



Thèse

2020

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Le rôle de la calprotectine sérique en tant que biomarqueur dans les
maladies rhumatismales chroniques

Jarlborg, Matthias

How to cite

JARLBORG, Matthias. Le rôle de la calprotectine sérique en tant que biomarqueur dans les maladies rhumatismales chroniques. 2020. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:139855

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch//unige:139855>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:139855](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:139855)



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**
FACULTÉ DE MÉDECINE

Section de Médecine Clinique,
Département de Médecine Interne des Spécialités
Service de Rhumatologie

Thèse préparée sous la direction du Professeur Cem Gabay et du Docteur Michael J Nissen

« Le rôle de la calprotectine sérique en tant que biomarqueur dans les maladies rhumatismales chroniques »

Thèse

Présentée à la faculté de Médecine de l'Université de Genève

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

Par

Matthias Alexander JARLBORG

De

Montagny-près-Yverdon (VD)

Thèse n°11006

Genève

2020



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**

FACULTÉ DE MÉDECINE
Secrétariat des étudiants



DOCTORAT EN MEDECINE

Thèse de :

Matthias Alexander JARLBORG

originaire de Montagny-près-Yverdon (VD), Suisse

Intitulée :

**Le rôle de la calprotectine sérique en tant que biomarqueur dans
les maladies rhumatismales chroniques**

La Faculté de médecine, sur le préavis du Comité directeur des thèses, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par-là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 24 juillet 2020

Thèse n° 11006

Cem Gabay

Doyen

Table des matières

RÉSUMÉ	5
Liste des abréviations (françaises et anglaises), par ordre alphabétique	7
I. INTRODUCTION	9
1. Les biomarqueurs dans les maladies inflammatoires rhumatismales	9
2. La biologie de la calprotectine	11
II. L'UTILITE DE LA CALPROTECTINE SÉRIQUE DANS LES RHUMATISMES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES	16
1. DONNÉES ISSUES DE LA LITTÉRATURE	16
A. La polyarthrite rhumatoïde	16
B. La spondylarthrite axiale	19
C. Le rhumatisme psoriasique	21
D. Les connectivites	23
E. Les arthropathies microcristallines et les maladies auto-inflammatoires	26
2. DONNÉES ISSUE DE L'ÉTUDE: "Serum calprotectin: a promising biomarker in rheumatoid arthritis and axial spondyloarthritis"	28
A. Description de la population étudiée et de la méthodologie	28
B. L'article original	33
C. Matériel supplémentaire (figures)	45
D. Discussion et commentaires sur les résultats de l'étude	50
III. DISCUSSION	56
IV. CONCLUSION	59
V. REMERCIEMENTS	60
VI. BIBLIOGRAPHIE	61

RÉSUMÉ

La calprotectine, complexe protéique S100A8/S100A9, est un biomarqueur bien connu en gastro-entérologie. Fréquemment recherchée dans les selles, son utilité comme biomarqueur sérique est moins bien étudiée. Très abondante dans le cytoplasme des granulocytes, la calprotectine fonctionne comme une *alarmine* et participe activement au processus inflammatoire. Elle constitue donc une cible de recherche intéressante sur le plan thérapeutique mais surtout en tant que biomarqueur d'un état inflammatoire. Ce travail tente de définir l'utilité du dosage de la calprotectine sérique dans les rhumatismes inflammatoires chroniques, en particulier la polyarthrite rhumatoïde (PR), la spondylarthrite axiale (SpA) et l'arthrite psoriasique (APso). Une revue de la littérature tentera de mettre en perspective les résultats d'un travail de recherche issu de la cohorte du registre suisse des maladies inflammatoires rhumatismales SCQM (*Swiss Clinical Quality Management cohort*). Dans cette étude, près de 1000 patients avec une PR, 451 avec une SpA et 237 avec une APso ont bénéficié d'un dosage sérique de la calprotectine. Il s'agit, pour la grande majorité d'entre eux, de patients présentant une maladie évoluant depuis plusieurs années et dont l'activité est contrôlée par un traitement de fond antirhumatismal. Les 71 cas contrôles sont issus d'une cohorte suisse d'individus en bonne santé ayant un parent du premier degré connu pour une PR (étude « SCREEN-RA », *Early detection of rheumatoid arthritis*). Les résultats du dosage de la calprotectine montrent une augmentation significative des taux sériques dans les 3 groupes de malades par rapport aux contrôles sains. Les patients ont été divisés en quatre groupes définis par les quartiles de concentrations sériques de calprotectine. Les paramètres cliniques et paracliniques, définissant les *outcomes* d'activité et pour certains de sévérité de la maladie, ont ensuite été comparés entre chaque quartile de calprotectine. Nous avons pu relever des différences significatives entre plusieurs paramètres d'activité de la maladie pour la PR et la SpA. Pour la PR, ceci a été démontré pour des *outcomes* purement cliniques (par exemple le nombre d'articulations douloureuses et tuméfiées, les scores RADAI, et le CDAI), des paramètres biologiques (VS et CRP) et des scores composites d'activité inflammatoire de la maladie (DAS28-CRP et DAS28-VS). Ces résultats témoignent d'une activité inflammatoire plus importante de la maladie chez les patients présentant une élévation de calprotectine sérique. Cela reste également vrai pour un sous-groupe de patients avec des valeurs de CRP dans la norme. De même, les résultats que nous présentons dans cette étude semblent indiquer que la calprotectine est plus précise que la CRP pour détecter une maladie active, en particulier chez les patients sous *tocilizumab*, un traitement bloquant la voie de signalisation de l'interleukine (IL)-6, ainsi que pour prédire l'activité de la maladie sur le plan échographique. A l'instar d'autres études, nous avons pu mettre en évidence une association entre les taux de calprotectine et certains paramètres définissant la sévérité de la maladie

(comme les modifications structurales articulaires au niveau radiologique, le score HAQ et la présence de nodules rhumatoïdes). Concernant la SpA, nous retrouvons une association significative entre les quartiles de calprotectine et les niveaux de CRP, le score d'activité composite ASDAS, ainsi que l'appréciation générale du médecin évaluateur. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative des paramètres témoignant d'une activité clinique purement axiale (BASDAI et BASFI) entre les différents quartiles. Par contre, nous retrouvons une association avec la présence d'une atteinte coxofémorale, témoin d'une forme extra-rachidienne et plus sévère de la maladie. Pour ce qui est de l'APso, nos résultats ne montrent pas d'association entre les niveaux de calprotectine et l'activité de la maladie sur le plan articulaire. La population étudiée ici présente toutefois peu d'articulations affectées et une distribution majoritairement oligoarticulaire (≤ 4 articulations atteintes). Or, les données issues de la littérature tendent à montrer une élévation de la calprotectine sérique dans les formes polyarticulaires et débutantes de la maladie. Sur le plan extra-articulaire, nous retrouvons une association avec le degré d'atteinte cutanée reportée par le patient.

Dans l'ensemble, nos résultats reflètent ceux retrouvés dans la littérature médicale, et confirment l'utilité de la calprotectine en tant que biomarqueur d'activité et de sévérité de la maladie, en particulier pour la PR et la SpA, mais aussi lorsque les taux d'autres biomarqueurs ne sont pas élevés, soutenant ainsi le rôle de la calprotectine comme biomarqueur d'activité et de sévérité.

Liste des abréviations (françaises et anglaises), par ordre alphabétique

ACPAs Anti-Citrullinated Peptide Antibodies
Anti-CCP Anticorps anti protéines citrullinées
APso Arthrite Psoriasique
ASAS Assessment of Spondyloarthritis International Society
ASDAS Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score
AxSpA Axial Spondyloarthritis
BASDAI Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
BASFI Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index
CASPAR Classification Criteria for Psoriatic Arthritis
CDAI Clinical Disease Activity Index
CRP C-Reactive Protein
DAMP Damage Associated Molecular Pattern
DAPSA Disease Activity index for PSoriatic Arthritis
DAS Disease Activity Score
DLQI Dermatology Life Quality Index
DM Dermatomyosite
EDTA Ethylenediamine Tetraacetic Acid
ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay
ESR Erythrocyte Sedimentation Rate
FDRs First-Degree Relatives
FMF Fièvre Méditerranéenne Familiale
FR Facteur Rhumatoïde
GS Grayscale
HAQ Health Assessment questionnaire
HC Healthy Controls
IRD Inflammatory Rheumatic Diseases
LES Lupus Erythémateux Disséminé
MCI Myosite à Corps d'Inclusion

