzed oxygen consumption by *S100a8^{-/-}* neutrophils using an extracellular flux analyzer. Neutrophils have very few mitochondria and almost no mitochondrial respiration. Most of their oxygen consumption is associated with NADPH oxidase activity, as demonstrated by inhibition of PMA-induced oxygen consumption using DPI (S3 Fig). Therefore, analysis of oxygen consumption by neutrophils allowed us to directly interrogate NADPH oxidase activation, without possible interference from ROS scavenging by S100A8. Direct measurement of NADPH oxidase activity revealed that oxygen consumption in response to PMA stimulation was delayed in *S100a8^{-/-}* neutrophils (Fig 2C), with 40% less oxygen consumed over a period of 50 min (Fig 2D). Flow cytometry revealed a corresponding reduction of 39% in ROS produced by *S100a8^{-/-}* neutrophils (Fig 2E). These results suggest that absence of S100A8 leads to inefficient NADPH oxidase activity in neutrophils, and that scavenging of ROS by S100A8 is limited.

Deletion of S100a8 promotes production of dendritic cells by bone marrow. The larger number of circulating neutrophils, monocytes and dendritic cells in *S100a8^{-/-}* mice suggested that the deletion alters myeloid cell production by bone marrow. While total numbers of leukocytes were similar in bone marrows of WT and *S100a8^{-/-}* mice (Fig 3A), analyses of bone marrow cells revealed that CD11b⁺ myeloid and granulocyte monocyte progenitor (GMP) populations were increased respectively by 22% and 19% compared to WT mice (Fig 3B,C; S4A Fig). In contrast, no differences in the numbers of megakaryocyte-erythroid progenitor (MEP), common monocyte progenitor (CMP), monocyte-macrophage DC progenitor (MDP) and common monocyte progenitor (cMOP) numbers were detected (Fig 3C; S4A-C Fig). Bone marrow of *S100a8^{-/-}* mice contained 33% more neutrophil-committed cells (Ly6C^{med}Ly6G^{hi}, Fig 3D), and these expressed higher levels of CD45, CD11b and Ly6G compared to those from WT mice (Fig 3E). Similarly, monocyte-committed cells were slightly elevated in *S100a8^{-/-}* bone marrow (Fig 3F) and expressed more CD11b than did those from WT (Fig 3G). These results suggest that *S100a8* acts as a repressor of myeloid cell differentiation in bone marrow.

We next derived dendritic cells from bone marrow to determine if the absence of S100A8 leads to greater numbers of DC precursors. Using GM-CSF and IL-4, approximately 35% more dendritic cells were generated in the case of *S100a8^{-/-}* (Fig 3H), and these expressed more MHC class II and CD86 (Fig 3I),

suggesting a more mature phenotype. Stimulation with LPS increased expression of CD86 but not MHC class II in dendritic cells derived from either mouse strain. Secretion of IL-12 following activation by LPS was also similar, whereas concentrations of immunosuppressive cytokines IL-10 and IL-27 were reduced for *S100a8*^{-/-} DCs (Fig 3J-L). However, *S100a8*^{-/-} DCs were as efficient as WT DCs in terms of inducing CD4⁺ lymphocyte proliferation (Fig 3M). More dendritic cells were also found in *S100a8*^{-/-} skin, as revealed by cell crawl-out observations (Fig 3N), and these cells also exhibited increased expression of MHC class II (Fig 3O). The absence of *S100a8* thus leads to increased differentiation and activation of myeloid cells in granulocytes, monocytes and dendritic cells.

Aggravated arthritis in *S100a8*^{-/-} mice. Elevated concentrations of calprotectin are found in the plasma and synovial fluids of rheumatoid arthritis patients, and S100A9 is known to exacerbate chronic inflammation in models of arthritis [6, 24, 49, 50]. In contrast, increased numbers of myeloid cells including neutrophils, monocytes and dendritic cells suggest that immune responses might be aggravated in the absence of the *S100a8* gene. However, data on the distribution of the S100A8 homodimer are scarce, and before investigating its possible role in arthritis, we first sought to determine if it is even present in association with the disease. We found it in plasma obtained from healthy donors and patients with rheumatoid arthritis (Fig 4A). We then confirmed in vitro that human neutrophils secrete small amounts of S100A8 homodimers spontaneously, and that this secretion is accentuated following stimulation with LPS (Fig 4B). To confirm that the adaptive immune response is enhanced in *S100a8*^{-/-} mice, arthritis was induced by injection of chicken collagen type II once at the base of the tail. This was sufficient to induce a rapid and strong response within 25 to 30 days, which was then inflamed with LPS. This led to arthritis in respectively 60% and 95% of WT and *S100a8*^{-/-} mice (Fig 4C), the latter developing more severe disease, with a mean score of 8.3 ± 1.1 on day 35, compared to 5.7 ± 1.3 for WT (Fig 4D). While expression of IL-6 was increased by 68% and IL-1 β expression was similar, expression of anti-inflammatory cytokine IL-10 was 14% lower in the paw homogenate of *S100a8*^{-/-} mice (Fig 4E), suggesting that the immune response in the absence of S100A8 is skewed toward a pro-inflammatory outcome. S100A9 was detected at 13.05 ± 3.85 ng/mL in the paws of naïve *S100a8*^{-/-} mice and about 10 times higher in arthritic paws (Fig 4F), which was nowhere near the level measured in WT animals (about 4,000 ng/mL). Deletion of the *S100a8* gene thus markedly reduced the S100A9 concentration reached in arthritic mice, although it did not eliminate it. Analyses of hematoxylin/eosin stains of paw tissue sections showed more extensive cell infiltration into the paws of *S100a8*^{-/-} mice (Fig 4G), with significantly more Ly6G⁺ neutrophils in the metatarsal joints (Fig 4H). This was associated with increased concentrations of the neutrophil chemo-attractant CXCL1/KC (Fig 4I). These results indicate that absence of S100A8 aggravates inflammation in arthritic *S100a8*^{-/-} mice.

S100A8 exerts intracellular and extracellular activities. To provide additional support for the idea that the increased disease severity observed in S100A8-deficient mice is due to the absence of extracellular S100A8, arthritis was induced in WT mice treated with anti-S100A8, a control antibody or PBS. Injection of anti-S100A8 IgG increased the arthritis score (Fig 4J), indicating that extracellular S100A8 provides some protection against chronic inflammation.

Increased cartilage and bone destruction in *S100a8*^{-/-} arthritic mice. Increased damage to cartilage and bone structure was observed in arthritic *S100a8*^{-/-} animals (Figs 5A, B). Histomorphometric analysis of the astragalus bone by μ CT revealed more asperities and a marked loss of mass compared to WT mice. Typical examples are shown in Fig 5C. The average bone volume to tissue volume ratio (BV/TV) was lower in *S100a8*^{-/-} mice (69.1 ± 2.2 % versus 76.1 ± 1.3 % in WT mice, Fig 5D) and the average total porosity was higher ($30.8\% \pm 2.2$ % versus $23.9\% \pm 1.3$ %, Fig 5E). These results indicate that the surface of mineralized bone is reduced in *S100a8*^{-/-} compared to WT mice and that the bones are more degraded.

Osteoclasts derived from monocytes are presumed to cause bone resorption in rheumatoid arthritis [51]. To determine if S100A8 inhibits the differentiation of osteoclasts, bone marrow cells were cultured in the presence of GM-CSF to generate bone-marrow-derived macrophages. This yielded 25% more macrophages in the *S100a8*^{-/-} case (Fig 5F). As observed in circulating monocytes, bone-marrow-derived macrophages from these mice expressed higher levels of CD11b, F4/80 and MHC class II (Figs 5G-I). Bone marrow cells were then cultured in presence of M-CSF and RANKL in wells coated with a mineralized matrix to generate osteoclasts. The area resorbed by these osteoclasts was three times larger compared to that of bone marrow cells from WT animals (Fig 5J). This observation corroborates the increased porosity observed in *S100a8*^{-/-} animals and indicates that their osteoclast activity is increased. Adding S100A8 nullified the increase in resorption, indicating that extracellular S100A8 regulates osteoclast numbers and activities. These results suggest that the gene deletion in *S100a8*^{-/-} mice leads to an increase in osteoclast activation and ultimately to significant bone degradation once arthritis is induced.

Discussion

Despite decades of research, the biological activity of S100A8 remains poorly understood. Upon discovery, this protein was first found to be a potent chemotactic factor for neutrophils and monocytes [9, 25]. Subsequent study indicated that upon oxidation, it acts as an anti-inflammatory factor inhibiting mast cell activation [33, 34, 52]. Recent reports suggest that it promotes the commitment of hematopoietic stem cells to the myeloid lineage and inhibits the differentiation of acute myeloid leukemia cells [18, 35]. In this study, we report the characterization of the first viable *S100a8*^{-/-} mouse strain. Deletion of the *S100a8* gene increases the numbers of granulocyte and monocyte progenitors and promotes the differentiation of mature myeloid cells including neutrophils, monocytes and dendritic cells. It has no effect on acute inflammation but does aggravate induced arthritis. Exacerbated disease is associated with the marked presence of mononuclear phagocytes, pro-inflammatory factors including S100A9 and cytokines, and osteoclastic activity potentiating joint damage and bone degradation in the paws. These results suggest that S100A8 has a damping effect on chronic inflammation by regulating myeloid cell differentiation.

Disruption of the S100A8 gene in exon 2 in mice is reportedly lethal during early development [39, 40]. In one study, homozygous null embryos (*S100a8*^{-/-}) were resorbed by day 9.5 in utero [39, 40], while another study reported failure of zygotes to develop beyond day 2.5 [39]. In sharp contrast, we report a viable *S100a8*^{-/-} strain generated by deleting all S100a8 coding exons. No embryo resorption has been observed to date. The absence of S100A8 in the KO mice has been confirmed at the genomic, RNA and protein levels using Southern blot, RT-PCR and western blot analyses. The reason for the viability of these KO mice is not clear. The previous studies mention deletion of most or all of exon 2, which is the first coding exon of the S100a8 gene. Since exon 3 was not targeted for deletion, it is possible that a spliced version of S100a8 was formed around the selection cassette in these ES cells. This could lead to translation of a protein truncated to 16 amino acids using the strong in-frame ATG start codon in exon 3 that could have biological activities. By deleting the entire coding portion of the S100a8 gene, no truncated version of this protein can be formed. Like *S100a9*^{-/-} mice, in which S100A8 is weakly expressed [53] or not detectable [54] in bone marrow cells, *S100a8*^{-/-} mice do not express S100A8 or S100A9 proteins in bone marrow and peripheral blood leukocytes in the absence of inflammation. However, S100A9 was detected in *S100a8*^{-/-} mice under inflammatory conditions, indicating that S100A8 and S100A9 can be expressed independently.

The generation of viable *S100a8*^{-/-} mice offers new perspectives for the study of S100A8 and S100A9, and the comparison of responses developed in *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice during inflammatory processes could help define the functions of the S100A8/A9 heterodimer. We cannot rule out the possibility that the phenotypic effects observed in *S100a8*^{-/-} mice are due to the loss of S100A8/A9 or S100A9. However, most of

the activities reported for the heterodimer are also attributed to the S100A9 homodimer and accumulating evidence strongly indicates that S100A9 is a major pro-inflammatory factor [12-14, 22, 36]. Experimental arthritis is less severe in *S100a9*^{-/-} mice (which lack S100A9 and S100A8/A9 proteins) [6] and in mice receiving anti-S100A9 antibodies [13]. In contrast, it is aggravated in mice lacking S100A8 and S100A8/A9 (this study). These studies suggest that S100A9 is pro-inflammatory whereas S100A8 is anti-inflammatory in experimental arthritis. In addition, since S100A8/A9 is absent in both genotypes, these data suggest that the role of S100A8/A9 is not as important as that of the homodimers.

The hallmark of the *S100a8*^{-/-} mouse is the increase in myeloid cell counts in peripheral blood and bone marrow. Massive cellular multiplication occurs during the lineage maturation that leads to the generation of neutrophils, monocytes and dendritic cells [55]. However, with the notable exception of GMP, progenitors and precursors of myeloid cells are not increased in bone marrow of *S100a8*^{-/-} mice, suggesting that S100A8 regulates the differentiation, but not the proliferation of myeloid cells. This is in contrast with a recent report indicating that S100A8 promotes changes in hematopoietic stem cells, supporting myeloid skewing in experimental arthritis [35] and possibly a positive feedback loop in which secreted S100A8 triggers emergency myelopoiesis, which cannot occur in a true *S100a8*^{-/-} mouse. We demonstrated recently that S100A8 regulates differentiation of myeloid cells associated with acute leukemia, a disease characterized by overabundance of myeloid cell precursors and progenitors [18]. These studies show that S100A8 and S100A9, both produced by acute myeloid leukemia cells, regulate the differentiation and proliferation of myeloid cell precursors and progenitors. Modifying the S100A8/S100A9 ratio by blocking S100A8 with antibodies or adding S100A9 induces the differentiation of acute myeloid leukemia cells and their growth arrest in mouse and human models. Again, these studies highlight the opposite effects of S100A8 and S100A9, the former inhibiting differentiation and the latter promoting the maturation and differentiation of precursors and progenitors of myeloid cells.

Dendritic cells were detected in greater numbers in the blood and skin of *S100a8*^{-/-} mice, indicating increased production. Myeloid cell maturation is linked with the silencing of *S100a8* and *S100a9* expression, and neither mRNA is expressed in macrophages or mature dendritic cells, while overexpression of both proteins leads to inhibition of macrophage and dendritic cell differentiation [56]. It is interesting that dendritic cells from *S100a9*^{-/-} mice exhibit an increased pro-inflammatory response and are stronger inducers of T cell proliferation, suggesting that they are more mature [57]. Through more efficient antigen presentation, the increased abundance of dendritic cells alone could be a major contributor to the aggravated disease observed in *S100a8*^{-/-} mice.

The onset of rheumatoid arthritis involves an aberrant activation of auto-reactive B and T cells by dendritic cells, giving rise to Th1/Th17 responses and increased activity of neutrophils, macrophages and osteoclasts, leading to bone and cartilage degradation [58]. S100A8 was first described as a 10 kDa chemotactic protein (CP-10), a potent chemotactic factor that attracts neutrophils at concentrations in the 10^{-11} to 10^{-13} M range [22, 59]. Neutrophils stimulated with LPS release S100A8 at low concentrations (10^{-10} M), and the concentrations found in the plasma of patients with arthritis (10^{-11} M) are consistent with its chemotactic activity [60]. Antibodies against S100A8 also reduce cell migration to the dorsal air pouch in response to inflammation induced by LPS [23] or by monosodium urate crystals [22] and to the lungs in response to *Streptococcus pneumoniae* infection [12]. It was therefore unexpected that deletion of S100a8 had no effect on myeloid cell migration in two models of acute inflammation. This suggests a compensatory mechanism in *S100a8*^{-/-} mice, which could be due to the increased numbers of circulating myeloid cells. In contrast, the observed increase in neutrophil and macrophage infiltration in arthritis likely resulted from indirect enhancement of the inflammatory response through altered cytokine secretion. S100A8 appears to induce expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 [28], which was found down-regulated in arthritic *S100a8*^{-/-} mice. In addition, the pro-inflammatory chemokine CXCL1/KC and cytokine IL-6 were elevated in these mice. Oxidized S100A8 is a known inhibitor of mast cell degranulation and FcεR-crosslinking-induced cytokine secretion [31, 33, 47, 61], and at least two studies indicate that it has an anti-inflammatory role in acute asthma and sepsis [33, 52], which is attributed to inhibition of inflammatory pathways mediated by ROS. Together, these observations suggest strongly that S100A8 acts as an anti-inflammatory factor in chronic inflammation. Another characteristic of *S100a8*^{-/-} mice is the enhanced osteoclastic activity in the arthritic paws. This observation was corroborated with μ CT analyses revealing more porous and degraded bones. S100A8 has been reported to participate in osteoclast formation and activation in *S100a9*^{-/-} mice [38], which express S100A8 in some bone marrow cells [53] and at the inflammatory site (our unpublished observations). Since extracellular S100A8 nullifies the effects of the gene deletion on osteoclast production, it likely affects osteoclast differentiation and activity directly by binding to an unknown receptor.

Conclusion

The results of this study suggest that S100A8 is a major regulator of myelopoiesis and that it plays an anti-inflammatory role. More importantly, this study reiterates that the simple release of intracellular proteins into the inflammatory milieu does not guarantee that they act as alarmins. In fact, S100A8 has been shown to inhibit mast cell activation, scavenge ROS and decrease arthritis symptoms and thus may be considered a potent anti-inflammatory factor. In view of these results, we suggest that it would be helpful to subdivide DAMPs into at least two categories, namely “alarmins” and “dampensins”, S100A8 being a prime example of the latter.

Acknowledgments

We acknowledge the help and contributions from Ken Platt and the "knockout mouse production group" at Lexicon Pharmaceuticals and from Isabelle Alleys at the CHU de Québec.

References

1. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology*. 2007;81(1):1-5. Epub 2006/10/13. doi: 10.1189/jlb.0306164. PubMed PMID: 17032697.
2. Foell D, Wittkowski H, Roth J. Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. *Nature clinical practice Rheumatology*. 2007;3(7):382-90. Epub 2007/06/30. doi: 10.1038/ncprheum0531. PubMed PMID: 17599072.
3. Popovic K, Ek M, Espinosa A, Padyukov L, Harris HE, Wahren-Herlenius M, et al. Increased expression of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in skin lesions of patients with lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(11):3639-45. Epub 2005/10/29. doi: 10.1002/art.21398. PubMed PMID: 16255056.
4. Mueller C. Danger-associated molecular patterns and inflammatory bowel disease: is there a connection? *Dig Dis*. 2012;30 Suppl 3:40-6. Epub 2013/01/18. doi: 10.1159/000342600. PubMed PMID: 23295691.
5. Edgeworth J, Gorman M, Bennett R, Freemont P, Hogg N. Identification of p8,14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(12):7706-13. Epub 1991/04/25. PubMed PMID: 2019594.
6. van Lent PL, Grevers LC, Blom AB, Arntz OJ, van de Loo FA, van der Kraan P, et al. Stimulation of chondrocyte-mediated cartilage destruction by S100A8 in experimental murine arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(12):3776-87. Epub 2008/11/28. doi: 10.1002/art.24074. PubMed PMID: 19035520.
7. Grimaldeston MA, Geczy CL, Tedla N, Finlay-Jones JJ, Hart PH. S100A8 induction in keratinocytes by ultraviolet A irradiation is dependent on reactive oxygen intermediates. *The Journal of investigative dermatology*. 2003;121(5):1168-74. Epub 2004/01/08. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12561.x. PubMed PMID: 14708622.
8. Henke MO, Renner A, Rubin BK, Gyves JI, Lorenz E, Koo JS. Up-regulation of S100A8 and S100A9 protein in bronchial epithelial cells by lipopolysaccharide. *Experimental lung research*. 2006;32(8):331-47. Epub 2006/11/09. doi: 10.1080/01902140600959580. PubMed PMID: 17090475.
9. Perera C, McNeil HP, Geczy CL. S100 Calgranulins in inflammatory arthritis. *Immunology and cell biology*. 2010;88(1):41-9. Epub 2009/11/26. doi: 10.1038/icb.2009.88. PubMed PMID: 19935766.
10. Korndorfer IP, Brueckner F, Skerra A. 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*. 2007;370(5):887-98. doi: 10.1016/j.jmb.2007.04.065. PubMed PMID: 17553524.
11. Rammes A, Roth J, Goebeler M, Klempt M, Hartmann M, Sorg C. 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*. 1997;272(14):9496-502. Epub 1997/04/04. PubMed PMID: 9083090.
 12. Raquil MA, Anceriz N, Rouleau P, Tessier PA. Blockade of antimicrobial proteins S100A8 and S100A9 inhibits phagocyte migration to the alveoli in streptococcal pneumonia. *J Immunol*. 2008;180(5):3366-74. Epub 2008/02/23. PubMed PMID: 18292562.
 13. Cesaro A, Anceriz N, Plante A, Page N, Tardif MR, Tessier PA. An Inflammation Loop Orchestrated by S100A9 and Calprotectin Is Critical for Development of Arthritis. *PloS one*. 2012;7(9):e45478. Epub 2012/10/03. doi: 10.1371/journal.pone.0045478. PubMed PMID: 23029038; PubMed Central PMCID: PMC3445527.
 14. Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, Kawashima M, Yamamoto H, et al. 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 research & therapy*. 2006;8(3):R69. Epub 2006/04/15. doi: 10.1186/ar1939. PubMed PMID: 16613612; PubMed Central PMCID: PMC1526633.
 15. Simard JC, Simon MM, Tessier PA, Girard D. Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. *J Immunol*. 2011;186(6):3622-31. Epub 2011/02/18. doi: 10.4049/jimmunol.1002956. PubMed PMID: 21325622.
 16. Simard JC, Girard D, Tessier PA. Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. *Journal of leukocyte biology*. 2010;87(5):905-14. Epub 2010/01/28. doi: 10.1189/jlb.1009676. PubMed PMID: 20103766.
 17. Ryckman C, McColl SR, Vandal K, de Medicis R, Lussier A, Poubelle PE, et al. 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*. 2003;48(8):2310-20. Epub 2003/08/09. doi: 10.1002/art.11079. PubMed PMID: 12905486.
 18. Laouedj M, Tardif MR, Gil L, Raquil MA, Lachhab A, Pelletier M, et al. S100A9 induces differentiation of acute myeloid leukemia cells through TLR4. *Blood*. 2017;129(14):1980-90. doi: 10.1182/blood-2016-09-738005. PubMed PMID: 28137827.
 19. Loser K, Vogl T, Voskort M, Lueken A, Kupas V, Nacken W, et al. The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells. *Nature medicine*. 2010;16(6):713-7. Epub 2010/05/18. doi: 10.1038/nm.2150. PubMed PMID: 20473308.
 20. van Lent PL, Grevers LC, Schelbergen R, Blom A, Geurts J, Sloetjes A, et al. S100A8 causes a shift toward expression of activatory Fcgamma receptors on macrophages via toll-like receptor 4 and regulates Fcgamma receptor expression in synovium during chronic experimental arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(11):3353-64. doi: 10.1002/art.27654. PubMed PMID: 20662072.
 21. Lackmann M, Cornish CJ, Simpson RJ, Moritz RL, Geczy CL. Purification and structural analysis of a murine chemotactic cytokine (CP-10) with sequence homology to S100 proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(11):7499-504. Epub 1992/04/15. PubMed PMID: 1559987.
 22. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol*. 2003;170(6):3233-42. Epub 2003/03/11. PubMed PMID: 12626582.
 23. Vandal K, Rouleau P, Boivin A, Ryckman C, Talbot M, Tessier PA. Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2003;171(5):2602-9. Epub 2003/08/21. PubMed PMID: 12928412.
 24. Anceriz N, Vandal K, Tessier PA. S100A9 mediates neutrophil adhesion to fibronectin through activation of beta2 integrins. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;354(1):84-9. Epub 2007/01/16. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.203. PubMed PMID: 17222807; PubMed Central PMCID: PMC1865105.

25. Devery JM, King NJ, Geczy CL. Acute inflammatory activity of the S100 protein CP-10. Activation of neutrophils in vivo and in vitro. *J Immunol.* 1994;152(4):1888-97. Epub 1994/02/15. PubMed PMID: 8120396.
26. Endoh Y, Chung YM, Clark IA, Geczy CL, Hsu K. IL-10-dependent S100A8 gene induction in monocytes/macrophages by double-stranded RNA. *J Immunol.* 2009;182(4):2258-68. Epub 2009/02/10. doi: 10.4049/jimmunol.0802683. PubMed PMID: 19201880.
27. Xu K, Yen T, Geczy CL. IL-10 up-regulates macrophage expression of the S100 protein S100A8. *J Immunol.* 2001;166(10):6358-66. Epub 2001/05/09. PubMed PMID: 11342660.
28. Hiroshima Y, Hsu K, Tedla N, Chung YM, Chow S, Herbert C, et al. S100A8 induces IL-10 and protects against acute lung injury. *J Immunol.* 2014;192(6):2800-11. Epub 2014/02/18. doi: 10.4049/jimmunol.1302556. PubMed PMID: 24532576.
29. Harrison CA, Raftery MJ, Walsh J, Alewood P, Iismaa SE, Thliveris S, et al. Oxidation regulates the inflammatory properties of the murine S100 protein S100A8. *The Journal of biological chemistry.* 1999;274(13):8561-9. Epub 1999/03/20. PubMed PMID: 10085090.
30. Lim SY, Raftery M, Cai H, Hsu K, Yan WX, Hsieh HL, et al. S-nitrosylated S100A8: novel anti-inflammatory properties. *J Immunol.* 2008;181(8):5627-36. Epub 2008/10/04. PubMed PMID: 18832721.
31. Lim SY, Raftery MJ, Geczy CL. Oxidative modifications of DAMPs suppress inflammation: the case for S100A8 and S100A9. *Antioxidants & redox signaling.* 2011;15(8):2235-48. Epub 2010/10/06. doi: 10.1089/ars.2010.3641. PubMed PMID: 20919939.
32. Raftery MJ, Yang Z, Valenzuela SM, Geczy CL. Novel intra- and inter-molecular sulfinamide bonds in S100A8 produced by hypochlorite oxidation. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(36):33393-401. Epub 2001/07/11. doi: 10.1074/jbc.M101566200. PubMed PMID: 11445563.
33. Zhao J, Endoh I, Hsu K, Tedla N, Endoh Y, Geczy CL. S100A8 modulates mast cell function and suppresses eosinophil migration in acute asthma. *Antioxidants & redox signaling.* 2011;14(9):1589-600. Epub 2010/12/15. doi: 10.1089/ars.2010.3583. PubMed PMID: 21142608.
34. Gomes LH, Raftery MJ, Yan WX, Goyette JD, Thomas PS, Geczy CL. S100A8 and S100A9-oxidant scavengers in inflammation. *Free radical biology & medicine.* 2013;58:170-86. Epub 2013/01/02. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.012. PubMed PMID: 23277148.
35. Oduro KA, Jr., Liu F, Tan Q, Kim CK, Lubman O, Fremont D, et al. Myeloid skewing in murine autoimmune arthritis occurs in hematopoietic stem and primitive progenitor cells. *Blood.* 2012;120(11):2203-13. doi: 10.1182/blood-2011-11-391342. PubMed PMID: 22855602; PubMed Central PMCID: PMC3447779.
36. Foell D, Roth J. Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis and rheumatism.* 2004;50(12):3762-71. Epub 2004/12/14. doi: 10.1002/art.20631. PubMed PMID: 15593206.
37. Zreiqat H, Howlett CR, Gronthos S, Hume D, Geczy CL. S100A8/S100A9 and their association with cartilage and bone. *Journal of molecular histology.* 2007;38(5):381-91. Epub 2007/07/20. doi: 10.1007/s10735-007-9117-2. PubMed PMID: 17636430.
38. Grevers LC, de Vries TJ, Vogl T, Abdollahi-Roodsaz S, Sloetjes AW, Leenen PJ, et al. S100A8 enhances osteoclastic bone resorption in vitro through activation of Toll-like receptor 4: implications for bone destruction in murine antigen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism.* 2011;63(5):1365-75. Epub 2011/02/22. doi: 10.1002/art.30290. PubMed PMID: 21337316.
39. Baker JR, Jeffery R, May RD, Mathies M, Spencer-Dene B, Poulsom R, et al. Distinct roles for S100a8 in early embryo development and in the maternal deciduum. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists.* 2011;240(9):2194-203. Epub 2011/10/22. doi: 10.1002/dvdy.22709. PubMed PMID: 22016186.
40. Passey RJ, Williams E, Lichanska AM, Wells C, Hu S, Geczy CL, et al. A null mutation in the inflammation-associated S100 protein S100A8 causes early resorption of the mouse embryo. *J Immunol.* 1999;163(4):2209-16. Epub 1999/08/10. PubMed PMID: 10438963.
41. Wattler S, Kelly M, Nehls M. Construction of gene targeting vectors from lambda KOS genomic libraries. *BioTechniques.* 1999;26(6):1150-6, 8, 60. Epub 1999/06/22. PubMed PMID: 10376154.
42. Davies JQ, Gordon S. Isolation and culture of murine macrophages. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ).* 2005;290:91-103. Epub 2004/09/14. PubMed PMID: 15361657.

43. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine*. 1992;176(6):1693-702. Epub 1992/12/01. PubMed PMID: 1460426; PubMed Central PMCID: PMC2119469.
44. Pelletier M, Billingham LK, Ramaswamy M, Siegel RM. Extracellular flux analysis to monitor glycolytic rates and mitochondrial oxygen consumption. *Methods in enzymology*. 2014;542:125-49. Epub 2014/05/28. doi: 10.1016/b978-0-12-416618-9.00007-8. PubMed PMID: 24862264.
45. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation Supplementum*. 1968;97:77-89. Epub 1968/01/01. PubMed PMID: 4179068.
46. Tardif MR, Chapeton-Montes JA, Posvandzic A, Page N, Gilbert C, Tessier PA. Secretion of S100A8, S100A9, and S100A12 by Neutrophils Involves Reactive Oxygen Species and Potassium Efflux. *J Immunol Res*. 2015;2015:296149. doi: 10.1155/2015/296149. PubMed PMID: 27057553; PubMed Central PMCID: PMC4736198.
47. Lim SY, Raftery MJ, Goyette J, Hsu K, Geczy CL. Oxidative modifications of S100 proteins: functional regulation by redox. *Journal of leukocyte biology*. 2009;86(3):577-87. Epub 2009/02/25. doi: 10.1189/jlb.1008608. PubMed PMID: 19237640.
48. Doussiere J, Bouzidi F, Vignais PV. The S100A8/A9 protein as a partner for the cytosolic factors of NADPH oxidase activation in neutrophils. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2002;269(13):3246-55. Epub 2002/06/27. PubMed PMID: 12084065.
49. Ryckman C, Gilbert C, de Medicis R, Lussier A, Vandal K, Tessier PA. Monosodium urate monohydrate crystals induce the release of the proinflammatory protein S100A8/A9 from neutrophils. *Journal of leukocyte biology*. 2004;76(2):433-40. Epub 2004/04/27. doi: 10.1189/jlb.0603294. PubMed PMID: 15107458.
50. van Lent PL, Grevers L, Blom AB, Sloetjes A, Mort JS, Vogl T, et al. Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67(12):1750-8. Epub 2007/12/07. doi: 10.1136/ard.2007.077800. PubMed PMID: 18055478.
51. Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, et al. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1996;11(1):88-95. Epub 1996/01/01. doi: 10.1002/jbmr.5650110113. PubMed PMID: 8770701.
52. Sun Y, Lu Y, Engeland CG, Gordon SC, Sroussi HY. The anti-oxidative, anti-inflammatory, and protective effect of S100A8 in endotoxemic mice. *Molecular immunology*. 2013;53(4):443-9. Epub 2012/11/07. doi: 10.1016/j.molimm.2012.10.002. PubMed PMID: 23127860; PubMed Central PMCID: PMC3595546.
53. Manitz MP, Horst B, Seeliger S, Strey A, Skryabin BV, Gunzer M, et al. Loss of S100A9 (MRP14) results in reduced interleukin-8-induced CD11b surface expression, a polarized microfilament system, and diminished responsiveness to chemoattractants in vitro. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(3):1034-43. Epub 2003/01/17. PubMed PMID: 12529407; PubMed Central PMCID: PMC140712.
54. Hobbs JA, May R, Tanousis K, McNeill E, Mathies M, Gebhardt C, et al. Myeloid cell function in MRP-14 (S100A9) null mice. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(7):2564-76. Epub 2003/03/18. PubMed PMID: 12640137; PubMed Central PMCID: PMC150714.
55. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annual review of immunology*. 2003;21:759-806. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141007. PubMed PMID: 12615892.
56. Cheng P, Corzo CA, Luetteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, et al. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(10):2235-49. Epub 2008/09/24. doi: 10.1084/jem.20080132. PubMed PMID: 18809714; PubMed Central PMCID: PMC2556797.

57. Averill MM, Barnhart S, Becker L, Li X, Heinecke JW, Leboeuf RC, et al. S100A9 differentially modifies phenotypic states of neutrophils, macrophages, and dendritic cells: implications for atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circulation*. 2011;123(11):1216-26. Epub 2011/03/09. doi: 10.1161/circulationaha.110.985523. PubMed PMID: 21382888; PubMed Central PMCID: PMC3072335.
58. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*. 2011;365(23):2205-19. doi: 10.1056/NEJMra1004965. PubMed PMID: 22150039.
59. Cornish CJ, Devery JM, Poronnik P, Lackmann M, Cook DI, Geczy CL. S100 protein CP-10 stimulates myeloid cell chemotaxis without activation. *Journal of cellular physiology*. 1996;166(2):427-37. Epub 1996/02/01. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199602)166:2<427::AID-JCP21>3.0.CO;2-6. PubMed PMID: 8592003.
60. Lackmann M, Rajasekariah P, Iismaa SE, Jones G, Cornish CJ, Hu S, et al. Identification of a chemotactic domain of the pro-inflammatory S100 protein CP-10. *J Immunol*. 1993;150(7):2981-91. Epub 1993/04/01. PubMed PMID: 8454868.
61. Lim SY, Raftery MJ, Goyette J, Geczy CL. S-glutathionylation regulates inflammatory activities of S100A9. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(19):14377-88. Epub 2010/03/13. doi: 10.1074/jbc.M109.075242. PubMed PMID: 20223829; PubMed Central PMCID: PMC2863208.

Figures

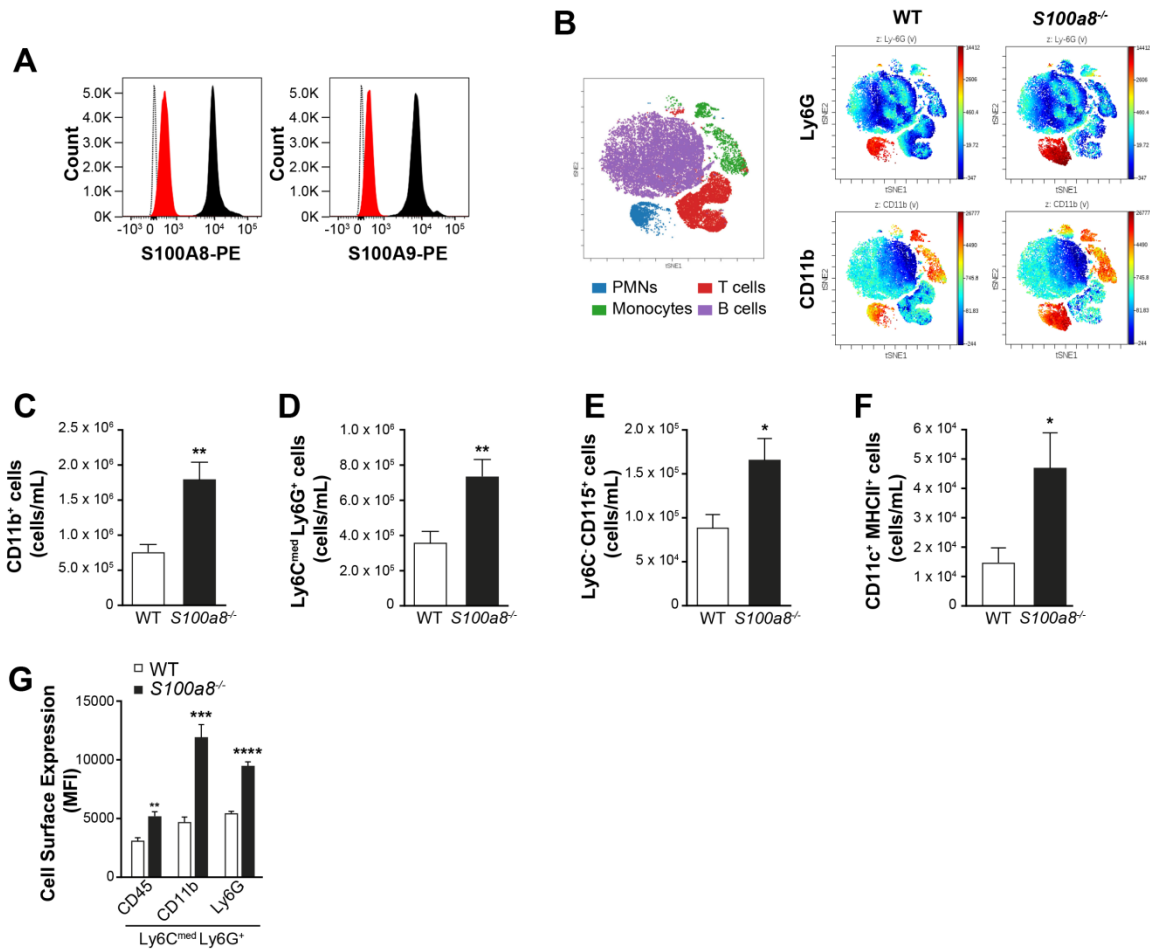


Fig 1. *S100a8*^{-/-} mice have increased circulating and mature myeloid cells. (A) Cytometry analysis of S100A8 and S100A9 expression in WT (black) and *S100a8*^{-/-} Ly6C^{med}Ly6G⁺ (red) blood cells. Dotted line: isotype control antibody in WT cells. Results are from 1 representative experiment (n = 3). (B) Visualization (viSNE) of CD11b and Ly6G expression in leukocyte populations in peripheral blood. Left: representation of cell population distribution, magenta for B cells, green for monocytes, red for T cells and blue for neutrophils. Right: CD11b and Ly6G expression intensity in the different cell populations in WT and *S100a8*^{-/-} mice. (C–F) Flow cytometry measurement of: (C) CD11b⁺ myeloid cell counts in peripheral blood, (D) circulating Ly6C^{med}Ly6G^{hi} neutrophil counts, (E) circulating Ly6C^{hi}Ly6G^{low} monocyte counts, (F) circulating CD11c⁺MHCII⁺ dendritic cells. (G) Surface expression of CD45, CD11b and Ly6G in neutrophils (based on 8 mice). All values are mean ± sem. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001, Student's t-test.

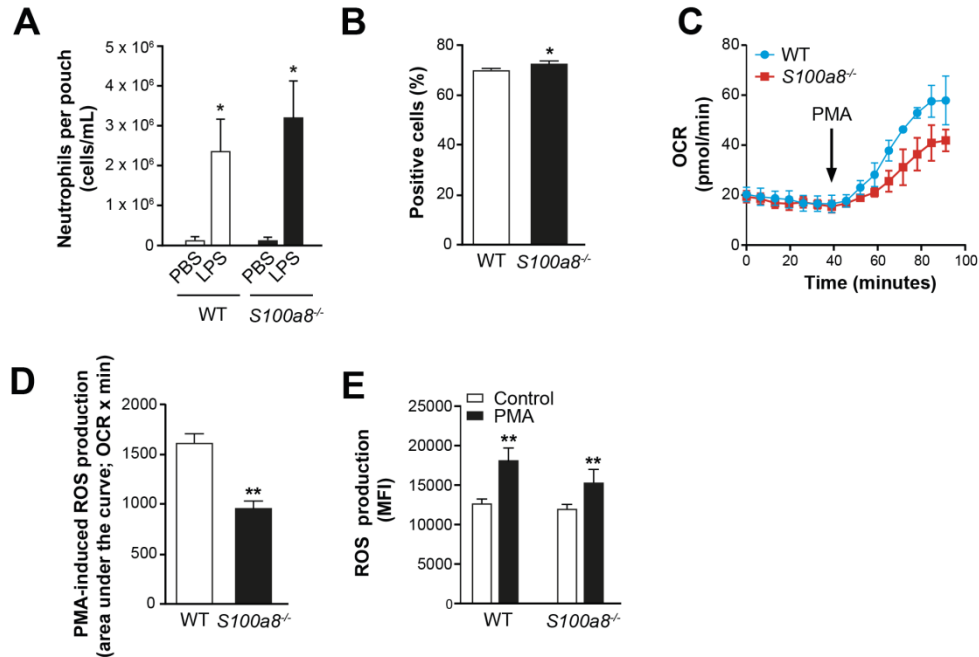


Fig. 2. Deletion of *S100a8* gene has limited effects on myeloid cell functions. (A) Neutrophil migration to the dorsal air pouch 6 h after LPS injection (10 mice). (B) Phagocytosis of monocytes. Values are percentage $\pm$ sem of fluorescein-labelled monocytes (4 mice). (C, D) Oxygen consumption rate (OCR) of bone marrow neutrophils in response to PMA, based on from 4 sample replicates from 1 representative experiment (out of 3). (E) ROS production measured as oxidation of the fluorogenic probe CellROX by neutrophils in response to PMA as measured by flow cytometry (n = 5). All values are mean $\pm$ sem. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001, Student's t-test.

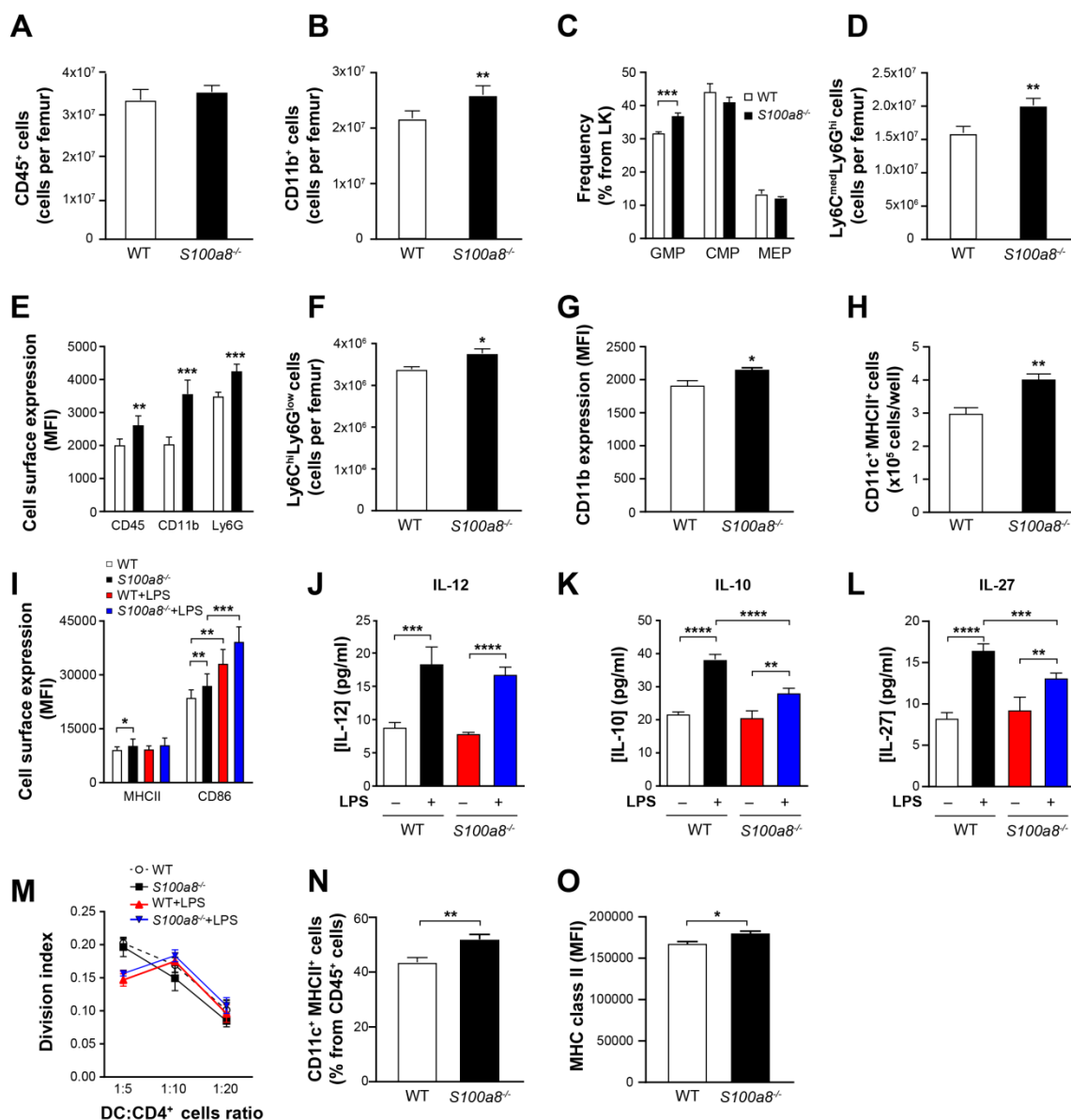


Fig 3. Increased numbers of dendritic cells in *S100a8*^{-/-} mice. (Values in A–I are from flow cytometry, based on 4 mice in A–G and on 12 mice in H and I. WT = wild type.) (A) CD45⁺ cells in bone marrow. (B) CD11b⁺ myeloid cells in bone marrow. (C) Frequency of granulocyte-macrophage progenitors (GMP), common monocyte progenitors (CMP) and megakaryocyte-erythrocyte progenitors (MEP) in bone marrow. (D) Neutrophil-committed (Ly6C^{med}Ly6G^{hi}) cells in bone marrow. (E) Expression of CD45, CD11b and Ly6G on the surface of neutrophil-committed cells. (F) Monocyte-committed (Ly6C^{hi}Ly6G^{low}) cells in bone marrow (G) Expression of CD11b on the surface of monocyte-committed cells. (H) Bone-marrow-derived dendritic cells (CD11c⁺MHC class II⁺) cultured with GM-CSF and IL-4. (I) Expression of MHC class II (MHCII) and CD86 on the surface of dendritic cells. (J–L) Secretion of IL-12, IL-10 and IL-27 by dendritic cells stimulated with 100 ng/mL LPS (4 mice). (M) Dendritic-cell-induced proliferation (mixed lymphocyte reaction) of CD4⁺ T cells

obtained from B10 mice versus DC/CD4⁺ T ratio (3 mice). (N) Dendritic cell crawl-out from the skin (8 mice). (O) Expression of MHC class II molecules on the surface of dendritic cells crawling out of ear skin (8 mice). All values are mean $\pm$ sem. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, Student's t-test.