MMP Métalloprotéinase

mSASSS modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score

NET Neutrophil extracellular trap

PASI Psoriasis Area and Severity Index

PD Power Doppler

PM Polymyosite

PR Polyarthrite Rhumatoïde

PRO patient reported outcome

PRR Pattern Recognition Receptors

PsA Psoriatic Arthritis

RA Rheumatoid Arthritis

RADAI Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index

RAI Rheumatology Attitudes Index

RF Rheumatoid Factor

RMS Réponse Moyenne Standardisée

ROC Receiver Operating Characteristic

SCQM Swiss Clinical Quality Management registry

SJC Swollen Joint Count

SLEDAI Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

SpA Spondylarthrite Axiale

SPARCCC Spondyloarthritis Research Consortium of Canada (SPARCC) scoring system

TJC Tender Joint Count

TLR-4 Toll-like Receptor 4

TNFi TNF Inhibitor

USPD Ultrasound Power Doppler

VS Vitesse de Sédimentation

I. INTRODUCTION

Le but de ce travail est d'étudier l'utilité du dosage sanguin de la calprotectine comme biomarqueur dans les maladies rhumatismales inflammatoires chroniques, en particulier la polyarthrite rhumatoïde (PR), la spondylarthrite axiale (SpA) et l'arthrite psoriasique (APso). Sa biologie, son rôle en tant que marqueur diagnostique et d'activité, ainsi que son utilité dans les connectivites, la goutte et les maladies auto-inflammatoires seront également abordés. Cette thèse fait l'objet d'une publication scientifique intitulée "*Serum calprotectin: a promising biomarker in rheumatoid arthritis and axial spondyloarthritis*" publiée dans le journal *Arthritis Research & Therapy* en mai 2020. Il s'agit d'une étude de cohorte, regroupant au total 1729 sujets, visant à établir le lien entre la calprotectine sérique et l'activité et la sévérité de la maladie dans la PR, la SpA et l'APso. L'article original, exposé dans cette thèse, constitue l'essentiel du travail. Les résultats de cette étude seront confrontés avec ceux issus de la littérature médicale disponible dans la base de données *MEDLINE*. Dans la première partie de ce travail, nous exposerons les connaissances actuelles relatives à la biologie de la calprotectine en lien avec son utilité en tant que biomarqueur. Puis, une revue de la littérature récente sur le rôle de la calprotectine dans les principales maladies rhumatismales articulaires sera proposée. Dans la troisième et dernière partie, l'étude et les résultats seront présentés et commentés.

1. Les biomarqueurs dans les maladies inflammatoires rhumatismales

L'un des principaux enjeux en rhumatologie est l'importance d'un diagnostic précoce afin de prévenir les dommages irréversibles sur le plan articulaire. Les maladies inflammatoires rhumatismales ont souvent des présentations cliniques et biologiques qui se ressemblent, ce qui peut occasionner des difficultés pour aboutir à un diagnostic précis. Par ailleurs, au sein même d'une maladie rhumatismale articulaire définie, les patients présentent une grande hétérogénéité en ce qui concerne leurs présentations cliniques, leurs réponses aux traitements et leurs pronostics. Les biomarqueurs sanguins ont donc un intérêt clinique majeur afin de faciliter le diagnostic, mais aussi le suivi et la prise en charge des pathologies inflammatoires articulaires chroniques¹. Les biomarqueurs sont définis par le groupe de travail de la *Food and Drug Administration and the National Institutes of Health* (FDA/NIH) comme des indicateurs mesurables, objectifs et reproductibles, permettant d'évaluer un processus biologique ou une maladie². Ils peuvent être classés selon leurs utilités dans le processus clinique. Sept types de biomarqueurs ont été ainsi définis : (1) pour le diagnostic, (2) le monitoring ou le suivi de la maladie, (3) le suivi de la réponse aux traitements et de la pharmacodynamique, (4) comme prédicteurs d'évolution face à une intervention médicale ou chirurgicale, (5) à but pronostique et pour l'évaluation

de la survenue de complications, (6) pour l'évaluation du profil de sécurité d'une intervention, et enfin (7) comme marqueurs de facteur de risque ou de susceptibilité³. Un bon biomarqueur doit être peu onéreux, précis et reproductible. La précision d'un biomarqueur diagnostique est estimée par la sensibilité et la spécificité du test⁴.

En rhumatologie, les biomarqueurs sont devenus des outils indispensables dans la pratique clinique quotidienne. Ils sont fréquemment employés à but diagnostique, mais également pour le suivi de la maladie et l'évaluation de la réponse au traitement. Certains biomarqueurs, comme la protéine C-réactive (CRP) et la vitesse de sédimentation (VS) sont dosés à large échelle pour mesurer l'activité inflammatoire de la plupart des maladies rhumatismales inflammatoires. Ils ne sont cependant pas toujours élevés, et ne reflètent donc pas l'activité de la maladie de façon infaillible^{5 6}. Par exemple, moins de 50% des patients avec une SpA ont une élévation sérique de la CRP⁷. Dans la PR, au début de la maladie, près de 40% des patients n'ont pas d'augmentation de ces marqueurs inflammatoires⁸. Dans le lupus érythémateux systémique (LES), une élévation isolée de la CRP suggère plutôt une infection concomitante, alors que l'élévation de la VS semble mieux témoigner de l'activité de la maladie⁹. D'autres biomarqueurs, plus spécifiques permettent de mieux identifier le type de maladie rhumatismale et/ou d'éventuels facteurs de mauvais pronostics associés. Il s'agit souvent d'autoanticorps dans le contexte de maladies auto-immunes, comme les facteurs antinucléaires et les anti-ADN double brin dans le LES. Dans la PR, les anticorps anti-peptides citrullinés (anti-CCP) ainsi que les facteurs rhumatoïdes (FR) permettent de discriminer la PR des autres maladies inflammatoires avec une bonne spécificité¹⁰, et font désormais parties des critères diagnostiques de la PR¹¹. Ils ont également la capacité de prédire la survenue d'une PR chez des populations à risque¹², et témoignent de la sévérité de la maladie^{13 14 15}. Plus récemment, les anticorps dirigés contre les protéines carbamylées (anti-Carp) sont associés à un pronostic plus sévère dans la PR^{16 17}. Ces anticorps sont présents dans environ deux tiers des cas. Leur absence n'est donc pas synonyme d'absence de maladie. L'identification de nouveaux biomarqueurs reste donc un besoin majeur.

Dans ce contexte, de nombreuses études ont tenté d'évaluer l'utilité de la calprotectine sérique comme biomarqueur dans les rhumatismes inflammatoires. Ce biomarqueur est bien connu en gastro-entérologie, où son dosage dans les selles fait partie des habitudes cliniques. Stable pendant plusieurs jours dans les selles, sa mesure reflète de façon relativement précise l'inflammation dans le tube digestif. L'absence d'élévation lors de son dosage permet alors d'écarter une pathologie inflammatoire du tube digestif avec une bonne fiabilité, et limite ainsi le recours à des méthodes diagnostiques plus invasives. En effet, avec une sensibilité estimée à 82% et une valeur prédictive négative de 98%¹⁸, elle est surtout utile lorsque sa concentration dans les selles est inférieure à 50 µg/g.

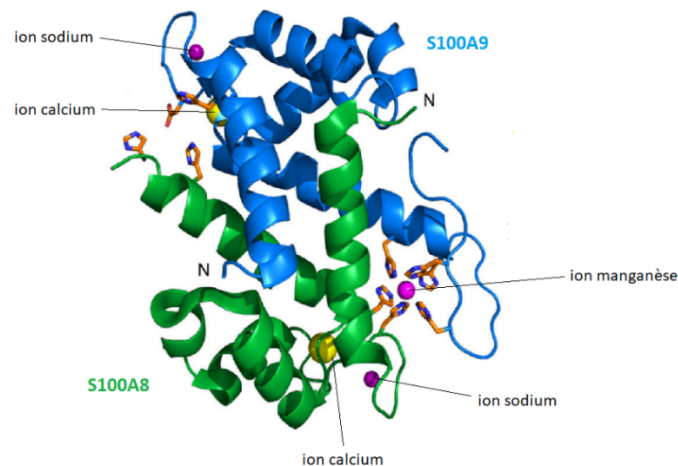
Du fait de ses propriétés biologiques intéressantes, son dosage sanguin dans les maladies rhumatismales a été investigué rapidement après sa découverte¹⁹. La majorité des études cliniques mesure la calprotectine par méthode immuno-enzymatique (ELISA). Bien que la variabilité de la calprotectine soit similaire si elle est mesurée dans le sérum ou dans le plasma-EDTA, une étude suggère que sa mesure dans le plasma-EDTA serait préférable du fait d'une stabilisation de la molécule par l'EDTA²⁰, avec notamment une meilleure corrélation avec les paramètres d'activité dans la PR. Toutefois, la plus grande part des travaux publiés effectue le dosage de la calprotectine dans le sérum.

2. La biologie de la calprotectine

La calprotectine a été décrite et isolée dès le début des années 1980, initialement par Fagerhol et Berntzen²¹. Présente en quantité abondante dans les leucocytes (en particulier la lignée myéloïde), elle a été initialement nommée protéine leucocytaire 1 (protéine L1). Ses caractéristiques biochimiques, notamment sa forme hétérodimérique, sa localisation abondante dans le cytosol des granulocytes et sa capacité à lier le calcium, ont été décrites plus tardivement^{22,23}. Le nom de calprotectine est proposé en 1990 dans un article publié dans le journal *Lancet* en raison de la découverte de propriétés antimicrobiennes²⁴. Dans ce papier, les chercheurs ont pu observer *in vitro* que la calprotectine inhibe la croissance de champignons (*Candida spp*, *Cryptococcus neoformans*) et de bactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Staphylococcus aureus* et *epidermidis*).

La calprotectine est un complexe hétérodimérique de deux protéines de petit poids moléculaires, les protéines S100A8 et S100A9, associées de façon non covalente. Ces deux chaînes protéiques, de 93 (10.8 kDa) et 113 (13.2 kDa) acides aminés respectivement, sont également nommées *myeloid-related protein* (MRP)-8 et MRP-14 ou encore *Calgranulin A* et B. Elles sont toutes deux codées par des gènes présents sur le chromosome 1q21. Elles font parties de la famille des protéines S100, regroupant 24 protéines connues à ce jour²⁵. L'étymologie de leur nom vient de leur propriété chimique, puisque qu'elles sont solubles dans le sulfate d'ammonium à 100%. Les protéines S100, présentes exclusivement chez les vertébrés, ont pour point commun leur motif structural de type « main EF », associant 2 hélices alpha reliées par une boucle ayant la propriété de fixer le calcium²⁶. La figure ci-dessous, adapté d'une référence publiée en 2015²⁷, représente le complexe S100A8/A9 avec les sites liant les 2 ions calcium, sodium et l'ion métallique. La calprotectine est en effet capable de séquestrer des ions métalliques comme le manganèse (représenté sur la figure), le zinc, le fer ou le nickel²⁸, ce qui explique en partie son effet antimicrobien.

Figure 1 : Structure hétérodimérique de la calprotectine avec ses sites de liaison aux ions (27)



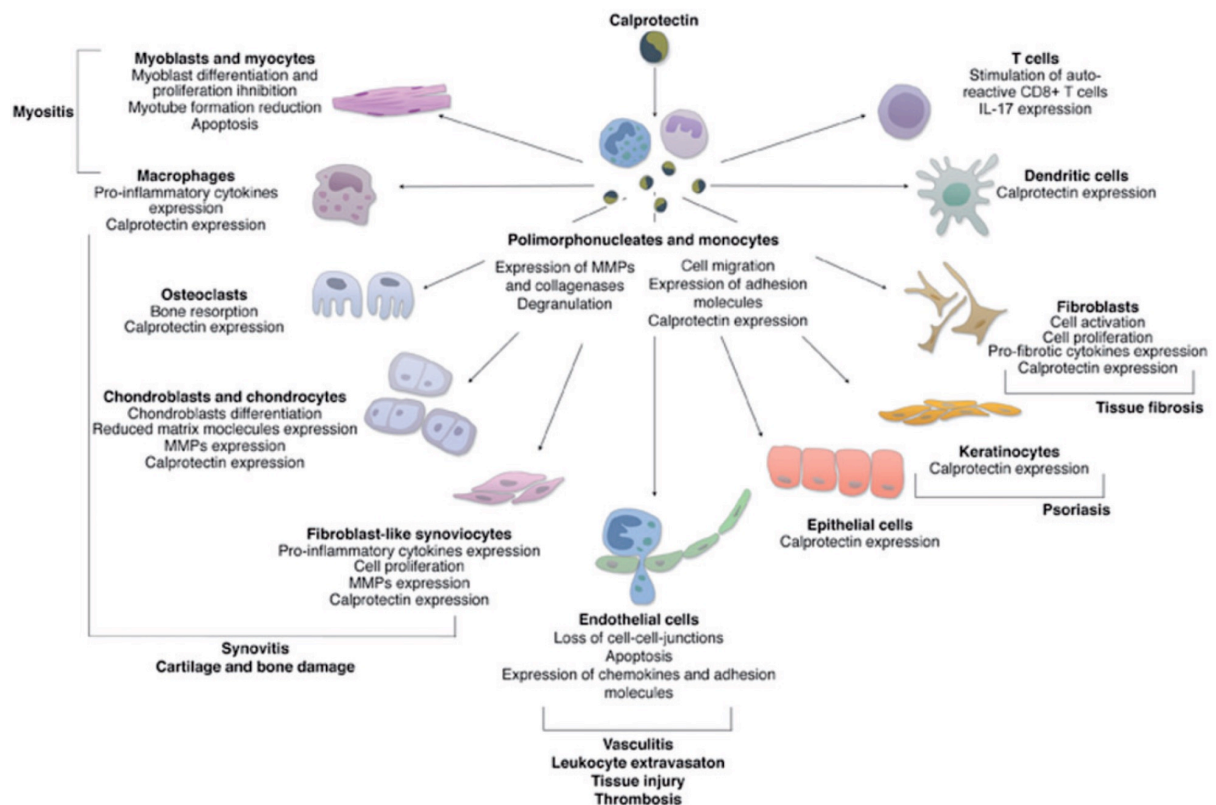
En condition physiologique, la forme hétérodimérique (S100A8/S100A9) est la plus stable et constitue la forme dominante. Ces protéines peuvent également coexister sous forme de monomères ou homodimères (peu stables) et d'hétérotétramères (présents transitoirement lors d'influx intracellulaire important de calcium, par exemple durant la phagocytose). Il est cependant admis qu'elles sont fonctionnellement actives sous leurs formes d'hétérodimères, en réponse au calcium²⁹³⁰. Ce consensus est toutefois relatif puisque sa biologie, complexe, n'est que partiellement élucidée. Par exemple, l'inhibition de la tétramérisation résulte en l'absence d'effet biologique *in vitro*³¹. De plus en plus de travaux ont par ailleurs pu observer des effets biologiques significatifs des monomères S100A9 dans le chimiotactisme des granulocytes³²³³ et la migration transendothéliale des phagocytes³⁴. Une étude a également montré que la protéine S100A9, et non la S100A8, est un ligand du récepteur transmembranaire EMMPRIN (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*) impliqué dans la migration des macrophages et des monocytes³⁵.

La calprotectine est stockée en grande quantité dans le cytosol des granulocytes où elle composerait jusqu'à 45-60% du contenu protéique du cytosol³⁶. Elle possède à la fois des fonctions intracellulaires, encore peu connues, et extracellulaires. Au sein de la cellule, elle participe à la régulation de l'homéostasie du calcium. Elle interagit également avec le cytosquelette et les microtubules, jouant ainsi un rôle dans le trafic intracellulaire des phagocytes et dans la phagocytose³⁷. De même, son rôle pour la migration des leucocytes a été récemment étudié *in vivo* dans un modèle murin³⁸.

En cas de stress cellulaire, la calprotectine est libérée dans le milieu extracellulaire via des mécanismes passifs et actifs. Les mécanismes passifs surviennent lorsque les tissus sont endommagés, par exemple via la formation de NET (*neutrophil extracellular trap*) et la nécrose cellulaire. Une sécrétion active est aussi décrite, mais les mécanismes exacts de libération de la protéine sont encore mal connus. Ils sembleraient faire intervenir une voie non dépendante du réticulum endoplasmique et de l'appareil

de Golgi³⁹. Une fois libéré, le complexe S100A8/S100A9 participe à l'amplification de la réponse inflammatoire. Cette protéine est considérée comme une *alarmine* ou une protéine DAMP (*damage associated molecular pattern*). Les alarmines sont des petites protéines endogènes, souvent exprimées constitutivement, et libérées lors d'un danger. Elles servent de signaux d'alarme et interagissent avec des récepteurs spécialisés, les PRR (*pattern recognition receptors*). Leur fonctionnement est proche de certaines molécules exogènes associées aux pathogènes (les PAMPs ; *pathogen associated molecular patterns*) comme le lipopolysaccharide bactérien. Les cellules cibles de la calprotectine sont multiples, s'agissant autant de cellules du système immunitaire (granulocytes, monocytes, macrophages et même certains lymphocytes) que de cellules du tissu conjonctif (cellules endothéliales, épithéliales et ostéoclastes). En particulier, une étude a pu démontrer son expression constitutive, et augmentée sous l'effet de l'interleukine (IL-)22, au sein même des synoviocytes de type B (*fibroblast-like*) chez des patients atteints de PR ou de gonarthrose⁴⁰. Sa quantité importante, sa quasi-ubiquité et ses multiples mécanismes d'action en font une protéine d'importance majeure du système immunitaire inné. La figure suivante, tirée d'une revue publiée en 2017⁴¹, démontre la multiplicité d'action et des cibles cellulaires de la calprotectine. Elle met également en avant son implication dans la pathogénèse de plusieurs maladies inflammatoires chroniques, qui seront exposés dans le chapitre suivant.