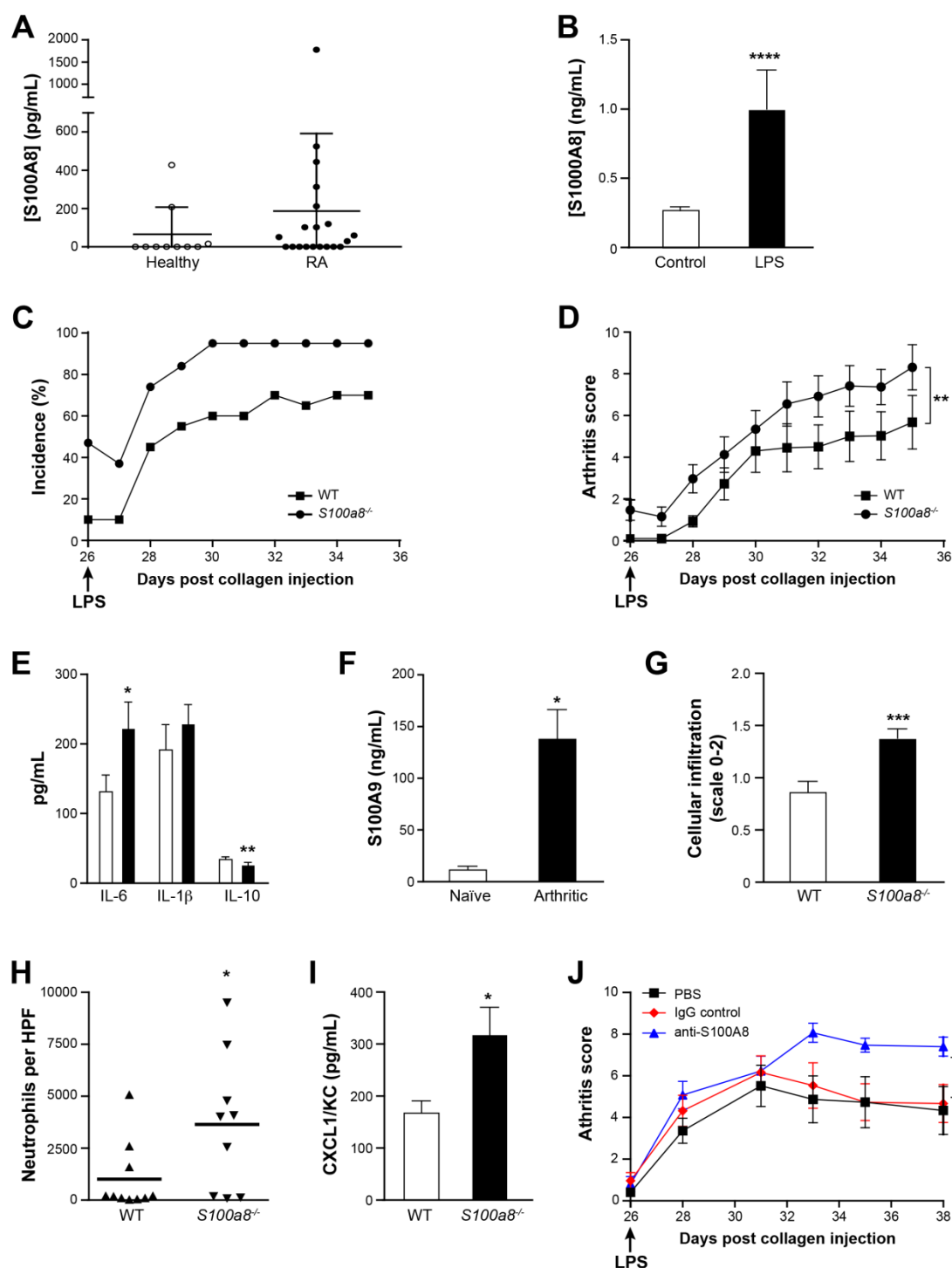


Fig 4. S100A8 mitigates arthritis. (A) Presence of S100A8 homodimer in the plasma of 20 rheumatoid arthritis patients and 10 age-matched and sex-matched healthy donors. S100A8 was quantified using an in-house ELISA. (B) Secretion of S100A8 homodimer by human peripheral blood neutrophils stimulated with LPS (100 ng/mL). S100A8 in culture supernatant was quantified using an in-house ELISA (12 healthy donors). (C) Incidence of collagen-induced arthritis in WT and *S100a8*^{-/-} mice. (D) Arthritis clinical score as measured by

impartial observers (n = 20 for WT and n = 19 for *S100a8*^{-/-}; ** based on GEE analysis). (E) Expression of IL-6, IL-1 β and IL-10 in paws of WT and *S100a8*^{-/-} mice (n = 18). (F) Expression of S100A9 in the paws of naïve and arthritic *S100a8*^{-/-} mice (n = 4 naïve and n = 19 arthritic). (G) Histological assessment of cellular infiltration into joints (scale of 0-2) as assessed by two impartial observers (n = 20 for WT and n = 19 for *S100a8*^{-/-}). (H) Neutrophil infiltration into joints of arthritic WT and *S100a8*^{-/-} mice. Neutrophils were enumerated in histological slides of arthritic paws (n = 9). (I) CXCL1/KC expression in homogenates of paws as assessed by multiplex assays (n = 18 paws). (J) Effect of anti-S100A8 IgG on collagen-induced arthritis Anti-S100A8 IgGs or normal rabbit IgG was injected 3 times per week starting on the day of LPS injection (n = 20 for WT and n = 19 for *S100a8*^{-/-}; * based on GEE analysis). All values are mean $\pm$ sem. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, Student's t-test.

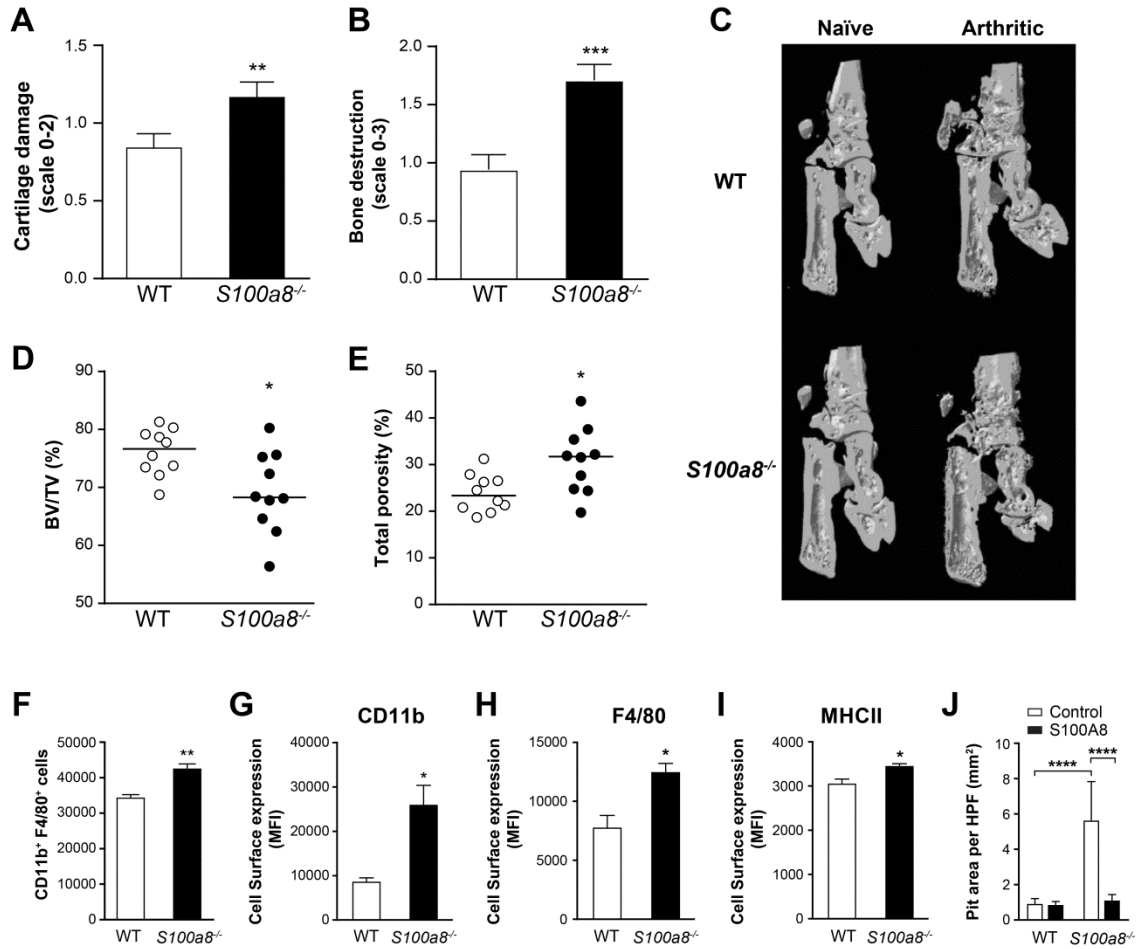
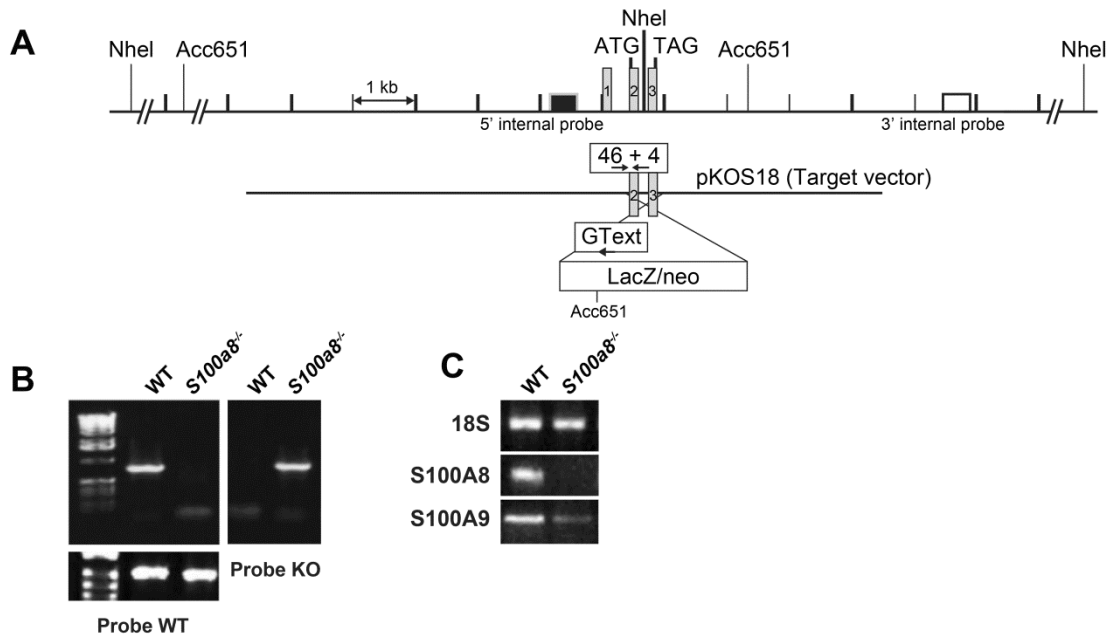
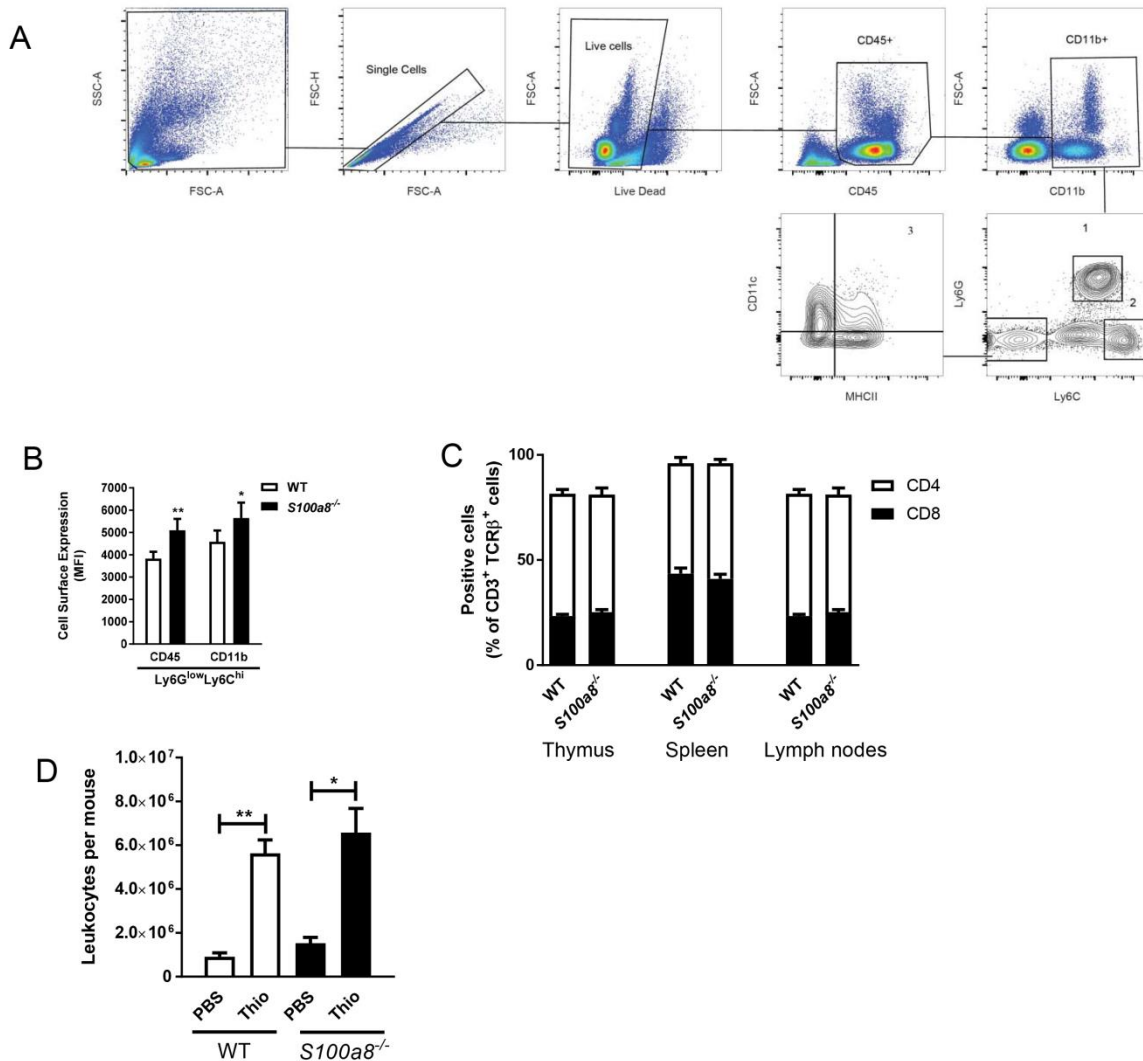


Fig 5. Increased bone destruction and osteoclast activity in *S100a8*^{-/-} mice with collagen-induced arthritis. (A) Cartilage degradation in paws, histological scale of 0-2 and (B) bone destruction, histological scale of 0-3, as assessed by two impartial observers (n = 20 for WT and n = 19 for *S100a8*^{-/-} mice). (C) 3D surface renderings showing bone erosion as assessed by μ CT scans of paws. One hind paw representative of 9 is shown. (D) Bone volume/tissue volume and (E) total porosity of the astragalus bone of WT and *S100a8*^{-/-} arthritic mice. Dots are individual values (bar = mean of 10 measurements). (F) Cultured *S100a8*^{-/-} bone marrow cells stimulated with GM-CSF produce more macrophages. The cells were harvested, counted and analyzed by flow cytometry after 6 days. (G–I) Expression of CD11b, F4/80 and MHC class II is increased on the surface of bone marrow-derived macrophages from *S100a8*^{-/-} mice compared to WT mice, based on flow cytometry (3 mice, one representative experiment out of 3). (J) Osteoclastic activity of *S100a8*^{-/-} bone-marrow-derived cells (obtained by incubation with M-CSF and RANKL for 10 days in osteoassay plates) in the presence of extracellular S100A8. Pit areas were measured by microscopy. Two experiments were performed on cells from different mice. All values are mean $\pm$ sem. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, Student's t-test.

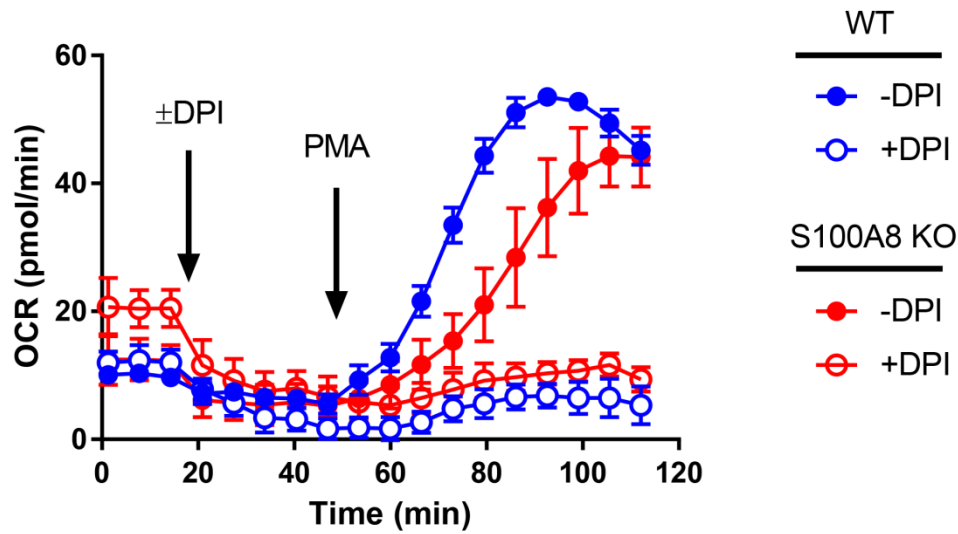
Supporting information



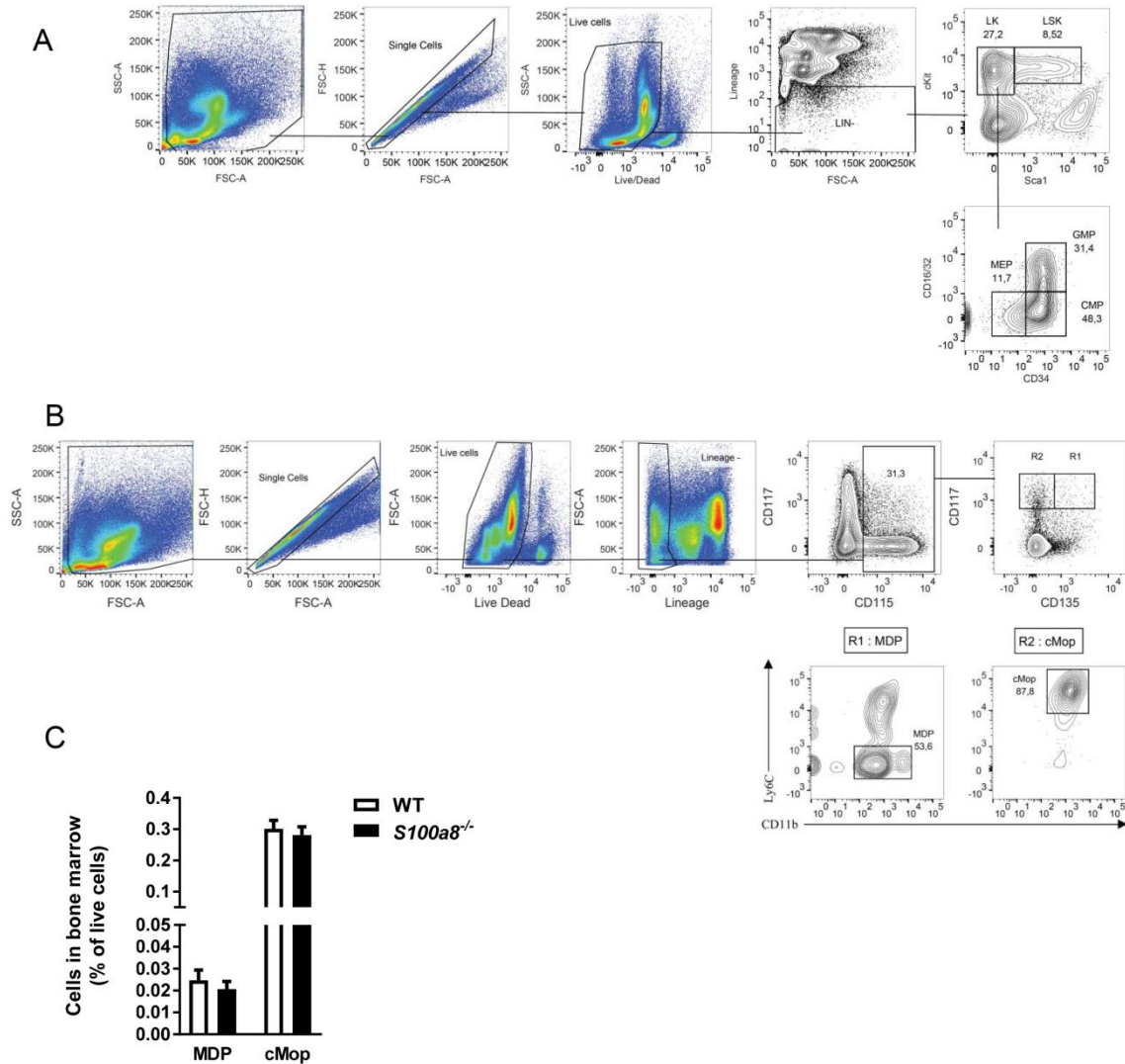
S1 fig. Targeted disruption of *S100a8* gene. (A) Targeting strategy used to disrupt the *S100a8* locus. Homologous recombination between the target vector and the *S100a8* gene results in the replacement of exons 2 and 3 with the selection cassette. (B) Gel electrophoretic resolution of PCR products generated from amplified mouse-tail DNA, revealed by ethidium bromide fluorescence on 1% agarose. (C) Gel electrophoretic resolution of RT-PCR products generated from bone marrow RNA (ethidium bromide fluorescence, on 2% agarose).



S2 fig. Analysis of leukocyte subsets in *S100a8*^{-/-} mice. (A) Gating strategy used in flow cytometry to analyse different subsets of circulating leukocytes: 1, 2 and 3 are respectively neutrophils (CD45⁺CD11b⁺Ly6C^{med}Ly6G⁺), Ly6C⁺ monocytes (CD45⁺CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ cells) and dendritic cells (CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁻CD11c⁺MHCII⁺). (B) Cell surface expression of CD45 and CD11b on peripheral blood monocytes (Ly6C^{hi}Ly6G^{low}) from WT and *S100a8*^{-/-} mice (n = 8). (C) Percentage of CD4⁺ and CD8⁺ cells among CD3⁺TCRα/β⁺ cells in the thymus, spleen and lymph nodes of WT and *S100a8*^{-/-} mice, based on flow cytometry (n = 10). (D) Leukocyte migration to the peritoneum in response to thioglycolate in WT and *S100a8*^{-/-} mice. Leukocytes were recovered 4 h after intra-peritoneal injection of thioglycolate or PBS (n = 3 or 8).



S3 fig. Oxygen consumption in murine neutrophils is almost completely dependent on NADPH oxidase. Oxygen consumption rate in response to PMA stimulation of neutrophils purified by negative selection from bone marrows of WT and *S100a8*^{-/-} mice was quantified using an extracellular flux analyzer. Neutrophils were incubated in the presence or absence of 5 μ M of the NADPH oxidase inhibitor DPI. Values are mean $\pm$ sem for 4 wells from one experiment representative of 3.



S4 fig. Analysis of bone marrow cells in *S100a8*^{-/-} mice. (A) Gating strategy used in flow cytometry to detect GMP (Lin⁻Sca1⁺cKit⁺CD16/32^{high-med}CD34⁺), CMP (Lin⁻Sca1⁺cKit⁺CD16/32^{med-low}CD34⁺ cells) and MEP (Lin⁻Sca1⁺cKit⁺CD16/32^{low}CD34⁻) cells. (B) Flow cytometry gating strategy used to detect MDP (R1, CD117⁺CD115⁺CD135⁺Ly6C⁻CD11b⁻) and cMop (R2, CD117⁺CD115⁺CD135⁺Ly6C⁺CD11b⁺) cells. (C) Percentages of MDP and cMop cells in WT and *S100a8*^{-/-} bone marrows (n = 6).

Antigen	Clone	Supplier
CD115	AFS98	eBioscience/Thermo Fisher
CD11b	M1/70	eBioscience/Thermo Fisher
CD11c	N418	eBioscience/Thermo Fisher
CD135	A2F10	eBioscience/Thermo Fisher
CD16/32	93	eBioscience/Thermo Fisher
CD19	6D5	eBioscience/Thermo Fisher
CD25	PC-61.5	eBioscience/Thermo Fisher
CD34	RAM34	BDBiosciences
CD3ε	145-2C11	eBioscience/Thermo Fisher
CD4	RM4-5	eBioscience/Thermo Fisher
CD45	30-F11	BDBiosciences
CD45R	RA3-6B2	eBioscience/Thermo Fisher
CD8	53-6.7	eBioscience/Thermo Fisher
CD86	GL1	eBioscience/Thermo Fisher
cKit	2B8	eBioscience/Thermo Fisher
F4/80	T7	eBioscience/Thermo Fisher
FOXP3	FJK-16s	eBioscience/Thermo Fisher
Ly6C	HK1.4	eBioscience/Thermo Fisher
Ly6G	1A8-Ly6G	eBioscience/Thermo Fisher
Ly6G and Ly6C	RB6-8C5	BDBiosciences
Ly-76	TER-119	BDBiosciences
MHCII	M5/114.5.2	eBioscience/Thermo Fisher
NK1.1	PK136	BDBiosciences
S100A8	335806	R&D Systems
S100A9	2A5	In house
Sca1	D7	eBioscience/Thermo Fisher
TCRαβ	H57-597	eBioscience/Thermo Fisher

S1 Table. List of antibodies used in this study

	Controls	Rheumatoid arthritis
Age, years	50 ± 8	55 ± 13
Disease duration, months		6.5 ± 2.5
BMI	27.6 ± 5.1	28.3 ± 8.4
Female	7 (70)	10 (56)
Smoker	0 (0)	6 (32)
Rheumatoid Factor	0 (0)	14 (74)
Anti-CCP	0 (0)	14 (74)
CDAI		41.7 ± 15.3
DAS28-CRP		5.5 ± 1.1
NSAIDs	0 (0)	8 (42)
Anti-malarial	0 (0)	6 (32)

S2 Table. Demographic and clinical data of the research project participants. Values presented as mean ± standard deviation or frequency (percentage). BMI: body mass index, Anti-CCP: anti-cyclic citrunillated peptide, CDAI: clinical disease activity index, DAS28-CRP: Disease Activity Score 28-joint count C reactive protein, NSAIDs: Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs

Chapitre 3 La délétion de *S100a8* et *S100a9* augmente la prolifération des kératinocytes et la réponse des lymphocytes Th17 dans le psoriasis induit par l'imiquimod.

1. Résumé

De fortes concentrations des alarmines S100A8 et S100A9 sont mesurées dans la peau et le sérum des personnes atteintes de psoriasis qui est une maladie dépendante de l'interleukine 17. Bien que l'expression de ces protéines corrèle avec la sévérité de la maladie, les rôles exacts de S100A8 et S100A9 dans la pathogenèse du psoriasis sont peu connus. Dans cette étude, nous avons analysé l'effet de S100A8 et S100A9 sur l'hyperplasie de la peau et la réponse inflammatoire chez les souris *S100a8^{-/-}* et *S100a9^{-/-}* dans le modèle de psoriasis induit par l'imiquimod. Les souris déficientes pour S100a8 et S100a9 ont montré des symptômes cliniques significativement aggravés et une forte expression de novo de S100A9 et S100A8 respectivement. De plus, nous avons observé que l'absence de S100A8 augmente la prolifération des kératinocytes et une diminution de leur différenciation. La production d'IL-17A et F dans les lymphocytes T CD4⁺ s'en est trouvée augmentée ainsi que l'infiltration de neutrophiles dans la peau. L'injection de traitement contre l'IL-17A et l'IL-17F réduit les symptômes du psoriasis et l'hyperplasie de la peau chez les souris *S100a8^{-/-}* et *S100a9^{-/-}*. Cette étude suggère que les protéines S100A8 et S100A9 régulent le psoriasis via la réduction de la production d'IL-17A et F, ces observations démontrent que S100A8 et S100A9 sont anti-inflammatoires dans l'inflammation liée au psoriasis et apportent un regard nouveau sur les fonctions de ces protéines.

2. Abstract

High concentrations of the damage-associated molecular patterns S100A8 and S100A9 are found in skin and serum from patients suffering from psoriasis, an IL-17-related disease. Although their expression correlates with psoriatic patient disease activity, the exact roles of S100A8 and S100A9 in psoriasis pathogenesis remain unclear. We investigated the activities of S100A8 and S100A9 on skin hyperplasia and the immune response using *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice in the imiquimod-induced model of psoriasis. *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} psoriatic mice exhibited worsened clinical symptoms, associated with and increased expression of S100A9 and S100A8 proteins in keratinocytes, respectively. In addition, absence of S100A8 augmented proliferation of undifferentiated keratinocytes. IL-17A and F production was increased in absence of S100A8 and S100A9 in CD4 T cells as well as infiltration of neutrophils in the skin. Treatment with anti-IL-17A and F reduced psoriasis symptoms and skin hyperplasia in *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice. This study suggests that S100A8 and S100A9 regulate psoriasis through the reduction of IL-17A and F production, providing new insights into their biological functions.

3. Article

Deletion of *S100a8* and *S100a9* enhances keratinocyte proliferation and Th17 response in imiquimod-induced psoriasis.

Joan Defrêne*, Sofiane Berrazouane*, Nayeli Esparza*, Nathalie Pagé*, Marie-France Côté†, Stéphane Gobeil†‡, Fawzi Aoudjit*§ and Philippe A. Tessier*§

* Axe de recherche sur les maladies infectieuses et immunitaires, Centre de recherche du CHU de Québec-Université Laval, Quebec city, Quebec, Canada

† Axe Endocrinologie et néphrologie, Centre de recherche du CHU de Québec-Université Laval, Quebec city, Quebec, Canada

‡ Département de médecine moléculaire, Faculté de Médecine, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada

§ Département de microbiologie-infectiologie et d'immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada

Introduction

Psoriasis is a common immune-mediated skin disease affecting approximately 2-4 % of the world population (1). It is a multifactorial IL-17-driven disease, influenced by multiple genes as well as environmental factors, including trauma and infections. Psoriatic skin is characterized by epidermal hyperplasia, leukocyte infiltration and increased number of dermal blood vessels (2). Although the exact factors triggering psoriasis are still unknown, both innate and adaptive immunity are involved in its pathophysiology with a critical implication of the IL-23-Th17 axis (3, 4), which promotes keratinocyte and endothelial cell proliferation and production of antimicrobial peptides including S100A8/A9 (5).

S100A8 (MRP-8) and S100A9 (MRP14) are two Ca^{2+} -binding proteins from the S100 proteins family characterized as damage associated molecular patterns (DAMPs) (6). Myeloid cells including neutrophils and monocytes constitutively express and secrete S100A8 and S100A9 (7). Their expression is also inducible in dendritic cells (8), synoviocytes (9), keratinocytes (10), epithelial cells (11) and endothelial cells (12). These proteins occur as non-covalently bonded homodimers and form a non-covalent heterodimer called S100A8/A9 or calprotectin in the presence of calcium (13).

S100A8 and S100A9 homodimers are not always co-expressed (12) suggesting different activities for these homodimers. S100A9 stimulates pro-inflammatory cytokine secretion from monocytes/macrophages (14, 15), neutrophil phagocytosis (16) and degranulation (17) and phagocyte migration (18). *S100a9*^{-/-} mice are resistant to adjuvant-induced arthritis and systemic lupus erythematosus, the latter been due at least in part to reduced CD8^{+} T cell activation (19, 20). In addition, *S100a9* deleted mice have less inflammation, neurodegeneration and cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease (21). However, deletion of *S100a9* in TNF overexpressing mice worsens joint inflammation and keratinocytes proliferation (22), suggesting different functions of S100A9 in inflammatory diseases. S100A8 is one of the most potent chemotactic factors for neutrophil and monocytes (23), and injection of anti-S100A8 reduces leukocyte recruitment in different models of acute inflammation (24, 25), indicating a pro-inflammatory role. However, S100A8 is sensitive to oxidation by reactive oxygen species (26-29), and oxidised S100A8 reduces IgE-mediated mast cell degranulation and cytokine secretion (30). In addition, chemotactic potential of S100A8 is lost when oxidised (26, 29). *S100a8*^{-/-} have more granulocyte and monocytes precursors (GMP) in bone marrow, as well as mature neutrophils and monocytes in peripheral blood. In addition, absence of *S100a8* diminishes collagen-induced arthritis symptoms by reducing osteoclasts differentiation and activation, and infiltration of neutrophils (31), suggesting that S100A8 is anti-inflammatory.

S100A8/A9 is elevated in serum of psoriatic patients, and its level tracks disease activity (32, 33). In addition, strong expression of S100A8 and S100A9 is a characteristic of skin lesions in psoriasis patients and mouse models of psoriasis (34-37). Albeit expression is weak or absent in the skin of healthy patients and in non-lesional skin of psoriasis patients (38), their expression is associated with early events in models of psoriasis, occurring before histological alterations or cytokine dysregulation (39, 40). High level of IL-22 (5) and lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) (41) in psoriatic skin contribute to the increased expression of S100A8/A9. S100A8 and S100A9 act as pro-angiogenic factors by inducing endothelial cell proliferation, migration and capillary-like tube formation, and promote keratinocyte proliferation (42, 43). In addition, S100A8/A9 released by keratinocytes regulates the activation of dermal fibroblasts upon dehydration of human skin (44), and regulates the expression and release of complement C3 expression by keratinocytes (45). These observations suggest that S100A8 and S100A9 are potential mediators in psoriasis, with possible intracellular and extracellular functions in epidermal hyperplasia, leukocyte infiltration and angiogenesis.

In this study, we investigated the roles of S100A8 and S100A9 in imiquimod-induced psoriasis by comparing both *S100a8^{-/-}* and *S100a9^{-/-}* mice. Our data show that psoriasis symptoms are aggravated in absence of S100A8 and S100A9 due to increased hyperplasia, neutrophils infiltration and Th17 response.

Material and methods

Mice and treatments. All experiments were carried out in accordance with the Université Laval Animal Protection Committee (Québec City, Québec, Canada). WT, *S100a8*-deficient and *S100a9*-deficient mice (31, 46) (8-10 weeks old) received daily topical applications of 80mg of commercially available 5% IMQ cream Aldara (Bausch Health, Laval, QC, CA) for 10 days on their shaved back. Erythema, desquamation, and hyperplasia of the skin were scored daily on a scale from 0 to 3: (0, none; 1, slight; 2, moderate; 3, marked), for a maximum score of 9.

Isolation of cells. Mice were sacrificed by cervical dislocation, and the blood, ears, back skin, femurs and lymph nodes were recovered. Bone marrow cells were collected from the femurs by flushing with RPMI medium supplemented with 5% fetal bovin serum (FBS). Erythrocytes were lysed by suspending the cells in 0.15 M NH₄Cl for 5 min followed by centrifugation at 300 x g, then washed with PBS. Inguinal lymph nodes were disrupted using a syringe piston through a 70 µm filter. Dermis cell suspension was prepared as previously described (47). Briefly, ears or back skin were extracted and kept in cold RPMI containing 5% FBS. Sheets of ear skin were separated using forceps. The skin was then incubated in a solution of Hank's Balanced Sodium Solution (HBSS) + 2.4 mg/mL Dispase II (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) for 60 min at 37°C to separate epidermis from dermis. Epidermis was discarded using forceps and dermis cut into small pieces using scissors then incubated in a solution of HBSS + 10% FBS + 2 mg/mL of collagenase type D (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) for 2 h. Cell suspension was homogenized by passing through a 19G syringe and filtered through a 70 µm filter.

Lymphocyte stimulation. Cells from inguinal lymph nodes and skin were rinsed with sterile PBS + 2% FBS then seeded at 1x10⁶ of cells/mL in RPMI + 10% FBS + 0,2% Primocin (Invivogen, San Diego, CA, USA) + 1X non-essential amino acids + 50ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) + 1µM Ionomycin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) + 1µL/mL of GolgiStop (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) for 5h at 37°C, 5% CO₂. Cells were then centrifuged 10 min at 300 x g, rinsed with PBS and analysed by flow cytometry.

Flow cytometry. Leukocytes were stained with Live/Dead Fixable Blue Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Fc receptors on cells were blocked by incubation with Fc block (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cell labelling was performed using a combination of monoclonal antibodies (Supplementary Table 1). Intracellular antigens were detected following permeabilization using the Intracellular Fixation & Permeabilization buffer set (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and labelling with monoclonal antibodies (Supplementary Table 1). Cell fluorescence was

analyzed on a BD LSR/LSRII (BD Biosciences, Mississauga, ON, CA) and data was analyzed using the FlowJo 10 software (BD, Franklin Lakes, N.J., USA).

Histological analysis. Skin samples were fixed in 4% paraformaldehyde then embedded in paraffin, and cut into 5 μ m sections. The sections were deparaffinised and rehydrated before being stained with hematoxylin and eosin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Skin sections were visualized using an Eclipse TE300 inverted microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Epidermis and dermis thickness were assessed using ImageJ software 1.51d (NIH, USA).

Immunofluorescence staining. Skin sections were deparaffinised in xylene then rehydrated, and heated 15 min in 10mM citrate buffer pH 6 at 65°C. After blocking of non-specific binding using a solution of PBS + 3% BSA + 0.1% saponine for 45 min at 37°C, the slides were incubated with rat anti-S100A9 (clone 2A5; 10 μ g/mL), rabbit anti-S100A8 (10 μ g/mL) or rat anti-S100A8 (clone # 335806; 10 μ g/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), rabbit anti-Ki-67 (1/500) (Abcam, Cambridge, EN), rabbit anti-K10 (1/100) (Abcam, Cambridge, EN), rat anti-Ly6G (clone 1A8; 2 μ g/mL) (StemCell technologies, Vancouver, BC, CA) or total IgG from rabbit or rat for 2h at RT. After washings, tissue sections were incubated with Alexa488 goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) or Alexa647 goat anti-rat IgG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (1/1000) + 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1/3000) for 1 hour at RT. Sections were then washed and coverslips were mounted with fluorescence mounting medium (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Pictures were taken using a DMI 6000B inverted microscope (Leica, Wetzlar, GER) and analyzed using Volocity® 5.4 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Skin homogenate preparation. Skin samples (100 mg) were flash-frozen in liquid nitrogen. Frozen tissues were cut into small pieces in liquid nitrogen using scissors. Pieces were grinded in liquid nitrogen to a fine powder. After nitrogen evaporation, tissue powder was homogenized with 1mL of Tissue Extraction Reagent I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with protease inhibitors (Roche, Basel, CH) then centrifuged 5 min at 10,000 x g at 4°C. Supernatant were harvested and protein concentration assessed using the BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

ELISA. Blood was collected, centrifuged and plasma frozen at -20°C. S100A8 and S100A9 homodimers, and S100A8/A9 heterodimer were quantified by ELISA as described previously (46).

Multiplex Assays. CXCL1 concentrations in skin homogenates and culture supernatants were measured using ProcartaPlex Immunoassays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism v7 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Two-way ANOVA with Bonferroni's correction was used for PASI score of imiquimod-induced psoriasis and Mann-Whitney test for other experiments. The p values < 0.05 were considered significant. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$.

Results

Deletion of *S100a8* and *S100a9* aggravates imiquimod-induced psoriasis. To investigate the roles of S100A8 and S100A9 in psoriasis, we first analyzed the expression and localization of S100A8 and S100A9 by immunofluorescence in imiquimod-treated WT skin. S100A8 and S100A9 were not expressed by keratinocytes of naïve mice. However, we observed a strong co-expression of S100A8 and S100A9 in the epidermis layer of imiquimod-treated mice as well as in infiltrating dermal leukocytes (**Fig. 1A**). Interestingly, S100A8 and S100A9 were detected in the cytosol and nuclei of apical keratinocytes. S100A8 and S100A9 homodimers, as well as S100A8/A9 heterodimer are secreted by keratinocytes and myeloid cells (48, 49). We therefore quantified S100A8/A9 and S100A8 and S100A9 homodimers in serum. Calprotectin concentration was significantly increased by more than 2-fold in the serum of imiquimod-treated mice compared to naïve serum (**Fig. 1B**). In addition, S100A9 homodimers were slightly increased in imiquimod-treated WT mice compared to naïve mice ($p = 0.5476$, **Fig. 1C**) while S100A8 homodimers were undetectable in serum.

We next induced psoriasis in *S100a8*- and *S100a9*-deficient mice. Imiquimod induced erythema, skin hypertrophy and desquamation in WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-}. While clinical scores diminished in WT mice by day 6, they remained elevated in both *S100a8*- and *S100a9*-deficient mice from day 8 to 10 (**Fig. 1D**). As expected, S100A8 and S100A9 expression was absent from *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mouse skin, respectively. However, de novo expression of S100A9 and S100A8 was observed in *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} imiquimod-treated mice, respectively, and their expression was mostly localized in the cytosol and nucleus of keratinocytes in the apical side of the epidermis (**Fig. 1E**). We then neutralized extracellular S100A8 and S100A9 activity using antibodies in WT mice to decipher the contribution of extracellular and intracellular functions of S100A8 and S100A9 in psoriasis (**Fig. 1F and G**). We observed a significant increase of PASI score with the anti-S100A8 and anti-S100A9, indicating that extracellular S100A8 and S100A9 diminish symptoms of psoriasis. While intracellular functions of S100A8 and S100A9 have been described in keratinocytes (50, 51), these observations indicate that extracellular S100A8 and S100A9 reduce psoriasis symptoms.