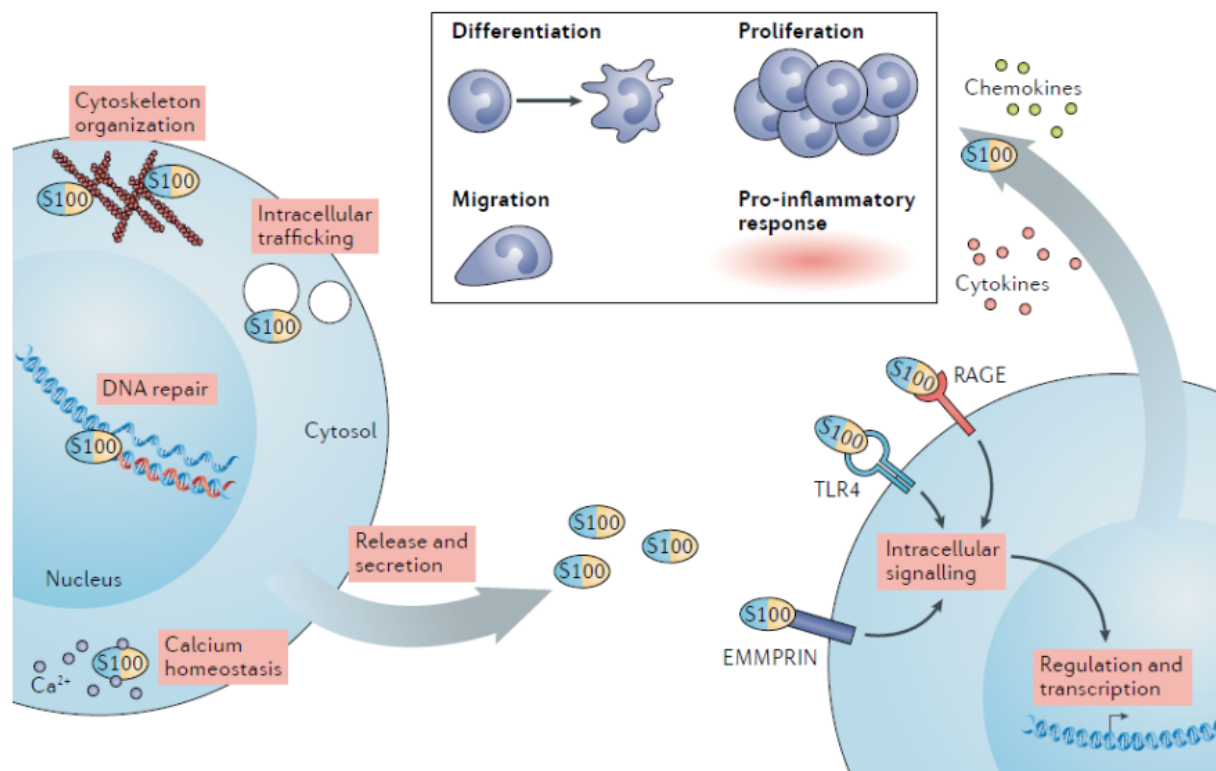
Figure 2 : Les multiples cibles cellulaires et effets de la calprotectine impliqués dans les maladies rhumatismales (40)



Les effets pro-inflammatoires de la calprotectine incluent notamment la perméabilisation endothéliale, l'expression de molécules d'adhésion ainsi que le recrutement et l'activation des neutrophiles³². L'un des principaux mécanismes effecteurs connus est la voie du récepteur Toll-like 4 (TLR-4), qui constitue un PRR important de la réponse immunitaire innée, notamment pour le lipopolysaccharide bactérien. Le TLR-4 est aussi un récepteur de la calprotectine. En effet, la calprotectine stimule l'expression et se lie au TLR-4^{42,43}, aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires telle que l'interleukine (IL)-1 β , IL-6 et le TNF α via l'activation des voies de signalisation intra-cellulaire NF- κ B et p38 MAPK⁴³. Ceci a également pu être observé dans la goutte, où la calprotectine augmente la production d'IL-1 β par activation du TLR-4⁴⁴. D'autres auteurs émettent l'hypothèse qu'elle interagit également avec le récepteur des produits de glycation avancé (RAGE), impliqué notamment dans l'activation des cellules *natural killer* (NK)⁴⁵.

La calprotectine possède une activité chimiotactique puissante sur les granulocytes, et facilite la production de l'IL-8³³ qui constitue la principale chimiokine impliquée dans l'attraction des granulocytes au site inflammatoire. La figure suivante, issue d'une revue sur les protéines S100 dans les rhumatismes inflammatoires parue dans *Nature Reviews Rheumatology*³⁶, illustre et résume les principaux effets intracellulaires et extracellulaires des protéines S100 dont la calprotectine.

Figure 3 : Principaux mécanismes effecteurs intracellulaires et extracellulaires de la calprotectine (36)



En plus de son activité pro-inflammatoire, la calprotectine possède des propriétés antimicrobiennes, conférant une protection contre certains pathogènes. Cette capacité provient vraisemblablement de par son implication dans la formation de réactifs de l'oxygène⁴⁶, et dans la séquestration de métaux⁴⁷. Une association avec une diminution du risque lié à certaines infections bactériennes (*pseudomonas aeruginosa*, *borrelia burgdorferi*) ou fongique (*candida albicans*) a été décrite^{48 49}.

De façon intéressante, la calprotectine possède également des propriétés anti-inflammatoires. Récemment, il a été montré qu'elle est impliquée dans l'induction de la tolérance immune des phagocytes sous certaines conditions⁵⁰. Il pourrait donc s'agir d'un mécanisme de régulation par boucle de contrôle rétroactif, permettant de freiner l'inflammation après l'avoir stimulé. Cette hypothèse, très intéressante, fait actuellement l'objet de recherches par les principaux groupes travaillant sur la biologie de la calprotectine.

II. L'UTILITE DE LA CALPROTECTINE SÉRIQUE DANS LES RHUMATISMES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES

Les concentrations sériques de calprotectine sont comprises entre 0.1-1.6 µg/ml dans une population saine (avec des variations parfois importantes entre les études), et sont souvent élevés dans de nombreuses pathologies inflammatoires (tels que les infections, les rhumatismes inflammatoires ou les néoplasies)⁵¹. Des travaux ont également observé des concentrations sériques augmentées dans l'arthrose digitale⁵² et la gonarthrose⁵³ par rapport à des patients sains. Les taux sont toutefois moins élevés qu'en cas de rhumatisme d'origine inflammatoire. Une analyse protéomique, comparant la synoviale de patients avec PR et arthrose, a montré une expression 10 fois plus importante dans la PR⁵⁴. A l'opposé de la CRP, la calprotectine ne fait pas partie des protéines de la phase aiguë. Elle témoigne de l'activation leucocytaire. Sa concentration sérique semble refléter la concentration synoviale (avec un ratio de 1 pour 2 ou 3 selon certaines études)^{55 56}. Du fait de son faible poids moléculaire, elle peut facilement diffuser de l'articulation enflammée dans la circulation sanguine. A la fois témoin d'une activité inflammatoire mais également actrice à part entière, nous comprenons donc l'intérêt d'étudier le rôle de la calprotectine en tant que biomarqueur dans les pathologies articulaires inflammatoires.

1. DONNÉES ISSUES DE LA LITTÉRATURE

A. La polyarthrite rhumatoïde

Parmi les rhumatismes inflammatoires, le rôle de la calprotectine en tant que biomarqueur reste le mieux étudié dans la PR. Les neutrophiles et les macrophages sont parmi les cellules les plus abondamment retrouvées dans le liquide synovial, le pannus et la membrane synoviale des malades^{57 58}. Il n'est donc pas étonnant d'observer une élévation significative de ce marqueur d'activation leucocytaire. Déjà en 1991, une étude a montré que la calprotectine est en effet augmentée dans le plasma et dans le liquide synovial des PR, de façon significative par rapport à l'arthrose⁵⁵. Depuis, de nombreuses études ont déjà établi une corrélation positive et significative entre les taux sériques de calprotectine et l'activité de la maladie. Une méta-analyse regroupant 849 patients de 16 études a confirmé des taux sanguins augmentés dans le sérum ou le plasma des patients atteints de PR. Il existe également une corrélation significative entre la calprotectine sérique et l'activité de la maladie mesurée par le score composite DAS-28⁵⁹. Le coefficient de corrélation reste toutefois modéré ($r=0.436$; $p<0.01$) et plus faible que la corrélation entre la calprotectine et la CRP ($r=0.566$, $p<0.01$).