S100A8 controls the proliferation and differentiation of mouse keratinocytes. As imiquimod-induced psoriasis is characterized by skin hyperplasia, we measured dermis and epidermis from skins of naïve and imiquimod-treated mice. As expected, imiquimod caused a significant thickening of the dermis and epidermis compared to naïve mice for all groups (**Fig 2A and 2B**). No differences were observed in dermis thickness between WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} treated mice. However, epidermis hyperplasia was significantly enhanced in *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice compared to WT mice (with a moderate increase for *S100a9*^{-/-} mice; **Fig. 2C**). Assessment of keratinocyte proliferation using Ki-67 staining revealed higher number

of Ki-67⁺ cells in *S100a8*^{-/-} epidermis compared to WT (**Fig. 2D and 2E**) indicating that S100A8 regulates keratinocyte proliferation. No significant differences between *S100a9*^{-/-} and WT epidermis were observed, suggesting that keratinocytes proliferation is independent of S100A9.

S100A8 and S100A9 expression was mostly localized in the apical part in imiquimod-treated *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice (**Suppl. Fig. 2A-D**). In naïve skin, keratinocytes proliferate in the basal side of epidermis, then differentiate and express terminal differentiation markers such as cytokeratin 10 (K10) (52). Rupture of controlled proliferation is accompanied by modified differentiation. We therefore investigated the expression of the early keratinocyte maturation marker expression K10 by microscopy. K10 expression was homogenous along epidermis cells in psoriatic WT and *S100a9*^{-/-} mice. In contrast, expression of K10 was decreased and heterogeneous in psoriatic *S100a8*^{-/-} epidermis, suggesting that keratinocytes differentiation is also controlled by S100A8 (**Fig. 2F**). These results suggest that S100A8 in keratinocytes diminish proliferation and regulates differentiation induced by imiquimod.

Deletion of *S100a8* and *S100a9* enhances IL-17 responses in draining lymph nodes and dermis. We next investigated the effects of S100A8 and S100A9 on the immune response. We assessed the expression of S100A8 and S100A9 in CD11c expressing cells of skin-draining lymph nodes from naïve and imiquimod-treated WT mice. While less than 1% of CD11c⁺ cells co-express S100A8 and S100A9 in lymph nodes of naïve WT mice, we observed a small population (approximately 4%, $p = 0.1$) of CD11c⁺ cells that strongly co-expressed S100A8 and S100A9 in imiquimod-treated WT mice (**Fig. 3A and B, Suppl. Fig. 2A**). Among cells recruited to inflammatory sites, monocytes can give rise to DCs including CD11b⁺ moDCs that are essential to generate psoriasis-like skin inflammation (53). Naïve WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice had similar number of CD11b⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ moDCs in dermis (**Suppl. Fig 2B and 2C**). However, more CD11b⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ moDCs migrated to the inguinal lymph nodes in psoriatic *S100a8*^{-/-} mice, but not *S100a9*^{-/-} mice compared to WT mice (**Fig. 3C, Suppl. Fig. 2D**). These results suggest that absence of S100A8 increases myeloid DC migration from the skin to the draining LNs.

We next examined IL-17A/F expressing cells in inguinal LNs and dermis by flow cytometry. Imiquimod treatment led to a significant increase in CD4⁺ IL-17A/F⁺ T cells number in the draining lymph nodes of *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice compared to WT mice (**Fig. 3D and E, Suppl. Fig. 3A**). We observed the same pattern in dermis where CD4⁺ IL-17A/F⁺ T cells were increased in *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice compared to WT mice (**Fig. 3F and G, Suppl. Fig. 3B**).

Increased IL-17A/F production amplifies keratinocytes proliferation and hyperplasia in *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice. To confirm that inflammation in absence of S100A8 and S100A9 is dependent of IL-17, we treated WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice with neutralizing anti-IL-17A, anti-IL-17F or a control Ab. We observed a significant reduction of clinical scores in *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice treated with anti-IL-17A but not WT mice (compared to control Ab; **Fig. 4A**). Injection of neutralising anti-IL-17F significantly reduced psoriasis in WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice (**Fig. 4B**). This was also associated with a significant decrease in the hyperplasia of the epidermis, as well as proliferating keratinocytes (Ki-67⁺ cells) in *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice (**Fig. 4C and 4D**). Together, these results suggest that Th17 response is enhanced in absence of S100A8 and S100A9, resulting in skin hyperplasia.

Infiltration of neutrophils is increased in imiquimod-treated *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice. We next examined skin inflammation in absence of *S100a8* and *S100a9*. We detected a significant increase of the neutrophil chemoattractant CXCL1/GRO- α concentration in skin of both *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} imiquimod-treated mice compared to their WT littermate (**Fig. 5A**). We then assessed the infiltration of neutrophils in the skin by counting Ly6G⁺ cells in dermis and detected a 3-fold increased number of Ly6G⁺ cells in the dermis of psoriatic *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice compared to psoriatic WT mice (**Fig. 5B and 5C**). As Th17 response is augmented in *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice, we next quantified dermis infiltrating Ly6G⁺ cells after treatment with anti-IL-17A and anti-IL-17F. Interestingly, anti-IL-17A or IL-17F had no effects on neutrophil accumulation in dermis of WT mice. However significantly less Ly6G⁺ cells were detected in both psoriatic *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice treated with anti-IL-17A or IL-17F compared to WT treated mice (**Fig. 5D**). Thus, deletion of *S100a8* and *S100a9* leads to enhanced expression of IL-17A/F and CXCL1, leading to the accumulation of neutrophils in the dermis.

Discussion

The serum and skin contain elevated levels of S100A8 and S100A9 in patients suffering from psoriasis and their levels correlate with disease activity (32, 54). In addition, S100A8/A9 is a biomarker of subclinical inflammation (55) and serum S100A8/A9 predicts treatment escalation in chronic inflammatory syndromes such as IBD (56) and non-responsiveness in rheumatoid arthritis patients (57). There is therefore a strong correlation between S100A8/A9 and disease intensity in chronic inflammation. In this study, we identify S100A8 and S100A9 as negative regulators of the IL-17 immune axis in psoriasis. We report that S100A8 and S100A9 are expressed by keratinocytes and myeloid cells in psoriatic skin and serum. Psoriatic *S100a8^{-/-}* and *S100a9^{-/-}* mice showed aggravated disease, with elevated production of IL-17A and F from CD4 T cells. The increased presence of IL-17A and F in *S100a8^{-/-}* and *S100a9^{-/-}* mice enhanced neutrophil migration to the skin, as well as keratinocyte proliferation. Taken together, these results suggest a regulatory role for S100A8 and S100A9 in skin inflammation through the reduction of IL-17A and F production.

This study is the first comparison of inflammatory responses in both *S100a8^{-/-}* and *S100a9^{-/-}* mice. S100A8 and S100A9 are the most abundant alarmins found in serum of psoriatic patients (32). Strong expression of S100A8 and S100A9 has also been reported in several mouse models of psoriasis (37, 49, 58). Although they were proposed as biomarkers for psoriasis (33) and psoriatic arthritis (59), their exact functions in the pathogenesis of psoriasis is still controversial. We observed worsened psoriasis symptoms in *S100a8^{-/-}* and *S100a9^{-/-}* mice, with a milder clinical score in *S100a9^{-/-}* compared to *S100a8^{-/-}*. This suggests that S100A8 and S100A9 homodimers regulate inflammation differently and have distinct function. However, the possibility still exists that S100A8/A9 heterodimers repress inflammation, with S100A8 homodimers and S100A9 homodimers having anti-inflammatory and pro-inflammatory functions, respectively. Indeed, a recent study suggests that the heterodimer S100A8/A9 is involved in an auto-inhibitory mechanism through tetramerization of two S100A8/A9 heterodimers in vitro, blocking the cascade of activation linked to TLR4/MD2 binding (22). Naïve *S100a8^{-/-}* and *S100a9^{-/-}* mice lack protein expression of S100A8/A9 and S100A9 and S100A8 respectively. Although the S100A8/A9 heterodimer is the secreted form predominantly measured in plasma of psoriatic WT mice, the homodimers are de novo expressed in inflamed skin and neutrophils from *S100a8^{-/-}* and *S100a9^{-/-}* mice, and can possibly exhibit both intra and extracellular functions. While deletion of *S100a8* or *S100a9* had similar effects on Th17 activation and neutrophil migration to the skin, deletion of *S100a8* increased proliferation, and reduced differentiation of keratinocytes. Since S100A9 protein is expressed in psoriatic *S100a8^{-/-}* keratinocytes, these results suggest that either S100A8 down-regulates keratinocyte proliferation, or S100A9 homodimers induce keratinocyte proliferation. Therefore, differences observed between *S100a8^{-/-}* and *S100a9^{-/-}* particularly on keratinocyte proliferation and differentiation as well as dendritic cells recruitment, cannot be explained only by the absence of the heterodimer S100A8/A9, but more

likely by the contribution of the S100A8 and S100A9 homodimers. No notable differences were observed in keratinocyte proliferation and differentiation in absence of S100A9 in this model of psoriasis. However, S100A9 appears to control keratinocyte proliferation as *S100a9^{-/-}* mice epidermis display increased Ki-67 positive keratinocytes in a model of papillomas (60). Given the high expression of S100A8 and S100A9 in keratinocytes in hypertrophic scars and keloid tissues (44), it is tempting to speculate that they participate in the hyperproliferation of keratinocytes in pathological conditions.

Loss of S100A8 and S100A9 resulted in an increased IL-17AF response in both skin and lymph nodes. Moreover, we showed that the amplified hyperplasia in *S100a8^{-/-}* and *S100a9^{-/-}* mice is highly dependent of the secretion of IL-17A and IL-17F. IL-17A and IL-17F contribute equally to psoriatic inflammation induced by imiquimod (61). IL-17A induces increased proliferation and aberrant differentiation of keratinocytes in psoriatic skin (62). In addition, IL-17A amplifies the inflammatory network by promoting the release of antimicrobial peptides and pro-inflammatory cytokines and chemokines (63). We detected an increased migration of dendritic cells to the lymph nodes in psoriatic mice, which might explain the increased presence of Th17 cells. In turn, the enhanced secretion of IL-17A and F would promote keratinocyte proliferation and the migration of inflammatory cells to the skin, leading to the aggravated psoriasis symptoms. We observed a greater efficiency of the IL-17F neutralizing antibody compared to the anti-IL-17A on the psoriasis symptoms which is consistent with the finding that *Il17f^{-/-}* mice show a higher disease resistance than *Il17a^{-/-}* in the imiquimod-induced psoriasis (61). We hypothesize that myeloid-derived dendritic cells from *S100a8^{-/-}* and *S100a9^{-/-}* mice are more efficient to activate Th17 through cytokines secretion. Further investigations would be needed to verify this hypothesis.

Manitz *et al.* reported that neutrophil migration is weakened in *S100a9^{-/-}* mice (64). However, we demonstrated that neutrophil infiltration in arthritic paws is increased in absence of S100A8 (31). In addition, neutrophil recruitment was not diminished in psoriatic skin of *S100a8^{-/-}* and *S100a9^{-/-}* mice, suggesting that migration of neutrophils is not impaired in the absence of S100A8, S100A9 and the S100A8/A9 heterodimer. We observed a greater infiltration of neutrophils through the dermis of both *S100a8^{-/-}* and *S100a9^{-/-}*, associated with an increased concentration of CXCL1 in the skin and this infiltration was dependant on IL-17A and IL-17F. However, as circulating neutrophils are more numerous in *S100a8*-deficient mice (31), we cannot rule out that the enhanced migration of neutrophils to the inflammation site observed in *S100a8^{-/-}* and *S100a9^{-/-}* might be due to their increased availability from the circulation.

S100A8 was first identified as a potent neutrophil chemotactic factor (65). Anti-S100A8 also reduces myeloid cell accumulation in models of gout, streptococcal pneumonia and LPS inflammation (18, 66, 67),

indicating pro-inflammatory activities. However, glucocorticoids and IL-10 induce S100A8 expression (68-70), suggesting an anti-inflammatory function for this protein. In addition, S100A8 induce the expression of IL-10, and its inhibition aggravates chronic inflammation like collagen-induced arthritis (31), indicating that it dampens this immune response. Our results support anti-inflammatory functions for S100A8 in psoriasis. Extracellular activity of S100A8 is controlled by its oxidation and nitrosylation on its cysteine residue, leading to the formation of covalent bounds between the monomers (27, 28). Oxidized S100A8 is anti-inflammatory, inhibiting mast cell degranulation and cytokine secretion induced by FcεR crosslinking (28, 30, 71, 72). Thus, a picture emerges in which S100A8 is rapidly secreted during inflammatory reactions. Secreted S100A8 would enhance the inflammatory response until its oxidization by ROS produced at the inflammatory site. Oxidized S100A8 would then dampen the immune response in chronic inflammation.

S100A9 is widely viewed as a pro-inflammatory factor, inducing phagocytosis, degranulation, and ROS production by neutrophils and monocytes (16). S100A9 also induces cytokine secretion by monocytes by activating NF-κB and the inflammasome, activates T cells, and blocking S100A9 reduces chronic inflammation (14, 73). *S100a9*^{-/-} mice have reduced inflammation in antigen-induced arthritis (74). Surprisingly, we found that inflammation is increased in imiquimod-induced psoriasis in *S100a9*^{-/-} mice. This contrasts with the protective effect provided by the deletion of *S100a9* in the *Jun* and *JunB* double knockout model of psoriasis (51). This might be due to the essential role played by IL-17 in the imiquimod model as these two psoriasis models differ in their requirement of IL-17. Like in human psoriasis, the IL-23/IL-17 inflammation axis is essential in the imiquimod-induced psoriasis (61). Since the AP-1 transcription factor JunB is required for Th17 cell differentiation (75), this axis cannot play a role in the *Jun/JunB* double knockout model of psoriasis. We found that S100A9 controls Th17 numbers and IL-17 expression. In addition, anti-IL-17 antibodies inhibit S100A8 and S100A9 expression, but increase IL-17 expression in the DBA-1 model of psoriasis-like dermatitis (76), suggesting an IL-17 – S100A8/A9 regulatory loop in psoriasis. The anti-inflammatory role of S100A9 in the imiquimod model of psoriasis could therefore be due to the control of IL-17-induced inflammation.

In conclusion, this research exposes some new and unexpected anti-inflammatory functions of the extracellular DAMPs S100A8 and S100A9 in the context of skin inflammation. It demonstrates that these proteins can exert pro- and anti-inflammatory activities depending on the disease model and/or tissues involved.

Acknowledgments

We thank the technicians from the Université Laval animal facilities and histology services for their technical assistance.

References

1. Boehncke, W.-H., and M. P. Schön. 2015. Psoriasis. *The Lancet* 386: 983-994.
2. Griffiths, C. E., and J. N. Barker. 2007. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 370: 263-271.
3. Di Meglio, P., Gayathri K. Perera, and Frank O. Nestle. 2011. The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function. *Immunity* 35: 857-869.
4. Antonella Di, C., M. Paola Di, and O. N. Frank. 2009. The IL-23/Th17 Axis in the Immunopathogenesis of Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 129: 1339.
5. Boniface, K., F. X. Bernard, M. Garcia, A. L. Gurney, J. C. Lecron, and F. Morel. 2005. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 174: 3695-3702.
6. 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.
7. Qin, H., B. Lerman, I. Sakamaki, G. Wei, S. C. Cha, S. S. Rao, J. Qian, Y. Hailemichael, R. Nurieva, K. C. Dwyer, J. Roth, Q. Yi, W. W. Overwijk, and L. W. Kwak. 2014. Generation of a new therapeutic peptide that depletes myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Nat Med* 20: 676-681.
8. Averill, M. M., S. Barnhart, L. Becker, X. Li, J. W. Heinecke, R. C. Leboeuf, J. A. Hamerman, C. Sorg, C. Kerkhoff, and K. E. Bornfeldt. 2011. S100A9 differentially modifies phenotypic states of neutrophils, macrophages, and dendritic cells: implications for atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circulation* 123: 1216-1226.
9. van Lent, P. L., L. C. Grevers, A. B. Blom, O. J. Arntz, F. A. van de Loo, P. van der Kraan, S. Abdollahi-Roodsaz, G. Srikrishna, H. Freeze, A. Sloetjes, W. Nacken, T. Vogl, J. Roth, and W. B. van den Berg. 2008. Stimulation of chondrocyte-mediated cartilage destruction by S100A8 in experimental murine arthritis. *Arthritis Rheum* 58: 3776-3787.
10. Grimbaldston, M. A., C. L. Geczy, N. Tedla, J. J. Finlay-Jones, and P. H. Hart. 2003. S100A8 induction in keratinocytes by ultraviolet A irradiation is dependent on reactive oxygen intermediates. *J Invest Dermatol* 121: 1168-1174.
11. Henke, M. O., A. Renner, B. K. Rubin, J. I. Gyves, E. Lorenz, and J. S. Koo. 2006. Up-regulation of S100A8 and S100A9 protein in bronchial epithelial cells by lipopolysaccharide. *Exp Lung Res* 32: 331-347.
12. Perera, C., H. P. McNeil, and C. L. Geczy. 2010. S100 Calgranulins in inflammatory arthritis. *Immunol Cell Biol* 88: 41-49.
13. Korndorfer, I. P., F. Brueckner, and A. Skerra. 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. *J Mol Biol* 370: 887-898.
14. Cesaro, A., N. Anceriz, A. Plante, N. Page, M. R. Tardif, and P. A. Tessier. 2012. An inflammation loop orchestrated by S100A9 and calprotectin is critical for development of arthritis. *PLoS One* 7: e45478.
15. Sunahori, K., M. Yamamura, J. Yamana, K. Takasugi, M. Kawashima, H. Yamamoto, W. J. Chazin, Y. Nakatani, S. Yui, and H. Makino. 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.
16. Simard, J. C., M. M. Simon, P. A. Tessier, and D. Girard. 2011. Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. *J Immunol* 186: 3622-3631.

17. 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.
18. Ryckman, C., S. R. McColl, K. Vandal, R. de Medicis, A. Lussier, P. E. Poubelle, and P. A. Tessier. 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.
19. Loser, K., T. Vogl, M. Voskort, A. Lueken, V. Kupas, W. Nacken, L. Klenner, A. Kuhn, D. Foell, L. Sorokin, T. A. Luger, J. Roth, and S. Beissert. 2010. The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8⁺ T cells. *Nature medicine* 16: 713-717.
20. van Lent, P. L., L. C. Grevers, R. Schelbergen, A. Blom, J. Geurts, A. Sloetjes, T. Vogl, J. Roth, and W. B. van den Berg. 2010. S100A8 causes a shift toward expression of activatory Fcγ receptors on macrophages via toll-like receptor 4 and regulates Fcγ receptor expression in synovium during chronic experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 62: 3353-3364.
21. Wang, C., A. G. Klechikov, A. L. Gharibyan, S. K. Warmlander, J. Jarvet, L. Zhao, X. Jia, V. K. Narayana, S. K. Shankar, A. Olofsson, T. Brannstrom, Y. Mu, A. Graslund, and L. A. Morozova-Roche. 2014. The role of pro-inflammatory S100A9 in Alzheimer's disease amyloid-neuroinflammatory cascade. *Acta Neuropathol* 127: 507-522.
22. Vogl, T., A. Stratis, V. Wixler, T. Voller, S. Thurainayagam, S. K. Jorch, S. Zenker, A. Dreiling, D. Chakraborty, M. Frohling, P. Paruzel, C. Wehmeyer, S. Hermann, O. Papantonopoulou, C. Geyer, K. Loser, M. Schafers, S. Ludwig, M. Stoll, T. Leanderson, J. L. Schultze, S. Konig, T. Pap, and J. Roth. 2018. Autoinhibitory regulation of S100A8/S100A9 alarmin activity locally restricts sterile inflammation. *J Clin Invest* 128: 1852-1866.
23. Lackmann, M., C. J. Cornish, R. J. Simpson, R. L. Moritz, and C. L. Geczy. 1992. Purification and structural analysis of a murine chemotactic cytokine (CP-10) with sequence homology to S100 proteins. *J Biol Chem* 267: 7499-7504.
24. Anceriz, N., K. Vandal, and P. A. Tessier. 2007. S100A9 mediates neutrophil adhesion to fibronectin through activation of beta2 integrins. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 84-89.
25. Devery, J. M., N. J. King, and C. L. Geczy. 1994. Acute inflammatory activity of the S100 protein CP-10. Activation of neutrophils in vivo and in vitro. *J Immunol* 152: 1888-1897.
26. Harrison, C. A., M. J. Raftery, J. Walsh, P. Alewood, S. E. Iismaa, S. Thliveris, and C. L. Geczy. 1999. Oxidation regulates the inflammatory properties of the murine S100 protein S100A8. *J Biol Chem* 274: 8561-8569.
27. Lim, S. Y., M. Raftery, H. Cai, K. Hsu, W. X. Yan, H. L. Hsieh, R. N. Watts, D. Richardson, S. Thomas, M. Perry, and C. L. Geczy. 2008. S-nitrosylated S100A8: novel anti-inflammatory properties. *J Immunol* 181: 5627-5636.
28. Lim, S. Y., M. J. Raftery, and C. L. Geczy. 2011. Oxidative modifications of DAMPs suppress inflammation: the case for S100A8 and S100A9. *Antioxid Redox Signal* 15: 2235-2248.
29. Raftery, M. J., Z. Yang, S. M. Valenzuela, and C. L. Geczy. 2001. Novel intra- and inter-molecular sulfinamide bonds in S100A8 produced by hypochlorite oxidation. *J Biol Chem* 276: 33393-33401.
30. Zhao, J., I. Endoh, K. Hsu, N. Tedla, Y. Endoh, and C. L. Geczy. 2011. S100A8 modulates mast cell function and suppresses eosinophil migration in acute asthma. *Antioxid Redox Signal* 14: 1589-1600.
31. Cesaro, A., J. Defrene, A. Lachhab, N. Page, M. R. Tardif, A. Al-Shami, T. Oravec, P. R. Fortin, J. F. Daudelin, N. Labrecque, F. Aoudjit, M. Pelletier, and P. A. Tessier. 2019. Enhanced myelopoiesis and aggravated arthritis in S100a8-deficient mice. *PLoS One* 14: e0221528.
32. Benoit, S., A. Toksoy, M. Ahlmann, M. Schmidt, C. Sunderkotter, D. Foell, M. Pasparakis, J. Roth, and M. Goebeler. 2006. Elevated serum levels of calcium-binding S100 proteins A8 and A9 reflect disease activity and abnormal differentiation of keratinocytes in psoriasis. *Br J Dermatol* 155: 62-66.
33. Qian, M., and N. J. Song. 2018. Serum calprotectin correlates with risk and disease severity in psoriasis patients and the decrease of calprotectin predicts better response to tumor necrosis factor inhibitors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22: 4299-4309.

34. Chimenti, M. S., P. Triggianese, E. Botti, A. Narcisi, P. Conigliaro, A. Giunta, M. Teoli, R. Perricone, and A. Costanzo. 2016. S100A8/A9 in psoriatic plaques from patients with psoriatic arthritis. *The Journal of international medical research* 44: 33-37.
35. Nakajima, K., T. Kanda, M. Takaishi, T. Shiga, K. Miyoshi, H. Nakajima, R. Kamijima, M. Tarutani, J. M. Benson, M. M. Elloso, L. L. Gutshall, M. F. Naso, Y. Iwakura, J. DiGiovanni, and S. Sano. 2011. Distinct roles of IL-23 and IL-17 in the development of psoriasis-like lesions in a mouse model. *J Immunol* 186: 4481-4489.
36. Johnston, A., Y. Fritz, S. M. Dawes, D. Diaconu, P. M. Al-Attar, A. M. Guzman, C. S. Chen, W. Fu, J. E. Gudjonsson, T. S. McCormick, and N. L. Ward. 2013. Keratinocyte overexpression of IL-17C promotes psoriasiform skin inflammation. *J Immunol* 190: 2252-2262.
37. Zhang, H., G. Carnevale, B. Polese, M. Simard, B. Thuraiajah, N. Khan, M. E. Gentile, G. Fontes, D. C. Vinh, R. Pouliot, and I. L. King. 2019. CD109 Restrains Activation of Cutaneous IL-17-Producing gammadelta T Cells by Commensal Microbiota. *Cell Rep* 29: 391-405 e395.
38. Madsen, P., H. H. Rasmussen, H. Leffers, B. Honore, and J. E. Celis. 1992. Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid-binding protein [PA-FABP]) that is highly up-regulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid-binding proteins. *J Invest Dermatol* 99: 299-305.
39. Sano, S., K. S. Chan, and J. DiGiovanni. 2008. Impact of Stat3 activation upon skin biology: a dichotomy of its role between homeostasis and diseases. *J Dermatol Sci* 50: 1-14.
40. Zenz, R., R. Eferl, L. Kenner, L. Florin, L. Hummerich, D. Mehic, H. Scheuch, P. Angel, E. Tschachler, and E. F. Wagner. 2005. Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature* 437: 369-375.
41. Takeichi, T., K. Sugiura, Y. Muro, K. Matsumoto, Y. Ogawa, K. Futamura, O. Kaminuma, N. Hashimoto, Y. Shimoyama, H. Saito, and Y. Tomita. 2010. Overexpression of LEDGF/DFS70 induces IL-6 via p38 activation in HaCaT cells, similar to that seen in the psoriatic condition. *J Invest Dermatol* 130: 2760-2767.
42. Lee, Y., S. Jang, J.-K. Min, K. Lee, K.-C. Sohn, J.-S. Lim, M. Im, H.-E. Lee, Y.-J. Seo, C.-D. Kim, and J.-H. Lee. 2012. S100A8 and S100A9 are messengers in the crosstalk between epidermis and dermis modulating a psoriatic milieu in human skin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 423: 647-653.
43. Nukui, T., R. Ehama, M. Sakaguchi, H. Sonogawa, C. Katagiri, T. Hibino, and N. H. Huh. 2008. S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes. *Journal of cellular biochemistry* 104: 453-464.
44. Zhong, A., W. Xu, J. Zhao, P. Xie, S. Jia, J. Sun, R. D. Galiano, T. A. Mustoe, and S. J. Hong. 2016. S100A8 and S100A9 Are Induced by Decreased Hydration in the Epidermis and Promote Fibroblast Activation and Fibrosis in the Dermis. *Am J Pathol* 186: 109-122.
45. Schonthaler, H. B., J. Guinea-Viniegra, S. K. Wculek, I. Ruppen, P. Ximenez-Embun, A. Guio-Carrion, R. Navarro, N. Hogg, K. Ashman, and E. F. Wagner. 2013. S100A8-S100A9 protein complex mediates psoriasis by regulating the expression of complement factor C3. *Immunity* 39: 1171-1181.
46. Laouedj, M., M. R. Tardif, L. Gil, M.-A. Raquil, A. Lachhab, M. Pelletier, P. A. Tessier, and F. Barabé. 2017. S100A9 induces differentiation of acute myeloid leukemia cells through TLR4. *Blood* 129: 1980.
47. Ginhoux, F., K. Liu, J. Helft, M. Bogunovic, M. Greter, D. Hashimoto, J. Price, N. Yin, J. Bromberg, S. A. Lira, E. R. Stanley, M. Nussenzweig, and M. Merad. 2009. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103⁺ DCs. *The Journal of Experimental Medicine* 206: 3115.
48. Tardif, M. R., J. A. Chapeton-Montes, A. Posvanzic, N. Page, C. Gilbert, and P. A. Tessier. 2015. Secretion of S100A8, S100A9, and S100A12 by Neutrophils Involves Reactive Oxygen Species and Potassium Efflux. *J Immunol Res* 2015: 296149.
49. Thorey, I. S., J. Roth, J. Regenbogen, J. P. Halle, M. Bittner, T. Vogl, S. Kaesler, P. Bugnon, B. Reitmaier, S. Durka, A. Graf, M. Wockner, N. Rieger, A. Konstantinow, E. Wolf, A. Goppelt, and S. Werner. 2001. The Ca²⁺-binding proteins S100A8 and S100A9 are encoded by novel injury-regulated genes. *J Biol Chem* 276: 35818-35825.

50. Schonthaler, Helia B., J. Guinea-Viniegra, Stefanie K. Wculek, I. Ruppen, P. Ximénez-Embún, A. Guío-Carrión, R. Navarro, N. Hogg, K. Ashman, and Erwin F. Wagner. 2013. S100A8-S100A9 Protein Complex Mediates Psoriasis by Regulating the Expression of Complement Factor C3. *Immunity* 39: 1171-1181.
51. Tanigawa, H., K. Miyata, Z. Tian, J. Aoi, T. Kadomatsu, S. Fukushima, A. Ogata, N. Takeda, J. Zhao, S. Zhu, K. Terada, M. Endo, J. Morinaga, T. Sugizaki, M. Sato, M. S. Morioka, I. Manabe, Y. Mashimo, A. Hata, Y. Taketomi, K. Yamamoto, M. Murakami, K. Araki, M. Jinnin, H. Ihn, and Y. Oike. 2016. Upregulation of ANGPTL6 in mouse keratinocytes enhances susceptibility to psoriasis. *Sci Rep* 6: 34690.
52. Santos, M., J. M. Paramio, A. Bravo, A. Ramirez, and J. L. Jorcano. 2002. The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis. *J Biol Chem* 277: 19122-19130.
53. Lee, M., S. H. Kim, T. G. Kim, J. Park, J. W. Lee, and M. G. Lee. 2018. Resident and monocyte-derived Langerhans cells are required for imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis model. *J Dermatol Sci* 91: 52-59.
54. Guzel, S., G. Erfan, M. Kulac, E. C. Guzel, V. Kucukyalcin, S. Kaya, and A. R. Kiziler. 2015. Chemerin and calprotectin levels correlate with disease activity and inflammation markers in psoriasis vulgaris. *Dermatologica Sinica* 33: 1-4.
55. Magro, F., S. Lopes, R. Coelho, J. Cotter, F. Dias de Castro, H. Tavares de Sousa, M. Salgado, P. Andrade, A. I. Vieira, P. Figueiredo, P. Caldeira, A. Sousa, M. A. Duarte, F. Avila, J. Silva, J. Moleiro, S. Mendes, S. Giestas, P. Ministro, P. Sousa, R. Goncalves, B. Goncalves, A. Oliveira, C. Chagas, J. Torres, C. C. Dias, J. Lopes, P. Borralho, J. Afonso, K. Geboes, F. Carneiro, and I. B. D. S. G. Portuguese. 2017. Accuracy of Faecal Calprotectin and Neutrophil Gelatinase B-associated Lipocalin in Evaluating Subclinical Inflammation in UlceRaTIVE Colitis-the ACERTIVE study. *J Crohns Colitis* 11: 435-444.
56. Kalla, R., N. A. Kennedy, N. T. Ventham, R. K. Boyapati, A. T. Adams, E. R. Nimmo, M. R. Visconti, H. Drummond, G. T. Ho, R. J. Pattenden, D. C. Wilson, and J. Satsangi. 2016. Serum Calprotectin: A Novel Diagnostic and Prognostic Marker in Inflammatory Bowel Diseases. *Am J Gastroenterol* 111: 1796-1805.
57. Patro, P. S., A. Singh, R. Misra, and A. Aggarwal. 2016. Myeloid-related Protein 8/14 Levels in Rheumatoid Arthritis: Marker of Disease Activity and Response to Methotrexate. *J Rheumatol* 43: 731-737.
58. Swindell, W. R., A. Johnston, S. Carbajal, G. Han, C. Wohn, J. Lu, X. Xing, R. P. Nair, J. J. Voorhees, J. T. Elder, X. J. Wang, S. Sano, E. P. Prens, J. DiGiovanni, M. R. Pittelkow, N. L. Ward, and J. E. Gudjonsson. 2011. Genome-wide expression profiling of five mouse models identifies similarities and differences with human psoriasis. *PLoS One* 6: e18266.
59. Inciarte-Mundo, J., J. Ramirez, M. V. Hernandez, V. Ruiz-Esquide, A. Cuervo, S. R. Cabrera-Villalba, M. Pascal, J. Yague, J. D. Canete, and R. Sanmarti. 2018. Calprotectin strongly and independently predicts relapse in rheumatoid arthritis and polyarticular psoriatic arthritis patients treated with tumor necrosis factor inhibitors: a 1-year prospective cohort study. *Arthritis Res Ther* 20: 275.
60. McNeill, E., and N. Hogg. 2014. S100A9 has a protective role in inflammation-induced skin carcinogenesis. *Int J Cancer* 135: 798-808.
61. van der Fits, L., S. Mourits, J. S. Voerman, M. Kant, L. Boon, J. D. Laman, F. Cornelissen, A. M. Mus, E. Florencia, E. P. Prens, and E. Lubberts. 2009. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* 182: 5836-5845.
62. Lai, Y., D. Li, C. Li, B. Muehleisen, K. A. Radek, H. J. Park, Z. Jiang, Z. Li, H. Lei, Y. Quan, T. Zhang, Y. Wu, P. Kotol, S. Morizane, T. R. Hata, K. Iwatsuki, C. Tang, and R. L. Gallo. 2012. The antimicrobial protein REG3A regulates keratinocyte proliferation and differentiation after skin injury. *Immunity* 37: 74-84.
63. Liang, S. C., X. Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, and L. A. Fouser. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 203: 2271-2279.
64. Manitz, M. P., B. Horst, S. Seeliger, A. Strey, B. V. Skryabin, M. Gunzer, W. Frings, F. Schonlau, J. Roth, C. Sorg, and W. Nacken. 2003. Loss of S100A9 (MRP14) results in reduced interleukin-8-induced CD11b surface expression, a polarized microfilament system, and diminished responsiveness to chemoattractants in vitro. *Mol Cell Biol* 23: 1034-1043.

65. Lackmann, M., P. Rajasekariah, S. E. Iismaa, G. Jones, C. J. Cornish, S. Hu, R. J. Simpson, R. L. Moritz, and C. L. Geczy. 1993. Identification of a chemotactic domain of the pro-inflammatory S100 protein CP-10. *J Immunol* 150: 2981-2991.
66. 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.
67. 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.
68. Hsu, K., R. J. Passey, Y. Endoh, F. Rahimi, P. Youssef, T. Yen, and C. L. Geczy. 2005. Regulation of S100A8 by glucocorticoids. *J Immunol* 174: 2318-2326.
69. 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.
70. Xu, K., T. Yen, and C. L. Geczy. 2001. IL-10 up-regulates macrophage expression of the S100 protein S100A8. *J Immunol* 166: 6358-6366.
71. Lim, S. Y., M. J. Raftery, J. Goyette, K. Hsu, and C. L. Geczy. 2009. Oxidative modifications of S100 proteins: functional regulation by redox. *Journal of leukocyte biology* 86: 577-587.
72. Lim, S. Y., M. J. Raftery, J. Goyette, and C. L. Geczy. 2010. S-glutathionylation regulates inflammatory activities of S100A9. *J Biol Chem* 285: 14377-14388.
73. Simard, J. C., A. Cesaro, J. Chapeton-Montes, M. Tardif, F. Antoine, D. Girard, and P. A. Tessier. 2013. S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF-kappaB(1.). *PLoS One* 8: e72138.
74. van Lent, P. L., L. Grevers, A. B. Blom, A. Sloetjes, 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.
75. Yamazaki, S., Y. Tanaka, H. Araki, A. Kohda, F. Sanematsu, T. Arasaki, X. Duan, F. Miura, T. Katagiri, R. Shindo, H. Nakano, T. Ito, Y. Fukui, S. Endo, and H. Sumimoto. 2017. The AP-1 transcription factor JunB is required for Th17 cell differentiation. *Sci Rep* 7: 17402.
76. Ebihara, S., F. Date, Y. Dong, and M. Ono. 2015. Interleukin-17 is a critical target for the treatment of ankylosing enthesitis and psoriasis-like dermatitis in mice. *Autoimmunity* 48: 259-266.

Figures

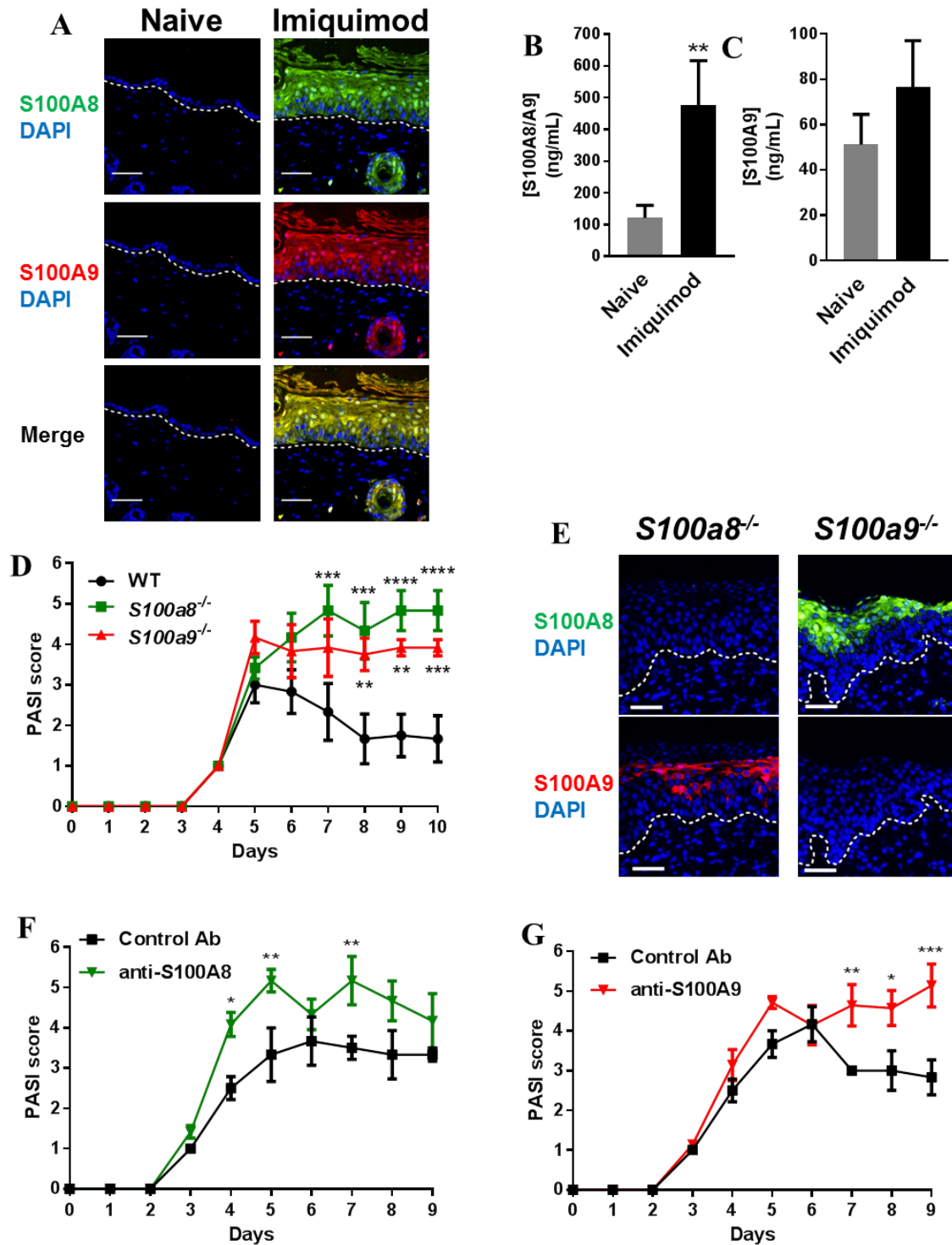


FIGURE 1: Extracellular S100A8 and S100A9 diminish imiquimod-induced psoriasis symptoms. (A) Skin sections from 10-day imiquimod-treated WT mice stained with anti-S100A8 (green), anti-S100A9 (red) and DAPI (blue). Scale bars represent 25 μ m. **(B and C)** S100A8/A9 and S100A9 levels in serum at day 10

were of mice with psoriasis. Data are means $\pm$ SEM (Control: n = 5 mice, imiquimod: n = 6 mice). **(D)** Cumulative Psoriasis Area Severity Index (PASI) scores of WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice. Data are means $\pm$ SEM (n = 6 mice per group). **(E)** Skin sections from 10-day imiquimod-treated *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice stained with anti-S100A8 (green), anti-S100A9 (red) and DAPI (blue). Scale bars represent 50 μ m. **(F)** PASI scores of WT mice treated with anti-S100A8 or control Ab. Data are means $\pm$ SEM (n = 6 mice per group). **(G)** PASI scores of WT mice treated with anti-S100A9 or control Ab. Data are means $\pm$ SEM (n = 6 mice per group). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; p values were calculated using Mann-Whitney test (B and C), or two-way ANOVA with Bonferroni's correction (D, F, G).

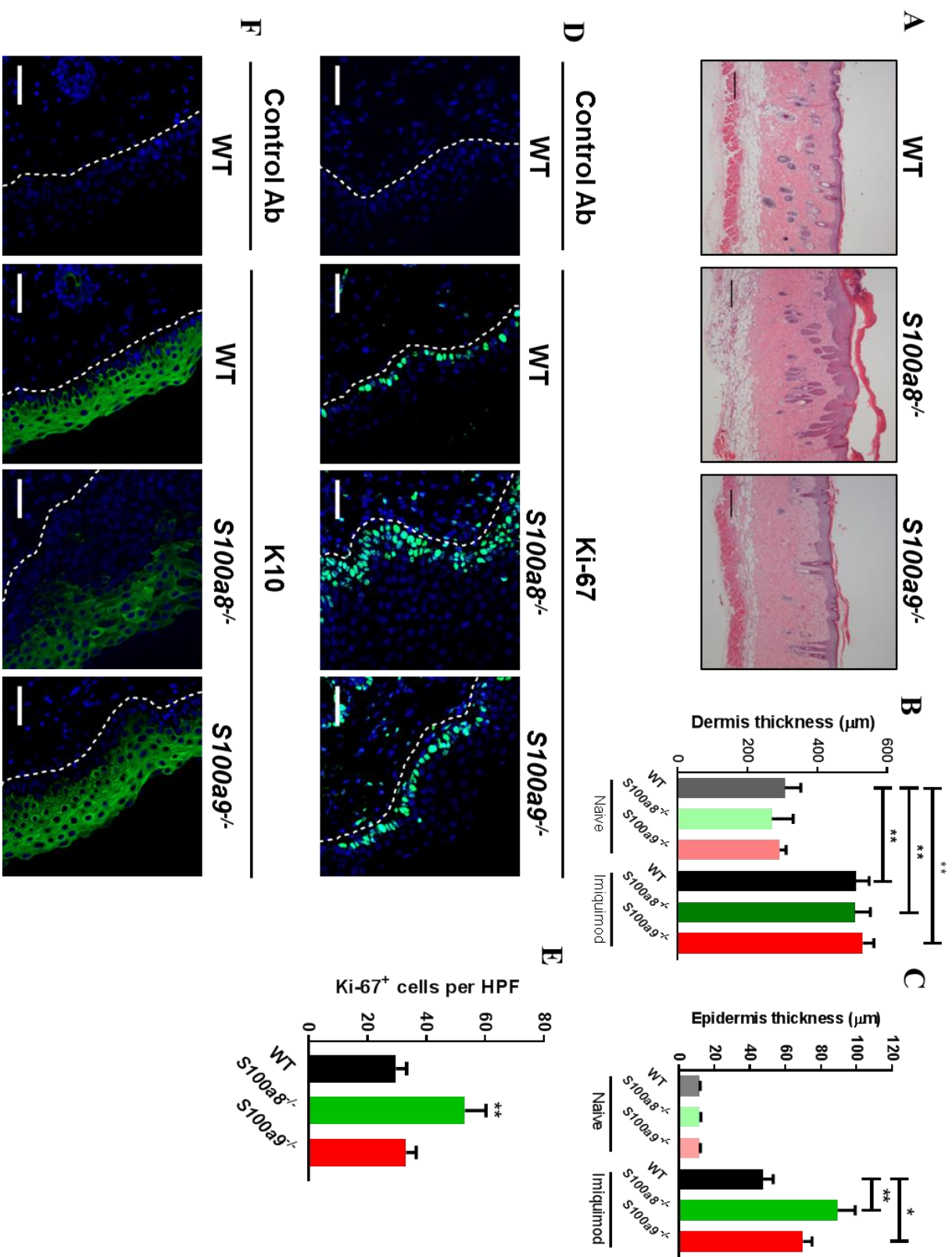


FIGURE 2: S100A8 regulates the keratinocyte proliferation and differentiation. (A) Skin sections from 10-day imiquimod-treated WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice stained with hematoxylin and eosin. Scale bars represent 200 μ m. (B) Dermis and (C) epidermis thickness of WT, *S100a8*^{-/-}, *S100a9*^{-/-} mice at day 10. Data are means $\pm$ SEM (n = 6 mice per group). (D) Skin sections from 10-day imiquimod-treated WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice stained with anti-Ki-67 (green) and DAPI (blue). Scale bars represent 50 μ m. (E) Numbers of Ki-67⁺ nuclei per high power field (HPF) at day 10 in imiquimod-treated WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice skins. Data are means $\pm$ SEM of at least 18 HPF from slides of 6 mice per group. (F) Skin sections from imiquimod-treated WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice at day 10 stained with anti-K10 (green) and DAPI (blue). Scale bars represent 50 μ m. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; p values were calculated using Mann-Whitney test (B, C, E).

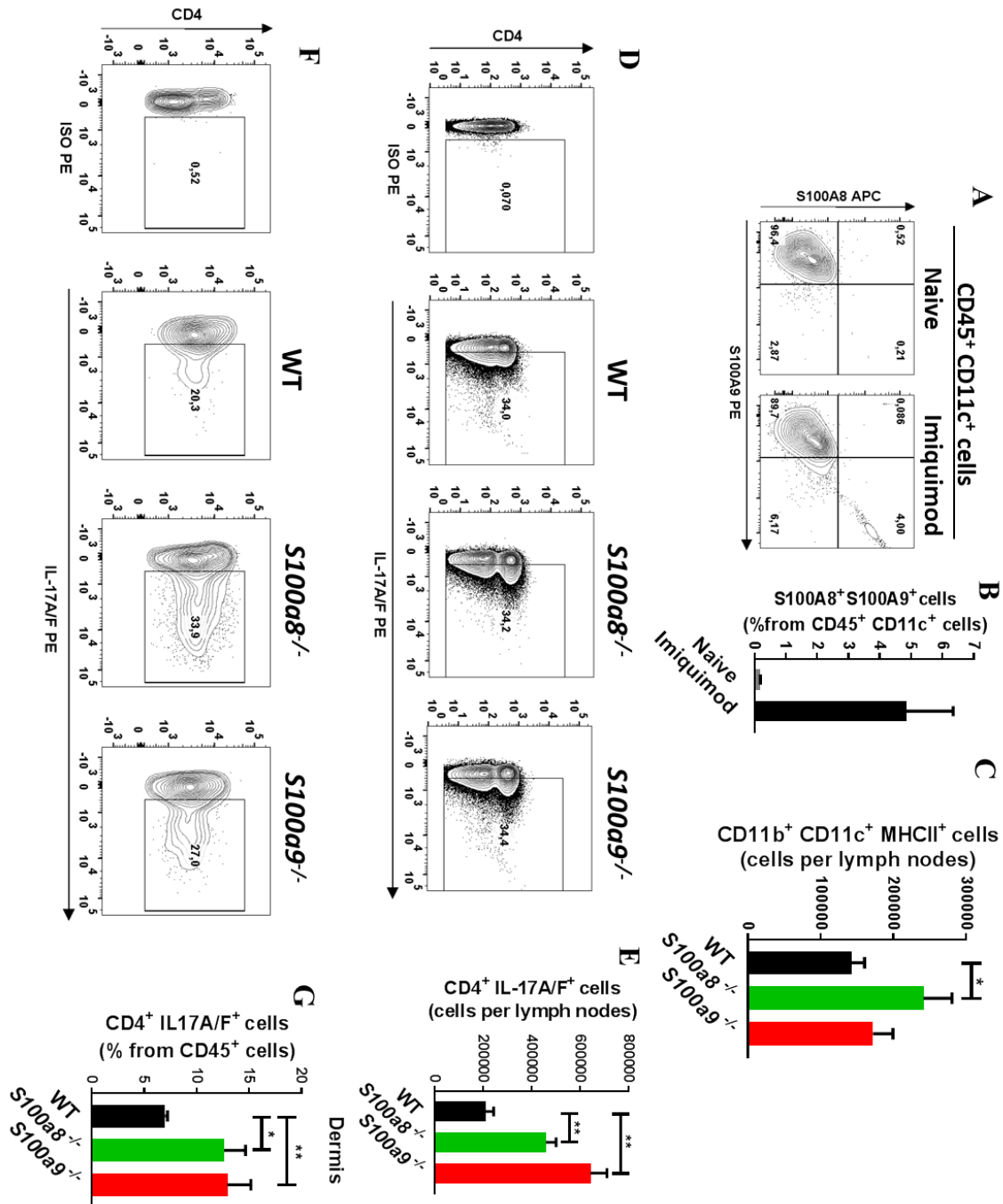


FIGURE 3: IL-17AF response is increased in *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice. (A) Expression of S100A8 and S100A9 in CD45⁺ CD11c⁺ cells in lymph nodes from naïve and imiquimod-treated WT mice at day 10. (B) Percentage of CD45⁺ CD11c⁺ cells co-expressing S100A8 and S100A9. Data are means ± SEM (n = 3 mice per group). (C) CD11b^{high} CD11c⁺ MHCII⁺ cells in inguinal lymph nodes of naïve and imiquimod-treated WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice at day 10. Data are means ± SEM (n ≥ 4 mice per group). (D) Representative flow cytometry profiles of CD4⁺ IL-17A/F⁺ T cells in inguinal lymph nodes. (E) CD4⁺ IL-17A/F⁺ T cells in iLN

from imiquimod-treated WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice at day 10. Data are means $\pm$ SEM ($n \geq 4$ mice per group). (F) Representative flow cytometry profiles of CD4⁺ IL-17A⁺ T cells in dermis. (G) CD4⁺ IL-17A/F⁺ T cells from imiquimod-treated WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice at day 10. Data are means $\pm$ SEM ($n \geq 4$ mice per group). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; p values were calculated using Mann-Whitney test (B, E, G).

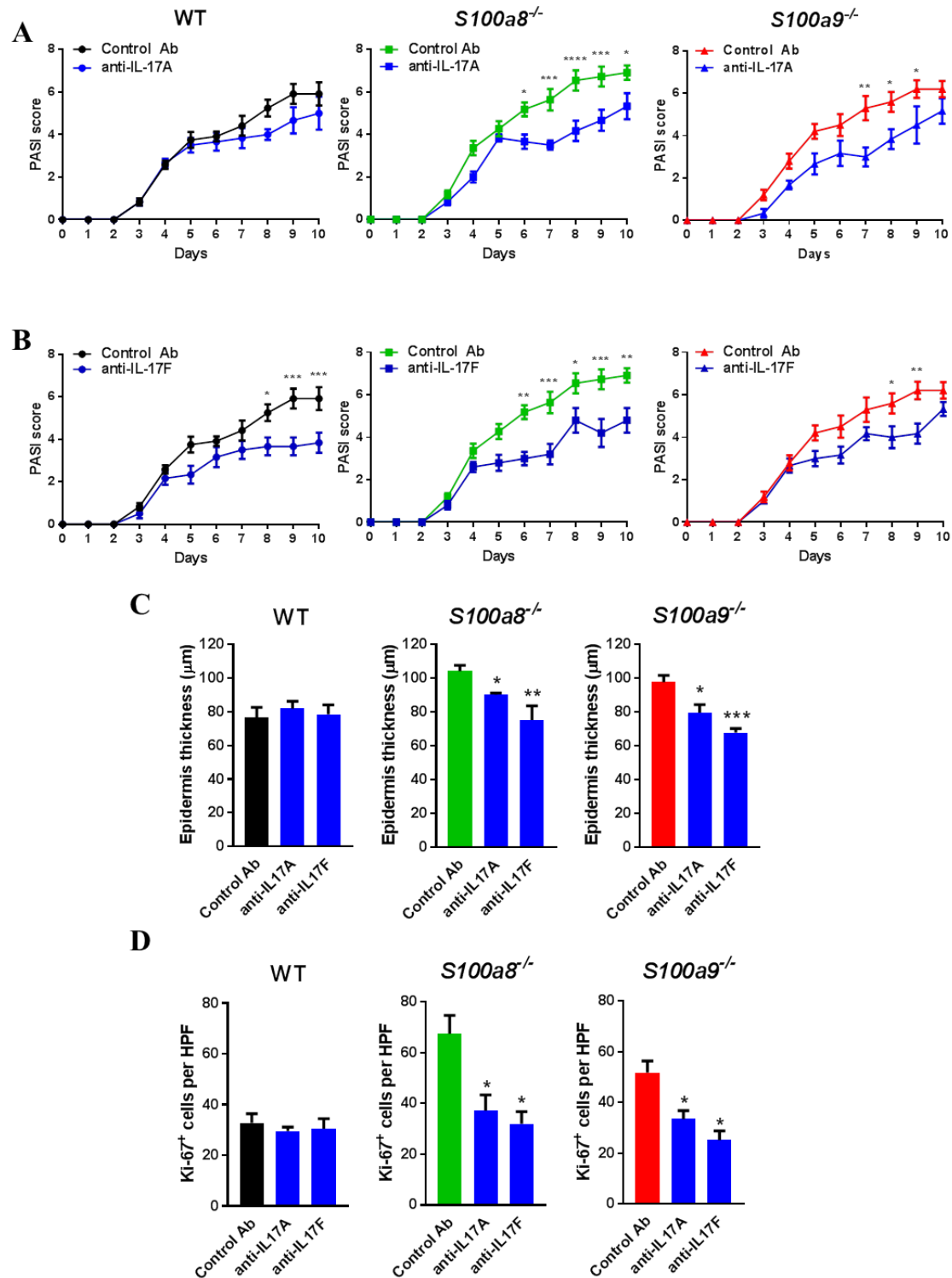


FIGURE 4: Anti-IL-17A and anti-IL-17F diminish hyperplasia and keratinocytes proliferation in *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice. Cumulative Psoriasis Area Severity Index (PASI) scores of WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice treated with (A) anti-IL-17A or (B) anti-IL-17F or control Ab. Data are means ± SEM (n ≥ 5 mice per

group). (C) Epidermis thickness of WT, *S100a8*^{-/-}, *S100a9*^{-/-} mice treated with anti-IL-17A, anti-IL-17F or control Ab at day 10. Data are means $\pm$ SEM ($n \geq 5$ mice per group). (D) Numbers of Ki-67⁺ nuclei per high power field (HPF) at day 10 in imiquimod-treated WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice treated with anti-IL-17A, anti-IL-17F or control Ab. Data are means $\pm$ SEM of 12 HPF from sections of four individual animals. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; p values were calculated using Mann-Whitney test (C and D), two-way ANOVA with Bonferroni's correction (A and B).

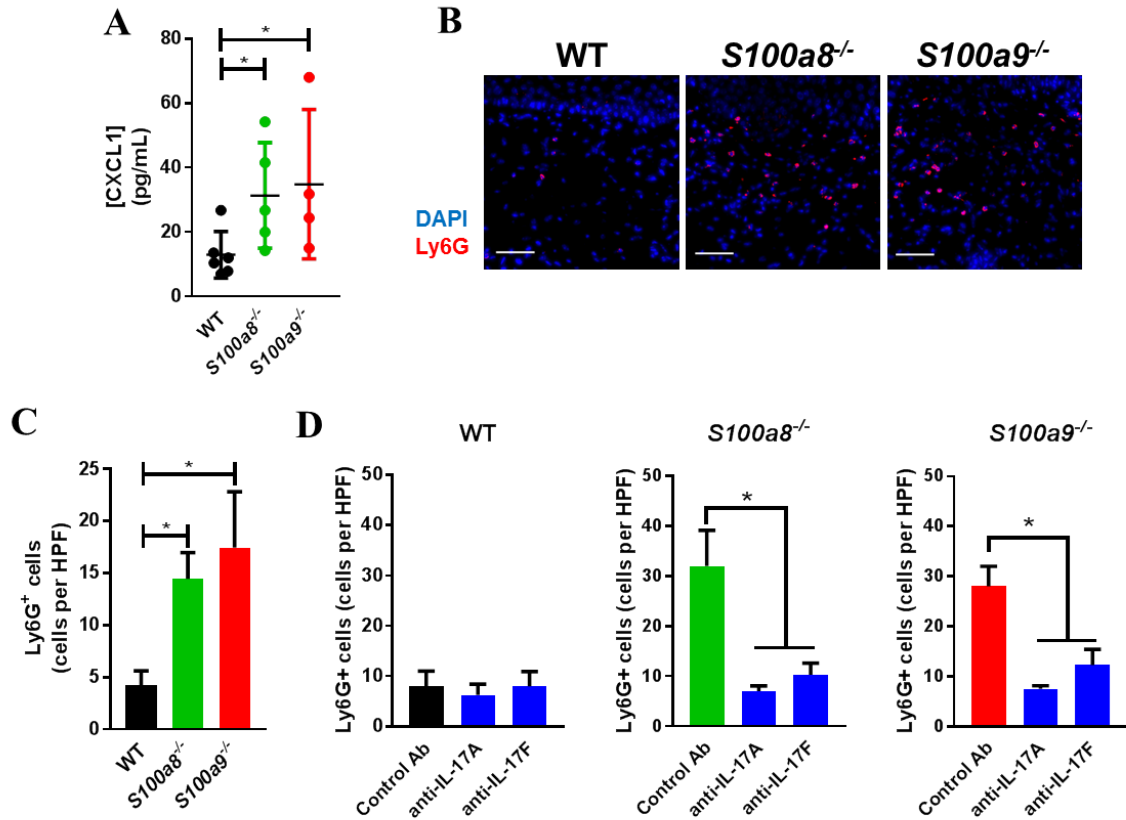
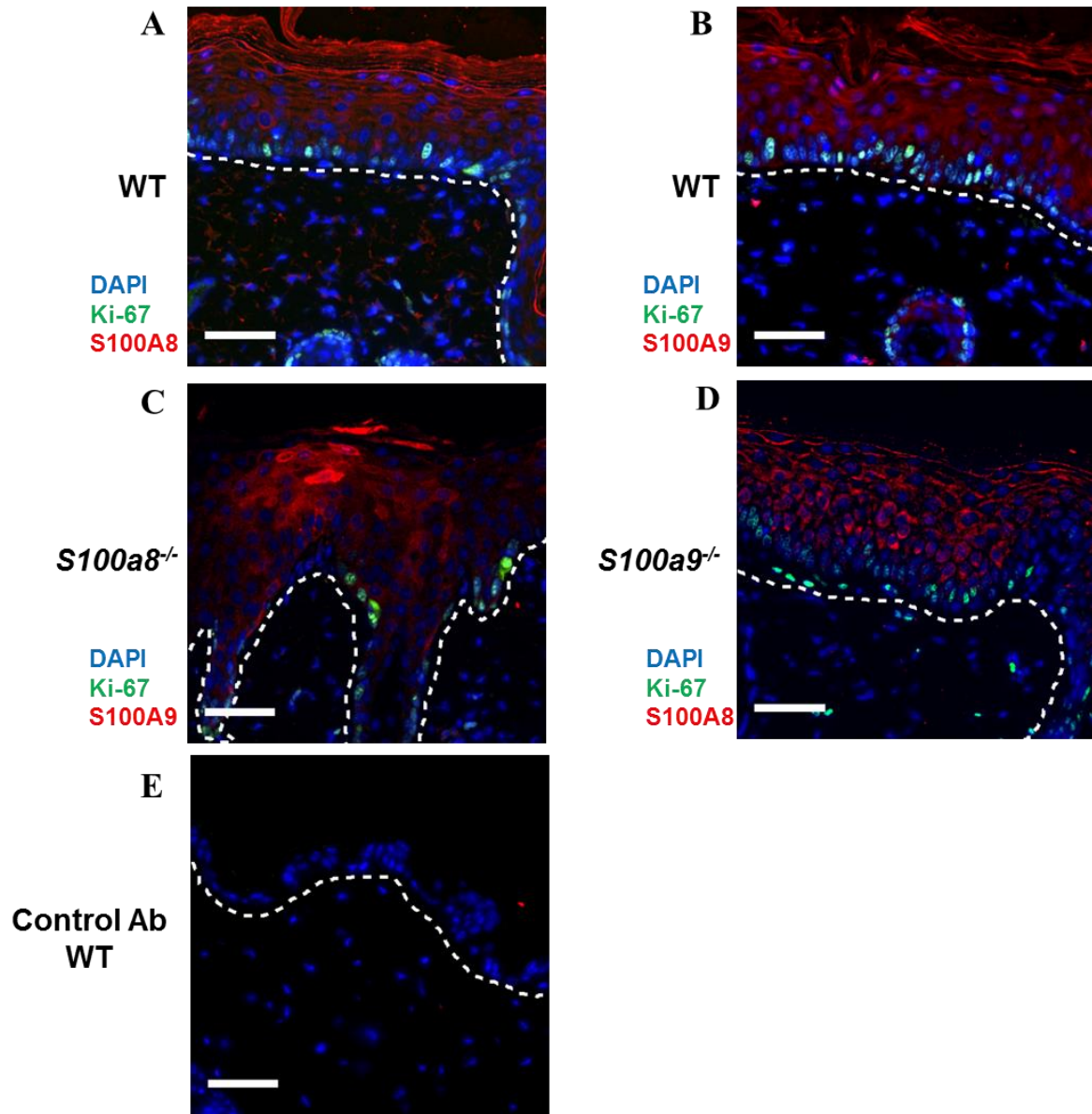
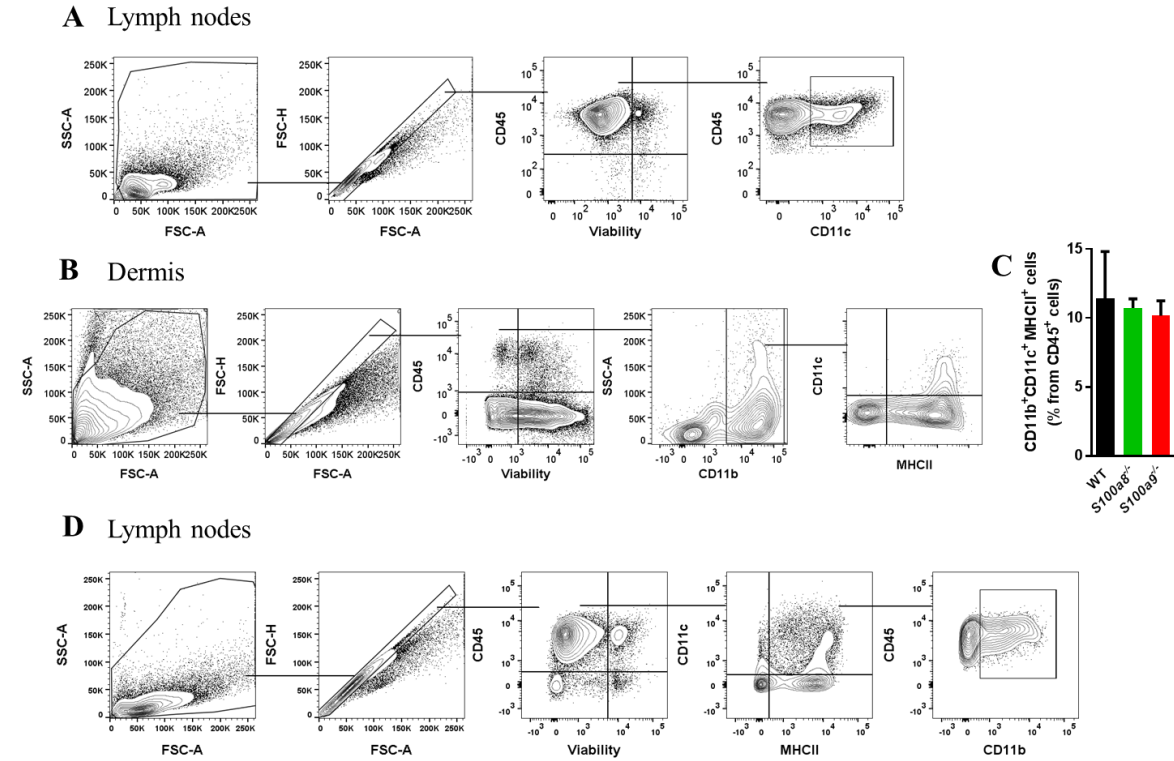


FIGURE 5: Enhanced neutrophil infiltration in the skin of *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice. (A) CXCL1 concentrations in skin homogenates of WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice at day 10. Data are means $\pm$ SEM ($n \geq 4$ mice per group) (B) Skin sections from 10-day imiquimod-treated WT, *S100a8*^{-/-}, *S100a9*^{-/-} mice stained with anti-Ly6G (red) and DAPI (blue). Scale bars represent 50 μ m. (C) Ly6G⁺ cells per high power field (HPF) of sections of imiquimod-treated WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice. Data are means $\pm$ SEM ($n = 6$ mice). (D) Ly6G⁺ cells per HPF of skin sections of imiquimod-treated WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-} mice treated with anti-IL-17A, anti-IL-17F or control Ab. Data are means $\pm$ SEM ($n = 4$ mice). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; p values were calculated using Mann-Whitney test (A, C, D).

Supporting information

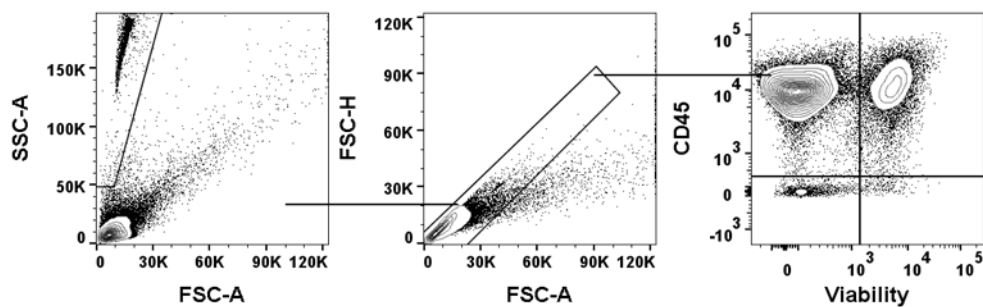


Supplementary figure 1: S100A8 and S100A9 are expressed by Ki-67⁺ cells in the epidermis. Skin sections from 10-day imiquimod-treated WT (**A and B**), *S100a8*^{-/-} (**C**) and *S100a9*^{-/-} (**D**) mice stained with anti-S100A8 (red) or anti-S100A9 (red), anti-Ki-67 (green) and DAPI (blue). (**E**) Isotype control staining of a section of WT mouse. Scale bars represent 50 μ m.

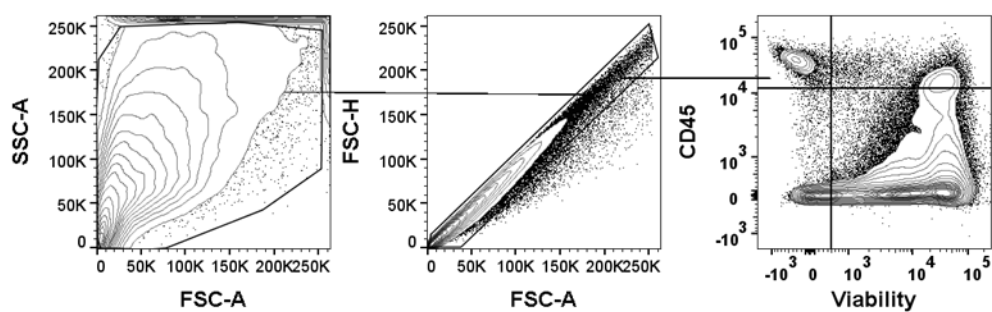


Supplementary figure 2: (A) Gating strategy of CD11c⁺ dendritic cells in dermis. (B) Gating strategy of CD11b⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ dendritic cells in dermis. (C) Percentage of CD11b⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ cells from CD45⁺ cells in dermis of naïve WT, *S100a8*^{-/-} and *S100a9*^{-/-}. Data are means $\pm$ SEM (n = 4 mice). (D) Gating strategy of CD11b⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ dendritic cells in lymph nodes.

A Lymph nodes



B Dermis



Supplementary figure 3: Gating strategy of CD45⁺ cells in (A) lymph nodes and (B) dermis.

Supplementary Table 1: Antibodies used in this study

Antigen	Clone	Supplier
CD11b	M1/70	BDBiosciences
CD11c	HL3	BDBiosciences
CD4	RM4-5	eBiosciences/Thermo Fisher
CD45	30-F11	BDBiosciences
IL-17A	17F3	BioXCell
IL-17AF	B8KN8R	eBiosciences/Thermo Fisher
IL-17F	MM17F8F5.1A9	BioXCell
K10	EP1607IHCY	Abcam
Ki-67	ab833	Abcam
Ly6G	1A8	BDBiosciences
MHC-II	M5/114.15.2	BDBiosciences
S100A8	335806	R&D Systems
S100A8	polyclonal	In house
S100A9	2A5	In house
TCR γ/δ	ebioGL3	eBiosciences/Thermo Fisher

Chapitre 4 Discussion générale et perspectives

1. Contexte

Les maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde et le psoriasis affectent plusieurs millions de personnes à travers le monde et ne possèdent pas de traitements curatifs (135, 521). Les motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires S100A8 et S100A9 sont deux protéines retrouvées en abondance dans le sérum et aux sites d'inflammation des patient(e)s atteint(e)s d'arthrite rhumatoïde et de psoriasis (484, 504). Ces deux protéines sont exprimées constitutivement par les neutrophiles et les monocytes ainsi que par de nombreux types cellulaires à la suite de leur activation (347). À l'heure actuelle, les fonctions précises de ces deux protéines dans la réaction inflammatoire associée aux maladies auto-immunes sont peu connues. De nombreuses études identifient des fonctions pro-inflammatoires pour S100A8 et S100A9, mais aussi anti-inflammatoires pour S100A8 dépendantes de l'oxydation, ce qui suggère des rôles différents pour S100A8 et S100A9. Auparavant, nous avons démontré que S100A9 est pro-inflammatoire dans l'arthrite induite par le collagène chez la souris.

Au regard de la littérature, j'ai fait l'hypothèse que la protéine S100A8 est anti-inflammatoire et que la protéine S100A9 au contraire aggrave l'inflammation liée aux maladies auto-immunes. Les études présentées en **chapitre 2 et 3** ont permis de tirer les conclusions suivantes : 1) S100A8 contrôle la différenciation des cellules myéloïdes et est anti-inflammatoire dans l'arthrite rhumatoïde chez la souris. 2) S100A8 et S100A9 sont anti-inflammatoires dans le psoriasis chez la souris et régule la réponse des lymphocytes Th17.

2. Les souris déficientes pour *S100a8*

La délétion de *S100a8* (via la disruption de l'exon 2) fut considérée longtemps comme impossible car létale pour l'embryon (438). En retirant les exons codants 2 et 3 du gène de S100A8, notre laboratoire a réussi le développement de souris déficientes pour *S100a8* viables et fertiles ce qui confirme que S100A8 n'est pas essentielle au développement embryonnaire comme il était suggéré (344).

- Fonctions liées à la migration des cellules myéloïdes

Nous avons pu montrer dans l'introduction de cette thèse que les fonctions de S100A8 associées à la migration des cellules myéloïdes sont controversées. Pour comprendre le rôle précis de S100A8 dans la migration cellulaire, nous avons décidé d'étudier dans un premier temps le recrutement des neutrophiles dans deux modèles d'inflammation aiguë à l'aide des souris *S100a8^{-/-}*. Ces observations suggèrent l'existence d'un mécanisme compensatoire à l'absence de S100A8 et de l'hétérodimère S100A8/A9 qui permet un recrutement similaire aux souris sauvages dans l'inflammation aiguë. En revanche, nous n'avons pas pu effectuer la

mesure de l'expression de l'homodimère de S100A9 dans nos expériences avec les modèles d'inflammation aiguë de la poche d'air et de thioglycolate chez les souris *S100a8^{-/-}*. Nos études suggèrent que S100A8 régule donc la migration des neutrophiles dans l'inflammation chronique, mais possiblement pas dans l'inflammation aiguë. Ensuite, je me suis intéressé à l'expression *de novo* de S100A9. La présence de l'homodimère de S100A9 est observée dans les pattes arthritiques et la peau psoriasique des souris *S100a8^{-/-}* (**Chapitre 3, Fig. 1E**), nous pouvons donc exclure un possible effet *de novo* de S100A9 dans nos modèles d'inflammation aigus. En revanche, nous avons montré précédemment que le traitement de souris arthritiques avec un anticorps anti-S100A9 vient diminuer l'infiltration de neutrophiles dans les articulations et les souris déficientes pour *S100a9* arthritiques présentent également une infiltration diminuée dans les articulations (494, 495). Ces observations montrent que S100A9 augmente la migration des neutrophiles *in vivo* dans le synovium des souris arthritiques. Cependant, dans le modèle de psoriasis induit par l'imiquimod j'ai montré que les souris *S100a9^{-/-}* ont un nombre plus important de neutrophiles infiltrés dans la peau (**Chapitre 3, Fig. 5B-C**). En comparant donc ces différentes études, nous pouvons conclure que les fonctions de S100A9 dans la migration des neutrophiles vers le site d'inflammation semblent être dépendantes du modèle de réaction inflammatoire.

Bien qu'il fut montré que l'hétérodimère de calprotectine est important pour la polymérisation des microtubules chez les neutrophiles et leur migration dans un modèle de cicatrisation de la peau chez la souris (338), je n'ai pas observé de déficience migratoire chez les leucocytes (**Chapitre 2 et 3**) ou de différences structurales chez les neutrophiles des souris *S100a8^{-/-}* par microscopie électronique (résultats internes à nos laboratoires). Des analyses plus fines sur les propriétés du cytosquelette chez les souris *S100a8^{-/-}* seraient requises pour tirer une conclusion à ce sujet.

Les résultats de mes études suggèrent que S100A8 diminue donc la migration des neutrophiles au site inflammatoire et des cellules dendritiques aux ganglions lymphatiques tandis que S100A9 diminue seulement la migration des neutrophiles. S100A8 et S100A9 ont donc des fonctions liées à la migration cellulaire dépendantes du type cellulaire et qui peuvent être indépendantes de l'hétérodimère. Une limite importante est l'absence de données comparables avec les souris déficientes pour *S100a9* dans l'étude de la migration de certains types cellulaires. Des essais de migration *in vitro* des neutrophiles et monocytes/macrophages des souris *S100a8^{-/-}* et *S100a9^{-/-}* permettraient de comparer en détail les fonctions et mécanismes de migration de types cellulaires qui expriment et sécrètent différents taux de ces protéines. De plus, l'injection des protéines S100A8 et S100A9 respectivement aux souris déficientes pour *S100a8* et *S100a9*, dans les modèles d'arthrite et de psoriasis permettrait d'affirmer ou non les conclusions faites avec les souris *S100a8^{-/-}* et *S100a9^{-/-}*.

- Fonctions liées à la différenciation des cellules myéloïdes

L'article présenté en chapitre 2 a permis de montrer que S100A8 diminue la différenciation des cellules myéloïdes. Une perspective intéressante serait d'étudier le mécanisme précis par lequel S100A8 contribue à diminuer la différenciation. Une possibilité serait la rupture du ratio des concentrations des protéines S100A8 et S100A9. Nous avons montré que S100A9 augmente la différenciation des cellules leucémiques myéloïdes via le TLR4 (390). Pour commencer l'étude de cette possibilité, j'ai injecté différentes quantités des protéines S100A8 et S100A9 par voie intraveineuse à des souris sauvages et analysé les taux de progéniteurs et cellules myéloïdes dans la moelle osseuse et le sang au bout de 24 heures. J'ai tout d'abord observé tout d'abord que l'injection de 2 µg de S100A8 recombinante diminue le pourcentage de GMP dans la moelle osseuse sans affecter le pourcentage de cellules myéloïdes matures. L'injection de S100A9 recombinante augmente le pourcentage de neutrophiles (Ly6G^{high} Ly6C^{med}) dans la moelle osseuse et cette augmentation est abolie par l'injection de S100A8 à un ratio 1 :10 et 1 :1. (**Chapitre 4, Fig. 1**). La formation de l'hétérodimère de calprotectine est un mécanisme possible de l'inhibition de la différenciation par S100A8, je n'ai pas détecté cependant d'expression visible de S100A9 dans les cellules myéloïdes des souris *S100a8^{-/-}* naïves (**Chapitre 2, Fig 1A**) ce qui exclue l'hypothèse que S100A9 est responsable de l'augmentation de la différenciation des cellules myéloïdes. En considérant l'ensemble de ces observations, il est probable que la protéine S100A8 inhibe la différenciation via un mécanisme indépendant, qui peut-être intracellulaire ou lié à un récepteur inconnu dont les voies de signalisation interfèrent avec celles du TLR4.

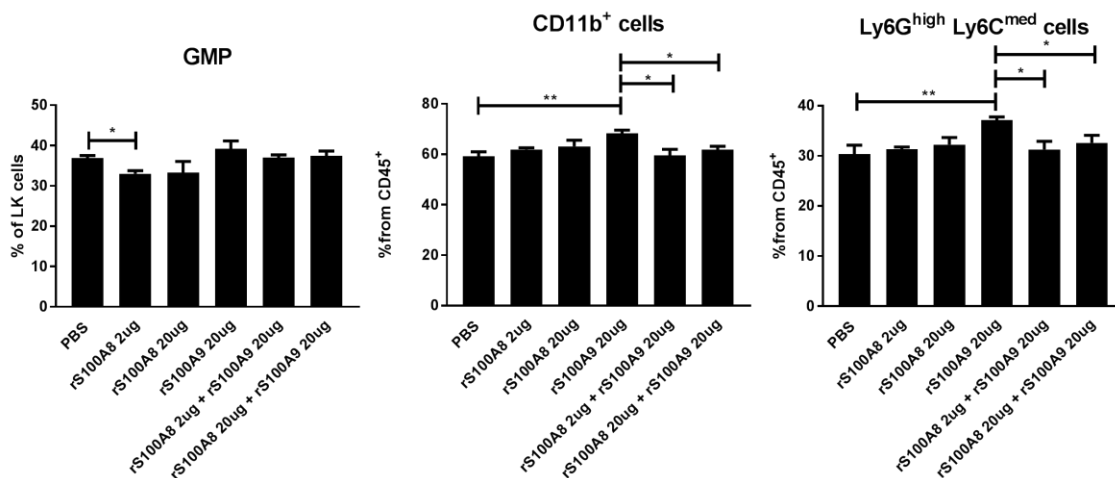


Figure 1 : Pourcentage de cellules CD11b⁺, neutrophiles et GMP dans la moelle des souris sauvages traitées avec S100A8 et S100A9. Des souris sauvages C57BL/6 ont été injectées par voie intraveineuse avec différentes quantités des protéines recombinantes S100A8 et S100A9. 24h post-injection les pourcentages des cellules CD11b⁺, des neutrophiles (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6C^{med} Ly6G^{high}) et GMP (Lin⁻ Sca1⁻

cKit⁺ CD16/32^{high} CD34⁺) dans la moelle osseuse ont été analysés par cytométrie en flux (n = 4 souris/groupe). (Moyenne + SEM. *p < 0.05; **p < 0.01; Test de Student).

Des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour approfondir l'étude des fonctions de S100A8 et S100A9 dans la myélopoïèse et granulopoïèse. Par exemple, allonger le temps de stimulation par l'injection de S100A8 et S100A9 recombinantes sur une période plus longue. Il serait aussi important d'étudier l'induction de la prolifération des progéniteurs de cellules myéloïdes à la suite de l'injection de S100A8 et S100A9.

Aussi, malgré une plus forte différenciation et production de cellules dendritiques à partir de la moelle osseuse des souris *S100a8*^{-/-} nous avons montré un potentiel d'activation des lymphocytes T similaire aux souris sauvage (**Chapitre 2**). Une autre approche spécifique d'antigène comme l'utilisation d'un essai de co-culture avec l'ovalbumine de poulet serait une perspective intéressante. De plus, la comparaison avec les souris *S100a9*^{-/-} apporterait une réponse précise sur le rôle de S100A8 et S100A9 dans ce processus. Il a été montré que les cellules dendritiques des souris *S100a9*^{-/-} stimulées avec du LPS et de l'IFN-γ sécrètent plus d'IL-6 et d'IL-12 et ont un meilleur potentiel d'activation des lymphocytes T (349). Également, le traitement de ces cellules dendritiques avec de la calprotectine réduit l'activation des lymphocytes T. J'ai observé que les cellules CD11c⁺ présentent dans les ganglions lymphatiques des souris psoriasiques produisent des fortes quantités des protéines S100A8 et S100A9 (**Chapitre 3, Fig. 3B**) ce qui suggérerait un mécanisme inhibiteur de l'activation des cellules dendritiques par l'hétérodimère de S100A8/A9 *in vivo*.

Lors de la caractérisation des souris *S100a8*^{-/-}, j'ai identifié par cytométrie en flux et cytométrie de masse une autre population enrichie parmi les leucocytes en circulation dans le sang périphérique (**Annexe B et C**). Cette population est enrichie dans le sang d'un facteur 5 et possède le phénotype B220⁻ CD19⁺ CD44^{high} CD11b^{med}. Le phénotype suggère que cette population soit un sous-type de lymphocytes B ou de plasmocytes. Cette observation est intrigante, car les gènes des protéines S100A8 et S100A9 semblent être exprimés par les lymphocytes B dans les centres germinaux (522). De plus, une seule étude rapporte la présence de S100A8 et S100A9 à la surface des cellules CD19⁺ de patients lupiques en phase active (523). Des données internes à notre laboratoire montrent que les souris *S100a8*^{-/-} produisent plus d'IgE. Ensemble ces données suggéreraient que S100A8 contrôle la différenciation et la maturation des lymphocytes B et plasmocytes. Il est intéressant de noter que les souris *S100a9*^{-/-} sont susceptibles aux réactions allergiques (418). Une étude a montré que les souris *S100a9*^{-/-} dans un modèle d'asthme présentent une plus forte inflammation allergique des voies respiratoires avec notamment une plus forte production d'IL-13, d'IgE, mais aussi un plus fort recrutement de granulocytes éosinophiles (418). La réponse des lymphocytes Th2 y est

augmentée et celle des lymphocytes Treg diminuée chez les *S100a9*^{-/-}. Des études supplémentaires seront nécessaires pour éclaircir les mécanismes de ces fonctions qui semblent similaire entre S100A8 et S100A9.

Notre étude des fonctions de S100A8 nous a permis de découvrir l'importance de cette protéine dans la régulation de la différenciation pour un nombre important et insoupçonné de types cellulaires. Afin de comprendre par quels mécanismes S100A8 inhibe la différenciation cellulaire, plusieurs études sont encore à réaliser. Il faut notamment déterminer si l'inhibition de la différenciation est due à des fonctions extracellulaires de S100A8 comme il a été démontré avec les leucémies myéloïdes aiguës (inhibition de l'activation du TLR4) (390) ou si la délétion de *S100a8* entraîne la rupture de mécanismes intracellulaires inhibiteurs de la différenciation. Les souris *S100a8*^{-/-} constituent plus particulièrement un outil idéal à la caractérisation des récepteurs de S100A8 et la découverte d'un possible nouveau récepteur.

- Fonctions intracellulaires de S100A8

Mes travaux montrent que les neutrophiles des souris déficientes pour *S100a8* ont une activité de la NADPH oxydase moins importante et produisent moins de ROS. Il est intéressant de noter que les neutrophiles des souris déficientes pour *S100a9* présentent en plus une diminution de l'activité de la NADPH oxydase (367) bien que la première caractérisation des cellules des souris *S100a9*^{-/-} ne montre aucune différence dans leur production d'ion superoxyde (346). Une étude complémentaire de la synthèse de ROS par d'autres phagocytes des souris *S100a8*^{-/-} et *S100a9*^{-/-} comme les macrophages, les cellules dendritiques ou les kératinocytes serait une perspective intéressante pour compléter ces travaux. Il est notamment connu que la surexpression de S100A8 et S100A9 dans les cellules HaCaT augmente la génération de ROS (364).

Globalement, la toute première caractérisation des souris *S100a8*^{-/-} nous a permis de découvrir un éventail très large de fonctions associées principalement à la biologie des cellules myéloïdes. Nos travaux confirment avant tout que S100A8 a majoritairement une fonction anti-inflammatoire. Mes résultats suggèrent que S100A8 diminue la différenciation, l'activation des cellules myéloïdes et la sécrétion de cytokines par les cellules dendritiques. Afin d'approfondir nos connaissances sur les fonctions de S100A8, il serait intéressant de tester l'injection d'un anticorps anti-S100A8 et étudier si l'absence de S100A8 extracellulaire entraîne des phénotypes similaires à ceux observés chez les souris *S100a8*^{-/-}. Aussi, l'injection de la protéine S100A8 recombinante à des souris déficientes pour *S100a8* permettrait d'affirmer que l'ensemble des fonctions de S100A8 n'est pas due à la présence de S100A9 ou bien une fonction régulatrice de l'hétérodimère de S100A8/S100A9.

3. Fonctions de S100A8 et S100A9 dans le développement de l'arthrite rhumatoïde chez la souris

Dans l'introduction de cette thèse, j'ai pu démontrer à quel point la protéine S100A8 est présente dans l'inflammation liée aux maladies auto-immunes notamment l'arthrite et le psoriasis. Depuis plusieurs décennies, les études des fonctions de S100A8 dans l'inflammation sans l'utilisation d'une véritable souris déficiente empêchent de déterminer précisément ses fonctions alors que les études des fonctions de S100A9 démontrent des fonctions majoritairement pro-inflammatoires. Notre laboratoire s'est tout d'abord intéressé notamment aux fonctions de S100A9 dans l'arthrite rhumatoïde chez la souris. En accord avec la littérature, nous avons montré que S100A9 est pro-inflammatoire dans le modèle d'arthrite induite par le collagène (495) et que l'utilisation d'un anticorps monoclonal contre S100A9 serait une voie de traitement thérapeutique aussi efficace que le traitement des souris avec un anticorps contre le TNF. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux fonctions de S100A8 dans l'arthrite induite par le collagène (**Chapitre 2**) et ces travaux suggèrent que les fonctions extracellulaires de S100A8 sont anti-inflammatoires dans l'arthrite rhumatoïde. Plus précisément, j'ai prouvé que l'activité de résorption des ostéoclastes *in vitro* est plus importante en l'absence de S100A8 et cette hausse d'activité est annulée par l'ajout de S100A8 recombinant extracellulaire (**Chapitre 2, Fig. 5J**). Il fut intéressant d'observer que l'ajout de S100A9 recombinant augmente l'activité de résorption des ostéoclastes de souris sauvages et *S100a8^{-/-}* (données internes) et il est possible que les ostéoclastes des souris *S100a8^{-/-}* produisent *de novo* la protéine S100A9. Nos observations *in vitro* et *in vivo* nous mènent à la même conclusion et sont à la fois en contradiction avec l'étude de Grevers *et al.* qui propose au contraire que S100A8 extracellulaire améliore l'ostéoclastogenèse et l'activité de résorption (439). Il est cependant possible que ces différences de fonctions soient dues à plusieurs différences de procédure expérimentale. Dans notre étude, le traitement avec la protéine S100A8 est ajouté tout au long de la différenciation *in vitro* des ostéoclastes tandis que les travaux de Grevers *et al.* ajoutent S100A8 au jour 4 de la différenciation. De plus, nous induisons la résorption par acidification du milieu pendant 72h tandis que leur étude ne mentionne pas cette technique. Enfin, leurs travaux ne contiennent pas l'utilisation de souris déficiente pour *S100a8*, mais seulement déficiente pour *S100a9* ce qui empêche une véritable comparaison. Il est aussi possible que l'augmentation de la dégradation osseuse dans les pattes des souris *S100a8^{-/-}* soit aussi due à la présence renforcée de neutrophiles dans le synovium (176), mais également de macrophages observés dans mes travaux avec une augmentation plus modeste dans le synovium (données internes). Le modèle d'arthrite induite par le collagène chez les souris DBA/1 est fortement dépendant de l'IL-17 et nos travaux semblent indiquer que S100A8 contrôle le développement des lymphocytes Th17.