Dans cette même étude, une analyse de sous-groupes a révélé des taux de calprotectine supérieurs chez les patients avec PR séropositive (présence de FR).

Ces observations ont également été démontrés dans la cohorte ARCTIC qui comprend des patients avec une PR débutante⁶⁰. Dans cette étude, la calprotectine sérique corrèle significativement avec un score d'activité purement clinique, le CDAI, non-dépendant d'autres biomarqueurs inflammatoires. Par ailleurs, un taux élevé de calprotectine en début de maladie (défini par le quatrième quartile) était associé à un risque de progression radiologique augmenté à 24 mois en analyse univariée et multivariée (avec un odds ratio de 3.65, $p=0.02$). Ceci n'a pas pu être observé avec les derniers quartiles de la VS ou de la CRP en analyse multivariée. Un autre point intéressant de l'étude est la corrélation significative entre les taux sériques de calprotectine et l'activité Doppler à l'échographie, même après instauration d'un traitement de fond, ce qui n'a pas pu être observé avec la VS ou la CRP.

Dans une étude portant sur des PR en rémission clinique, Hurnakova et ses collègues ont montré que la calprotectine sérique était également significativement plus élevée chez les patients présentant une activité inflammatoire résiduelle visualisée à l'échographie (signe d'une activité subclinique). Là encore, la calprotectine s'était montrée supérieure aux marqueurs inflammatoires conventionnelles pour distinguer la rémission ultrasonographique⁶¹. Or, il est désormais bien reconnu que la persistance d'une activité inflammatoire subclinique, déterminée à l'échographie par la présence notamment d'une activité Doppler, est associée à la survenue d'érosions articulaires⁶². Dans cette même étude, il a été montré que la calprotectine permet de discriminer une maladie active avec une aire sous la courbe ROC de 60.7% (IC 95% 0.503-0.711, $p=0.043$)⁶³. Plus récemment, une étude prospective chinoise a pu confirmer une association entre la calprotectine et l'activité de la maladie dans une population de 162 patients avec PR sans élévation de la CRP⁶⁴. Dans cette population, la calprotectine sérique constitue un facteur prédictif de maladie active en analyse multivariée avec un odds ratio de 2.31 (IC 95% 1.12-6.84).

En plus de l'activité de la maladie, la calprotectine semble également pouvoir prédire sa sévérité. Sur le plan radiologique, Hammer et ses collègues ont observé des niveaux circulants de calprotectine plus élevés chez des patients avec une PR séropositive (anti-CCP, FR IgM et IgA)⁶¹. Ils ont également pu démontrer que les taux basaux permettaient de prédire le score radiologique à 10 ans de façon indépendante⁶⁵. En analyse multivariée, la calprotectine et les anti-CCP ont permis de prédire une progression du score radiologiques de Sharp, avec un coefficient de régression de 1.15 ($p=0.007$) et 0.10 ($p<0.001$) respectivement.

Les données concernant le rôle de la calprotectine comme marqueur de réponse aux traitements sont moins claires. Une étude danoise a pu mettre en évidence une association entre la calprotectine

sérique et la réponse clinique après l'introduction du méthotrexate, avec une association meilleure que pour la CRP⁶⁶. Certains suggèrent que des taux sériques élevés en début de maladie permettent de prédire une bonne réponse au méthotrexate⁶⁷. Cela n'a toutefois pas été retrouvé dans la cohorte ARCTIC⁶⁰. Concernant les traitements biologiques, Choi et ses collègues ont observé que la réponse moyenne standardisée (RMS) de la calprotectine, représentant sa sensibilité au changement, est supérieure à celle de la CRP chez les patients traités par l'infliximab (TNFi), l'adalimumab (TNFi) et le rituximab (anti-CD20). Par ailleurs, les données montrent également que la calprotectine est très peu sensible à l'effet placebo (avec une RMS de seulement 0.06 pour la calprotectine contre 0.35 pour la CRP)⁶⁸. Dans une étude prospective du même auteur, des taux de calprotectine plus élevés ont été mesurés parmi les patients ayant eu une bonne réponse à ces biologiques, suggérant qu'elle permettrait de prédire l'efficacité potentielle au traitement⁶⁹. En étudiant la probabilité de réponse au rituximab et aux TNFi, certains auteurs ont proposé un algorithme de traitement basé sur la calprotectine sérique et le DAS28⁷⁰. Toutefois, une large cohorte anglaise n'a pas pu confirmer le rôle de prédictif de la calprotectine pour la réponse thérapeutique à un autre TNFi, l'éta nercept⁷¹.

Globalement, l'ensemble de ces études ne parvient pas à démontrer un net avantage de la calprotectine par rapport aux biomarqueurs traditionnels tels que la CRP et la VS. En revanche, son utilité semble intéressante lors de situations où ces biomarqueurs ne sont pas élevés. Une situation bien connue des rhumatologues est l'effet des traitements anti-IL-6R (tocilizumab, sarilumab) sur la production des protéines de la phase aigüe qui rend impossible l'interprétation des valeurs de la CRP et de la VS. Dans ces cas, la calprotectine – qui, rappelons-le, ne fait pas partie des protéines de la phase aigüe – pourrait présenter un intérêt pratique non négligeable. Toutefois, encore peu d'études se sont intéressées à cette éventualité⁷². Une étude transversale regroupant 87 patients traité par TNFi suggère que la calprotectine est plus discriminante que les biomarqueurs de la phase aigüe pour détecter l'activité de la maladie⁷³. Le même auteur a montré que la calprotectine est également plus discriminante pour détecter l'activité de la maladie chez 33 patients traités par tocilizumab⁷².

B. La spondylarthrite axiale

Le diagnostic de SpA repose sur la conjonction de critères cliniques, comprenant obligatoirement la présence de lombalgies de plus de 3 mois, associés à des modifications radiologiques ou à la présence de l'antigène d'histocompatibilité majeur de classe 1, HLA-B27⁷⁴. La présence de ce gène de prédisposition ainsi que l'élévation de la CRP restent les seuls biomarqueurs inclus dans les critères de classifications validés à ce jour, malgré leur faible sensibilité et spécificité. Le diagnostic reste donc parfois difficile à établir, résultant en un retard conséquent de prise en charge. Malgré l'inclusion de l'IRM dans les critères ASAS de 2009 (*Assessment of SpondyloArthritis international Society*), le retard moyen de diagnostic est estimé entre 4 à 5 ans en Europe dans une étude de 2019⁷⁵. Pour rappel, seul deux tiers des patients présentent une élévation de la CRP⁷⁶. Ainsi, l'identification de biomarqueurs permettant un diagnostic plus rapide et un suivi de l'activité de la maladie plus sensible reste un enjeu clinique important.

Dans un article de revue, W. Maksymowych évoque la calprotectine comme seul candidat suffisamment sérieux pour concurrencer la CRP dans ce contexte⁷⁷. Ses taux sériques sont augmentés chez des patients avec SpA, permettant de discriminer les malades des contrôles sains avec une bonne spécificité et sensibilité, de 92.7% et 80.2% respectivement, pour un seuil à 151.5 ng/ml⁷⁸. Dans une étude chinoise portant sur 522 sujets, la calprotectine corrélait de façon modeste mais significative avec la CRP, la VS mais aussi avec l'échelle visuelle de douleur, le BASDAI et le BASFI. Une autre étude de taille plus modeste a démontré une augmentation significative des taux sériques de calprotectine définis par une augmentation de 2 déviations standards dans 86% des malades, contre 81% pour la CRP⁷⁹. La réponse moyenne standardisée (RMS) de la calprotectine après 2 semaines de traitement par infliximab (TNFi) était également meilleure que celle de la CRP.

L'utilité de la calprotectine a également été mise en avant dans les formes non radiographiques de SpA. Une étude chinoise n'a pas trouvé de différence significative entre 53 patients avec une SpA et 59 patients avec une forme non radiographique. Les 2 groupes avaient un taux significativement supérieur au groupe de contrôles sains⁸⁰. Dans cette étude, l'auteur a pu mettre en évidence une corrélation significative entre la calprotectine sérique et des marqueurs d'activité biologique (CRP ; $r=0.43$), radiologique définie par l'IRM et le score de SPARCCC ($r=0.41$) ainsi que clinique (BASDAI et ASDAS ; $r=0.48$ et 0.38 , respectivement).