L'arthrite induite par le collagène entraîne la génération d'anticorps contre le collagène. Nous avons mesuré les concentrations sériques de ces anticorps et celles-ci sont significativement augmentées dans le

sérum des souris *S100a8*^{-/-} (données internes). Mes données de caractérisation suggèrent un rôle possible de S100A8 dans le développement des lymphocytes B (**Annexe B et C**), il est donc possible de faire l'hypothèse que S100A8 régule la réponse immunitaire humorale par le développement des plasmocytes. Pour répondre à cette hypothèse, plusieurs expériences sont envisageables. Un protocole d'immunisation par vaccination (ex. : injection de FLUVIRAL, vaccin trivalent antigrippal) des souris déficientes pour *S100a8* et *S100a9* permettrait d'étudier la génération d'une réponse humorale en quantifiant les taux de différentes classes d'immunoglobulines spécifiques (IgG et IgM). Lors de mon doctorat, j'ai réalisé un essai préliminaire d'immunisation des souris *S100a8*^{-/-} en collaboration avec les laboratoires du Pr. Denis Leclerc. Les mesures des taux d'IgG1 spécifiques 13 jours après immunisation au FLUVIRAL semblent suggérer une augmentation de la quantité de ces immunoglobulines spécifiques dans le sérum des souris *S100a8*^{-/-} comparé aux souris sauvages (données internes). Ces résultats suggèreraient donc que S100A8 diminue la réponse humorale. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour approfondir cette observation. Il serait également judicieux d'étudier les fonctions de S100A8 et S100A9 dans un modèle d'allergie des voies respiratoires comme l'inoculation d'un extrait de l'allergène *Alternaria alternata*.

Grâce à cette étude, j'ai montré qu'une alarmine comme S100A8 exerce des fonctions anti-inflammatoires dans un modèle d'arthrite chronique. Plus généralement, nos travaux démontrent que S100A8 et S100A9 extracellulaires ont des fonctions opposées dans le développement de l'arthrite induite par le collagène. La protéine S100A9 apparaît comme une cible thérapeutique de choix pour contrôler l'inflammation et diminuer la destruction des articulations lors de l'arthrite. Ces travaux sur les fonctions de S100A8 chez la souris devront ensuite être étudiés chez l'humain pour confirmer si S100A8 possède des activités anti-inflammatoires similaires à ce que nous avons observé. Plus précisément, les modifications post-traductionnelles, les micro ARN et les facteurs de transcription jouent un rôle important dans la régulation des fonctions de ces protéines et sont des mécanismes à étudier pour améliorer la compréhension sur les fonctions de ces protéines (343, 491, 524). De plus, un potentiel récepteur de S100A8 aurait aussi un rôle important à jouer dans les fonctions de S100A8 lié à la différenciation des cellules myéloïdes, des études devront donc être réalisées pour approfondir cette hypothèse (390). Enfin, cette étude n'exclut malheureusement pas complètement la possibilité que l'hétérodimère de S100A8/A9 ait des fonctions redondantes avec S100A8 ou S100A9.

4. Fonctions de S100A8 et S100A9 dans le développement du psoriasis chez la souris

La comparaison des phénotypes des souris déficientes pour *S100a8* et *S100a9* est indispensable pour comprendre plus efficacement les fonctions de ces protéines dans le développement des maladies auto-immunes. Nos connaissances sur les fonctions précises de S100A8 et S100A9 dans le développement du

psoriasis sont limitées. Les protéines S100A8 et S100A9 sont fortement présentes dans l'épiderme et le sérum des patients psoriasiques ainsi que différents modèles de psoriasis chez la souris (504). Les fonctions de S100A9 ont été étudiées via l'utilisation des souris déficientes pour *S100a9* et présentent des phénotypes différents. Pour répondre aux besoins de clarifier les fonctions de ces protéines, nous avons effectué la première comparaison des souris *S100a8^{-/-}* et *S100a9^{-/-}* dans le modèle de psoriasis induit par l'imiquimod.

J'ai démontré que contrairement aux souris naïves, les souris *S100a8^{-/-}* et *S100a9^{-/-}* psoriasiques expriment respectivement l'homodimère de S100A9 et S100A8 *de novo* dans les kératinocytes et plus faiblement dans les neutrophiles infiltrant du derme des souris *S100a8^{-/-}* et *S100a9^{-/-}* (**Annexe D**). Cette observation a permis de confirmer que la stabilité des homodimères de S100A8 et S100A9 *in vivo* est régulée par des mécanismes possiblement similaires. Au regard de la littérature, mes données suggèrent la présence de mécanismes de régulation intracellulaires et possiblement dépendant du type cellulaire (329). Plusieurs études montrent que leur stabilité est dépendante du TNF. Pour S100A8, son expression *de novo* est induite par le TNF dans les cellules de moelle osseuse des souris *S100a9^{-/-}* *in vitro* (287). S100A8 intracellulaire est notamment ubiquitinée par RNF5 indépendamment de S100A9 et dégradée dans les cellules épithéliales intestinales et cette régulation est inhibé par le TNF *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin d'inflammation intestinale (343). Cependant, la stabilité de S100A9 et S100A8 produites *de novo* dans les kératinocytes des souris *S100a8^{-/-}* et *S100a9^{-/-}* devrait être étudiée plus en détail pour comprendre les mécanismes de régulation de ces protéines.

Malgré le fait que l'absence de S100A8 et S100A9 aggrave le psoriasis induit par l'imiquimod, les phénotypes de ces souris présentent des différences. Même si les souris *S100a9^{-/-}* psoriasiques au jour 10 de la maladie ont une épaisseur d'épiderme légèrement plus importante, l'absence de différence dans le nombre de kératinocytes en différenciation suggère une possible régulation de l'hyperplasie. Il est possible que la prolifération des kératinocytes déficients en *S100a9* soit plus forte plus précocement dans le protocole puis atténuée. Une comparaison de la prolifération des kératinocytes à différents temps dans le modèle de psoriasis induit par l'imiquimod chez les souris *S100a8^{-/-}* et *S100a9^{-/-}* serait utile pour répondre à cette question. Mes résultats ont aussi montré qu'au jour 10, la réponse des Th17 est significativement augmentée dans la peau des souris *S100a9^{-/-}* psoriasiques. L'IL-17 jouant un rôle important dans la prolifération des kératinocytes (525) il est possible que les kératinocytes déficients en *S100a9* soient légèrement moins sensibles à l'IL-17. Une analyse de l'expression d'un nombre plus important de marqueurs de différenciation précoce et terminale comme K1, involucrine, loricrine, K16 permettrait de déterminer l'état de la différenciation en absence de S100A8 et S100A9.

Au travers de ce projet, j'ai tenté d'étudier les kératinocytes extraits des souris *S100a8^{-/-}* et *S100a9^{-/-}* dans des expériences de stimulation *in vitro*. Ces expériences avaient pour but d'étudier les fonctions de S100A8 et S100A9 sur la prolifération, la différenciation, la sécrétion de cytokines et la production de ROS des kératinocytes primaires traitées avec la molécule d'imiquimod. Des difficultés à maintenir la viabilité de ces cellules m'ont malheureusement contraint à l'arrêt de ces essais. Un des mécanismes possibles de l'initiation de l'inflammation dans le psoriasis induit par l'imiquimod est la mort cellulaire des kératinocytes à la suite de la stimulation par l'imiquimod. L'imiquimod peut induire l'apoptose des kératinocytes *in vitro* ainsi que dans l'épiderme de patient (526).

Également, j'ai mis en évidence la production de S100A8 et S100A9 dans le cytosol et le noyau des kératinocytes des souris sauvages et cette localisation semble maintenue dans les souris *S100a8^{-/-}* et *S100a9^{-/-}*. La translocation de S100A9 dans le noyau des kératinocytes contrôle l'expression du gène du facteur du complément C3 et augmente les symptômes de psoriasis des souris DKO* (303). Cependant, nous ne connaissons pas les fonctions de S100A8 localisée au noyau. De plus, l'injection d'anticorps neutralisants contre S100A8 et S100A9 chez des souris sauvages augmente les symptômes du psoriasis induit par l'imiquimod (**Chapitre 3, Fig. 1F-G**) ce qui confirme que les fonctions extracellulaires de S100A8 et S100A9 sont anti-inflammatoires. Cependant, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que S100A8 ou S100A9 possèdent des fonctions nucléaires favorisant une réponse anti-inflammatoire comme le suggère l'étude des fonctions suppressives de S100A9 nucléaire dans les MDSC (374).

L'importance de S100A8 et S100A9 dans l'hyperplasie de la peau, la prolifération et l'activation des kératinocytes suggère d'étudier leurs fonctions dans d'autres processus biologiques de la peau comme la cicatrisation (527-529) où S100A8, mais aussi S100A9 ont des rôles partiellement connus.

Les cellules dendritiques sont une famille hétérogène assurant un véritable pont entre l'immunité innée et adaptative dans l'inflammation associé au psoriasis. Cependant, les populations de cellules dendritiques dans la peau et les ganglions lymphatiques et celles générées *in vitro* dans mes études peuvent être différentes (530). Les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse sont considérées comme des cellules dendritiques dérivées des monocytes qui peuvent être comparées *in vivo* aux cellules dendritiques inflammatoires CD11b⁺ dérivées de monocytes (112). Nous devons tenir compte du fait que les cellules dendritiques CD11c⁺ MHCII⁺ CD11b⁺ analysées dans les ganglions lymphatiques et la peau sont une population hétérogène de cellules dendritiques contenant les cellules dendritiques classiques 2 (cDC2) ainsi que les cellules dendritiques dérivées de monocytes ou encore les cellules de Langerhans (244, 530, 531). Tout d'abord, sachant que la délétion de *S100a8* la différenciation des monocytes et des BMDM (**Chapitre 2,**

Fig. 3), il est possible que l'augmentation de nombre de cellules dendritiques CD11b⁺ dans les ganglions lymphatiques des souris *S100a8*^{-/-} soit due à une augmentation de la migration de cellules dendritiques inflammatoires dérivées de monocytes. La littérature montre que les souris *S100a9*^{-/-} ont en revanche des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse possédant une meilleure efficacité d'activation des lymphocytes T et sécrètent plus d'IL-6 et d'IL-12 (349). Il est possible que la délétion de *S100a9* n'entraîne pas une meilleure différenciation et migration accrue des cellules dendritiques issues de monocytes. Ensuite, en dépit de l'absence d'analyses approfondies des familles de DC et de leurs précurseurs dans mes travaux, nous ne pouvons pas exclure une augmentation du nombre ou de l'efficacité d'activation des cDC2, car ces cellules sont connues pour produire de l'IL-23, de l'IL-6 et TGF- β et pour induire la polarisation en Th17 (532). Une perspective nécessaire serait d'analyser plus en détail le rôle de S100A8 et S100A9 dans la maturation des différentes sous-populations de cellules dendritiques mais aussi des macrophages tissulaires et dérivés de monocytes, leurs fonctions ainsi que leurs sécrétomes.

Enfin, la polarisation de lymphocytes Th17 par les cellules dendritiques via notamment par la sécrétion d'IL-23 est une voie inflammatoire déterminante pour entretenir l'inflammation dans le derme et l'épiderme. Les thérapies biologiques récentes utilisées contre les formes modérées à sévères de psoriasis ciblent notamment l'IL-23 et l'IL-17A et F (231, 533, 534). Le traitement du psoriasis induit par l'imiquimod avec l'anti-IL-17F a démontré une meilleure efficacité dans la diminution de l'hyperplasie de la peau dans la peau des souris *S100a8*^{-/-} et *S100a9*^{-/-}. L'IL-17F contribue à la réponse inflammatoire majoritairement dans les tissus constituant une barrière ce qui pourrait expliquer en partie mes observations (535). Dans cette étude, je n'ai en revanche pas mesuré la production des homodimères d'IL-17A et IL-17F ni testé l'injection d'un double traitement contre l'IL-17A et IL-17F. Une seconde limite à cette étude est l'absence d'une analyse comparative de l'activation et la prolifération des lymphocytes Th17 par les cellules dendritiques des souris *S100a8*^{-/-} et *S100a9*^{-/-}.

5. Autres fonctions de S100A8 et S100A9 dans la réaction inflammatoire

Parmi les fonctions de S100A8 et S100A9 dans l'inflammation qui doivent être étudiées, il y a également le lien avec le développement et les fonctions des cellules suppressives MDSC. Ces cellules semblent jouer un rôle crucial dans la résolution de la réponse inflammatoire associée aux maladies auto-immunes (536). Des travaux effectués dans un modèle de tumeur solide avec les cellules B16-F10 nous ont permis de suggérer que les protéines S100A8 et S100A9 extracellulaires sont nécessaires au développement tumoral (**Annexe E**). Lors de ce projet, j'ai également tenté de démontrer une diminution de l'activité suppressives des PMN-MDSC et M-MDSC extraites des rates de souris, mais des contaminations cellulaires lors des purifications de MDSC ont biaisé les résultats obtenus. Une caractérisation plus poussée des

fonctions de ces cellules en l'absence de *S100a8* et *S100a9* *in vitro* et *in vivo* permettrait de connaître avec précision les rôles de S100A8 et S100A9 en lien avec les MDSC. Les fonctions nucléaires de S100A9 semblent notamment jouer un rôle important sur les propriétés suppressives des neutrophiles (437). Dans les travaux sur le psoriasis induit par l'imiquimod, j'ai réalisé des observations de neutrophiles Ly6G⁺ perméabilisés qui n'ont pas permis d'identifier la présence de S100A8 ou S100A9 dans le noyau des neutrophiles de la moelle, du sang, de la rate ou du derme (données internes). Cependant, il est possible que le faible nombre de cellules analysées ait empêché d'identifier des neutrophiles avec les protéines S100A8 ou S100A9 présentes dans le noyau. Sachant que les souris *S100a8*^{-/-} et *S100a9*^{-/-} ont des symptômes de psoriasis aggravés, nous pourrions aussi faire l'hypothèse qu'en l'absence de *S100a8* et *S100a9*, les neutrophiles générés par une granulopoïèse prolongée sont globalement pro-inflammatoires et contiennent moins de MDSC.

6. Conclusion sur les fonctions de S100A8 et S100A9 dans l'inflammation associée aux maladies auto-immunes

Bien que les souris déficientes pour *S100a8* et la neutralisation de S100A8 extracellulaire montrent que S100A8 est protectrice dans l'arthrite rhumatoïde et le psoriasis chez la souris, nous avons pu voir au travers de cette thèse que la délétion de *S100a9* chez la souris entraîne différents phénotypes dépendamment du modèle de maladie utilisé (287, 303). Étonnamment, dans le modèle d'arthrite induit par le collagène S100A9 contribue au développement de la maladie tandis que dans le modèle de psoriasis induit par l'imiquimod, nous avons montré que S100A9 est protectrice contre la réponse inflammatoire liée à l'IL-17A/F. La protéine S100A9 possède des fonctions dans l'inflammation différentes selon le tissu comme nous avons pu l'apprécier dans les articulations et la peau, mais aussi dans le recrutement de leucocytes au site inflammatoire et la sécrétion de cytokines. Également, les fonctions de S100A9 apparaissent différentes dans deux études utilisant les souris transgéniques produisant de grande quantité de TNF et déficientes pour *S100a9* ; dans ces souris l'inflammation est augmentée dans la peau mais diminuée dans un modèle de maladie inflammatoire de l'intestin (287, 537).

Par ailleurs, les modèles murins de maladies auto-immunes sélectionnés génèrent des réactions inflammatoires aux stimuli et mécanismes différents. Le modèle d'arthrite induit par le collagène synchronisé par l'injection de LPS est un modèle possédant une réaction inflammatoire dépendante d'une réponse immunitaire contre le collagène et une stimulation subséquente au LPS qui active la réponse inflammatoire via le TLR4 (194). Le modèle de psoriasis induit par l'imiquimod génère une réaction inflammatoire dépendante ou non de la stimulation du TLR7 (538). De plus, il est montré que le modèle de psoriasis induit par l'imiquimod chez les souris C57BL/6 induit une plus forte expression des gènes de la voie de l'IL-17 que chez les souris de génotype BALB/c (517). Des différences subsistent entre les réponses inflammatoires des

pathologies comme le démontrent les études cliniques des personnes atteintes d'arthrite psoriasique. Chez les patient(e)s atteint(e)s d'arthrite psoriasique modérée à sévère, il est intéressant de noter que les traitements biologiques contre l'IL-17A et F (secukinumab et bimekizumab) sont très efficaces contre les symptômes de psoriasis, mais présentent une faible amélioration des symptômes arthritiques (539, 540). Dans ces conditions, différents symptômes sont contrôlés ou partiellement contrôlés par l'IL-17.

Les fonctions de S100A9 chez la souris dans le psoriasis induit par l'imiquimod peuvent varier selon le génotype, car des données internes à notre laboratoire montrent que l'injection d'un anticorps contre S100A9 diminue le score clinique des souris BALB/c alors que l'injection d'un anticorps contre S100A8 augmente le score clinique des souris BALB/c traitées avec l'imiquimod. Par ailleurs, notre laboratoire a généré des souris déficientes pour *S100a8* dans les génotypes DBA/1 et C57BL/6, et mes travaux de doctorat montrent que S100A8 est anti-inflammatoire dans ces deux génotypes dans l'arthrite et le psoriasis respectivement. Cependant, S100A9 est pro-inflammatoire dans l'arthrite induite par le collagène chez les souris DBA/1. S100A9 est donc pro-inflammatoire dans l'arthrite chez les souris DBA/1 et dans le psoriasis chez les souris BALB/c, mais anti-inflammatoire dans le psoriasis chez les souris C57BL/6. Une étude a montré que l'application d'imiquimod induit l'expression de gènes différents dans la peau selon le génotype chez la souris (517). L'application d'imiquimod pendant 5 jours induit chez les souris C57BL/6 une expression génique similaire à celle observée chez les personnes atteintes de psoriasis. Une forte expression des gènes *Il17a*, *Il17b*, *Il17c* et *Il17f* est notamment rapportée chez les souris C57BL/6 traitées avec imiquimod, mais l'expression de ces gènes n'est en revanche pas modifiée chez les souris BALB/c. J'ai pu montrer dans cette thèse que S100A9 contrôle la réponse des Th17 chez les souris C57BL/6 psoriasiques. S100A9 est pro-inflammatoire chez les souris BALB/c dont la réponse immunitaire dans le psoriasis induit par l'imiquimod semble dépendante des lymphocytes Th1 plutôt que des Th17 (541). Il serait intéressant de montrer si S100A9 participe effectivement à la régulation de la réponse des lymphocytes Th1 dans le psoriasis chez la souris, mais aussi dans d'autres modèles de maladie auto-immune. Enfin, nous pouvons donc faire l'hypothèse que S100A9 puissent présenter chez l'humain des fonctions différentes selon le type de la réponse inflammatoire.

Nous avons présenté dans l'introduction de cette thèse un ensemble de modifications post-traductionnelles et des structures secondaires qui confèrent à S100A8 et S100A9 des fonctions particulières dans l'inflammation. Il est probable que l'oxydation de l'homodimère de S100A8 favorise une activité anti-inflammatoire autant dans l'inflammation associée à l'arthrite rhumatoïde qu'au psoriasis. De plus, des limites subsistent dans la comparaison entre l'humain et la souris. La phosphorylation de la Thr113 de la protéine S100A9 humaine dans le neutrophile n'est pas conservée chez la souris et nous ne savons pas à l'heure

actuelle si les fonctions associées à la phosphorylation sont conservées chez la souris. De plus, l'analyse de la forme hétérodimérique et de ces formes supérieures est complexe, car il n'existe pas à l'heure actuelle d'anticorps capable de détecter spécifiquement l'hétérodimère de S100A8/A9 murin. Une étude a récemment montré la mutation de certains acides aminés responsable de la formation de l'hétérotétramère de S100A8/A9, mais aucune souris mutante n'a été générée à ce jour avec ces mutations pour prouver l'importance de cette structure *in vivo* (287).

Ainsi la comparaison des souris *S100a8^{-/-}* et *S100a9^{-/-}* et l'utilisation d'anticorps neutralisant contre S100A8 et S100A9 nous ont permis de mettre en évidence que S100A8 et S100A9 ont des fonctions opposées dans l'arthrite rhumatoïde et protectrices dans le psoriasis chez la souris. Malgré tout, ces outils ne nous permettent pas de discriminer précisément les fonctions des homodimères et de l'hétérodimère de calprotectine. Une approche complémentaire serait de générer une souris double déficiente *S100a8^{-/-} S100a9^{-/-}*. La comparaison de ces souris avec les souris *S100a8^{-/-}* et *S100a9^{-/-}* offrirait la possibilité de comparer *in vivo* la contribution des homodimères de S100A8 et S100A9 dans la réaction inflammatoire. De plus, plusieurs combinaisons de transfert de moelle osseuse entre les souris simples déficientes et souris doubles déficientes seraient réalisables pour identifier avec précision les fonctions de chacune des formes de ces protéines.

Dans une perspective thérapeutique, nos travaux sur l'arthrite rhumatoïde chez la souris démontrent que l'utilisation d'un anticorps contre l'homodimère de S100A9 constitue une piste thérapeutique pour diminuer la dégradation des articulations. Sachant que nos anticorps contre S100A8 et S100A9 ont le potentiel de cibler ces protéines y compris en structure hétérodimérique et que le blocage de S100A8 avec un anticorps chez la souris aggrave l'arthrite, l'hétérodimère de calprotectine ne peut être une cible. Nos connaissances sur les fonctions protectrices de S100A8 et S100A9 dans le psoriasis sont en revanche à approfondir et à explorer chez l'humain. En identifiant par exemple les domaines d'interaction de ces protéines qui confèrent un signal anti-inflammatoire, nous pourrions par ce biais envisager la création de protéines chimériques modulant la réponse inflammatoire.

Conclusion générale et perspectives

Au travers de cette thèse de doctorat, nous nous sommes intéressés aux fonctions des alarmines S100A8 et S100A9 dans l'inflammation associée à l'arthrite rhumatoïde et le psoriasis chez la souris. Notre hypothèse initiale était que les homodimères de S100A8 et S100A9 ont des fonctions indépendantes et opposées dans l'inflammation plus précisément que S100A8 est anti-inflammatoire et au contraire que S100A9 est pro-inflammatoire.

Tout d'abord, les différents travaux réalisés lors de la première caractérisation des souris déficientes pour *S100a8* ont permis de mettre en lumière de nouvelles fonctions en lien avec la différenciation des cellules myéloïdes et leur activité. La protéine S100A8 se révèle être majoritairement régulatrice de la myélopoïèse, de la différenciation des cellules dendritiques et macrophages, ainsi que leur sécrétion de cytokines.

Les protéines S100A8 et S100A9 sont fortement exprimées et sécrétées chez les patient(e)s arthritiques et psoriasiques et leurs fonctions dans la pathogenèse de ces maladies sont peu connues. Nous avons pu démontrer ensuite dans un modèle d'arthrite chez les souris *S100a8*^{-/-} que S100A8 diminue l'arthrite via la réduction de l'infiltration de neutrophiles, de la réponse inflammatoire et de l'activité des ostéoclastes. Les mécanismes précis par lesquelles S100A8 est anti-inflammatoire sont encore à élucider. L'utilisation future des souris *S100a8*^{-/-} permettra en outre de démontrer l'importance de S100A8 dans différentes pathologies et la découverte de nouveaux mécanismes anti-inflammatoires.

Enfin, nous avons investigué les fonctions de S100A8 et S100A9 dans un modèle de psoriasis et découvert que S100A8, mais aussi S100A9 sont anti-inflammatoires dans le psoriasis. S100A8 et S100A9 diminuent la boucle inflammatoire liée au psoriasis en réduisant l'infiltration de neutrophiles dans la peau et la production d'IL-17A/F par les lymphocytes dans la peau. En comparaison avec la littérature, cette étude a contribué à démontrer que S100A9 peut exercer des fonctions différentes dans l'inflammation selon le tissu concerné. Les mécanismes précis par lesquelles S100A8 et S100A9 sont anti-inflammatoires dans le psoriasis chez la souris sont à déterminer. Aussi, nos résultats suggèrent l'importance d'approfondir nos connaissances des mécanismes anti-inflammatoires de S100A8 et S100A9 chez l'humain. Ces propriétés de modulation l'inflammation et les symptômes font de ces protéines des cibles d'intérêts thérapeutiques.

Ainsi, les travaux de cette thèse illustrent que les protéines S100A8 et S100A9 sont bien plus que des signaux de danger et des marqueurs de l'inflammation des maladies auto-immunes. Nos découvertes prouvent que ces deux alarmines jouent un rôle important dans la communication entre l'immunité innée et

adaptative ainsi que dans la génération d'une réponse anti-inflammatoire. Face à ce constat, une nouvelle nomenclature pour ces protéines apparaît nécessaire.

Bibliographie

1. Ehrlich, P. 1900. On immunity with special reference to cell life. *Proc R Soc Lond (Biol)* 66: 424-448.
2. Burnet, F. M. S. 1959. *The clonal selection theory of acquired immunity*. Vanderbilt University Press, Nashville.
3. Luan, M., Z. Shang, Y. Teng, X. Chen, M. Zhang, H. Lv, and R. Zhang. 2017. The shared and specific mechanism of four autoimmune diseases. *Oncotarget* 8: 108355-108374.
4. Yamamoto, K. 2016. Introduction: Autoimmunity Special Issue. *Int Immunol* 28: 153-154.
5. Cooper, G. S., F. W. Miller, and J. P. Pandey. 1999. The role of genetic factors in autoimmune disease: implications for environmental research. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 5: 693-700.
6. Xing, Y., and K. A. Hogquist. 2012. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
7. Nemazee, D. 2017. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol* 17: 281-294.
8. Eyerich, S., K. Eyerich, C. Traidl-Hoffmann, and T. Biedermann. 2018. Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network. *Trends Immunol* 39: 315-327.
9. Hartley, S. B., J. Crosbie, R. Brink, A. B. Kantor, A. Basten, and C. C. Goodnow. 1991. Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature* 353: 765-769.
10. Wang, P., and S. G. Zheng. 2013. Regulatory T cells and B cells: implication on autoimmune diseases. *Int J Clin Exp Pathol* 6: 2668-2674.
11. Eeva, J., and J. Pelkonen. 2004. Mechanisms of B cell receptor induced apoptosis. *Apoptosis* 9: 525-531.
12. Murphy, K. 2018. *Immunobiologie de Janeway*. De Boeck supérieur.
13. Goldenberg, M. M. 2012. Multiple sclerosis review. *P T* 37: 175-184.
14. Nam, M., S. Shin, K. U. Park, I. Kim, S. S. Yoon, T. K. Kwon, and E. Y. Song. 2018. Association of FOXP3 Single Nucleotide Polymorphisms With Clinical Outcomes After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Ann Lab Med* 38: 591-598.
15. Gutierrez-Arcelus, M., S. S. Rich, and S. Raychaudhuri. 2016. Autoimmune diseases - connecting risk alleles with molecular traits of the immune system. *Nat Rev Genet* 17: 160-174.
16. Matzaraki, V., V. Kumar, C. Wijmenga, and A. Zhernakova. 2017. The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome Biol* 18: 76.
17. Morris, D. L., M. M. Fernando, K. E. Taylor, S. A. Chung, J. Nititham, M. E. Alarcon-Riquelme, L. F. Barcellos, T. W. Behrens, C. Cotsapas, P. M. Gaffney, R. R. Graham, B. A. Pons-Estel, P. K. Gregersen, J. B. Harley, S. L. Hauser, G. Hom, C. D. Langefeld, J. A. Noble, J. D. Rioux, M. F. Seldin, C. Systemic Lupus Erythematosus Genetics, T. J. Vyse, and L. A. Criswell. 2014. MHC associations with clinical and autoantibody manifestations in European SLE. *Genes Immun* 15: 210-217.
18. Dendrou, C. A., J. Petersen, J. Rossjohn, and L. Fugger. 2018. HLA variation and disease. *Nat Rev Immunol* 18: 325-339.
19. Belot, A., and R. Cimaz. 2012. Monogenic forms of systemic lupus erythematosus: new insights into SLE pathogenesis. *Pediatr Rheumatol Online J* 10: 21.
20. Uhlig, H. H., T. Schwerd, S. Koletzko, N. Shah, J. Kammermeier, A. Elkadri, J. Ouahed, D. C. Wilson, S. P. Travis, D. Turner, C. Klein, S. B. Snapper, A. M. Muise, C. i. I. S. Group, and Neopics. 2014. The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 147: 990-1007 e1003.
21. Cooper, G. S., and B. C. Stroehla. 2003. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2: 119-125.
22. Manzel, A., D. N. Muller, D. A. Hafler, S. E. Erdman, R. A. Linker, and M. Kleinewietfeld. 2014. Role of "Western diet" in inflammatory autoimmune diseases. *Curr Allergy Asthma Rep* 14: 404.

23. Theofilopoulos, A. N., D. H. Kono, and R. Baccala. 2017. The multiple pathways to autoimmunity. *Nat Immunol* 18: 716-724.
24. Duan, L., X. Rao, and K. R. Sigdel. 2019. Regulation of Inflammation in Autoimmune Disease. *J Immunol Res* 2019: 7403796.
25. Liu, M., A. Kalbasi, and G. L. Beatty. 2017. Functio Laesa: Cancer Inflammation and Therapeutic Resistance. *J Oncol Pract* 13: 173-180.
26. Medzhitov, R. 2010. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140: 771-776.
27. Ferrero-Miliani, L., O. H. Nielsen, P. S. Andersen, and S. E. Girardin. 2007. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol* 147: 227-235.
28. Netea, M. G., F. Balkwill, M. Chonchol, F. Cominelli, M. Y. Donath, E. J. Giamarellos-Bourboulis, D. Golenbock, M. S. Gresnigt, M. T. Heneka, H. M. Hoffman, R. Hotchkiss, L. A. B. Joosten, D. L. Kastner, M. Korte, E. Latz, P. Libby, T. Mandrup-Poulsen, A. Mantovani, K. H. G. Mills, K. L. Nowak, L. A. O'Neill, P. Pickkers, T. van der Poll, P. M. Ridker, J. Schalkwijk, D. A. Schwartz, B. Siegmund, C. J. Steer, H. Tilg, J. W. M. van der Meer, F. L. van de Veerdonk, and C. A. Dinarello. 2017. A guiding map for inflammation. *Nat Immunol* 18: 826-831.
29. Chen, L., H. Deng, H. Cui, J. Fang, Z. Zuo, J. Deng, Y. Li, X. Wang, and L. Zhao. 2018. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9: 7204-7218.
30. Liao, X., Y. Shen, R. Zhang, K. Sugi, N. T. Vasudevan, M. A. Alaiti, D. R. Sweet, L. Zhou, Y. Qing, S. L. Gerson, C. Fu, A. Wynshaw-Boris, R. Hu, M. A. Schwartz, H. Fujioka, B. Richardson, M. J. Cameron, H. Hayashi, J. S. Stamler, and M. K. Jain. 2018. Distinct roles of resident and nonresident macrophages in nonischemic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: E4661-E4669.
31. Rosales, C. 2018. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol* 9: 113.
32. Uluckan, O., and E. F. Wagner. 2017. Chronic systemic inflammation originating from epithelial tissues. *FEBS J* 284: 505-516.
33. Pate, M., V. Damarla, D. S. Chi, S. Negi, and G. Krishnaswamy. 2010. Endothelial cell biology: role in the inflammatory response. *Adv Clin Chem* 52: 109-130.
34. Hadland, B., and M. Yoshimoto. 2018. Many layers of embryonic hematopoiesis: new insights into B-cell ontogeny and the origin of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 60: 1-9.
35. Ivanovs, A., S. Rybtsov, E. S. Ng, E. G. Stanley, A. G. Elefanty, and A. Medvinsky. 2017. Human haematopoietic stem cell development: from the embryo to the dish. *Development* 144: 2323-2337.
36. Seita, J., and I. L. Weissman. 2010. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2: 640-653.
37. Wang, L. D., and A. J. Wagers. 2011. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 643-655.
38. Challen, G. A., N. Boles, K. K. Lin, and M. A. Goodell. 2009. Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry A* 75: 14-24.
39. Weiskopf, K., P. J. Schnorr, W. W. Pang, M. P. Chao, A. Chhabra, J. Seita, M. Feng, and I. L. Weissman. 2016. Myeloid Cell Origins, Differentiation, and Clinical Implications. *Microbiol Spectr* 4.
40. Stegelmeier, A. A., J. P. van Vloten, R. C. Mould, E. M. Klafuric, J. A. Minott, S. K. Wootton, B. W. Bridle, and K. Karimi. 2019. Myeloid Cells during Viral Infections and Inflammation. *Viruses* 11.
41. Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327: 656-661.
42. Wright, H. L., R. J. Moots, R. C. Bucknall, and S. W. Edwards. 2010. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* 49: 1618-1631.
43. von Vietinghoff, S., and K. Ley. 2008. Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *J Immunol* 181: 5183-5188.
44. Hager, M., J. B. Cowland, and N. Borregaard. 2010. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med* 268: 25-34.
45. Summers, C., S. M. Rankin, A. M. Condliffe, N. Singh, A. M. Peters, and E. R. Chilvers. 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 31: 318-324.

46. Gordy, C., H. Pua, G. D. Sempowski, and Y. W. He. 2011. Regulation of steady-state neutrophil homeostasis by macrophages. *Blood* 117: 618-629.
47. Jiao, J., A. C. Dragomir, P. Kocabayoglu, A. H. Rahman, A. Chow, D. Hashimoto, M. Leboeuf, T. Kraus, T. Moran, G. Carrasco-Avino, S. L. Friedman, M. Merad, and C. Aloman. 2014. Central role of conventional dendritic cells in regulation of bone marrow release and survival of neutrophils. *J Immunol* 192: 3374-3382.
48. Ueda, Y., D. W. Cain, M. Kuraoka, M. Kondo, and G. Kelsoe. 2009. IL-1R type I-dependent hemopoietic stem cell proliferation is necessary for inflammatory granulopoiesis and reactive neutrophilia. *J Immunol* 182: 6477-6484.
49. Kolaczowska, E., and P. Kubes. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13: 159-175.
50. Kobayashi, Y. 2008. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci* 13: 2400-2407.
51. Pillay, J., I. den Braber, N. Vrisekoop, L. M. Kwast, R. J. de Boer, J. A. Borghans, K. Tesselaar, and L. Koenderman. 2010. In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116: 625-627.
52. Colotta, F., F. Re, N. Polentarutti, S. Sozzani, and A. Mantovani. 1992. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80: 2012-2020.
53. Peters, A. M. 1998. Just how big is the pulmonary granulocyte pool? *Clin Sci (Lond)* 94: 7-19.
54. Buckley, C. D., E. A. Ross, H. M. McGettrick, C. E. Osborne, O. Haworth, C. Schmutz, P. C. Stone, M. Salmon, N. M. Matharu, R. K. Vohra, G. B. Nash, and G. E. Rainger. 2006. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J Leukoc Biol* 79: 303-311.
55. Hayashi, F., T. K. Means, and A. D. Luster. 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102: 2660-2669.
56. Borregaard, N. 2010. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33: 657-670.
57. Nguyen, G. T., E. R. Green, and J. Mecsas. 2017. Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol* 7: 373.
58. Van Acker, H., and T. Coenye. 2017. The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. *Trends Microbiol* 25: 456-466.
59. Robinson, J. M. 2008. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem Cell Biol* 130: 281-297.
60. Nathan, C., and A. Cunningham-Bussell. 2013. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* 13: 349-361.
61. Smallwood, M. J., A. Nissim, A. R. Knight, M. Whiteman, R. Haigh, and P. G. Winyard. 2018. Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. *Free Radic Biol Med* 125: 3-14.
62. Borregaard, N., O. E. Sorensen, and K. Theilgaard-Monch. 2007. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol* 28: 340-345.
63. 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.
64. Bonaventura, A., L. Liberale, F. Carbone, A. Vecchie, C. Diaz-Canestro, G. G. Camici, F. Montecucco, and F. Dallegri. 2018. The Pathophysiological Role of Neutrophil Extracellular Traps in Inflammatory Diseases. *Thromb Haemost* 118: 6-27.
65. Lee, K. H., A. Kronbichler, D. D. Park, Y. Park, H. Moon, H. Kim, J. H. Choi, Y. Choi, S. Shim, I. S. Lyu, B. H. Yun, Y. Han, D. Lee, S. Y. Lee, B. H. Yoo, K. H. Lee, T. L. Kim, H. Kim, J. S. Shim, W. Nam, H. So, S. Choi, S. Lee, and J. I. Shin. 2017. Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Autoimmun Rev* 16: 1160-1173.
66. Pratesi, F., I. Dioni, C. Tommasi, M. C. Alcaro, I. Paolini, F. Barbetti, F. Boscaro, F. Panza, I. Puxeddu, P. Rovero, and P. Migliorini. 2014. Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann Rheum Dis* 73: 1414-1422.

67. Soehnlein, O., A. Zernecke, E. E. Eriksson, A. G. Rothfuchs, C. T. Pham, H. Herwald, K. Bidzhekov, M. E. Rottenberg, C. Weber, and L. Lindbom. 2008. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* 112: 1461-1471.
68. Mantovani, A., M. A. Cassatella, C. Costantini, and S. Jaillon. 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11: 519-531.
69. Soehnlein, O., and L. Lindbom. 2010. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 10: 427-439.
70. Chtanova, T., M. Schaeffer, S. J. Han, G. G. van Dooren, M. Nollmann, P. Herzmark, S. W. Chan, H. Satija, K. Camfield, H. Aaron, B. Striepen, and E. A. Robey. 2008. Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. *Immunity* 29: 487-496.
71. Guillemins, M., F. Ginhoux, C. Jakubzick, S. H. Naik, N. Onai, B. U. Schraml, E. Segura, R. Tussiwand, and S. Yona. 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 14: 571-578.
72. Auffray, C., M. H. Sieweke, and F. Geissmann. 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27: 669-692.
73. Chong, S. Z., M. Evrard, S. Devi, J. Chen, J. Y. Lim, P. See, Y. Zhang, J. M. Adrover, B. Lee, L. Tan, J. L. Li, K. H. Liong, C. Phua, A. Balachander, A. Boey, D. Liebl, S. M. Tan, J. K. Chan, K. Balabanian, J. E. Harris, M. Bianchini, C. Weber, J. Duchene, J. Lum, M. Poidinger, Q. Chen, L. Renia, C. I. Wang, A. Larbi, G. J. Randolph, W. Weninger, M. R. Looney, M. F. Krummel, S. K. Biswas, F. Ginhoux, A. Hidalgo, F. Bachelier, and L. G. Ng. 2016. CXCR4 identifies transitional bone marrow premonocytes that replenish the mature monocyte pool for peripheral responses. *J Exp Med* 213: 2293-2314.
74. Yona, S., K. W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guillemins, A. Misharin, D. A. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer, and S. Jung. 2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38: 79-91.
75. Cros, J., N. Cagnard, K. Woollard, N. Patey, S. Y. Zhang, B. Senechal, A. Puel, S. K. Biswas, D. Moshous, C. Picard, J. P. Jais, D. D'Cruz, J. L. Casanova, C. Trouillet, and F. Geissmann. 2010. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33: 375-386.
76. Ingersoll, M. A., R. Spanbroek, C. Lottaz, E. L. Gautier, M. Frankenberger, R. Hoffmann, R. Lang, M. Haniffa, M. Collin, F. Tacke, A. J. Habenicht, L. Ziegler-Heitbrock, and G. J. Randolph. 2010. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115: e10-19.
77. Auffray, C., D. Fogg, M. Garfa, G. Elain, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau, and F. Geissmann. 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317: 666-670.
78. van Furth, R., and Z. A. Cohn. 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128: 415-435.
79. Ziegler-Heitbrock, L., and T. P. Hofer. 2013. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol* 4: 23.
80. Hashimoto, D., A. Chow, C. Noizat, P. Teo, M. B. Beasley, M. Leboeuf, C. D. Becker, P. See, J. Price, D. Lucas, M. Greter, A. Mortha, S. W. Boyer, E. C. Forsberg, M. Tanaka, N. van Rooijen, A. Garcia-Sastre, E. R. Stanley, F. Ginhoux, P. S. Frenette, and M. Merad. 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38: 792-804.
81. Liu, K., G. D. Vitoria, T. A. Schwickert, P. Guernonprez, M. M. Meredith, K. Yao, F. F. Chu, G. J. Randolph, A. Y. Rudensky, and M. Nussenzweig. 2009. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324: 392-397.
82. Jakubzick, C., E. L. Gautier, S. L. Gibbings, D. K. Sojka, A. Schlitzer, T. E. Johnson, S. Ivanov, Q. Duan, S. Bala, T. Condon, N. van Rooijen, J. R. Grainger, Y. Belkaid, A. Ma'ayan, D. W. Riches, W.

- M. Yokoyama, F. Ginhoux, P. M. Henson, and G. J. Randolph. 2013. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39: 599-610.
83. Ginhoux, F., and S. Jung. 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology* 14: 392.
84. Wynn, T. A., A. Chawla, and J. W. Pollard. 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496: 445-455.
85. Shapouri-Moghaddam, A., S. Mohammadian, H. Vazini, M. Taghadosi, S. A. Esmaeili, F. Mardani, B. Seifi, A. Mohammadi, J. T. Afshari, and A. Sahebkar. 2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 233: 6425-6440.
86. Murray, P. J., and T. A. Wynn. 2011. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol* 89: 557-563.
87. Dos Anjos Cassado, A. 2017. F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen. *Results Probl Cell Differ* 62: 161-179.
88. Lukic, A., P. Larssen, A. Fauland, B. Samuelsson, C. E. Wheelock, S. Gabrielsson, and O. Radmark. 2017. GM-CSF- and M-CSF-primed macrophages present similar resolving but distinct inflammatory lipid mediator signatures. *FASEB J* 31: 4370-4381.
89. Dziarski, R. 2003. Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system. *Cell Mol Life Sci* 60: 1793-1804.
90. Pereira, M., E. Petretto, S. Gordon, J. H. D. Bassett, G. R. Williams, and J. Behmoaras. 2018. Common signalling pathways in macrophage and osteoclast multinucleation. *J Cell Sci* 131.
91. Yasuda, H., N. Shima, N. Nakagawa, K. Yamaguchi, M. Kinosaki, S. Mochizuki, A. Tomoyasu, K. Yano, M. Goto, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, N. Udagawa, N. Takahashi, and T. Suda. 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3597-3602.
92. Henriksen, K., J. Bollerslev, V. Everts, and M. A. Karsdal. 2011. Osteoclast activity and subtypes as a function of physiology and pathology--implications for future treatments of osteoporosis. *Endocr Rev* 32: 31-63.
93. Steinman, R. M., and Z. A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137: 1142-1162.
94. Segura, E., A. L. Albiston, I. P. Wicks, S. Y. Chai, and J. A. Villadangos. 2009. Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20377-20381.
95. Mbongue, J., D. Nicholas, A. Firek, and W. Langridge. 2014. The role of dendritic cells in tissue-specific autoimmunity. *J Immunol Res* 2014: 857143.
96. Powell, A. M., and M. M. Black. 2001. Epitope spreading: protection from pathogens, but propagation of autoimmunity? *Clin Exp Dermatol* 26: 427-433.
97. Schlitzer, A., N. McGovern, and F. Ginhoux. 2015. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin Cell Dev Biol* 41: 9-22.
98. Onai, N., A. Obata-Onai, M. A. Schmid, T. Ohteki, D. Jarrossay, and M. G. Manz. 2007. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 8: 1207-1216.
99. Sichien, D., B. N. Lambrecht, M. Guillems, and C. L. Scott. 2017. Development of conventional dendritic cells: from common bone marrow progenitors to multiple subsets in peripheral tissues. *Mucosal Immunol* 10: 831-844.
100. Schlitzer, A., N. McGovern, P. Teo, T. Zelante, K. Atarashi, D. Low, A. W. Ho, P. See, A. Shin, P. S. Wasan, G. Hoeffel, B. Malleret, A. Heiseke, S. Chew, L. Jardine, H. A. Purvis, C. M. Hilkens, J. Tam, M. Poidinger, E. R. Stanley, A. B. Krug, L. Renia, B. Sivasankar, L. G. Ng, M. Collin, P. Ricciardi-Castagnoli, K. Honda, M. Haniffa, and F. Ginhoux. 2013. IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* 38: 970-983.

101. Murakami, R., K. Denda-Nagai, S. Hashimoto, S. Nagai, M. Hattori, and T. Irimura. 2013. A unique dermal dendritic cell subset that skews the immune response toward Th2. *PLoS One* 8: e73270.
102. Ginhoux, F., K. Liu, J. Helft, M. Bogunovic, M. Greter, D. Hashimoto, J. Price, N. Yin, J. Bromberg, S. A. Lira, E. R. Stanley, M. Nussenzweig, and M. Merad. 2009. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J Exp Med* 206: 3115-3130.
103. Bedoui, S., P. G. Whitney, J. Waithman, L. Eidsmo, L. Wakim, I. Caminschi, R. S. Allan, M. Wojtasiak, K. Shortman, F. R. Carbone, A. G. Brooks, and W. R. Heath. 2009. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol* 10: 488-495.
104. Plantinga, M., M. Guillems, M. Vanheerswynghele, K. Deswarte, F. Branco-Madeira, W. Toussaint, L. Vanhoutte, K. Neyt, N. Killeen, B. Malissen, H. Hammad, and B. N. Lambrecht. 2013. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* 38: 322-335.
105. Greter, M., J. Helft, A. Chow, D. Hashimoto, A. Mortha, J. Agudo-Cantero, M. Bogunovic, E. L. Gautier, J. Miller, M. Leboeuf, G. Lu, C. Aloman, B. D. Brown, J. W. Pollard, H. Xiong, G. J. Randolph, J. E. Chipuk, P. S. Frenette, and M. Merad. 2012. GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity* 36: 1031-1046.
106. Segura, E., M. Touzot, A. Bohineust, A. Cappuccio, G. Chiocchia, A. Hosmalin, M. Dalod, V. Soumelis, and S. Amigorena. 2013. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity* 38: 336-348.
107. Hansel, A., C. Gunther, J. Ingwersen, J. Starke, M. Schmitz, M. Bachmann, M. Meurer, E. P. Rieber, and K. Schakel. 2011. Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses. *J Allergy Clin Immunol* 127: 787-794 e781-789.
108. Xu, Y., Y. Zhan, A. M. Lew, S. H. Naik, and M. H. Kershaw. 2007. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J Immunol* 179: 7577-7584.
109. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176: 1693-1702.
110. Lutz, M. B., N. Kukulski, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223: 77-92.
111. Son, Y. I., S. Egawa, T. Tatsumi, R. E. Redlinger, Jr., P. Kalinski, and T. Kanto. 2002. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. *J Immunol Methods* 262: 145-157.
112. Helft, J., J. Bottcher, P. Chakravarty, S. Zelenay, J. Huotari, B. U. Schraml, D. Goubau, and C. Reis e Sousa. 2015. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* 42: 1197-1211.
113. Vander Lugt, B., A. A. Khan, J. A. Hackney, S. Agrawal, J. Lesch, M. Zhou, W. P. Lee, S. Park, M. Xu, J. DeVoss, C. J. Spooner, C. Chalouni, L. Delamarre, I. Mellman, and H. Singh. 2014. Transcriptional programming of dendritic cells for enhanced MHC class II antigen presentation. *Nat Immunol* 15: 161-167.
114. Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller, and A. Mortha. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 31: 563-604.
115. Jager, A., and V. K. Kuchroo. 2010. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand J Immunol* 72: 173-184.
116. Stadhouders, R., E. Lubberts, and R. W. Hendriks. 2018. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *J Autoimmun* 87: 1-15.

117. Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348-2357.
118. Zhu, J., and W. E. Paul. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112: 1557-1569.
119. Nakayama, T., K. Hirahara, A. Onodera, Y. Endo, H. Hosokawa, K. Shinoda, D. J. Tumes, and Y. Okamoto. 2017. Th2 Cells in Health and Disease. *Annu Rev Immunol* 35: 53-84.
120. Mullen, A. C., F. A. High, A. S. Hutchins, H. W. Lee, A. V. Villarino, D. M. Livingston, A. L. Kung, N. Cereb, T. P. Yao, S. Y. Yang, and S. L. Reiner. 2001. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292: 1907-1910.
121. Zhang, D. H., L. Cohn, P. Ray, K. Bottomly, and A. Ray. 1997. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem* 272: 21597-21603.
122. Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6: 1123-1132.
123. Omenetti, S., C. Bussi, A. Metidji, A. Iseppon, S. Lee, M. Tolaini, Y. Li, G. Kelly, P. Chakravarty, S. Shoaie, M. G. Gutierrez, and B. Stockinger. 2019. The Intestine Harbors Functionally Distinct Homeostatic Tissue-Resident and Inflammatory Th17 Cells. *Immunity* 51: 77-89 e76.
124. Lee, Y. K., H. Turner, C. L. Maynard, J. R. Oliver, D. Chen, C. O. Elson, and C. T. Weaver. 2009. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 30: 92-107.
125. Crotty, S. 2014. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 41: 529-542.
126. Shevach, E. M., and A. M. Thornton. 2014. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev* 259: 88-102.
127. Iezzi, G., D. Scheidegger, and A. Lanzavecchia. 2001. Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 193: 987-993.
128. Leipe, J., F. Pirronello, A. Klose, H. Schulze-Koops, and A. Skapenko. 2019. Increased plasticity of non-classic Th1 cells toward the Th17 phenotype. *Mod Rheumatol*: 1-7.
129. Kotake, S., T. Yago, T. Kobashigawa, and Y. Nanke. 2017. The Plasticity of Th17 Cells in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *J Clin Med* 6.
130. Basdeo, S. A., D. Cluxton, J. Sulaimani, B. Moran, M. Canavan, C. Orr, D. J. Veale, U. Fearon, and J. M. Fletcher. 2017. Ex-Th17 (Nonclassical Th1) Cells Are Functionally Distinct from Classical Th1 and Th17 Cells and Are Not Constrained by Regulatory T Cells. *J Immunol* 198: 2249-2259.
131. Christophersen, A., E. G. Lund, O. Snir, E. Sola, C. Kanduri, S. Dahal-Koirala, S. Zuhlke, O. Molberg, P. J. Utz, M. Rohani-Pichavant, J. F. Simard, C. L. Dekker, K. E. A. Lundin, L. M. Sollid, and M. M. Davis. 2019. Distinct phenotype of CD4⁺ T cells driving celiac disease identified in multiple autoimmune conditions. *Nat Med* 25: 734-737.
132. Smolen, J. S., D. Aletaha, and I. B. McInnes. 2016. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 388: 2023-2038.
133. Landre-Beauvais, A. J. 2001. The first description of rheumatoid arthritis. Unabridged text of the doctoral dissertation presented in 1800. *Joint Bone Spine* 68: 130-143.
134. Aletaha, D., T. Neogi, A. J. Silman, J. Funovits, D. T. Felson, C. O. Bingham, 3rd, N. S. Birnbaum, G. R. Burmester, V. P. Bykerk, M. D. Cohen, B. Combe, K. H. Costenbader, M. Dougados, P. Emery, G. Ferraccioli, J. M. Hazes, K. Hobbs, T. W. Huizinga, A. Kavanaugh, J. Kay, T. K. Kvien, T. Laing, P. Mease, H. A. Menard, L. W. Moreland, R. L. Naden, T. Pincus, J. S. Smolen, E. Stanislawski-Biernat, D. Symmons, P. P. Tak, K. S. Upchurch, J. Vencovsky, F. Wolfe, and G. Hawker. 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 62: 2569-2581.
135. Cross, M., E. Smith, D. Hoy, L. Carmona, F. Wolfe, T. Vos, B. Williams, S. Gabriel, M. Lassere, N. Johns, R. Buchbinder, A. Woolf, and L. March. 2014. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis* 73: 1316-1322.

136. Alamanos, Y., P. V. Voulgari, and A. A. Drosos. 2006. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 36: 182-188.
137. Silman, A. J., and J. E. Pearson. 2002. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 4 Suppl 3: S265-272.
138. Jean, S., M. Hudson, P. Gamache, L. Bessette, P. R. Fortin, G. Boire, and S. Bernatsky. 2017. Temporal trends in prevalence, incidence, and mortality for rheumatoid arthritis in Quebec, Canada: a population-based study. *Clin Rheumatol* 36: 2667-2671.
139. Silman, A. J., A. J. MacGregor, W. Thomson, S. Holligan, D. Carthy, A. Farhan, and W. E. Ollier. 1993. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 32: 903-907.
140. Sokka, T., H. Kautiainen, T. Pincus, S. M. Verstappen, A. Aggarwal, R. Alten, D. Andersone, H. Badsha, E. Baecklund, M. Belmonte, J. Craig-Muller, L. M. da Mota, A. Dimic, N. A. Fathi, G. Ferraccioli, W. Fukuda, P. Geher, F. Gogus, N. Hajjaj-Hassouni, H. Hamoud, G. Haugeberg, D. Henrohn, K. Horslev-Petersen, R. Ionescu, D. Karateew, R. Kuuse, I. M. Laurindo, J. Lazovskis, R. Luukkainen, A. Mofti, E. Murphy, A. Nakajima, O. Oyoo, S. C. Pandya, C. Pohl, D. Predeteanu, M. Rexhepi, S. Rexhepi, B. Sharma, E. Shono, J. Sibilia, S. Sierakowski, F. N. Skopouli, S. Stropuviene, S. Toloza, I. Valter, A. Woolf, H. Yamanaka, and R. A. Quest. 2010. Work disability remains a major problem in rheumatoid arthritis in the 2000s: data from 32 countries in the QUEST-RA study. *Arthritis Res Ther* 12: R42.
141. Guo, Q., Y. Wang, D. Xu, J. Nossent, N. J. Pavlos, and J. Xu. 2018. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Res* 6: 15.
142. Aletaha, D., and J. S. Smolen. 2018. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA* 320: 1360-1372.
143. van der Heijde, D. M. 1995. Joint erosions and patients with early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 34 Suppl 2: 74-78.
144. Visser, H., S. le Cessie, K. Vos, F. C. Breedveld, and J. M. Hazes. 2002. How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum* 46: 357-365.
145. Crowson, C. S., S. Rollefstad, E. Ik Dahl, G. D. Kitis, P. van Riel, S. E. Gabriel, E. L. Matteson, T. K. Kvien, K. Douglas, A. Sandoo, E. Arts, S. Wallberg-Jonsson, L. Innala, G. Karpouzas, P. H. Dessein, L. Tsang, H. El-Gabalawy, C. Hitchon, V. P. Ramos, I. C. Yanez, P. P. Sfikakis, E. Zampeli, M. A. Gonzalez-Gay, A. Corrales, M. V. Laar, H. E. Vonkeman, I. Meek, A. G. Semb, and A. T.-A. C. C. f. R. Arthritis. 2018. Impact of risk factors associated with cardiovascular outcomes in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 77: 48-54.
146. Roberson, E. D., and A. M. Bowcock. 2010. Psoriasis genetics: breaking the barrier. *Trends Genet* 26: 415-423.
147. Gregersen, P. K., J. Silver, and R. J. Winchester. 1987. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30: 1205-1213.
148. Okada, Y., D. Wu, G. Trynka, T. Raj, C. Terao, K. Ikari, Y. Kochi, K. Ohmura, A. Suzuki, S. Yoshida, R. R. Graham, A. Manoharan, W. Ortmann, T. Bhangale, J. C. Denny, R. J. Carroll, A. E. Eyler, J. D. Greenberg, J. M. Kremer, D. A. Pappas, L. Jiang, J. Yin, L. Ye, D. F. Su, J. Yang, G. Xie, E. Keystone, H. J. Westra, T. Esko, A. Metspalu, X. Zhou, N. Gupta, D. Mirel, E. A. Stahl, D. Diogo, J. Cui, K. Liao, M. H. Guo, K. Myouzen, T. Kawaguchi, M. J. Coenen, P. L. van Riel, M. A. van de Laar, H. J. Guchelaar, T. W. Huizinga, P. Dieude, X. Mariette, S. L. Bridges, Jr., A. Zernakova, R. E. Toes, P. P. Tak, C. Miceli-Richard, S. Y. Bang, H. S. Lee, J. Martin, M. A. Gonzalez-Gay, L. Rodriguez-Rodriguez, S. Rantapaa-Dahlqvist, L. Arlestig, H. K. Choi, Y. Kamatani, P. Galan, M. Lathrop, R. consortium, G. consortium, S. Eyre, J. Bowes, A. Barton, N. de Vries, L. W. Moreland, L. A. Criswell, E. W. Karlson, A. Taniguchi, R. Yamada, M. Kubo, J. S. Liu, S. C. Bae, J. Worthington, L. Padyukov, L. Klareskog, P. K. Gregersen, S. Raychaudhuri, B. E. Stranger, P. L. De Jager, L. Franke, P. M.

- Visscher, M. A. Brown, H. Yamanaka, T. Mimori, A. Takahashi, H. Xu, T. W. Behrens, K. A. Siminovitch, S. Momohara, F. Matsuda, K. Yamamoto, and R. M. Plenge. 2014. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 506: 376-381.
149. Viatte, S., D. Plant, B. Han, B. Fu, A. Yarwood, W. Thomson, D. P. Symmons, J. Worthington, A. Young, K. L. Hyrich, A. W. Morgan, A. G. Wilson, J. D. Isaacs, S. Raychaudhuri, and A. Barton. 2015. Association of HLA-DRB1 haplotypes with rheumatoid arthritis severity, mortality, and treatment response. *JAMA* 313: 1645-1656.
150. Barra, L., J. Pope, L. Bessette, B. Haraoui, and V. Bykerk. 2011. Lack of seroconversion of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide in patients with early inflammatory arthritis: a systematic literature review. *Rheumatology (Oxford)* 50: 311-316.
151. Nell-Duxneuner, V., K. Machold, T. Stamm, G. Eberl, H. Heinzl, E. Hoefler, J. S. Smolen, and G. Steiner. 2010. Autoantibody profiling in patients with very early rheumatoid arthritis: a follow-up study. *Ann Rheum Dis* 69: 169-174.
152. Liu, Y., M. J. Aryee, L. Padyukov, M. D. Fallin, E. Hesselberg, A. Runarsson, L. Reinius, N. Acevedo, M. Taub, M. Ronninger, K. Shchetynsky, A. Scheynius, J. Kere, L. Alfredsson, L. Klareskog, T. J. Ekstrom, and A. P. Feinberg. 2013. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat Biotechnol* 31: 142-147.
153. Klein, K., and S. Gay. 2015. Epigenetics in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 27: 76-82.
154. Baxter, D., I. B. McInnes, and M. Kurowska-Stolarska. 2012. Novel regulatory mechanisms in inflammatory arthritis: a role for microRNA. *Immunol Cell Biol* 90: 288-292.
155. Bluml, S., M. Bonelli, B. Niederreiter, A. Puchner, G. Mayr, S. Hayer, M. I. Koenders, W. B. van den Berg, J. Smolen, and K. Redlich. 2011. Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 63: 1281-1288.
156. Klareskog, L., V. Malmstrom, K. Lundberg, L. Padyukov, and L. Alfredsson. 2011. Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Semin Immunol* 23: 92-98.
157. Liao, K. P., L. Alfredsson, and E. W. Karlson. 2009. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 21: 279-283.
158. Scher, J. U., D. R. Littman, and S. B. Abramson. 2016. Microbiome in Inflammatory Arthritis and Human Rheumatic Diseases. *Arthritis Rheumatol* 68: 35-45.
159. Wegner, N., R. Wait, A. Sroka, S. Eick, K. A. Nguyen, K. Lundberg, A. Kinloch, S. Culshaw, J. Potempa, and P. J. Venables. 2010. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 62: 2662-2672.
160. Ebringer, A., and C. Wilson. 2000. HLA molecules, bacteria and autoimmunity. *J Med Microbiol* 49: 305-311.
161. Scher, J. U., C. Ubeda, A. Artacho, M. Attur, S. Isaac, S. M. Reddy, S. Marmon, A. Neimann, S. Brusca, T. Patel, J. Manasson, E. G. Pamer, D. R. Littman, and S. B. Abramson. 2015. Decreased bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Arthritis Rheumatol* 67: 128-139.
162. Karmakar, S., J. Kay, and E. M. Gravallese. 2010. Bone damage in rheumatoid arthritis: mechanistic insights and approaches to prevention. *Rheum Dis Clin North Am* 36: 385-404.
163. Zhao, X., N. L. Okeke, O. Sharpe, F. M. Batliwalla, A. T. Lee, P. P. Ho, B. H. Tomooka, P. K. Gregersen, and W. H. Robinson. 2008. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10: R94.
164. Anquetil, F., C. Clavel, G. Offer, G. Serre, and M. Sebbag. 2015. IgM and IgA rheumatoid factors purified from rheumatoid arthritis sera boost the Fc receptor- and complement-dependent effector functions of the disease-specific anti-citrullinated protein autoantibodies. *J Immunol* 194: 3664-3674.
165. Sabharwal, U. K., J. H. Vaughan, S. Fong, P. H. Bennett, D. A. Carson, and J. G. Curd. 1982. Activation of the classical pathway of complement by rheumatoid factors. Assessment by radioimmunoassay for C4. *Arthritis Rheum* 25: 161-167.

166. Rombouts, Y., E. Ewing, L. A. van de Stadt, M. H. Selman, L. A. Trouw, A. M. Deelder, T. W. Huizinga, M. Wuhler, D. van Schaardenburg, R. E. Toes, and H. U. Scherer. 2015. Anti-citrullinated protein antibodies acquire a pro-inflammatory Fc glycosylation phenotype prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 74: 234-241.
167. Schellekens, G. A., B. A. de Jong, F. H. van den Hoogen, L. B. van de Putte, and W. J. van Venrooij. 2015. Citrulline is an Essential Constituent of Antigenic Determinants Recognized by Rheumatoid Arthritis-specific Autoantibodies. 1998. *J Immunol* 195: 8-16.
168. Kerkman, P. F., E. Fabre, E. I. van der Voort, A. Zaldumbide, Y. Rombouts, T. Rispen, G. Wolbink, R. C. Hoebe, H. Spits, D. L. Baeten, T. W. Huizinga, R. E. Toes, and H. U. Scherer. 2016. Identification and characterisation of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 75: 1170-1176.
169. Harre, U., D. Georgess, H. Bang, A. Bozec, R. Axmann, E. Ossipova, P. J. Jakobsson, W. Baum, F. Nimmerjahn, E. Szarka, G. Sarmay, G. Krumbholz, E. Neumann, R. Toes, H. U. Scherer, A. I. Catrina, L. Klareskog, P. Jurdic, and G. Schett. 2012. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest* 122: 1791-1802.
170. Sokolove, J., D. S. Johnson, L. J. Lahey, C. A. Wagner, D. Cheng, G. M. Thiele, K. Michaud, H. Sayles, A. M. Reimold, L. Caplan, G. W. Cannon, G. Kerr, T. R. Mikuls, and W. H. Robinson. 2014. Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody-mediated inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 66: 813-821.
171. McInnes, I. B., and G. Schett. 2011. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365: 2205-2219.
172. Behrens, F., A. Himsel, S. Rehart, J. Stanczyk, B. Beutel, S. Y. Zimmermann, U. Koehl, B. Moller, S. Gay, J. P. Kaltwasser, J. M. Pfeilschifter, and H. H. Radeke. 2007. Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66: 1151-1156.
173. Seyler, T. M., Y. W. Park, S. Takemura, R. J. Bram, P. J. Kurtin, J. J. Goronzy, and C. M. Weyand. 2005. BLYS and APRIL in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 115: 3083-3092.
174. Haringman, J. J., D. M. Gerlag, A. H. Zwinderman, T. J. Smeets, M. C. Kraan, D. Baeten, I. B. McInnes, B. Bresnahan, and P. P. Tak. 2005. Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64: 834-838.
175. Liew, F. Y., and I. B. McInnes. 2002. The role of innate mediators in inflammatory response. *Mol Immunol* 38: 887-890.
176. Poubelle, P. E., A. Chakravarti, M. J. Fernandes, K. Doiron, and A. A. Marceau. 2007. Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis Res Ther* 9: R25.
177. Otero, M., and M. B. Goldring. 2007. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 9: 220.
178. Goldring, M. B., and F. Berenbaum. 2004. The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. *Clin Orthop Relat Res*: S37-46.
179. Gravallesse, E. M., Y. Harada, J. T. Wang, A. H. Gorn, T. S. Thornhill, and S. R. Goldring. 1998. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 152: 943-951.
180. Schett, G., and S. L. Teitelbaum. 2009. Osteoclasts and Arthritis. *J Bone Miner Res* 24: 1142-1146.
181. Kong, Y. Y., U. Feige, I. Sarosi, B. Bolon, A. Tafuri, S. Morony, C. Capparelli, J. Li, R. Elliott, S. McCabe, T. Wong, G. Campagnuolo, E. Moran, E. R. Bogoch, G. Van, L. T. Nguyen, P. S. Ohashi, D. L. Lacey, E. Fish, W. J. Boyle, and J. M. Penninger. 1999. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402: 304-309.
182. Gravallesse, E. M., C. Manning, A. Tsay, A. Naito, C. Pan, E. Amento, and S. R. Goldring. 2000. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum* 43: 250-258.

183. Jimenez-Boj, E., K. Redlich, B. Turk, B. Hanslik-Schnabel, A. Wanivenhaus, A. Chott, J. S. Smolen, and G. Schett. 2005. Interaction between synovial inflammatory tissue and bone marrow in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 175: 2579-2588.
184. Amarasekara, D. S., H. Yun, S. Kim, N. Lee, H. Kim, and J. Rho. 2018. Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. *Immune Netw* 18: e8.
185. Smolen, J. S., D. Aletaha, M. Koeller, M. H. Weisman, and P. Emery. 2007. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 370: 1861-1874.
186. Combe, B., R. Landewe, C. I. Daien, C. Hua, D. Aletaha, J. M. Alvaro-Gracia, M. Bakkers, N. Brodin, G. R. Burmester, C. Codreanu, R. Conway, M. Dougados, P. Emery, G. Ferraccioli, J. Fonseca, K. Raza, L. Silva-Fernandez, J. S. Smolen, D. Skingle, Z. Szekanecz, T. K. Kvien, A. van der Helm-van Mil, and R. van Vollenhoven. 2017. 2016 update of the EULAR recommendations for the management of early arthritis. *Ann Rheum Dis* 76: 948-959.
187. Smolen, J. S., R. Landewe, J. Bijlsma, G. Burmester, K. Chatzidionysiou, M. Dougados, J. Nam, S. Ramiro, M. Voshaar, R. van Vollenhoven, D. Aletaha, M. Aringer, M. Boers, C. D. Buckley, F. Buttgerit, V. Bykerk, M. Cardiel, B. Combe, M. Cutolo, Y. van Eijk-Hustings, P. Emery, A. Finckh, C. Gabay, J. Gomez-Reino, L. Gossec, J. E. Gottenberg, J. M. W. Hazes, T. Huizinga, M. Jani, D. Karateev, M. Kouloumas, T. Kvien, Z. Li, X. Mariette, I. McInnes, E. Mysler, P. Nash, K. Pavelka, G. Poor, C. Richez, P. van Riel, A. Rubbert-Roth, K. Saag, J. da Silva, T. Stamm, T. Takeuchi, R. Westhovens, M. de Wit, and D. van der Heijde. 2017. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis* 76: 960-977.
188. Friedman, B., and B. Cronstein. 2019. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 86: 301-307.
189. Kirwan, J. R. 1995. The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. The Arthritis and Rheumatism Council Low-Dose Glucocorticoid Study Group. *N Engl J Med* 333: 142-146.
190. Paolino, S., M. Cutolo, and C. Pizzorni. 2017. Glucocorticoid management in rheumatoid arthritis: morning or night low dose? *Reumatologia* 55: 189-197.
191. van der Heijde, D. M., P. L. van Riel, I. H. Nuvér-Zwart, F. W. Gribnau, and L. B. van de Putte. 1989. Effects of hydroxychloroquine and sulphasalazine on progression of joint damage in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1: 1036-1038.
192. O'Shea, J. J., D. M. Schwartz, A. V. Villarino, M. Gadina, I. B. McInnes, and A. Laurence. 2015. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med* 66: 311-328.
193. Molto, A., and M. Dougados. 2019. Novel DMARD monotherapy in rheumatoid arthritis. *Lancet* 393: 2277-2278.
194. Kannan, K., R. A. Ortmann, and D. Kimpel. 2005. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology* 12: 167-181.
195. Choudhary, N., L. K. Bhatt, and K. S. Prabhavalkar. 2018. Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 40: 193-200.
196. Kouskoff, V., A. S. Korganow, V. Duchatelle, C. Degott, C. Benoist, and D. Mathis. 1996. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 87: 811-822.
197. Keffer, J., L. Probert, H. Cazlaris, S. Georgopoulos, E. Kaslaris, D. Kioussis, and G. Kollias. 1991. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 10: 4025-4031.
198. Horai, R., S. Saijo, H. Tanioka, S. Nakae, K. Sudo, A. Okahara, T. Ikuse, M. Asano, and Y. Iwakura. 2000. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med* 191: 313-320.
199. Bevaart, L., M. J. Vervoordeldonk, and P. P. Tak. 2010. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 62: 2192-2205.

200. Caccese, R. G., J. L. Zimmerman, and R. P. Carlson. 1992. Bacterial lipopolysaccharide potentiates type II collagen-induced arthritis in mice. *Mediators Inflamm* 1: 273-279.
201. Tanaka, S., T. Toki, T. Akimoto, and K. Morishita. 2013. Lipopolysaccharide accelerates collagen-induced arthritis in association with rapid and continuous production of inflammatory mediators and anti-type II collagen antibody. *Microbiol Immunol* 57: 445-454.
202. Schinnerling, K., C. Rosas, L. Soto, R. Thomas, and J. C. Aguilon. 2019. Humanized Mouse Models of Rheumatoid Arthritis for Studies on Immunopathogenesis and Preclinical Testing of Cell-Based Therapies. *Front Immunol* 10: 203.
203. Yamada, H., Y. Nakashima, K. Okazaki, T. Mawatari, J. I. Fukushi, N. Kaibara, A. Hori, Y. Iwamoto, and Y. Yoshikai. 2008. Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67: 1299-1304.
204. Mauri, C., R. O. Williams, M. Walmsley, and M. Feldmann. 1996. Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 26: 1511-1518.
205. Van den Bosch, F., and L. Coates. 2018. Clinical management of psoriatic arthritis. *Lancet* 391: 2285-2294.
206. Henes, J. C., E. Ziupa, M. Eisfelder, A. Adamczyk, B. Knaut, F. Jacobs, J. Lux, S. Schanz, G. Fierbeck, D. Spira, M. Horger, L. Kanz, and I. Koetter. 2014. High prevalence of psoriatic arthritis in dermatological patients with psoriasis: a cross-sectional study. *Rheumatol Int* 34: 227-234.
207. Boehncke, W. H., and M. P. Schon. 2015. Psoriasis. *Lancet* 386: 983-994.
208. Organization, W. H. 2016. Global Report on Psoriasis. *Geneva: World Health Organization*.
209. Parisi, R., D. P. Symmons, C. E. Griffiths, D. M. Ashcroft, Identification, P. Management of, and t. Associated Comorbidities project. 2013. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol* 133: 377-385.
210. Gudjonsson, J. E., and J. T. Elder. 2007. Psoriasis: epidemiology. *Clin Dermatol* 25: 535-546.
211. Queiro, R., P. Tejon, S. Alonso, and P. Coto. 2014. Age at disease onset: a key factor for understanding psoriatic disease. *Rheumatology (Oxford)* 53: 1178-1185.
212. Mahe, E. 2016. Childhood psoriasis. *Eur J Dermatol* 26: 537-548.
213. Singh, R. K., K. M. Lee, D. Ucmak, M. Brodsky, Z. Atanelov, B. Farahnik, M. Abrouk, M. Nakamura, T. H. Zhu, and W. Liao. 2016. Erythrodermic psoriasis: pathophysiology and current treatment perspectives. *Psoriasis (Auckl)* 6: 93-104.
214. Onumah, N., and L. H. Kircik. 2012. Psoriasis and its comorbidities. *J Drugs Dermatol* 11: s5-10.
215. Tan, E. S., W. S. Chong, and H. L. Tey. 2012. Nail psoriasis: a review. *Am J Clin Dermatol* 13: 375-388.
216. Schmitt, J., and G. Wozel. 2005. The psoriasis area and severity index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis. *Dermatology* 210: 194-199.
217. Langley, R. G., and C. N. Ellis. 2004. Evaluating psoriasis with Psoriasis Area and Severity Index, Psoriasis Global Assessment, and Lattice System Physician's Global Assessment. *J Am Acad Dermatol* 51: 563-569.
218. Wang, F., A. Ziemann, and P. A. Coulombe. 2016. Skin Keratins. *Methods Enzymol* 568: 303-350.
219. Zhang, L. J., G. L. Sen, N. L. Ward, A. Johnston, K. Chun, Y. Chen, C. Adase, J. A. Sanford, N. Gao, M. Chensee, E. Sato, Y. Fritz, J. Baliwag, M. R. Williams, T. Hata, and R. L. Gallo. 2016. Antimicrobial Peptide LL37 and MAVS Signaling Drive Interferon-beta Production by Epidermal Keratinocytes during Skin Injury. *Immunity* 45: 119-130.
220. Steffen, C. 2002. William John Munro and Munro's abscess, and Franz Kogoj and Kogoj's spongiform pustule. *Am J Dermatopathol* 24: 364-368.
221. Farber, E. M., and M. L. Nall. 1974. The natural history of psoriasis in 5,600 patients. *Dermatologica* 148: 1-18.
222. Henseler, T., and E. Christophers. 1985. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 13: 450-456.

223. Nair, R. P., P. E. Stuart, I. Nistor, R. Hiremagalore, N. V. C. Chia, S. Jenisch, M. Weichenthal, G. R. Abecasis, H. W. Lim, E. Christophers, J. J. Voorhees, and J. T. Elder. 2006. Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet* 78: 827-851.
224. Trembath, R. C., R. L. Clough, J. L. Rosbotham, A. B. Jones, R. D. Camp, A. Frodsham, J. Browne, R. Barber, J. Terwilliger, G. M. Lathrop, and J. N. Barker. 1997. Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet* 6: 813-820.
225. Gupta, R., M. G. Debbaneh, and W. Liao. 2014. Genetic Epidemiology of Psoriasis. *Curr Dermatol Rep* 3: 61-78.
226. Capon, F., A. D. Burden, R. C. Trembath, and J. N. Barker. 2012. Psoriasis and other complex trait dermatoses: from Loci to functional pathways. *J Invest Dermatol* 132: 915-922.
227. Semprini, S., F. Capon, A. Tacconelli, E. Giardina, A. Orecchia, R. Mingarelli, T. Gobello, G. Zambruno, A. Botta, G. Fabrizi, and G. Novelli. 2002. Evidence for differential S100 gene over-expression in psoriatic patients from genetically heterogeneous pedigrees. *Hum Genet* 111: 310-313.
228. Besgen, P., P. Trommler, S. Vollmer, and J. C. Prinz. 2010. Ezrin, maspin, peroxiredoxin 2, and heat shock protein 27: potential targets of a streptococcal-induced autoimmune response in psoriasis. *J Immunol* 184: 5392-5402.
229. Martin, B. A., R. J. Chalmers, and N. R. Telfer. 1996. How great is the risk of further psoriasis following a single episode of acute guttate psoriasis? *Arch Dermatol* 132: 717-718.
230. Fry, L., and B. S. Baker. 2007. Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clin Dermatol* 25: 606-615.
231. Schadler, E. D., B. Ortel, and S. L. Mehlis. 2019. Biologics for the primary care physician: Review and treatment of psoriasis. *Dis Mon* 65: 51-90.
232. Basavaraj, K. H., N. M. Ashok, R. Rashmi, and T. K. Praveen. 2010. The role of drugs in the induction and/or exacerbation of psoriasis. *Int J Dermatol* 49: 1351-1361.
233. Nestle, F. O., L. A. Turka, and B. J. Nickoloff. 1994. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest* 94: 202-209.
234. Gilliet, M., and R. Lande. 2008. Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr Opin Immunol* 20: 401-407.
235. Ganguly, D., G. Chamilos, R. Lande, J. Gregorio, S. Meller, V. Facchinetti, B. Homey, F. J. Barrat, T. Zal, and M. Gilliet. 2009. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med* 206: 1983-1994.
236. Herster, F., Z. Bittner, N. K. Archer, S. Dickhofer, D. Eisel, T. Eigenbrod, T. Knorpp, N. Schneiderhan-Marra, M. W. Loffler, H. Kalbacher, T. Vierbuchen, H. Heine, L. S. Miller, D. Hartl, L. Freund, K. Schakel, M. Heister, K. Ghoreschi, and A. N. R. Weber. 2020. Neutrophil extracellular trap-associated RNA and LL37 enable self-amplifying inflammation in psoriasis. *Nat Commun* 11: 105.
237. Yuan, Y., J. Qiu, Z. T. Lin, W. Li, C. Haley, U. N. Mui, J. Ning, S. K. Tying, and T. Wu. 2019. Identification of Novel Autoantibodies Associated With Psoriatic Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 71: 941-951.
238. Frasca, L., R. Palazzo, M. S. Chimenti, S. Alivernini, B. Tolusso, L. Bui, E. Botti, A. Giunta, L. Bianchi, L. Petricca, S. E. Auteri, F. Spadaro, G. L. Fonti, M. Falchi, A. Evangelista, B. Marinari, I. Pietraforte, F. R. Spinelli, T. Colasanti, C. Alessandri, F. Conti, E. Gremese, A. Costanzo, G. Valesini, R. Perricone, and R. Lande. 2018. Anti-LL37 Antibodies Are Present in Psoriatic Arthritis (PsA) Patients: New Biomarkers in PsA. *Front Immunol* 9: 1936.
239. Cheung, K. L., R. Jarrett, S. Subramaniam, M. Salimi, D. Gutowska-Owsiak, Y. L. Chen, C. Hardman, L. Xue, V. Cerundolo, and G. Ogg. 2016. Psoriatic T cells recognize neolipid antigens generated by mast cell phospholipase delivered by exosomes and presented by CD1a. *J Exp Med* 213: 2399-2412.
240. Eidsmo, L., and E. Martini. 2018. Human Langerhans Cells with Pro-inflammatory Features Relocate within Psoriasis Lesions. *Front Immunol* 9: 300.

241. Lande, R., J. Gregorio, V. Facchinetti, B. Chatterjee, Y. H. Wang, B. Homey, W. Cao, Y. H. Wang, B. Su, F. O. Nestle, T. Zal, I. Mellman, J. M. Schroder, Y. J. Liu, and M. Gilliet. 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449: 564-569.
242. Di Cesare, A., P. Di Meglio, and F. O. Nestle. 2009. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 129: 1339-1350.
243. Cheng, J. B., A. J. Sedgewick, A. I. Finnegan, P. Harirchian, J. Lee, S. Kwon, M. S. Fassett, J. Golovato, M. Gray, R. Ghadially, W. Liao, B. E. Perez White, T. M. Mauro, T. Mully, E. A. Kim, H. Sbitany, I. M. Neuhaus, R. C. Grekin, S. S. Yu, J. W. Gray, E. Purdom, R. Paus, C. J. Vaske, S. C. Benz, J. S. Song, and R. J. Cho. 2018. Transcriptional Programming of Normal and Inflamed Human Epidermis at Single-Cell Resolution. *Cell Rep* 25: 871-883.
244. Singh, T. P., H. H. Zhang, I. Borek, P. Wolf, M. N. Hedrick, S. P. Singh, B. L. Kelsall, B. E. Clausen, and J. M. Farber. 2016. Monocyte-derived inflammatory Langerhans cells and dermal dendritic cells mediate psoriasis-like inflammation. *Nat Commun* 7: 13581.
245. Wang, Y., R. Edelmayer, J. Wetter, K. Salte, D. Gauvin, L. Leys, S. Paulsboe, Z. Su, I. Weinberg, M. Namovic, S. B. Gauld, P. Honore, V. E. Scott, and S. McGaraghty. 2019. Monocytes/Macrophages play a pathogenic role in IL-23 mediated psoriasis-like skin inflammation. *Sci Rep* 9: 5310.
246. Kim, J., and J. G. Krueger. 2015. The immunopathogenesis of psoriasis. *Dermatol Clin* 33: 13-23.
247. Weaver, C. T., R. D. Hatton, P. R. Mangan, and L. E. Harrington. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25: 821-852.
248. Albanesi, C., C. Scarponi, M. L. Giustizieri, and G. Girolomoni. 2005. Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4: 329-334.
249. Katayama, H. 2018. Development of psoriasis by continuous neutrophil infiltration into the epidermis. *Exp Dermatol* 27: 1084-1091.
250. Hijnen, D., E. F. Knol, Y. Y. Gent, B. Giovannone, S. J. Beijm, T. S. Kupper, C. A. Bruijnzeel-Koomen, and R. A. Clark. 2013. CD8(+) T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN-gamma, IL-13, IL-17, and IL-22. *J Invest Dermatol* 133: 973-979.
251. Dunphy, S., and C. M. Gardiner. 2011. NK cells and psoriasis. *J Biomed Biotechnol* 2011: 248317.
252. Werner, S., T. Krieg, and H. Smola. 2007. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* 127: 998-1008.
253. Heidenreich, R., M. Rocken, and K. Ghoreschi. 2009. Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. *Int J Exp Pathol* 90: 232-248.
254. Nestle, F. O., P. Di Meglio, J. Z. Qin, and B. J. Nickoloff. 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 679-691.
255. Schon, M. P., and W. H. Boehncke. 2005. Psoriasis. *N Engl J Med* 352: 1899-1912.
256. Nast, A., W. H. Boehncke, U. Mrowietz, H. M. Ockenfels, S. Philipp, K. Reich, T. Rosenbach, A. Sammain, M. Schlaeger, M. Sebastian, W. Sterry, V. Streit, M. Augustin, R. Erdmann, J. Klaus, J. Koza, S. Muller, H. D. Orzechowski, S. Rosumeck, G. Schmid-Ott, T. Weberschock, B. Rzany, G. Deutsche Dermatologische, and D. Berufsverband Deutscher. 2012. S3 - Guidelines on the treatment of psoriasis vulgaris (English version). Update. *J Dtsch Dermatol Ges* 10 Suppl 2: S1-95.
257. Papp, K. A., R. Kaufmann, D. Thaci, C. Hu, D. Sutherland, and P. Rohane. 2013. Efficacy and safety of apremilast in subjects with moderate to severe plaque psoriasis: results from a phase II, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, dose-comparison study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 27: e376-383.
258. Gaspari, A. A., and S. Tying. 2015. New and emerging biologic therapies for moderate-to-severe plaque psoriasis: mechanistic rationales and recent clinical data for IL-17 and IL-23 inhibitors. *Dermatol Ther* 28: 179-193.
259. Nakajima, K., and S. Sano. 2018. Mouse models of psoriasis and their relevance. *J Dermatol* 45: 252-263.
260. Swindell, W. R., A. Johnston, S. Carbajal, G. Han, C. Wohn, J. Lu, X. Xing, R. P. Nair, J. J. Voorhees, J. T. Elder, X. J. Wang, S. Sano, E. P. Prens, J. DiGiovanni, M. R. Pittelkow, N. L. Ward, and J. E.

- Gudjonsson. 2011. Genome-wide expression profiling of five mouse models identifies similarities and differences with human psoriasis. *PLoS One* 6: e18266.
261. van der Fits, L., S. Mourits, J. S. Voerman, M. Kant, L. Boon, J. D. Laman, F. Cornelissen, A. M. Mus, E. Florencia, E. P. Prens, and E. Lubberts. 2009. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* 182: 5836-5845.
 262. Chamcheu, J. C., M. I. Chaves-Rodriguez, V. M. Adhami, I. A. Siddiqui, G. S. Wood, B. J. Longley, and H. Mukhtar. 2016. Upregulation of PI3K/AKT/mTOR, FABP5 and PPARbeta/delta in Human Psoriasis and Imiquimod-induced Murine Psoriasiform Dermatitis Model. *Acta Derm Venereol* 96: 854-856.
 263. Grine, L., L. Dejager, C. Libert, and R. E. Vandenbroucke. 2015. Dual Inhibition of TNFR1 and IFNAR1 in Imiquimod-Induced Psoriasiform Skin Inflammation in Mice. *J Immunol* 194: 5094-5102.
 264. Ha, H. L., H. Wang, P. Pisitkun, J. C. Kim, I. Tassi, W. Tang, M. I. Morasso, M. C. Udey, and U. Siebenlist. 2014. IL-17 drives psoriatic inflammation via distinct, target cell-specific mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E3422-3431.
 265. Vinter, H., K. Kragballe, T. Steiniche, M. Gaestel, L. Iversen, and C. Johansen. 2016. Tumour necrosis factor-alpha plays a significant role in the Aldara-induced skin inflammation in mice. *Br J Dermatol* 174: 1011-1021.
 266. Nerurkar, L., A. McColl, G. Graham, and J. Cavanagh. 2017. The Systemic Response to Topical Aldara Treatment is Mediated Through Direct TLR7 Stimulation as Imiquimod Enters the Circulation. *Sci Rep* 7: 16570.
 267. Moore, B. W., and D. McGregor. 1965. Chromatographic and Electrophoretic Fractionation of Soluble Proteins of Brain and Liver. *J Biol Chem* 240: 1647-1653.
 268. Moore, B. W. 1965. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 19: 739-744.
 269. Isobe, T., and T. Okuyama. 1978. The amino-acid sequence of S-100 protein (PAP I-b protein) and its relation to the calcium-binding proteins. *Eur J Biochem* 89: 379-388.
 270. Isobe, T., and T. Okuyama. 1981. The amino-acid sequence of the alpha subunit in bovine brain S-100a protein. *Eur J Biochem* 116: 79-86.
 271. Cocchia, D., F. Michetti, and R. Donato. 1981. Immunochemical and immuno-cytochemical localization of S-100 antigen in normal human skin. *Nature* 294: 85-87.
 272. Morgan, R. O., S. Martin-Almedina, M. Garcia, J. Jhoncon-Kooyip, and M. P. Fernandez. 2006. Deciphering function and mechanism of calcium-binding proteins from their evolutionary imprints. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1238-1249.
 273. Donato, R., B. R. Cannon, G. Sorci, F. Riuzzi, K. Hsu, D. J. Weber, and C. L. Geczy. 2013. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med* 13: 24-57.
 274. Donato, R. 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 637-668.
 275. Marenholz, I., C. W. Heizmann, and G. Fritz. 2004. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* 322: 1111-1122.
 276. Zimmer, D. B., J. O. Eubanks, D. Ramakrishnan, and M. F. Criscitiello. 2013. Evolution of the S100 family of calcium sensor proteins. *Cell Calcium* 53: 170-179.
 277. Ji, Y. F., H. Huang, F. Jiang, R. Z. Ni, and M. B. Xiao. 2014. S100 family signaling network and related proteins in pancreatic cancer (Review). *Int J Mol Med* 33: 769-776.
 278. Maler, L., M. Sastry, and W. J. Chazin. 2002. A structural basis for S100 protein specificity derived from comparative analysis of apo and Ca(2+)-calyculin. *J Mol Biol* 317: 279-290.
 279. Hilt D.C., K. D. 1991. Novel Calcium-Binding Proteins. H. C. W. (eds), ed. Springer, Berlin, Heidelberg.
 280. Brodersen, D. E., J. Nyborg, and M. Kjeldgaard. 1999. Zinc-binding site of an S100 protein revealed. Two crystal structures of Ca2+-bound human psoriasin (S100A7) in the Zn2+-loaded and Zn2+-free states. *Biochemistry* 38: 1695-1704.