Concernant l'atteinte extra-axiale, l'équipe de Gupta a retrouvé des taux sériques significativement plus élevés chez les patients avec une atteinte articulaire périphérique. Il existait par ailleurs une corrélation avec le nombre d'articulations tuméfiées ($r=0.38$, $p=0.01$)⁸¹.

Toutes les études ne sont cependant pas unanimes concernant la fiabilité de la calprotectine dans la SpA. A l'instar d'une étude portant sur 205 patients remplissant les critères de classification de SpA modifiés de New York, il n'y avait pas de différence significative entre les malades par rapport aux contrôles sains⁸². Cependant, 68% des cas présentaient une calprotectine fécale élevée. Il est en effet reconnu que près de la moitié des patients avec SpA présentent une inflammation à bas bruit de la paroi digestive, souvent asymptomatique. L'auteur de l'article a par la suite démontré que la calprotectine fécale élevée était prédictive de la survenue d'une maladie inflammatoire intestinale⁸³. Dans la cohorte belge de SpA (GIANT), des taux élevés de calprotectine sérique étaient indépendamment associés à une inflammation digestive à minima, facteur de risque pour une maladie digestive⁸⁴. Cette étude a montré l'importance que peut avoir un dosage de la calprotectine à but pronostic.

Concernant les marqueurs de sévérité sur le plan axial, les données publiées par Turina et son équipe suggèrent que la calprotectine pourrait être prédictive d'une progression de dommages structuraux de la colonne vertébrale⁸⁵. Les taux médians étaient plus hauts parmi les patients avec une progression radiologique définie par une augmentation du score mSASSS de ≥ 2 ou une progression des syndesmophytes. L'analyse ROC, ajustée à la CRP, montre qu'un taux de calprotectine supérieur à 0.5 $\mu\text{g/ml}$ permet de prédire la progression du mSASSS avec une sensibilité de 80% et une spécificité de 62%.

La calprotectine sérique, en complément à la CRP, semble être un biomarqueur prometteur dans la spondylarthrite axiale. Son utilité est démontrée à la fois comme un outils diagnostique supplémentaire, et comme marqueur de sévérité notamment par l'association avec les maladies inflammatoires digestives (surtout par son dosage dans les selles). Sa capacité de biomarqueur d'activité de la maladie sur le plan axial semble moins convaincante, comme reflété par les coefficients de corrélation qui restent plutôt modeste et les données contradictoires notamment pour les scores d'activité axiale.

C. Le rhumatisme psoriasique

Bien que moins nombreuses, les données sur l'arthrite psoriasique et la calprotectine se calquent sur celles de la PR. Il existe en effet une corrélation entre la calprotectine sérique et l'activité inflammatoire de la maladie. Une étude a montré que les taux sériques sont particulièrement élevés parmi les patients présentant une atteinte polyarticulaire (comparativement aux formes oligo- ou monoarticulaire)⁸⁶. Dans une étude longitudinale avec suivi sur 1 an, Inciarte-Mundo et collègues ont démontré que la calprotectine constitue un facteur prédictif indépendant de récurrence chez des patients avec une APso polyarticulaire, de la même façon que pour les patients présentant une PR⁸⁷. Récemment, d'autres auteurs se sont intéressés au rhumatisme psoriasique débutant et ont observé des taux sériques de calprotectine similaires aux patients présentant une PR débutante⁸⁸. Il existait une corrélation positive significative entre la calprotectine et le score échographique articulaire (à la fois en mode bidimensionnel et en mode Doppler), ainsi qu'avec la CRP. Par contre, ils n'ont pas pu confirmer d'association avec le nombre d'articulations tuméfiées ou douloureuses objectivées à l'examen clinique. Une étude publiée en 2020 s'est intéressée aux biomarqueurs alternatifs à la CRP dans les différentes formes de rhumatisme psoriasique. Il en ressort que la calprotectine et l'IL-8 sont préférentiellement associés à une atteinte articulaire, et en moindre mesure à une forme enthésitique⁸⁹.

La calprotectine permettrait également de prédire les dommages structuraux. Une étude suédoise portant sur 119 malades a pu démontrer que son dosage sérique était associé de façon indépendante à la présence de modifications radiologiques, avec un odds ratio de 1.33 (IC 95% 1.01-1.76)⁹⁰. Sur le plan pathologique, une étude comparative a observé une différence de l'expression de la calprotectine dans le tissu synovial chez des patients avec rhumatisme psoriasique par rapport à ceux présentant une PR ou une SpA. L'expression du complexe S100A8/S100A9 y était significativement augmentée dans les couches synoviales plus profondes, au niveau périvasculaire. Il n'y avait par contre pas de différence entre les taux sériques et synoviaux entre PR, SpA et APso. Ces observations suggèrent un rôle différent de la calprotectine dans la physiopathologie de l'APso. Les auteurs de cette étude émettent l'hypothèse que l'expression périvasculaire pourrait avoir un rôle dans la migration transendothéliale des leucocytes dans l'APso.⁹¹

Comme on pourrait s'y attendre, au vu de la présence d'un infiltrat inflammatoire dans l'épiderme, les taux sériques de calprotectine sont également augmentés dans les formes purement cutanées du psoriasis. Une corrélation avec les scores cliniques d'activité cutanée comme le score PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*) a été retrouvée.⁹² Une analyse protéomique des échantillons de peau des malades avec psoriasis a montré que la calprotectine est la protéine la plus exprimée dans

l'épiderme⁹³. Il semble toutefois que les taux de calprotectine soient plus élevés en cas d'atteinte articulaire associée. Une étude a en effet comparé les taux de calprotectine chez 70 patients présentant soit une APso, un psoriasis vulgaire ou un psoriasis pustuleux. Une élévation significative des taux sanguins dans ces groupes a pu être confirmée par rapport à des contrôles sains et à des patients atteints de dermatite atopique. Les taux les plus élevés ont été observés parmi les patients présentant l'APso et la forme pustuleuse de psoriasis. Dans ce même travail, les analyses de l'ARN messenger codant pour S100A8 ont montré qu'il était exprimé par les kératinocytes et les monocytes infiltrants, alors que l'ARN messenger codant pour S100A9 était principalement présent dans les neutrophiles. Les niveaux d'expression des ARN messagers étaient statistiquement plus élevés dans le groupe d'APso.⁹⁴

Au total, ces données confirment une élévation significative de la calprotectine principalement dans les formes polyarticulaires et débutantes de la maladie. L'atteinte cutanée est, elle-aussi, associée à une augmentation des taux sériques de la calprotectine, rendant peut-être son utilisation pour le suivi de l'atteinte articulaire plus compliquée.

D. Les connectivites

La calprotectine sérique est également augmentée dans la plupart des connectivites. Cela a pu être démontré pour le lupus érythémateux systémique⁹⁵, le syndrome de Sjögren^{96 97}, les myopathies inflammatoires et la sclérodermie systémique. Très peu spécifique, ce biomarqueur apporte peu sur le plan diagnostique pour différencier ces entités. Son utilité comme marqueur de sévérité semble néanmoins se démarquer dans certains cas.

Dans le **lupus érythémateux systémique**, les données sur le lien entre la calprotectine sérique et l'activité de la maladie sont plutôt décevantes. Une étude a néanmoins trouvé une corrélation avec le score d'activité SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) et en particulier l'atteinte articulaire et la présence d'anti-ADN double brin⁹⁸. La présence d'anti-ADN double brin est connue pour être un facteur de sévérité, notamment associé avec l'atteinte rénale. Plus récemment, une étude de cohorte portant sur 44 malades a montré que 2 autres membres de la famille des protéines S100, les protéines S100A12 et S100A4, semblent être plus performants que la calprotectine comme marqueur diagnostique et d'activité⁹⁹. Bien que plus élevée par rapport aux contrôles sains, la calprotectine ne corrélait pas avec l'activité de la maladie dans cette étude.