281. Moroz, O. V., A. A. Antson, S. J. Grist, N. J. Maitland, G. G. Dodson, K. S. Wilson, E. Lukanidin, and I. B. Bronstein. 2003. Structure of the human S100A12-copper complex: implications for host-parasite defence. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59: 859-867.
282. 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, R. M. Caprioli, W. Nacken, W. J. Chazin, and E. P. Skaar. 2008. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science* 319: 962-965.
283. Nakashige, T. G., S. E. J. Bowman, E. M. Zygiel, C. L. Drennan, and E. M. Nolan. 2018. Biophysical Examination of the Calcium-Modulated Nickel-Binding Properties of Human Calprotectin Reveals Conformational Change in the EF-Hand Domains and His3Asp Site. *Biochemistry* 57: 4155-4164.
284. Itou, H., M. Yao, I. Fujita, N. Watanabe, M. Suzuki, J. Nishihira, and I. Tanaka. 2002. The crystal structure of human MRP14 (S100A9), a Ca(2+)-dependent regulator protein in inflammatory process. *J Mol Biol* 316: 265-276.
285. Moroz, O. V., A. A. Antson, E. J. Dodson, H. J. Burrell, S. J. Grist, R. M. Lloyd, N. J. Maitland, G. G. Dodson, K. S. Wilson, E. Lukanidin, and I. B. Bronstein. 2002. The structure of S100A12 in a hexameric form and its proposed role in receptor signalling. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58: 407-413.
286. Wang, C., I. A. Iashchishyn, J. Pansieri, S. Nystrom, O. Klementieva, J. Kara, I. Horvath, R. Moskalenko, R. Rofougaran, G. Gouras, G. G. Kovacs, S. K. Shankar, and L. A. Morozova-Roche. 2018. S100A9-Driven Amyloid-Neuroinflammatory Cascade in Traumatic Brain Injury as a Precursor State for Alzheimer's Disease. *Sci Rep* 8: 12836.
287. Vogl, T., A. Stratis, V. Wixler, T. Voller, S. Thurainayagam, S. K. Jorch, S. Zenker, A. Dreiling, D. Chakraborty, M. Frohling, P. Paruzel, C. Wehmeyer, S. Hermann, O. Papantonopoulou, C. Geyer, K. Loser, M. Schafers, S. Ludwig, M. Stoll, T. Leanderson, J. L. Schultze, S. Konig, T. Pap, and J. Roth. 2018. Autoinhibitory regulation of S100A8/S100A9 alarmin activity locally restricts sterile inflammation. *J Clin Invest* 128: 1852-1866.
288. Hermann, A., R. Donato, T. M. Weiger, and W. J. Chazin. 2012. S100 calcium binding proteins and ion channels. *Front Pharmacol* 3: 67.
289. Chen, M., M. Sinha, B. A. Luxon, A. R. Bresnick, and K. L. O'Connor. 2009. Integrin alpha6beta4 controls the expression of genes associated with cell motility, invasion, and metastasis, including S100A4/metastasin. *J Biol Chem* 284: 1484-1494.
290. Riuzzi, F., G. Sorci, and R. Donato. 2011. S100B protein regulates myoblast proliferation and differentiation by activating FGFR1 in a bFGF-dependent manner. *J Cell Sci* 124: 2389-2400.
291. Cheng, P., C. A. Corzo, N. Luetkeke, B. Yu, S. Nagaraj, M. M. Bui, M. Ortiz, W. Nacken, C. Sorg, T. Vogl, J. Roth, and D. I. Gabrilovich. 2008. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med* 205: 2235-2249.
292. Tsoporis, J. N., F. Mohammadzadeh, and T. G. Parker. 2010. Intracellular and Extracellular Effects of S100B in the Cardiovascular Response to Disease. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2010: 206073.
293. Tsoporis, J. N., S. Izhar, and T. G. Parker. 2008. Expression of S100A6 in cardiac myocytes limits apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 283: 30174-30183.
294. Ma, L., P. Sun, J. C. Zhang, Q. Zhang, and S. L. Yao. 2017. Proinflammatory effects of S100A8/A9 via TLR4 and RAGE signaling pathways in BV-2 microglial cells. *Int J Mol Med* 40: 31-38.
295. Gogl, G., A. Alexa, B. Kiss, G. Katona, M. Kovacs, A. Bodor, A. Remenyi, and L. Nyitray. 2016. Structural Basis of Ribosomal S6 Kinase 1 (RSK1) Inhibition by S100B Protein: MODULATION OF THE EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE (ERK) SIGNALING CASCADE IN A CALCIUM-DEPENDENT WAY. *J Biol Chem* 291: 11-27.
296. Kriajevska, M. V., M. N. Cardenas, M. S. Grigorian, N. S. Ambartsumian, G. P. Georgiev, and E. M. Lukanidin. 1994. Non-muscle myosin heavy chain as a possible target for protein encoded by metastasis-related mts-1 gene. *J Biol Chem* 269: 19679-19682.

297. Takenaga, K., Y. Nakamura, S. Sakiyama, Y. Hasegawa, K. Sato, and H. Endo. 1994. Binding of pEL98 protein, an S100-related calcium-binding protein, to nonmuscle tropomyosin. *J Cell Biol* 124: 757-768.
298. Leclerc, E., G. Fritz, S. W. Vetter, and C. W. Heizmann. 2009. Binding of S100 proteins to RAGE: an update. *Biochim Biophys Acta* 1793: 993-1007.
299. 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.
300. Foell, D., H. Wittkowski, C. Kessel, A. Luken, T. Weinlage, G. Varga, T. Vogl, T. Wirth, D. Viemann, P. Bjork, M. A. van Zoelen, F. Gohar, G. Srikrishna, M. Kraft, and J. Roth. 2013. Proinflammatory S100A12 can activate human monocytes via Toll-like receptor 4. *Am J Respir Crit Care Med* 187: 1324-1334.
301. Cerezo, L. A., M. Remakova, M. Tomcik, S. Gay, M. Neidhart, E. Lukanidin, K. Pavelka, M. Grigorian, J. Vencovsky, and L. Senolt. 2014. The metastasis-associated protein S100A4 promotes the inflammatory response of mononuclear cells via the TLR4 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 53: 1520-1526.
302. Fernandez-Fernandez, M. R., T. J. Rutherford, and A. R. Fersht. 2008. Members of the S100 family bind p53 in two distinct ways. *Protein Sci* 17: 1663-1670.
303. Schonhaler, H. B., J. Guinea-Viniegra, S. K. Wculek, I. Ruppen, P. Ximenez-Embun, A. Guio-Carrion, R. Navarro, N. Hogg, K. Ashman, and E. F. Wagner. 2013. S100A8-S100A9 protein complex mediates psoriasis by regulating the expression of complement factor C3. *Immunity* 39: 1171-1181.
304. Steiner, J., B. Bogerts, M. L. Schroeter, and H. G. Bernstein. 2011. S100B protein in neurodegenerative disorders. *Clin Chem Lab Med* 49: 409-424.
305. Ebrahimi, E., S. Kheirouri, and M. Alizadeh. 2017. Down-regulation of S100A1 protein in patients with metabolic syndrome and its association with zinc-alpha2-glycoprotein. *Scott Med J* 62: 88-95.
306. Yamaoka, M., N. Maeda, S. Nakamura, T. Mori, K. Inoue, K. Matsuda, R. Sekimoto, S. Kashine, Y. Nakagawa, Y. Tsushima, Y. Fujishima, N. Komura, A. Hirata, H. Nishizawa, Y. Matsuzawa, K. Matsubara, T. Funahashi, and I. Shimomura. 2013. Gene expression levels of S100 protein family in blood cells are associated with insulin resistance and inflammation (Peripheral blood S100 mRNAs and metabolic syndrome). *Biochem Biophys Res Commun* 433: 450-455.
307. Bresnick, A. R., D. J. Weber, and D. B. Zimmer. 2015. S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 15: 96-109.
308. Yammani, R. R. 2012. S100 proteins in cartilage: role in arthritis. *Biochim Biophys Acta* 1822: 600-606.
309. Foell, D., and J. Roth. 2004. Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 50: 3762-3771.
310. Harpio, R., and R. Einarsson. 2004. S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. *Clin Biochem* 37: 512-518.
311. Abildtrup, M., G. H. Kingsley, and D. L. Scott. 2015. Calprotectin as a biomarker for rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol* 42: 760-770.
312. Konikoff, M. R., and L. A. Denson. 2006. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 12: 524-534.
313. Fuellen, G., W. Nacken, C. Sorg, and C. Kerkhoff. 2004. Computational searches for missing orthologs: the case of S100A12 in mice. *OMICS* 8: 334-340.
314. Ilg, E. C., H. Troxler, D. M. Burgisser, T. Kuster, M. Markert, F. Guignard, P. Hunziker, N. Birchler, and C. W. Heizmann. 1996. Amino acid sequence determination of human S100A12 (P6, calgranulin C, CGRP, CAAF1) by tandem mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 225: 146-150.
315. Ravasi, T., K. Hsu, J. Goyette, K. Schroder, Z. Yang, F. Rahimi, L. P. Miranda, P. F. Alewood, D. A. Hume, and C. Geczy. 2004. Probing the S100 protein family through genomic and functional analysis. *Genomics* 84: 10-22.

316. Vogl, T., A. L. Gharibyan, and L. A. Morozova-Roche. 2012. Pro-inflammatory S100A8 and S100A9 proteins: self-assembly into multifunctional native and amyloid complexes. *Int J Mol Sci* 13: 2893-2917.
317. van den Bos, C., J. Roth, H. G. Koch, M. Hartmann, and C. Sorg. 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: 1247-1254.
318. Lim, S. Y., M. J. Raftery, J. Goyette, and C. L. Geczy. 2010. S-glutathionylation regulates inflammatory activities of S100A9. *J Biol Chem* 285: 14377-14388.
319. Proper, C., X. Huang, J. Roth, C. Sorg, and W. Nacken. 1999. Analysis of the MRP8-MRP14 protein-protein interaction by the two-hybrid system suggests a prominent role of the C-terminal domain of S100 proteins in dimer formation. *J Biol Chem* 274: 183-188.
320. Raftery, M. J., C. A. Harrison, P. Alewood, A. Jones, and C. L. Geczy. 1996. Isolation of the murine S100 protein MRP14 (14 kDa migration-inhibitory-factor-related protein) from activated spleen cells: characterization of post-translational modifications and zinc binding. *Biochem J* 316 (Pt 1): 285-293.
321. Nacken, W., C. Sopalla, C. Proper, C. Sorg, and C. Kerkhoff. 2000. Biochemical characterization of the murine S100A9 (MRP14) protein suggests that it is functionally equivalent to its human counterpart despite its low degree of sequence homology. *Eur J Biochem* 267: 560-565.
322. Lagasse, E., and I. L. Weissman. 1992. Mouse MRP8 and MRP14, two intracellular calcium-binding proteins associated with the development of the myeloid lineage. *Blood* 79: 1907-1915.
323. Hunter, M. J., and W. J. Chazin. 1998. High level expression and dimer characterization of the S100 EF-hand proteins, migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14. *J Biol Chem* 273: 12427-12435.
324. Leukert, N., C. Sorg, and J. Roth. 2005. Molecular basis of the complex formation between the two calcium-binding proteins S100A8 (MRP8) and S100A9 (MRP14). *Biol Chem* 386: 429-434.
325. Ishikawa, K., A. Nakagawa, I. Tanaka, M. Suzuki, and J. Nishihira. 2000. The structure of human MRP8, a member of the S100 calcium-binding protein family, by MAD phasing at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56: 559-566.
326. Lin, H., G. R. Andersen, and L. Yafine. 2016. Crystal structure of human S100A8 in complex with zinc and calcium. *BMC Struct Biol* 16: 8.
327. Strupat, K., H. Rogniaux, A. Van Dorsselaer, J. Roth, and T. Vogl. 2000. Calcium-induced noncovalently linked tetramers of MRP8 and MRP14 are confirmed by electrospray ionization-mass analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* 11: 780-788.
328. Vogl, T., J. Roth, C. Sorg, F. Hillenkamp, and K. Strupat. 1999. Calcium-induced noncovalently linked tetramers of MRP8 and MRP14 detected by ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 10: 1124-1130.
329. Riva, M., Z. He, E. Kallberg, F. Ivars, and T. Leanderson. 2013. Human S100A9 protein is stabilized by inflammatory stimuli via the formation of proteolytically-resistant homodimers. *PLoS One* 8: e61832.
330. Lackmann, M., P. Rajasekariah, S. E. Iismaa, G. Jones, C. J. Cornish, S. Hu, R. J. Simpson, R. L. Moritz, and C. L. Geczy. 1993. Identification of a chemotactic domain of the pro-inflammatory S100 protein CP-10. *J Immunol* 150: 2981-2991.
331. Hsu, K., C. Champaiboon, B. D. Guenther, B. S. Sorenson, A. Khammanivong, K. F. Ross, C. L. Geczy, and M. C. Herzberg. 2009. Anti-Infective Protective Properties of S100 Calgranulins. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 8: 290-305.
332. Stephan, J. R., and E. M. Nolan. 2016. Calcium-induced Tetramerization and Zinc Chelation Shield Human Calprotectin from Degradation by Host and Bacterial Extracellular Proteases. *Chem Sci* 7: 1962-1975.
333. Lim, S. Y., M. Raftery, H. Cai, K. Hsu, W. X. Yan, H. L. Hsieh, R. N. Watts, D. Richardson, S. Thomas, M. Perry, and C. L. Geczy. 2008. S-nitrosylated S100A8: novel anti-inflammatory properties. *J Immunol* 181: 5627-5636.

334. Jia, J., A. Arif, F. Terenzi, B. Willard, E. F. Plow, S. L. Hazen, and P. L. Fox. 2014. Target-selective protein S-nitrosylation by sequence motif recognition. *Cell* 159: 623-634.
335. Harrison, C. A., M. J. Raftery, J. Walsh, P. Alewood, S. E. Iismaa, S. Thliveris, and C. L. Geczy. 1999. Oxidation regulates the inflammatory properties of the murine S100 protein S100A8. *J Biol Chem* 274: 8561-8569.
336. Raftery, M. J., Z. Yang, S. M. Valenzuela, and C. L. Geczy. 2001. Novel intra- and inter-molecular sulfinamide bonds in S100A8 produced by hypochlorite oxidation. *J Biol Chem* 276: 33393-33401.
337. Lominadze, G., M. J. Rane, M. Merchant, J. Cai, R. A. Ward, and K. R. McLeish. 2005. Myeloid-related protein-14 is a p38 MAPK substrate in human neutrophils. *J Immunol* 174: 7257-7267.
338. Vogl, T., S. Ludwig, M. Goebeler, A. Strey, I. S. Thorey, R. Reichelt, D. Foell, V. Gerke, M. P. Manitz, W. Nacken, S. Werner, C. Sorg, and J. Roth. 2004. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood* 104: 4260-4268.
339. Schenten, V., S. Brechard, S. Plancon, C. Melchior, J. P. Fripiat, and E. J. Tschirhart. 2010. iPLA2, a novel determinant in Ca²⁺- and phosphorylation-dependent S100A8/A9 regulated NOX2 activity. *Biochim Biophys Acta* 1803: 840-847.
340. Schenten, V., S. Plancon, N. Jung, J. Hann, J. L. Bueb, S. Brechard, E. J. Tschirhart, and F. Tolle. 2018. Secretion of the Phosphorylated Form of S100A9 from Neutrophils Is Essential for the Proinflammatory Functions of Extracellular S100A8/A9. *Front Immunol* 9: 447.
341. Stephan, J. R., F. Yu, R. M. Costello, B. S. Bleier, and E. M. Nolan. 2018. Oxidative Post-translational Modifications Accelerate Proteolytic Degradation of Calprotectin. *J Am Chem Soc* 140: 17444-17455.
342. Hoskin, T. S., J. M. Crowther, J. Cheung, M. J. Epton, P. D. Sly, P. A. Elder, R. C. J. Dobson, A. J. Kettle, and N. Dickerhof. 2019. Oxidative cross-linking of calprotectin occurs in vivo, altering its structure and susceptibility to proteolysis. *Redox Biol* 24: 101202.
343. Fujita, Y., A. Khateb, Y. Li, R. Tinoco, T. Zhang, H. Bar-Yoseph, M. A. Tam, Y. Chowers, E. Sabo, S. Gerassy-Vainberg, E. Starosvetsky, B. James, K. Brown, S. S. Shen-Orr, L. M. Bradley, P. A. Tessier, and Z. A. Ronai. 2018. Regulation of S100A8 Stability by RNF5 in Intestinal Epithelial Cells Determines Intestinal Inflammation and Severity of Colitis. *Cell Rep* 24: 3296-3311 e3296.
344. Baker, J. R., R. Jeffery, R. D. May, M. Mathies, B. Spencer-Dene, R. Poulsom, and N. Hogg. 2011. Distinct roles for S100a8 in early embryo development and in the maternal deciduum. *Dev Dyn* 240: 2194-2203.
345. Manitz, M. P., B. Horst, S. Seeliger, A. Strey, B. V. Skryabin, M. Gunzer, W. Frings, F. Schonlau, J. Roth, C. Sorg, and W. Nacken. 2003. Loss of S100A9 (MRP14) results in reduced interleukin-8-induced CD11b surface expression, a polarized microfilament system, and diminished responsiveness to chemoattractants in vitro. *Mol Cell Biol* 23: 1034-1043.
346. Hobbs, J. A., R. May, K. Tanousis, E. McNeill, M. Mathies, C. Gebhardt, R. Henderson, M. J. Robinson, and N. Hogg. 2003. Myeloid cell function in MRP-14 (S100A9) null mice. *Mol Cell Biol* 23: 2564-2576.
347. 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.
348. Zreiqat, H., C. R. Howlett, S. Gronthos, D. Hume, and C. L. Geczy. 2007. S100A8/S100A9 and their association with cartilage and bone. *J Mol Histol* 38: 381-391.
349. Averill, M. M., S. Barnhart, L. Becker, X. Li, J. W. Heinecke, R. C. Leboeuf, J. A. Hamerman, C. Sorg, C. Kerkhoff, and K. E. Bornfeldt. 2011. S100A9 differentially modifies phenotypic states of neutrophils, macrophages, and dendritic cells: implications for atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circulation* 123: 1216-1226.
350. Kerkhoff, C., H. A. Hofmann, J. Vormoor, H. Melkonyan, J. Roth, C. Sorg, and M. Klempt. 2002. Binding of two nuclear complexes to a novel regulatory element within the human S100A9 promoter drives the S100A9 gene expression. *J Biol Chem* 277: 41879-41887.
351. Hu, S. P., C. Harrison, K. Xu, C. J. Cornish, and C. L. Geczy. 1996. Induction of the chemotactic S100 protein, CP-10, in monocyte/macrophages by lipopolysaccharide. *Blood* 87: 3919-3928.

352. Xu, K., and C. L. Geczy. 2000. IFN-gamma and TNF regulate macrophage expression of the chemotactic S100 protein S100A8. *J Immunol* 164: 4916-4923.
353. Xu, K., T. Yen, and C. L. Geczy. 2001. IL-10 up-regulates macrophage expression of the S100 protein S100A8. *J Immunol* 166: 6358-6366.
354. 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.
355. Hsu, K., Y. M. Chung, Y. Endoh, and C. L. Geczy. 2014. TLR9 ligands induce S100A8 in macrophages via a STAT3-dependent pathway which requires IL-10 and PGE2. *PLoS One* 9: e103629.
356. Kumar, A., A. Steinkasserer, and S. Berchtold. 2003. Interleukin-10 influences the expression of MRP8 and MRP14 in human dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol* 132: 40-47.
357. Miao, L., S. Grebhardt, J. Shi, I. Peipe, J. Zhang, and D. Mayer. 2012. Prostaglandin E2 stimulates S100A8 expression by activating protein kinase A and CCAAT/enhancer-binding-protein-beta in prostate cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 1919-1928.
358. Zhong, A., W. Xu, J. Zhao, P. Xie, S. Jia, J. Sun, R. D. Galiano, T. A. Mustoe, and S. J. Hong. 2016. S100A8 and S100A9 Are Induced by Decreased Hydration in the Epidermis and Promote Fibroblast Activation and Fibrosis in the Dermis. *Am J Pathol* 186: 109-122.
359. Qin, M., Y. Zou, K. Zhong, Y. Guo, and X. Zou. 2019. Expression of S100A8 is induced by interleukin1alpha in TR146 epithelial cells through a mechanism involving CCAAT/enhancer binding protein beta. *Mol Med Rep* 19: 2413-2420.
360. Grimbaldston, M. A., C. L. Geczy, N. Tedla, J. J. Finlay-Jones, and P. H. Hart. 2003. S100A8 induction in keratinocytes by ultraviolet A irradiation is dependent on reactive oxygen intermediates. *J Invest Dermatol* 121: 1168-1174.
361. 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.
362. Rahimi, F., K. Hsu, Y. Endoh, and C. L. Geczy. 2005. FGF-2, IL-1beta and TGF-beta regulate fibroblast expression of S100A8. *FEBS J* 272: 2811-2827.
363. Kerkhoff, C., C. Sorg, N. N. Tandon, and W. Nacken. 2001. Interaction of S100A8/S100A9-arachidonic acid complexes with the scavenger receptor CD36 may facilitate fatty acid uptake by endothelial cells. *Biochemistry* 40: 241-248.
364. Benedyk, M., C. Sopalla, W. Nacken, G. Bode, H. Melkonyan, B. Banfi, and C. Kerkhoff. 2007. HaCaT keratinocytes overexpressing the S100 proteins S100A8 and S100A9 show increased NADPH oxidase and NF-kappaB activities. *J Invest Dermatol* 127: 2001-2011.
365. Kerkhoff, C., M. Klempt, V. Kaefer, and C. Sorg. 1999. The two calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, are involved in the metabolism of arachidonic acid in human neutrophils. *J Biol Chem* 274: 32672-32679.
366. Sopalla, C., N. Leukert, C. Sorg, and C. Kerkhoff. 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: 1895-1905.
367. 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.
368. Clark, R. A., B. D. Volpp, K. G. Leidal, and W. M. Nauseef. 1990. Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *J Clin Invest* 85: 714-721.
369. Doussiere, J., F. Bouzidi, and P. V. Vignais. 2002. The S100A8/A9 protein as a partner for the cytosolic factors of NADPH oxidase activation in neutrophils. *Eur J Biochem* 269: 3246-3255.
370. Berthier, S., M. H. Paclet, S. Lerouge, F. Roux, S. Vergnaud, A. W. Coleman, and F. Morel. 2003. Changing the conformation state of cytochrome b558 initiates NADPH oxidase activation: MRP8/MRP14 regulation. *J Biol Chem* 278: 25499-25508.

371. Berthier, S., M. V. Nguyen, A. Baillet, M. A. Hograindeur, M. H. Paclet, B. Polack, and F. Morel. 2012. Molecular interface of S100A8 with cytochrome b558 and NADPH oxidase activation. *PLoS One* 7: e40277.
372. Wang, R., and M. G. Brattain. 2007. The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. *FEBS Lett* 581: 3164-3170.
373. Funk, S., R. Mark, P. Bayo, C. Flechtenmacher, N. Grabe, P. Angel, P. K. Plinkert, and J. Hess. 2015. High S100A8 and S100A12 protein expression is a favorable prognostic factor for survival of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 136: 2037-2046.
374. Dai, J., A. Kumbhare, D. Youssef, C. E. McCall, and M. El Gazzar. 2017. Intracellular S100A9 Promotes Myeloid-Derived Suppressor Cells during Late Sepsis. *Front Immunol* 8: 1565.
375. Tardif, M. R., J. A. Chapeton-Montes, A. Posvanzic, N. Page, C. Gilbert, and P. A. Tessier. 2015. Secretion of S100A8, S100A9, and S100A12 by Neutrophils Involves Reactive Oxygen Species and Potassium Efflux. *J Immunol Res* 2015: 296149.
376. Voganatsi, A., A. Panyutich, K. T. Miyasaki, and R. K. Murthy. 2001. Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex. *J Leukoc Biol* 70: 130-134.
377. Ryckman, C., C. Gilbert, R. de Medicis, A. Lussier, K. Vandal, and P. A. Tessier. 2004. Monosodium urate monohydrate crystals induce the release of the proinflammatory protein S100A8/A9 from neutrophils. *J Leukoc Biol* 76: 433-440.
378. Rammes, A., J. Roth, M. Goebeler, M. Klempt, M. Hartmann, and C. Sorg. 1997. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J Biol Chem* 272: 9496-9502.
379. Diercks, B. P., I. Hauschildt, F. Stab, H. Wenck, O. Doring, and N. Peters. 2013. IL-10 promotes secretion of S100A8/A9 from human monocytes through an inclusion in plasma membranes. *Scand J Immunol* 77: 169-170.
380. Chakraborty, P., P. Bjork, E. Kallberg, A. Olsson, M. Riva, M. Morgelin, D. Liberg, F. Ivars, and T. Leanderson. 2015. Vesicular Location and Transport of S100A8 and S100A9 Proteins in Monocytoid Cells. *PLoS One* 10: e0145217.
381. Foell, D., H. Wittkowski, and J. Roth. 2007. Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3: 382-390.
382. Donato, R. 2007. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Curr Mol Med* 7: 711-724.
383. Jin, M. S., and J. O. Lee. 2008. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* 29: 182-191.
384. Yu, L., L. Wang, and S. Chen. 2010. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med* 14: 2592-2603.
385. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301: 640-643.
386. Schiopu, A., and O. S. Cotoi. 2013. S100A8 and S100A9: DAMPs at the crossroads between innate immunity, traditional risk factors, and cardiovascular disease. *Mediators Inflamm* 2013: 828354.
387. Fassl, S. K., J. Austerlmann, O. Papantonopoulou, M. Riemenschneider, J. Xue, D. Bertheloot, N. Freise, C. Spiekermann, A. Witten, D. Viemann, S. Kirschnek, M. Stoll, E. Latz, J. L. Schultze, J. Roth, and T. Vogl. 2015. Transcriptome assessment reveals a dominant role for TLR4 in the activation of human monocytes by the alarmin MRP8. *J Immunol* 194: 575-583.
388. He, Z., M. Riva, P. Bjork, K. Sward, M. Morgelin, T. Leanderson, and F. Ivars. 2016. CD14 Is a Co-Receptor for TLR4 in the S100A9-Induced Pro-Inflammatory Response in Monocytes. *PLoS One* 11: e0156377.
389. Riva, M., E. Kallberg, P. Bjork, D. Hancz, T. Vogl, J. Roth, F. Ivars, and T. Leanderson. 2012. Induction of nuclear factor-kappaB responses by the S100A9 protein is Toll-like receptor-4-dependent. *Immunology* 137: 172-182.

390. Laouedj, M., M. R. Tardif, L. Gil, M. A. Raquil, A. Lachhab, M. Pelletier, P. A. Tessier, and F. Barabe. 2017. S100A9 induces differentiation of acute myeloid leukemia cells through TLR4. *Blood* 129: 1980-1990.
391. Foell, D., N. Wulffraat, L. R. Wedderburn, H. Wittkowski, M. Frosch, J. Gerst, V. Stanevich, D. Mihaylova, V. Ferriani, F. K. Tsakalidou, I. Foeldvari, R. Cuttica, B. Gonzalez, A. Ravelli, R. Khubchandani, S. Oliveira, W. Armbrust, S. Garay, J. Vojinovic, X. Norambuena, M. L. Gamir, J. Garcia-Consuegra, L. Lepore, G. Susic, F. Corona, P. Dolezalova, A. Pistorio, A. Martini, N. Ruperto, J. Roth, and O. Paediatric Rheumatology International Trials. 2010. Methotrexate withdrawal at 6 vs 12 months in juvenile idiopathic arthritis in remission: a randomized clinical trial. *JAMA* 303: 1266-1273.
392. Kostakis, I. D., K. G. Cholidou, A. G. Vaiopoulos, I. S. Vlachos, D. Perrea, and G. Vaos. 2013. Fecal calprotectin in pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review. *Dig Dis Sci* 58: 309-319.
393. Kalea, A. Z., N. Reiniger, H. Yang, M. Arriero, A. M. Schmidt, and B. I. Hudson. 2009. Alternative splicing of the murine receptor for advanced glycation end-products (RAGE) gene. *FASEB J* 23: 1766-1774.
394. Lee, E. J., and J. H. Park. 2013. Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE), Its Ligands, and Soluble RAGE: Potential Biomarkers for Diagnosis and Therapeutic Targets for Human Renal Diseases. *Genomics Inform* 11: 224-229.
395. Gugliucci, A., and T. Menini. 2014. The axis AGE-RAGE-soluble RAGE and oxidative stress in chronic kidney disease. *Adv Exp Med Biol* 824: 191-208.
396. Sims, G. P., D. C. Rowe, S. T. Rietdijk, R. Herbst, and A. J. Coyle. 2010. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 28: 367-388.
397. Eggers, K., K. Sikora, M. Lorenz, T. Taubert, M. Moobed, G. Baumann, K. Stangl, and V. Stangl. 2011. RAGE-dependent regulation of calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 in human THP-1. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 119: 353-357.
398. Ehlermann, P., K. Eggers, A. Bierhaus, P. Most, D. Weichenhan, J. Greten, P. P. Nawroth, H. A. Katus, and A. Remppis. 2006. Increased proinflammatory endothelial response to S100A8/A9 after preactivation through advanced glycation end products. *Cardiovasc Diabetol* 5: 6.
399. Wang, S., R. Song, Z. Wang, Z. Jing, S. Wang, and J. Ma. 2018. S100A8/A9 in Inflammation. *Front Immunol* 9: 1298.
400. Abumrad, N. A., M. R. el-Maghrabi, E. Z. Amri, E. Lopez, and P. A. Grimaldi. 1993. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem* 268: 17665-17668.
401. Tontonoz, P., and L. Nagy. 1999. Regulation of macrophage gene expression by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma: implications for cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 10: 485-490.
402. Rader, D. J., and K. A. Dugi. 2000. The endothelium and lipoproteins: insights from recent cell biology and animal studies. *Semin Thromb Hemost* 26: 521-528.
403. Wang, Y., C. Fang, H. Gao, M. L. Bilodeau, Z. Zhang, K. Croce, S. Liu, T. Morooka, M. Sakuma, K. Nakajima, S. Yoneda, C. Shi, D. Zidar, P. Andre, G. Stephens, R. L. Silverstein, N. Hogg, A. H. Schmaier, and D. I. Simon. 2014. Platelet-derived S100 family member myeloid-related protein-14 regulates thrombosis. *J Clin Invest* 124: 2160-2171.
404. Crocker, P. R., J. C. Paulson, and A. Varki. 2007. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 7: 255-266.
405. Chen, X., E. A. Eksioglu, J. Zhou, L. Zhang, J. Djeu, N. Fortenbery, P. Epling-Burnette, S. Van Bijnen, H. Dolstra, J. Cannon, J. I. Youn, S. S. Donatelli, D. Qin, T. De Witte, J. Tao, H. Wang, P. Cheng, D. I. Gabrilovich, A. List, and S. Wei. 2013. Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest* 123: 4595-4611.
406. Hibino, T., M. Sakaguchi, S. Miyamoto, M. Yamamoto, A. Motoyama, J. Hosoi, T. Shimokata, T. Ito, R. Tsuboi, and N. H. Huh. 2013. S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cancer Res* 73: 172-183.

407. Sakaguchi, M., M. Yamamoto, M. Miyai, T. Maeda, J. Hiruma, H. Murata, R. Kinoshita, I. M. Winarsa Ruma, E. W. Putranto, Y. Inoue, S. Morizane, N. H. Huh, R. Tsuboi, and T. Hibino. 2016. Identification of an S100A8 Receptor Neuroplastin-beta and its Heterodimer Formation with EMMPRIN. *J Invest Dermatol* 136: 2240-2250.
408. Kehl-Fie, T. E., S. Chitayat, M. I. Hood, S. Damo, N. Restrepo, C. Garcia, K. A. Munro, W. J. Chazin, and E. P. Skaar. 2011. Nutrient metal sequestration by calprotectin inhibits bacterial superoxide defense, enhancing neutrophil killing of *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe* 10: 158-164.
409. Bianchi, M., M. J. Niemiec, U. Siler, C. F. Urban, and J. Reichenbach. 2011. Restoration of anti-*Aspergillus* defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *J Allergy Clin Immunol* 127: 1243-1252 e1247.
410. Besold, A. N., E. M. Culbertson, L. Nam, R. P. Hobbs, A. Boyko, C. N. Maxwell, W. J. Chazin, A. R. Marques, and V. C. Culotta. 2018. Antimicrobial action of calprotectin that does not involve metal withholding. *Metallomics* 10: 1728-1742.
411. Sorenson, B. S., A. Khammanivong, B. D. Guenther, K. F. Ross, and M. C. Herzberg. 2012. IL-1 receptor regulates S100A8/A9-dependent keratinocyte resistance to bacterial invasion. *Mucosal Immunol* 5: 66-75.
412. Viemann, D., A. Strey, A. Janning, K. Jurk, K. Klimmek, T. Vogl, K. Hirono, F. Ichida, D. Foell, B. Kehrel, V. Gerke, C. Sorg, and J. Roth. 2005. Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. *Blood* 105: 2955-2962.
413. Simard, J. C., M. M. Simon, P. A. Tessier, and D. Girard. 2011. Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. *J Immunol* 186: 3622-3631.
414. Simard, J. C., A. Cesaro, J. Chapeton-Montes, M. Tardif, F. Antoine, D. Girard, and P. A. Tessier. 2013. S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF-kappaB(1.). *PLoS One* 8: e72138.
415. Lee, D. G., J. W. Woo, S. K. Kwok, M. L. Cho, and S. H. Park. 2013. MRP8 promotes Th17 differentiation via upregulation of IL-6 production by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Exp Mol Med* 45: e20.
416. Narumi, K., R. Miyakawa, R. Ueda, H. Hashimoto, Y. Yamamoto, T. Yoshida, and K. Aoki. 2015. Proinflammatory Proteins S100A8/S100A9 Activate NK Cells via Interaction with RAGE. *J Immunol* 194: 5539-5548.
417. Iotzova-Weiss, G., P. J. Dziunycz, S. N. Freiburger, S. Lauchli, J. Hafner, T. Vogl, L. E. French, and G. F. Hofbauer. 2015. S100A8/A9 stimulates keratinocyte proliferation in the development of squamous cell carcinoma of the skin via the receptor for advanced glycation-end products. *PLoS One* 10: e0120971.
418. Palmer, L. D., K. N. Maloney, K. L. Boyd, A. K. Goleniewska, S. Toki, C. N. Maxwell, W. J. Chazin, R. S. Peebles, Jr., D. C. Newcomb, and E. P. Skaar. 2019. The Innate Immune Protein S100A9 Protects from Th2-Mediated Allergic Airway Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*.
419. Yang, J., J. Anholts, U. Kolbe, J. A. Stegehuis-Kamp, F. H. J. Claas, and M. Eikmans. 2018. Calcium-Binding Proteins S100A8 and S100A9: Investigation of Their Immune Regulatory Effect in Myeloid Cells. *Int J Mol Sci* 19.
420. McNeill, E., and N. Hogg. 2014. S100A9 has a protective role in inflammation-induced skin carcinogenesis. *Int J Cancer* 135: 798-808.
421. Nukui, T., R. Ehama, M. Sakaguchi, H. Sonogawa, C. Katagiri, T. Hibino, and N. H. Huh. 2008. S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes. *J Cell Biochem* 104: 453-464.
422. Oduro, K. A., Jr., F. Liu, Q. Tan, C. K. Kim, O. Lubman, D. Fremont, J. C. Mills, and K. Choi. 2012. Myeloid skewing in murine autoimmune arthritis occurs in hematopoietic stem and primitive progenitor cells. *Blood* 120: 2203-2213.

423. Roth, J., F. Burwinkel, C. van den Bos, M. Goebeler, E. Vollmer, and C. Sorg. 1993. MRP8 and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner. *Blood* 82: 1875-1883.
424. Goebeler, M., J. Roth, C. van den Bos, G. Ader, and C. Sorg. 1995. Increase of calcium levels in epithelial cells induces translocation of calcium-binding proteins migration inhibitory factor-related protein 8 (MRP8) and MRP14 to keratin intermediate filaments. *Biochem J* 309 (Pt 2): 419-424.
425. Sroussi, H. Y., J. Berline, P. Dazin, P. Green, and J. M. Palefsky. 2006. S100A8 triggers oxidation-sensitive repulsion of neutrophils. *J Dent Res* 85: 829-833.
426. 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: 818-824.
427. 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.
428. Devery, J. M., N. J. King, and C. L. Geczy. 1994. Acute inflammatory activity of the S100 protein CP-10. Activation of neutrophils in vivo and in vitro. *J Immunol* 152: 1888-1897.
429. van Lent, P. L., L. Grevers, A. B. Blom, A. Sloetjes, 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.
430. van den Bosch, M. H., A. B. Blom, R. F. Schelbergen, M. I. Koenders, F. A. van de Loo, W. B. van den Berg, T. Vogl, J. Roth, P. M. van der Kraan, and P. L. van Lent. 2016. Alarmin S100A9 Induces Proinflammatory and Catabolic Effects Predominantly in the M1 Macrophages of Human Osteoarthritic Synovium. *J Rheumatol* 43: 1874-1884.
431. Kwon, C. H., H. J. Moon, H. J. Park, J. H. Choi, and D. Y. Park. 2013. S100A8 and S100A9 promotes invasion and migration through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent NF-kappaB activation in gastric cancer cells. *Mol Cells* 35: 226-234.
432. Isaksen, B., and M. K. Fagerhol. 2001. Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc. *Mol Pathol* 54: 289-292.
433. Kessel, C., D. Holzinger, and D. Foell. 2013. Phagocyte-derived S100 proteins in autoinflammation: putative role in pathogenesis and usefulness as biomarkers. *Clin Immunol* 147: 229-241.
434. Gabrilovich, D. I. 2017. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res* 5: 3-8.
435. Gabrilovich, D. I., V. Bronte, S. H. Chen, M. P. Colombo, A. Ochoa, S. Ostrand-Rosenberg, and H. Schreiber. 2007. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 67: 425; author reply 426.
436. Qin, H., B. Lerman, I. Sakamaki, G. Wei, S. C. Cha, S. S. Rao, J. Qian, Y. Hailemichael, R. Nurieva, K. C. Dwyer, J. Roth, Q. Yi, W. W. Overwijk, and L. W. Kwak. 2014. Generation of a new therapeutic peptide that depletes myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Nat Med* 20: 676-681.
437. Alkhateeb, T., A. Kumbhare, I. Bah, D. Youssef, Z. Q. Yao, C. E. McCall, and M. El Gazzar. 2019. S100A9 maintains myeloid-derived suppressor cells in chronic sepsis by inducing miR-21 and miR-181b. *Mol Immunol* 112: 72-81.
438. Passey, R. J., E. Williams, A. M. Lichanska, C. Wells, S. Hu, C. L. Geczy, M. H. Little, and D. A. Hume. 1999. A null mutation in the inflammation-associated S100 protein S100A8 causes early resorption of the mouse embryo. *J Immunol* 163: 2209-2216.
439. Grevers, L. C., T. J. de Vries, T. Vogl, S. Abdollahi-Roodsaz, A. W. Sloetjes, P. J. Leenen, J. Roth, V. Everts, W. B. van den Berg, and P. L. van Lent. 2011. S100A8 enhances osteoclastic bone resorption in vitro through activation of Toll-like receptor 4: implications for bone destruction in murine antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 63: 1365-1375.
440. Scott, N. R., R. V. Swanson, N. Al-Hammadi, R. Domingo-Gonzalez, J. Rangel-Moreno, B. A. Kriel, A. N. Bucsan, S. Das, M. Ahmed, S. Mehra, P. Treerat, A. Cruz-Lagunas, L. Jimenez-Alvarez, M. Munoz-Torrico, K. Bobadilla-Lozoya, T. Vogl, G. Walzl, N. du Plessis, D. Kaushal, T. J. Scriba, J. Zuniga, and S. A. Khader. 2020. S100A8/A9 regulates CD11b expression and neutrophil recruitment during chronic tuberculosis. *J Clin Invest*.

441. McNeill, E., S. J. Conway, H. L. Roderick, M. D. Bootman, and N. Hogg. 2007. Defective chemoattractant-induced calcium signalling in S100A9 null neutrophils. *Cell Calcium* 41: 107-121.
442. Inciarte-Mundo, J., J. Ramirez, M. V. Hernández, V. Ruiz-Esquide, A. Cuervo, S. R. Cabrera-Villalba, M. Pascal, J. Yagüe, J. D. Cañete, and R. Sanmarti. 2018. Calprotectin strongly and independently predicts relapse in rheumatoid arthritis and polyarticular psoriatic arthritis patients treated with tumor necrosis factor inhibitors: a 1-year prospective cohort study. *Arthritis Research & Therapy* 20: 275.
443. Bjarnason, I. 2017. The Use of Fecal Calprotectin in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 13: 53-56.
444. Mumolo, M. G., L. Bertani, L. Ceccarelli, G. Laino, G. Di Fluri, E. Albano, G. Tapete, and F. Costa. 2018. From bench to bedside: Fecal calprotectin in inflammatory bowel diseases clinical setting. *World J Gastroenterol* 24: 3681-3694.
445. Ferreiro-Iglesias, R., M. Barreiro-de Acosta, M. Otero Santiago, A. Lorenzo Gonzalez, C. Alonso de la Pena, A. J. Benitez Estevez, and J. E. Dominguez-Munoz. 2016. Fecal Calprotectin as Predictor of Relapse in Patients With Inflammatory Bowel Disease Under Maintenance Infliximab Therapy. *J Clin Gastroenterol* 50: 147-151.
446. Qian, M., and N. J. Song. 2018. Serum calprotectin correlates with risk and disease severity in psoriasis patients and the decrease of calprotectin predicts better response to tumor necrosis factor inhibitors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22: 4299-4309.
447. Foell, D., D. Kane, B. Bresnihan, T. Vogl, W. Nacken, C. Sorg, O. Fitzgerald, and J. Roth. 2003. Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 42: 1383-1389.
448. Kane, D., J. Roth, M. Frosch, T. Vogl, B. Bresnihan, and O. FitzGerald. 2003. Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 1676-1685.
449. Frosch, M., T. Vogl, S. Seeliger, N. Wulffraat, W. Kuis, D. Viemann, D. Foell, C. Sorg, C. Sunderkotter, and J. Roth. 2003. Expression of myeloid-related proteins 8 and 14 in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 2622-2626.
450. 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.
451. Ryckman, C., S. R. McColl, K. Vandal, R. de Medicis, A. Lussier, P. E. Poubelle, and P. A. Tessier. 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.
452. Kruithof, E., L. De Rycke, B. Vandooren, F. De Keyser, O. FitzGerald, I. McInnes, P. P. Tak, B. Bresnihan, E. M. Veys, D. Baeten, and O. S. I. G. o. S. A. i. C. Trials. 2006. Identification of synovial biomarkers of response to experimental treatment in early-phase clinical trials in spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 54: 1795-1804.
453. Holzinger, D., S. K. Fassl, W. de Jager, P. Lohse, U. F. Rohrig, M. Gattorno, A. Omenetti, S. Chiesa, F. Schena, J. Austerlmann, T. Vogl, D. B. Kuhns, S. M. Holland, C. Rodriguez-Gallego, R. Lopez-Almaraz, J. I. Arostegui, E. Colino, R. Roldan, S. Fessatou, B. Isidor, S. Poignant, K. Ito, H. J. Eppel, J. A. Bernstein, M. Jeng, J. Frankovich, G. Lionetti, J. A. Church, P. Y. Ong, M. LaPlant, M. Abinun, R. Skinner, V. Bigley, U. J. Sachs, C. Hinze, E. Hoppenreijds, J. Ehrchen, D. Foell, J. J. Chae, A. Ombrello, I. Aksentjevich, C. Sunderkoetter, and J. Roth. 2015. Single amino acid charge switch defines clinically distinct proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1 (PSTPIP1)-associated inflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 136: 1337-1345.
454. Wittkowski, H., M. Frosch, N. Wulffraat, R. Goldbach-Mansky, T. Kallinich, J. Kuemmerle-Deschner, M. C. Fruhwald, S. Dassmann, T. H. Pham, J. Roth, and D. Foell. 2008. S100A12 is a novel molecular marker differentiating systemic-onset juvenile idiopathic arthritis from other causes of fever of unknown origin. *Arthritis Rheum* 58: 3924-3931.

455. Luger, 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.
456. Luger, N., R. Stoll, K. W. Schmid, T. Kucharzik, H. Stein, G. Burmeister, C. Sorg, and W. Domschke. 1995. The myeloic related protein MRP8/14 (27E10 antigen)--usefulness as a potential marker for disease activity in ulcerative colitis and putative biological function. *Eur J Clin Invest* 25: 659-664.
457. Foell, D., T. Kucharzik, M. Kraft, T. Vogl, C. Sorg, W. Domschke, and J. Roth. 2003. Neutrophil derived human S100A12 (EN-RAGE) is strongly expressed during chronic active inflammatory bowel disease. *Gut* 52: 847-853.
458. Kojima, T., E. Andersen, J. C. Sanchez, M. R. Wilkins, D. F. Hochstrasser, W. F. Pralong, and G. Cimasoni. 2000. Human gingival crevicular fluid contains MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9), two calcium-binding proteins of the S100 family. *J Dent Res* 79: 740-747.
459. Shepherd, C. E., J. Goyette, V. Utter, F. Rahimi, Z. Yang, C. L. Geczy, and G. M. Halliday. 2006. Inflammatory S100A9 and S100A12 proteins in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27: 1554-1563.
460. Horvath, I., I. A. Iashchishyn, R. A. Moskalenko, C. Wang, S. Warmlander, C. Wallin, A. Graslund, G. G. Kovacs, and L. A. Morozova-Roche. 2018. Co-aggregation of pro-inflammatory S100A9 with alpha-synuclein in Parkinson's disease: ex vivo and in vitro studies. *J Neuroinflammation* 15: 172.
461. Floris, S., A. van der Goes, J. Killestein, D. L. Knol, F. Barkhof, C. H. Polman, C. D. Dijkstra, H. E. de Vries, and J. F. Meilof. 2004. Monocyte activation and disease activity in multiple sclerosis. A longitudinal analysis of serum MRP8/14 levels. *J Neuroimmunol* 148: 172-177.
462. Postler, E., A. Lehr, H. Schluesener, and R. Meyermann. 1997. Expression of the S-100 proteins MRP-8 and -14 in ischemic brain lesions. *Glia* 19: 27-34.
463. Wilschmann-Theis, D., J. Wagenpfeil, D. Holzinger, J. Roth, S. Koch, S. Schnautz, T. Bieber, and J. Wenzel. 2016. Among the S100 proteins, S100A12 is the most significant marker for psoriasis disease activity. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 30: 1165-1170.
464. Kunz, M., J. Roth, C. Sorg, and G. Kolde. 1992. Epidermal expression of the calcium binding surface antigen 27E10 in inflammatory skin diseases. *Arch Dermatol Res* 284: 386-390.
465. Foell, D., S. Seeliger, T. Vogl, H. G. Koch, H. Maschek, E. Harms, C. Sorg, and J. Roth. 2003. Expression of S100A12 (EN-RAGE) in cystic fibrosis. *Thorax* 58: 613-617.
466. Renaud, W., M. Merten, and C. Figarella. 1994. Increased coexpression of CFTR and S100 calcium binding proteins MRP8 and MRP14 mRNAs in cystic fibrosis human tracheal gland cells. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 1518-1525.
467. Hayward, C., S. Glass, V. van Heyningen, and D. J. Brock. 1987. Serum concentrations of a granulocyte-derived calcium-binding protein in cystic fibrosis patients and heterozygotes. *Clin Chim Acta* 170: 45-55.
468. Lorenz, E., M. S. Muhlebach, P. A. Tessier, N. E. Alexis, R. Duncan Hite, M. C. Seeds, D. B. Peden, and W. Meredith. 2008. Different expression ratio of S100A8/A9 and S100A12 in acute and chronic lung diseases. *Respir Med* 102: 567-573.
469. Yang, Z., W. X. Yan, H. Cai, N. Tedla, C. Armishaw, N. Di Girolamo, H. W. Wang, T. Hampartzoumian, J. L. Simpson, P. G. Gibson, J. Hunt, P. Hart, J. M. Hughes, M. A. Perry, P. F. Alewood, and C. L. Geczy. 2007. S100A12 provokes mast cell activation: a potential amplification pathway in asthma and innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 119: 106-114.
470. Halayko, A. J., and S. Ghavami. 2009. S100A8/A9: a mediator of severe asthma pathogenesis and morbidity? *Can J Physiol Pharmacol* 87: 743-755.
471. McMorran, B. J., S. A. Patat, J. B. Carlin, K. Grimwood, A. Jones, D. S. Armstrong, J. C. Galati, P. J. Cooper, C. A. Byrnes, P. W. Francis, C. F. Robertson, D. A. Hume, C. H. Borchers, C. E. Wainwright, and B. J. Wainwright. 2007. Novel neutrophil-derived proteins in bronchoalveolar lavage fluid indicate an exaggerated inflammatory response in pediatric cystic fibrosis patients. *Clin Chem* 53: 1782-1791.

472. Buhling, F., A. Ittenson, D. Kaiser, G. Tholert, B. Hoffmann, D. Reinhold, S. Ansorge, and T. Welte. 2000. MRP8/MRP14, CD11b and HLA-DR expression of alveolar macrophages in pneumonia. *Immunol Lett* 71: 185-190.
473. Bargagli, E., A. Prasse, C. Olivieri, J. Muller-Quernheim, and P. Rottoli. 2011. Macrophage-derived biomarkers of idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Med* 2011: 717130.
474. Mori, Y., A. Kosaki, N. Kishimoto, T. Kimura, K. Iida, M. Fukui, F. Nakajima, M. Nagahara, M. Urakami, T. Iwasaka, and H. Matsubara. 2009. Increased plasma S100A12 (EN-RAGE) levels in hemodialysis patients with atherosclerosis. *Am J Nephrol* 29: 18-24.
475. McCormick, M. M., F. Rahimi, Y. V. Bobryshev, K. Gaus, H. Zreiqat, H. Cai, R. S. Lord, and C. L. Geczy. 2005. S100A8 and S100A9 in human arterial wall. Implications for atherogenesis. *J Biol Chem* 280: 41521-41529.
476. Kosaki, A., T. Hasegawa, T. Kimura, K. Iida, J. Hitomi, H. Matsubara, Y. Mori, M. Okigaki, N. Toyoda, H. Masaki, M. Inoue-Shibata, M. Nishikawa, and T. Iwasaka. 2004. Increased plasma S100A12 (EN-RAGE) levels in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5423-5428.
477. Burkhardt, K., S. Schwarz, C. Pan, F. Stelter, K. Kotliar, M. Von Eynatten, D. Sollinger, I. Lanzl, U. Heemann, and M. Baumann. 2009. Myeloid-related protein 8/14 complex describes microcirculatory alterations in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *Cardiovasc Diabetol* 8: 10.
478. Nijhuis, J., S. S. Rensen, Y. Slaats, F. M. van Dielen, W. A. Buurman, and J. W. Greve. 2009. Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. *Obesity (Silver Spring)* 17: 2014-2018.
479. Haga, H. J., J. G. Brun, H. B. Berntzen, R. Cervera, M. Khamashta, and G. R. Hughes. 1993. Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity. *Lupus* 2: 47-50.
480. Hirono, K., D. Foell, Y. Xing, S. Miyagawa-Tomita, F. Ye, M. Ahlmann, T. Vogl, T. Futatani, C. Rui, X. Yu, K. Watanabe, S. Watanabe, S. Tsubata, K. Uese, I. Hashimoto, F. Ichida, M. Nakazawa, J. Roth, and T. Miyawaki. 2006. Expression of myeloid-related protein-8 and -14 in patients with acute Kawasaki disease. *J Am Coll Cardiol* 48: 1257-1264.
481. Foell, D., F. Ichida, T. Vogl, X. Yu, R. Chen, T. Miyawaki, C. Sorg, and J. Roth. 2003. S100A12 (EN-RAGE) in monitoring Kawasaki disease. *Lancet* 361: 1270-1272.
482. Brun, J. G., M. Cuida, H. Jacobsen, R. Kloster, A. C. Johannesen, H. M. Hoyeraal, and R. Jonsson. 1994. Sjogren's syndrome in inflammatory rheumatic diseases: analysis of the leukocyte protein calprotectin in plasma and saliva. *Scand J Rheumatol* 23: 114-118.
483. Odink, K., N. Cerletti, J. Bruggen, R. G. Clerc, L. Tarcsay, G. Zwadlo, G. Gerhards, R. Schlegel, and C. Sorg. 1987. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature* 330: 80-82.
484. Youssef, P., J. Roth, M. Frosch, P. Costello, O. Fitzgerald, C. Sorg, and B. Bresnihan. 1999. Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane. *J Rheumatol* 26: 2523-2528.
485. Hammer, H. B., S. Odegard, M. K. Fagerhol, R. Landewe, D. van der Heijde, T. Uhlig, P. Mowinckel, and T. K. Kvien. 2007. Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66: 1093-1097.
486. Nacken, W., J. Roth, C. Sorg, and C. Kerkhoff. 2003. S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. *Microsc Res Tech* 60: 569-580.
487. Berntzen, H. B., U. Olmez, M. K. Fagerhol, and E. Munthe. 1991. The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 20: 74-82.
488. Baillet, A., C. Trocme, S. Berthier, M. Arlotto, L. Grange, J. Chenau, S. Quetant, M. Seve, F. Berger, R. Juvin, F. Morel, and P. Gaudin. 2010. Synovial fluid proteomic fingerprint: S100A8, S100A9 and S100A12 proteins discriminate rheumatoid arthritis from other inflammatory joint diseases. *Rheumatology (Oxford)* 49: 671-682.

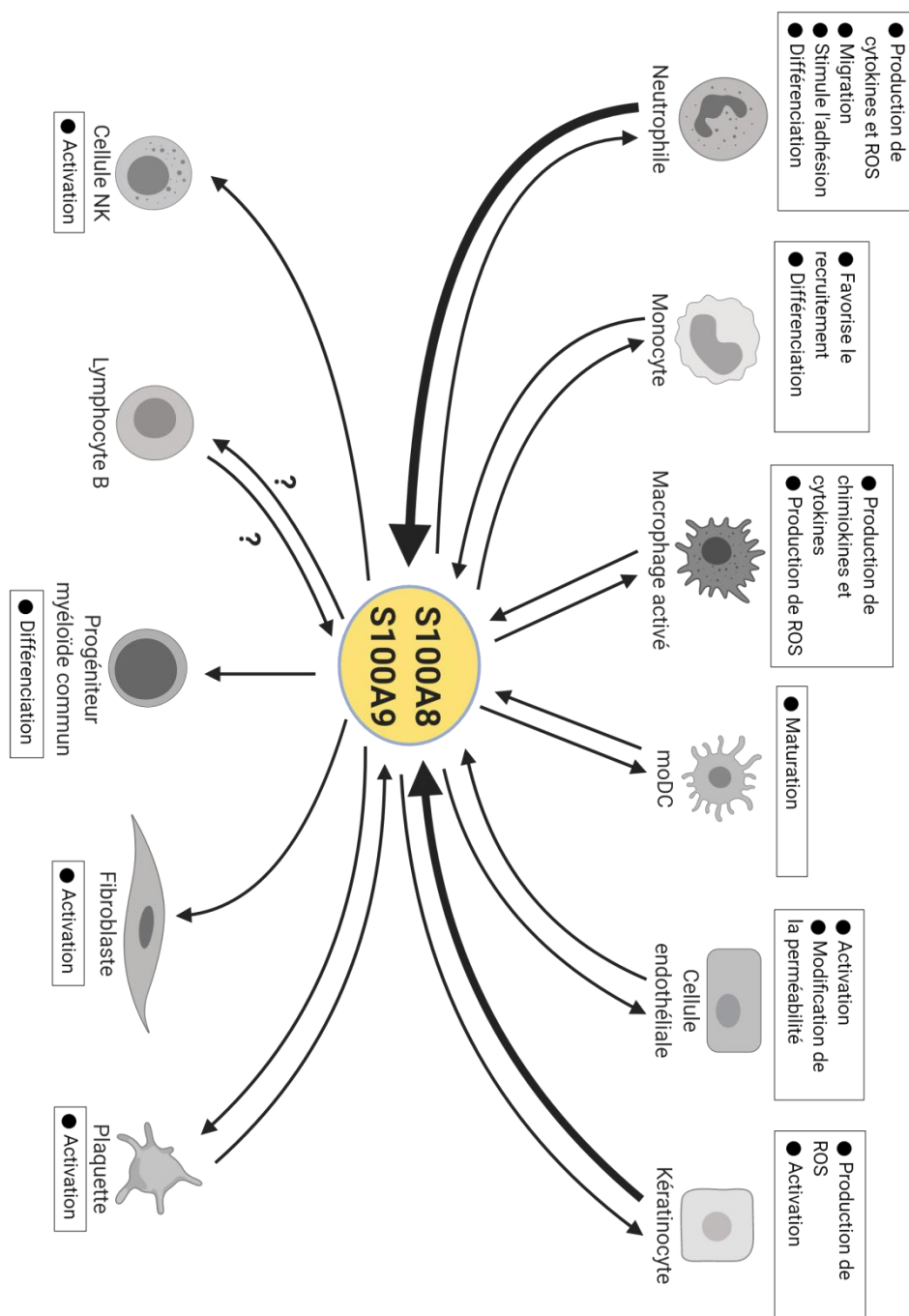
489. Sunahori, K., M. Yamamura, J. Yamana, K. Takasugi, M. Kawashima, H. Yamamoto, W. J. Chazin, Y. Nakatani, S. Yui, and H. Makino. 2006. The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 8: R69.
490. van Lent, P. L., L. C. Grevers, A. B. Blom, O. J. Arntz, F. A. van de Loo, P. van der Kraan, S. Abdollahi-Roodsaz, G. Srikrishna, H. Freeze, A. Sloetjes, W. Nacken, T. Vogl, J. Roth, and W. B. van den Berg. 2008. Stimulation of chondrocyte-mediated cartilage destruction by S100A8 in experimental murine arthritis. *Arthritis Rheum* 58: 3776-3787.
491. Jung, N., V. Schenten, J. L. Bueb, F. Tolle, and S. Brechard. 2019. miRNAs Regulate Cytokine Secretion Induced by Phosphorylated S100A8/A9 in Neutrophils. *Int J Mol Sci* 20.
492. Austermann, J., C. Spiekermann, and J. Roth. 2018. S100 proteins in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 14: 528-541.
493. Nishida, M., J. Saegusa, S. Tanaka, and A. Morinobu. 2018. S100A12 facilitates osteoclast differentiation from human monocytes. *PLoS One* 13: e0204140.
494. Rampersad, R. R., D. Esserman, M. W. McGinnis, D. M. Lee, D. D. Patel, and T. K. Tarrant. 2009. S100A9 is not essential for disease expression in an acute (K/BxN) or chronic (CIA) model of inflammatory arthritis. *Scand J Rheumatol* 38: 445-449.
495. Cesaro, A., N. Anceriz, A. Plante, N. Page, M. R. Tardif, and P. A. Tessier. 2012. An inflammation loop orchestrated by S100A9 and calprotectin is critical for development of arthritis. *PLoS One* 7: e45478.
496. Robinson, M. J., P. Tessier, R. Poulsom, and N. Hogg. 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.
497. Hogg, N., C. Allen, and J. Edgeworth. 1989. Monoclonal antibody 5.5 reacts with p8,14, a myeloid molecule associated with some vascular endothelium. *Eur J Immunol* 19: 1053-1061.
498. Shibata, F., A. Ito, Y. Ohkuma, and K. Mitsui. 2005. Mitogenic activity of S100A9 (MRP-14). *Biol Pharm Bull* 28: 2312-2314.
499. van Lent, P. L., L. C. Grevers, R. Schelbergen, A. Blom, J. Geurts, A. Sloetjes, T. Vogl, J. Roth, and W. B. van den Berg. 2010. S100A8 causes a shift toward expression of activatory Fcgamma receptors on macrophages via toll-like receptor 4 and regulates Fcgamma receptor expression in synovium during chronic experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 62: 3353-3364.
500. Anceriz, N., K. Vandal, and P. A. Tessier. 2007. S100A9 mediates neutrophil adhesion to fibronectin through activation of beta2 integrins. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 84-89.
501. Hiroshima, Y., K. Hsu, N. Tedla, Y. M. Chung, S. Chow, C. Herbert, and C. L. Geczy. 2014. S100A8 induces IL-10 and protects against acute lung injury. *J Immunol* 192: 2800-2811.
502. Zhao, J., I. Endoh, K. Hsu, N. Tedla, Y. Endoh, and C. L. Geczy. 2011. S100A8 modulates mast cell function and suppresses eosinophil migration in acute asthma. *Antioxid Redox Signal* 14: 1589-1600.
503. Gomes, L. H., M. J. Raftery, W. X. Yan, J. D. Goyette, P. S. Thomas, and C. L. Geczy. 2013. S100A8 and S100A9-oxidant scavengers in inflammation. *Free Radic Biol Med* 58: 170-186.
504. Chimenti, M. S., P. Triggianese, E. Botti, A. Narcisi, P. Conigliaro, A. Giunta, M. Teoli, R. Perricone, and A. Costanzo. 2016. S100A8/A9 in psoriatic plaques from patients with psoriatic arthritis. *J Int Med Res* 44: 33-37.
505. Suga, H., M. Sugaya, T. Miyagaki, H. Ohmatsu, M. Kawaguchi, N. Takahashi, H. Fujita, Y. Asano, Y. Tada, T. Kadono, and S. Sato. 2014. Skin barrier dysfunction and low antimicrobial peptide expression in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 20: 4339-4348.
506. Broome, A. M., D. Ryan, and R. L. Eckert. 2003. S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis. *J Histochem Cytochem* 51: 675-685.
507. Madsen, P., H. H. Rasmussen, H. Leffers, B. Honore, and J. E. Celis. 1992. Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid-binding protein [PA-FABP]) that is highly up-regulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid-binding proteins. *J Invest Dermatol* 99: 299-305.

508. Benoit, S., A. Toksoy, M. Ahlmann, M. Schmidt, C. Sunderkotter, D. Foell, M. Pasparakis, J. Roth, and M. Goebeler. 2006. Elevated serum levels of calcium-binding S100 proteins A8 and A9 reflect disease activity and abnormal differentiation of keratinocytes in psoriasis. *Br J Dermatol* 155: 62-66.
509. Hardas, B. D., X. Zhao, J. Zhang, X. Longqing, S. Stoll, and J. T. Elder. 1996. Assignment of psoriasin to human chromosomal band 1q21: coordinate overexpression of clustered genes in psoriasis. *J Invest Dermatol* 106: 753-758.
510. Mischke, D., B. P. Korge, I. Marenholz, A. Volz, and A. Ziegler. 1996. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol* 106: 989-992.
511. Wang, X., X. Liu, N. Liu, and H. Chen. 2019. Prediction of crucial epigenetically associated, differentially expressed genes by integrated bioinformatics analysis and the identification of S100A9 as a novel biomarker in psoriasis. *Int J Mol Med*.
512. Bando, M., Y. Hiroshima, M. Kataoka, Y. Shinohara, M. C. Herzberg, K. F. Ross, T. Nagata, and J. Kido. 2007. Interleukin-1alpha regulates antimicrobial peptide expression in human keratinocytes. *Immunol Cell Biol* 85: 532-537.
513. Mork, G., H. Schjerven, L. Mangschau, E. Soyland, and P. Brandtzaeg. 2003. Proinflammatory cytokines upregulate expression of calprotectin (L1 protein, MRP-8/MRP-14) in cultured human keratinocytes. *Br J Dermatol* 149: 484-491.
514. Guttman-Yassky, E., M. A. Lowes, J. Fuentes-Duculan, L. C. Zaba, I. Cardinale, K. E. Nogales, A. Khatcherian, I. Novitskaya, J. A. Carucci, R. Bergman, and J. G. Krueger. 2008. Low expression of the IL-23/Th17 pathway in atopic dermatitis compared to psoriasis. *J Immunol* 181: 7420-7427.
515. Gazel, A., M. Rosdy, B. Bertino, C. Tornier, F. Sahuc, and M. Blumenberg. 2006. A characteristic subset of psoriasis-associated genes is induced by oncostatin-M in reconstituted epidermis. *J Invest Dermatol* 126: 2647-2657.
516. Tanigawa, H., K. Miyata, Z. Tian, J. Aoi, T. Kadomatsu, S. Fukushima, A. Ogata, N. Takeda, J. Zhao, S. Zhu, K. Terada, M. Endo, J. Morinaga, T. Sugizaki, M. Sato, M. S. Morioka, I. Manabe, Y. Mashimo, A. Hata, Y. Taketomi, K. Yamamoto, M. Murakami, K. Araki, M. Jinnin, H. Ihn, and Y. Oike. 2016. Upregulation of ANGPTL6 in mouse keratinocytes enhances susceptibility to psoriasis. *Sci Rep* 6: 34690.
517. Swindell, W. R., K. A. Michaels, A. J. Sutter, D. Diaconu, Y. Fritz, X. Xing, M. K. Sarkar, Y. Liang, A. Tsoi, J. E. Gudjonsson, and N. L. Ward. 2017. Imiquimod has strain-dependent effects in mice and does not uniquely model human psoriasis. *Genome Med* 9: 24.
518. Ippagunta, S. K., R. Gangwar, D. Finkelstein, P. Vogel, S. Pelletier, S. Gingras, V. Redecke, and H. Hacker. 2016. Keratinocytes contribute intrinsically to psoriasis upon loss of Tnfr1 function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E6162-E6171.
519. Schonthaler, H. B., R. Huggenberger, S. K. Wculek, M. Detmar, and E. F. Wagner. 2009. Systemic anti-VEGF treatment strongly reduces skin inflammation in a mouse model of psoriasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21264-21269.
520. Korndorfer, I. P., F. Brueckner, and A. Skerra. 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. *J Mol Biol* 370: 887-898.
521. Dogra, S., and R. Mahajan. 2016. Psoriasis: Epidemiology, clinical features, co-morbidities, and clinical scoring. *Indian Dermatol Online J* 7: 471-480.
522. Husson, H., E. G. Carideo, D. Neuberg, J. Schultze, O. Munoz, P. W. Marks, J. W. Donovan, A. C. Chillemi, P. O'Connell, and A. S. Freedman. 2002. Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays. *Blood* 99: 282-289.
523. Lood, C., M. Stenstrom, H. Tyden, B. Gullstrand, E. Kallberg, T. Leanderson, L. Truedsson, G. Sturfelt, F. Ivars, and A. A. Bengtsson. 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 Res Ther* 13: R60.

524. Perera, C., H. P. McNeil, and C. L. Geczy. 2010. S100 Calgranulins in inflammatory arthritis. *Immunol Cell Biol* 88: 41-49.
525. Wu, L., X. Chen, J. Zhao, B. Martin, J. A. Zepp, J. S. Ko, C. Gu, G. Cai, W. Ouyang, G. Sen, G. R. Stark, B. Su, C. M. Vines, C. Tournier, T. A. Hamilton, A. Vidimos, B. Gastman, C. Liu, and X. Li. 2015. A novel IL-17 signaling pathway controlling keratinocyte proliferation and tumorigenesis via the TRAF4-ERK5 axis. *J Exp Med* 212: 1571-1587.
526. Schon, M., A. B. Bong, C. Drewniok, J. Herz, C. C. Geilen, J. Reifenberger, B. Benninghoff, H. B. Slade, H. Gollnick, and M. P. Schon. 2003. Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J Natl Cancer Inst* 95: 1138-1149.
527. Thorey, I. S., J. Roth, J. Regenbogen, J. P. Halle, M. Bittner, T. Vogl, S. Kaesler, P. Bugnon, B. Reitmaier, S. Durka, A. Graf, M. Wockner, N. Rieger, A. Konstantinow, E. Wolf, A. Goppelt, and S. Werner. 2001. The Ca²⁺-binding proteins S100A8 and S100A9 are encoded by novel injury-regulated genes. *J Biol Chem* 276: 35818-35825.
528. Basu, A., S. Munir, M. A. Mulaw, K. Singh, D. Crisan, A. Sindrilaru, N. Treiber, M. Wlaschek, M. Huber-Lang, F. Gebhard, and K. Scharffetter-Kochanek. 2018. A Novel S100A8/A9 Induced Fingerprint of Mesenchymal Stem Cells associated with Enhanced Wound Healing. *Sci Rep* 8: 6205.
529. Soo, C., D. N. Sayah, X. Zhang, S. R. Beanes, I. Nishimura, C. Dang, E. Freymiller, and K. Ting. 2002. The identification of novel wound-healing genes through differential display. *Plast Reconstr Surg* 110: 787-797; discussion 798-800.
530. Guilliams, M., C. A. Dutertre, C. L. Scott, N. McGovern, D. Sichien, S. Chakarov, S. Van Gassen, J. Chen, M. Poidinger, S. De Pijck, S. J. Tavernier, I. Low, S. E. Irac, C. N. Mattar, H. R. Sumatoh, G. H. L. Low, T. J. K. Chung, D. K. H. Chan, K. K. Tan, T. L. K. Hon, E. Fossum, B. Bogen, M. Choolani, J. K. Y. Chan, A. Larbi, H. Luche, S. Henri, Y. Saeys, E. W. Newell, B. N. Lambrecht, B. Malissen, and F. Ginhoux. 2016. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity* 45: 669-684.
531. Clausen, B. E., and P. Stoitzner. 2015. Functional Specialization of Skin Dendritic Cell Subsets in Regulating T Cell Responses. *Front Immunol* 6: 534.
532. Durai, V., and K. M. Murphy. 2016. Functions of Murine Dendritic Cells. *Immunity* 45: 719-736.
533. Olszewska, B., Z. Adamski, and M. Czarnecka-Operacz. 2018. Quo vadis, biological treatment for psoriasis and psoriatic arthritis? *Postepy Dermatol Alergol* 35: 231-237.
534. Kampylafka, E., D. Simon, I. d'Oliveira, C. Linz, V. Lerchen, M. Englbrecht, J. Rech, A. Kleyer, M. Sticherling, G. Schett, and A. J. Hueber. 2019. Disease interception with interleukin-17 inhibition in high-risk psoriasis patients with subclinical joint inflammation-data from the prospective IVEPSA study. *Arthritis Res Ther* 21: 178.
535. Puel, A., S. Cypowyj, J. Bustamante, J. F. Wright, L. Liu, H. K. Lim, M. Migaud, L. Israel, M. Chrabieh, M. Audry, M. Gumbleton, A. Toulon, C. Bodemer, J. El-Baghdadi, M. Whitters, T. Paradis, J. Brooks, M. Collins, N. M. Wolfman, S. Al-Muhsen, M. Galicchio, L. Abel, C. Picard, and J. L. Casanova. 2011. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 332: 65-68.
536. Li, M., D. Zhu, T. Wang, X. Xia, J. Tian, and S. Wang. 2018. Roles of Myeloid-Derived Suppressor Cell Subpopulations in Autoimmune Arthritis. *Front Immunol* 9: 2849.
537. Leite Dantas, R., D. Bettenworth, G. Varga, T. Weinhage, H. T. Wami, U. Dobrindt, J. Roth, T. Vogl, S. Ludwig, and V. Wixler. 2020. Spontaneous onset of TNFalpha-triggered colonic inflammation depends on functional T lymphocytes, S100A8/A9 alarmins and MHC H-2 haplotype. *J Pathol*.
538. Walter, A., M. Schafer, V. Cecconi, C. Matter, M. Urosevic-Maiwald, B. Belloni, N. Schonewolf, R. Dummer, W. Bloch, S. Werner, H. D. Beer, A. Knuth, and M. van den Broek. 2013. Aldara activates TLR7-independent immune defence. *Nat Commun* 4: 1560.
539. Mease, P., D. van der Heijde, R. Landewe, S. Mpofu, P. Rahman, H. Tahir, A. Singhal, E. Boettcher, S. Navarra, K. Meiser, A. Readie, L. Pricop, and K. Abrams. 2018. Secukinumab improves active psoriatic arthritis symptoms and inhibits radiographic progression: primary results from the randomised, double-blind, phase III FUTURE 5 study. *Ann Rheum Dis* 77: 890-897.

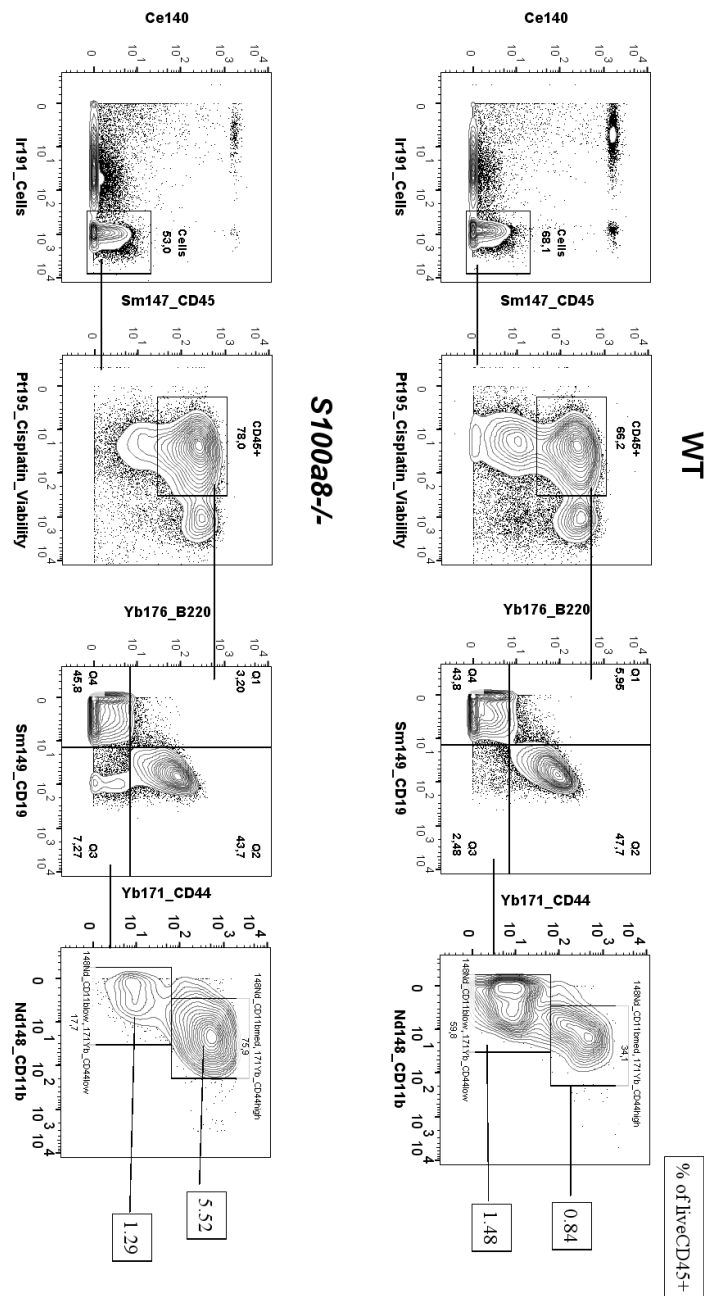
540. Glatt, S., D. Baeten, T. Baker, M. Griffiths, L. Ionescu, A. D. G. Lawson, A. Maroof, R. Oliver, S. Popa, F. Strimenopoulou, P. Vajjah, M. I. L. Watling, N. Yermenko, P. Miossec, and S. Shaw. 2018. Dual IL-17A and IL-17F neutralisation by bimekizumab in psoriatic arthritis: evidence from preclinical experiments and a randomised placebo-controlled clinical trial that IL-17F contributes to human chronic tissue inflammation. *Ann Rheum Dis* 77: 523-532.
541. Shibata, S., Y. Tada, Y. Asano, K. Yanaba, M. Sugaya, T. Kadono, N. Kanda, S. Watanabe, and S. Sato. 2013. IL-27 activates Th1-mediated responses in imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions. *J Invest Dermatol* 133: 479-488.

Annexe A



Cellules produisant les protéines S100A8 et S100A9 chez la souris et fonctions cellulaires associées.

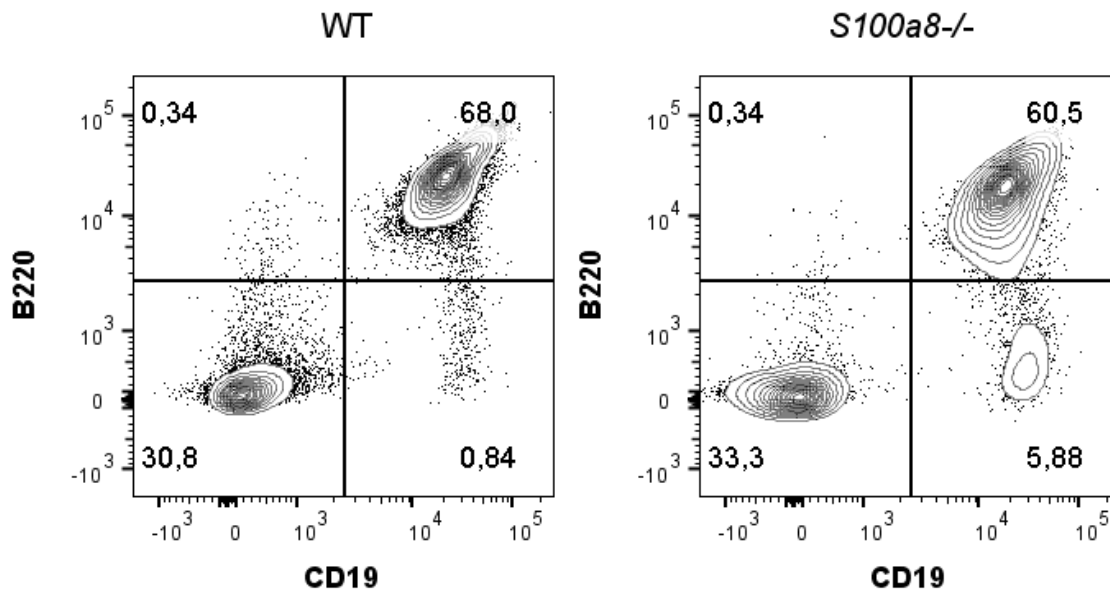
Annexe B



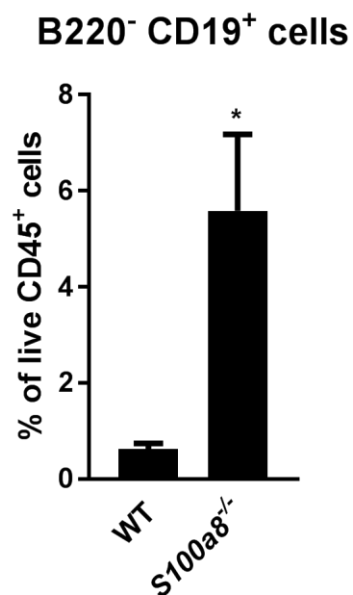
Stratégie de phénotypage et pourcentage des cellules CD45⁺ B220⁻ CD19⁺ dans le sang périphérique des souris sauvages et *S100a8*^{-/-} naïves par CyTOF. Les leucocytes de sang de souris ont été marqués avec le kit *Maxpar*® Mouse Phenotyping panel Kit et analysé par un CyTOF Helios (Fluidigm, CA, USA). Résultats représentatifs du sang périphérique prélevé chez 4 souris femelles par groupe.

Annexe C

A

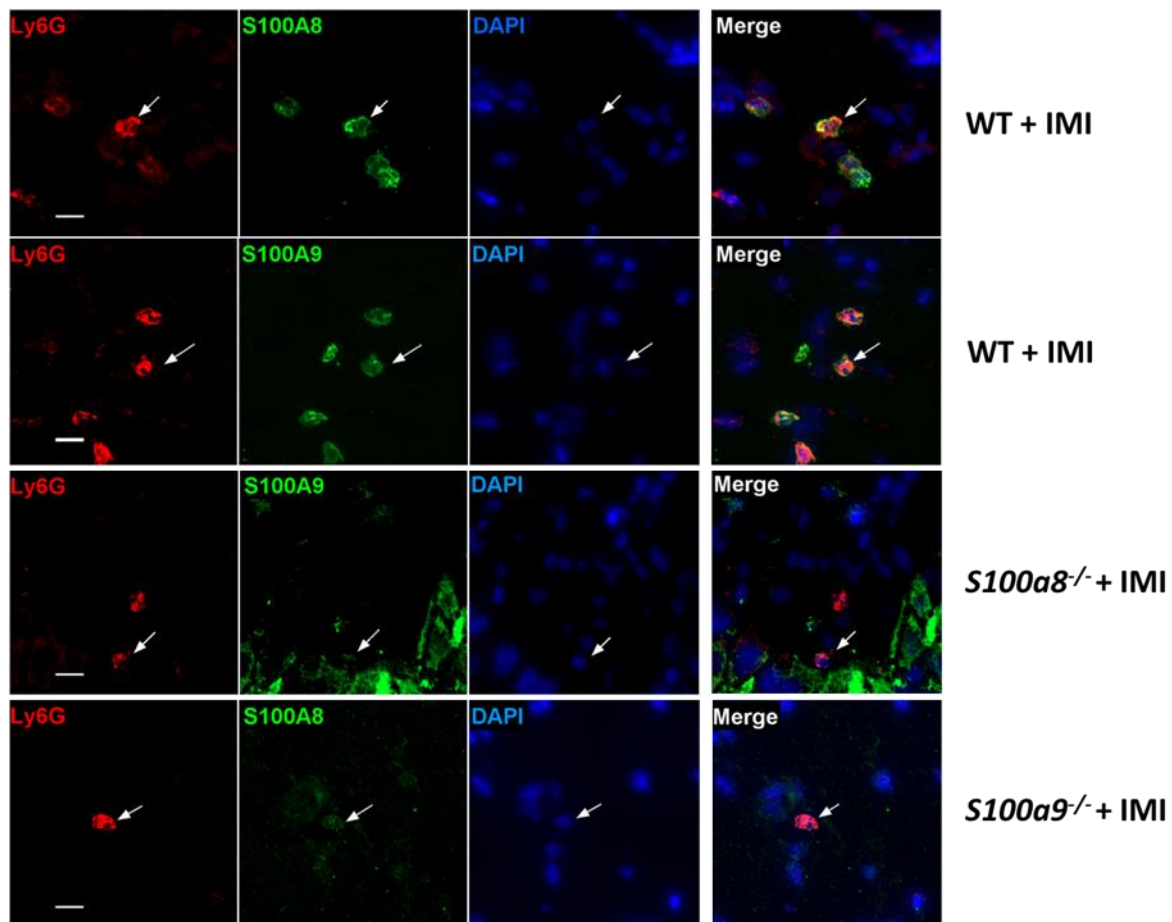


B



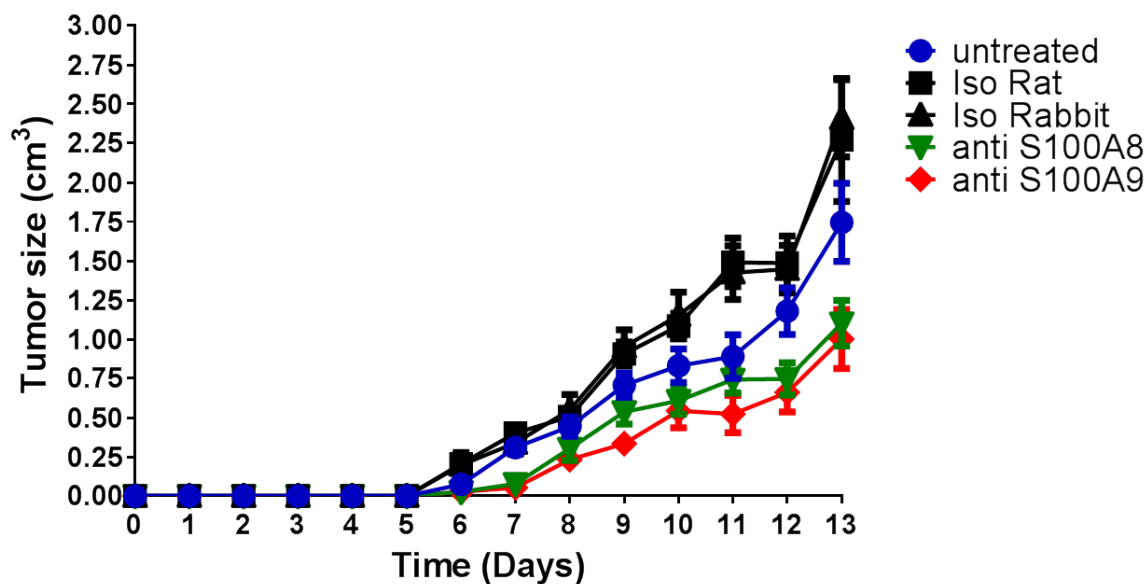
Stratégie de phénotypage (A) et pourcentage (B) des leucocytes sanguins CD45⁺ B220⁻ CD19⁺ analysés par cytométrie en flux chez les souris sauvages et *S100a8*^{-/-} naïves. (n=4 souris par groupe ; Moyenne + SEM; *p < 0.05; Test de Student).

Annexe D



Expression de S100A8 et S100A9 dans les neutrophiles infiltrant du derme des souris sauvages, *S100a8*^{-/-} et *S100a9*^{-/-} psoriasiques. Photo de neutrophiles (flèches blanches) par microscopie confocale dans des sections de peau des souris sauvages, *S100a8*^{-/-}, *S100a9*^{-/-} traitées avec l'imiquimod marquées avec un anti-S100A8 (vert) ou un anti-S100A9 (vert) et un anti-Ly6G (rouge) et le DAPI (bleu). Échelle : 10µm

Annexe E



Taille des tumeurs sous-cutanées de cellules de mélanome B16F10 chez les souris C57BL/6 traitées avec des anticorps anti-S100A8, anti-S100A9 ou contrôle. Les souris ont été injectées au J0 avec 0.5×10^6 cellules B16F10 par voie sous-cutanée puis traitées 3 fois par semaine avec 100 μg d'anticorps anti-S100A8 ou anti-S100A9.