Cependant, certains travaux ont pu mettre en exergue plusieurs faits intéressants concernant la corrélation des taux circulants de calprotectine avec la sévérité de la maladie. Tout comme cela a été démontré dans les rhumatismes articulaires inflammatoires chroniques, la présence d'un taux sérique élevé est associée à un risque cardiovasculaire augmenté dans le LES selon une étude de cas-témoin¹⁰⁰. Du point de vue néphrologique, un lien a également pu être observé entre les taux de calprotectine et le degré d'atteinte rénale associé à la glomérulonéphrite lupique¹⁰¹. Les taux sanguins de calprotectine corrélaient avec sa présence au niveau rénal (établis par immunohistochimie), ainsi qu'avec le stade pathologique et la perte de la fonction rénale¹⁰². Il s'agit d'une observation importante puisque l'on sait qu'il n'y a pas de biomarqueur pronostique permettant d'établir le degré de l'atteinte glomérulaire (la seule méthode efficace reconnue et validée étant la biopsie). Les auteurs insistent également sur le rôle pathogénique de cette *alarmine* qui participe à l'altération des glomérules en amplifiant la réponse inflammatoire notamment par l'activation de la voie de signalisation TLR-4. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes, connues pour leur rôle central dans la pathogénèse du LES, produisent également la calprotectine et présentent une expression de surface augmentée¹⁰³. Dans un modèle murin de maladie auto-immune, la calprotectine a démontré un rôle essentiel dans l'activation des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ autoréactifs via le récepteur TLR-4¹⁰⁴. Le traitement par hydroxychloroquine, dont les mécanismes d'action ne sont pas entièrement connus mais semblent faire intervenir les voies TLR, est associé à une diminution des taux de calprotectine, et ceci d'autant

plus si une atteinte rénale coexiste¹⁰⁵. Ces travaux suggèrent donc que la calprotectine pourrait être une cible thérapeutique dans le LES.

Dans le **syndrome de Sjögren**, des concentrations plus élevées dans la salive par rapport au plasma ont été observées et suggèrent une production locale glandulaire de calprotectine^{106 107}. Récemment, une étude a pu montrer que la calprotectine salivaire était plus élevée chez les malades par rapport aux contrôles sains et à des patients souffrant d'un syndrome sec non lié au syndrome de Sjögren. Les taux de calprotectine dans la salive provenant de la parotide étaient également significativement plus élevés dans un sous-groupe de patients présentant des facteurs de risque pour la survenue d'un lymphome, complication grave du syndrome de Sjögren¹⁰⁸. Les données en relations avec l'activité de la maladie et notamment l'atteinte articulaire sont plus éparses et parfois contradictoires. Ces constats renforcent l'idée que la calprotectine sérique semble moins utile que son dosage salivaire dans le syndrome de Sjögren.

Moins d'études se sont penchées sur la calprotectine dans les **myopathies inflammatoires**. Ces maladies comprennent la dermatomyosite (DM), la polymyosite (PM) et la myosite à corps d'inclusion (MCI). Elles ont pour points communs notamment la présence d'un infiltrat inflammatoire prédominant de monocytes/macrophages et de lymphocytes T (majoritairement T-CD4+ pour la DM et T-CD8+ pour la PM). Dans la DM de l'enfant, une étude a pu montrer une corrélation entre la calprotectine sérique et l'évaluation globale de l'activité de la maladie par le médecin ($r=0.64$, $p<0.001$), ainsi qu'avec les scores de force musculaire¹⁰⁹. La corrélation était également significative, mais de degré moindre, avec le dosage des créatines phosphokinases (CPK). Quarante-six patients ont également eu une biopsie musculaire. Les résultats, comparés à des biopsies de patients contrôles présentant une maladie musculaire non inflammatoire, démontraient la présence d'une infiltration de macrophages CD68+ CD163+ sécrétant la calprotectine au sein de la musculature. Des analyses supplémentaires réalisées *in vitro* ont pu montrer que la protéine S100A8 induit la sécrétion des cytokines IL-6 et de MCP-1 par le myoblaste. L'infiltration de monocytes exprimant fortement la calprotectine a également pu être observée dans une autre étude regroupant les biopsies de 12 patients avec DM, 12 avec PM et 9 avec MCI¹¹⁰. Dans cette étude, la calprotectine induit une inhibition de la prolifération et une augmentation de l'apoptose des myoblastes dans un modèle murin *in vitro*, suggérant un rôle pathogénique direct de la calprotectine sur le tissu musculaire.

La **sclérodémie systémique** est une maladie sévère du tissu conjonctif qui se définit par trois processus pathogéniques : l'auto-immunité (avec présence de facteur anti-nucléaire, anticorps anti-centromère, anti-Scl70, ou RNA polymérase III), la vasculopathie (phénomène de Raynaud, hypertension artérielle pulmonaire, néphropathie) et la fibrose (cutanée, digestive et pulmonaire). Elle

regroupe une forme dite « diffuse », caractérisée par une importante fibrose cutanée et pulmonaire, ainsi qu'une forme dite « limitée » associée à une atteinte cutanée périphérique et à la présence d'une hypertension artérielle pulmonaire. Une cohorte chinoise, regroupant 57 patients avec atteintes diffuses et 31 avec formes limitées, a mis en évidence des taux plasmatiques et une expression des ARN messagers codant pour S100A8 et S100A9 plus élevés chez les patients présentant une forme diffuse avec atteinte pulmonaire ou rénale¹¹¹. Il y avait également une association avec les anticorps anti-Scl70, anti-histone et anti-U1RNP. Les analyses immunohistochimiques des échantillons cutanés montraient une forte expression cytoplasmique et nucléaire de ces protéines dans les fibroblastes cutanés des patients avec sclérodermie. Une analyse protéomique effectuée chez 40 patients caucasiens a montré un pic d'expression des protéines S100A8/S100A9 chez les patients présentant une sclérodermie systémique avec atteinte pulmonaire fibrosante¹¹². Plusieurs études ont pu également attester de la présence de calprotectine et de la protéine S100A9 dans le liquide bronchoalvéolaire des patients, avec une association avec le degré d'atteinte pulmonaire^{113 114}. Les études dans un modèle expérimental ont montré que la protéine S100A9 présente une activité profibrotique chez le rat¹¹⁵. De même, dans un modèle murin, l'inhibition de la voie de signalisation TLR-4 améliore le degré de fibrose pulmonaire¹¹⁶.

L'ensemble de ces travaux suggèrent que la calprotectine possède un rôle dans la pathogénèse de ces connectivites, et peut constituer un marqueur de sévérité pour la plupart des connectivites.

E. Les arthropathies microcristallines et les maladies auto-inflammatoires

Etant donné les liens étroits entre la calprotectine et le système immunitaire inné, il est plausible de retrouver une corrélation importante entre les taux sériques de calprotectine et l'activité inflammatoire des arthropathies microcristallines et des maladies auto-inflammatoires. En effet, pour ces dernières, une dérégulation des réponses immunitaires innées est fréquemment retrouvée.

Dans **la goutte**, les concentrations de calprotectine sont augmentées dans le sérum, le liquide synovial et les tophi, et corrélient avec l'activité de la maladie¹¹⁷. Une étude a montré que la calprotectine sérique est également augmentée durant les périodes intercritiques¹¹⁸. Cette même étude a pu montrer une corrélation positive entre les taux de calprotectine et les concentrations de la chimiokine IL-8. La calprotectine est libérée par les neutrophiles sous l'effet de la stimulation par les cristaux d'urate¹¹⁹. Le rôle pro-inflammatoire de la protéine S100A8/S100A9 a pu être établi dans un modèle murin où l'immunisation passive contre ces protéines conduisait à l'inhibition complète de la migration des neutrophiles¹²⁰. Les cristaux d'urates de sodium sont nécessaires mais pas suffisants pour induire l'activation de l'inflammasome et la sécrétion d'IL-1 β . Holzinger et ses collègues ont démontrés que la calprotectine peut agir comme co-stimulateur de la voie de signalisation TLR-4 aboutissant à la sécrétion de l'IL-1 β par les cristaux¹¹⁷. De surcroît, les cristaux d'urate de sodium induisent une sécrétion active de calprotectine par les monocytes à concentration modérée, et passive à plus forte dose. De même, la présence de la protéine S100A9 stimule la production d'IL-1 β et des produits réactifs de l'oxygène *in vitro*¹²¹. La calprotectine peut donc agir comme second signal qui aboutit à l'induction de l'inflammasome par les cristaux d'urate de sodium.

Très peu de littératures existent sur la calprotectine sérique et les **rhumatismes à pyrophosphate de calcium (chondrocalcinose)**. L'utilité de son dosage dans la synoviale semble mieux avoir été étudié. Le dosage synovial de la calprotectine semble être l'indicateur le plus efficace pour discriminer une arthrite infectieuse d'une arthrite inflammatoire de type pseudogoutte ou PR¹²². En effet, les auteurs de cette étude ont pu observer qu'un taux de calprotectine synovial de 150 mg/l permettait de diagnostiquer une arthrite septique avec une sensibilité de 76% et une spécificité de 94%, soit un marqueur bien meilleur que le compte leucocytaire ou le dosage des α -défensines.

La **maladie de Still** de l'adulte est une affection auto-inflammatoire difficile à diagnostiquer, sans critères diagnostiques cliniques ou laboratoires spécifiques. De nombreuses études ont constaté des taux sanguins de calprotectine très fortement élevés, avec comme point commun notamment une augmentation significativement plus élevée que chez les patients avec PR^{123 124 125 126}. Certains spécialistes de la maladie proposent d'ajouter la calprotectine aux autres biomarqueurs diagnostiques^{127 128}. Chez l'enfant, une étude sur 60 cas a montré que la calprotectine permet de

différencier l'arthrite juvénile idiopathique de forme systémique d'une infection systémique avec une spécificité estimée à 95%¹²⁹. Les concentrations sériques étaient en effet significativement beaucoup plus élevées chez ces patients par rapport à tous les autres groupes de malades qui comprenaient des enfants avec infections systémiques, des leucémies lymphoblastiques aiguës, des leucémies myéloblastiques aiguës et des cas de NOMID (*Neonatal onset multisystem inflammatory disease*).

A notre connaissance, une seule étude s'est intéressée au dosage de la calprotectine sérique dans les **maladies auto-inflammatoires avec fièvre périodique**¹³⁰. Elle regroupait 39 patients avec des syndromes de fièvres périodiques associés aux mutations du gène codant pour la cryopyrine (CAPS), dont 5 avec un syndrome auto-inflammatoire familial au froid (FCAS), 16 avec un syndrome de Muckle-Wells (MWS) et 18 avec un syndrome CINCA (Chronic Infantile Neurological Cutaneous and Articular syndrome) ou NOMID (*Neonatal onset multisystem inflammatory disease*). Des taux circulants élevés ont été retrouvés, corrélant avec l'activité inflammatoire. Plus important, des taux élevés persistants étaient retrouvés chez des patients avec un CAPS en rémission clinique sous traitement, témoignant d'une activité subclinique de la maladie. Les études sur la fièvre méditerranéenne familiale (FMF) se sont davantage focalisées sur le dosage de la calprotectine fécale lors de crises abdominales^{131 132}. Il n'y a pas de donnée récente sur la calprotectine sérique durant les crises. Cependant, en dehors des périodes de poussées inflammatoires, une étude turque a retrouvé des taux sériques de calprotectine significativement plus élevés chez 60 patients atteints de FMF¹³³.

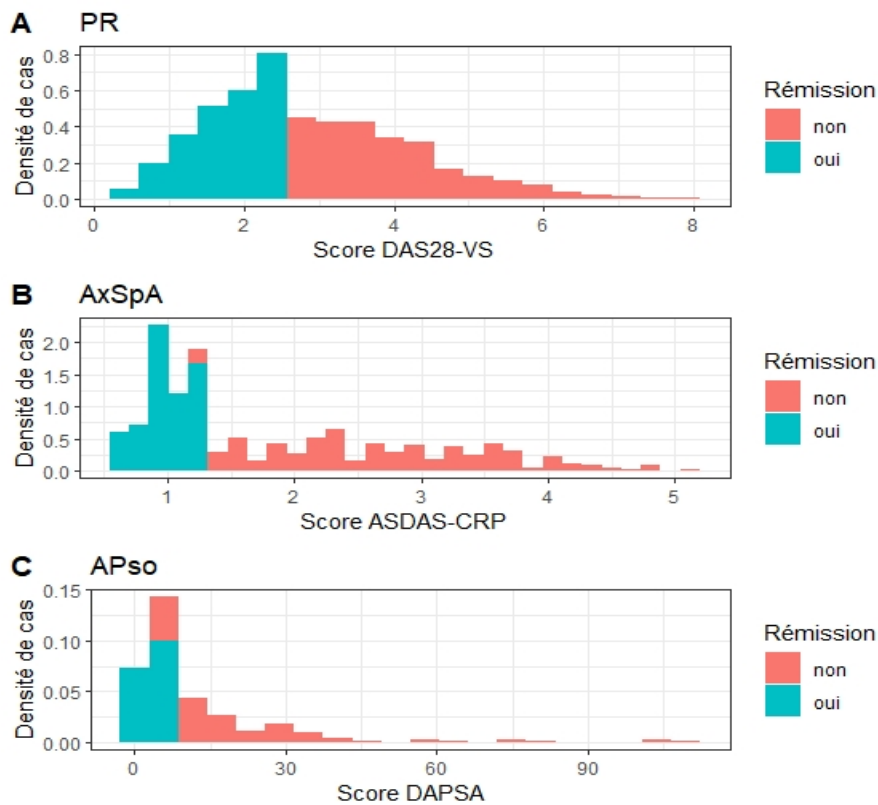
2. DONNÉES ISSUE DE L'ÉTUDE: *“Serum calprotectin: a promising biomarker in rheumatoid arthritis and axial spondyloarthritis”*

A. Description de la population étudiée et de la méthodologie

Afin d'explorer le rôle de la calprotectine en tant que biomarqueur d'activité dans les rhumatismes inflammatoires, nous avons effectué une analyse des données issues du registre national des maladies rhumatismales inflammatoires, la cohorte SCQM (« *Swiss Clinical Quality Management* »). Il s'agit d'une étude cas-témoins visant à établir le lien entre les taux de calprotectine sérique et les paramètres d'activité de la PR, de la SpA et de l'APso. Ce travail fait l'objet d'un article scientifique, publié dans *Arthritis Research & Therapy* en mai 2020. Les principaux résultats et les conclusions de ce travail sont présentés dans l'article original dans la section 2B « L'article original », en anglais. Néanmoins, nous tacherons de commenter certaines observations intéressantes, de les comparer à la lumière des études décrites précédemment et d'apporter quelques analyses complémentaires.

L'un des principaux intérêts de cette étude réside dans le fait qu'elle s'intéresse à une population non sélectionnée de patients présentant soit une PR, une SpA ou une APso. La majorité d'entre eux (près de 80%) répondent aux critères de classifications pour ces maladies, respectivement les critères ACR/EULAR 2010 pour la PR, les critères ASAS pour la SpA et CASPAR pour l'Apso. Le tableau 1, présenté dans la publication, résume les caractéristiques des différents groupes. Les patients inclus dans l'étude avaient en effet une maladie de longue durée d'évolution. Par ailleurs, une majorité des malades était sous traitement de fond antirhumatismal, que ce soit par des traitements de fond conventionnels, des biologiques, ou une association des deux. Il en résulte donc qu'une part significative des patients étaient en rémission clinique au moment de l'étude. La figure 4 montre la densité de distribution pour chaque population inclus dans l'étude par rapport à l'activité de la maladie. Nous constatons effectivement qu'une proportion importante des patients inclus dans l'étude avaient atteint un état de rémission clinique, tel que défini par les différents scores composites.

Figure 4 : Histogrammes de l'activité de la maladie pour (A) la polyarthrite rhumatoïde (DAS-28-VS), (B) la spondylarthrite ankylosante (ASDAS-CRP) et (C) le rhumatisme psoriasique (DAPSA).



Contrairement à la majorité des publications dans le domaine, il ne s'agit donc pas d'une population de patients sélectionnée par certains critères d'inclusions (comme par exemple une maladie de diagnostic récent, active, ou l'absence de traitement biologique etc.). Les patients inclus dans cette étude sont l'ensemble des patients du registre SCQM, avec pour seuls critères d'inclusion la disponibilité d'un échantillon de sérum et un diagnostic de PR, axSpA ou PsA confirmé par un rhumatologue. Si l'hétérogénéité de cette population peut constituer un inconvénient, elle présente néanmoins l'avantage de se rapprocher au mieux de la situation « réelle » des patients suivis en pratique par les rhumatologues. La mise en évidence d'associations éventuelles entre les taux sériques de calprotectine et l'activité de la maladie est donc d'autant plus convaincante.

La cohorte SCQM inclue continuellement des patients souffrant de PR, de SpA, d'APso et d'arthrite non spécifique depuis près de 25 ans. Elle constitue une base de données nationale regroupant des informations concernant les caractéristiques du patient et de la maladie, de nombreux indicateurs de l'activité de la maladie rhumatismale, les traitements, ainsi que les comorbidités. Elle est également associée à une bio-banque, et à des données radiologiques (principalement échographiques et de radiologie standard). Cette impressionnante banque de données est rendue possible grâce à la collecte d'informations cliniques par les médecins rhumatologues spécialistes (travaillant pour la plupart en pratique privée, mais également en milieu hospitalier). De même, les patients, consentis et

consentants, remplissent régulièrement des questionnaires d'auto-évaluation. Une évaluation détaillée et standardisée du patient est ainsi pratiquée annuellement. Le tableau suivant, en langue anglaise, tiré du site internet du registre SCQM, montre les informations qui sont collectées lors des visites, et qui, pour certaines, ont servies à la réalisation de ce travail :

Figure 5 : Aperçu des données saisies lors de l'inclusion et des visites annuelles ou intermédiaires.
Source : <https://www.scqm.ch/fr/aerzte/scqm-datenbank/>

Rheumatoid Arthritis		Axial Spondyloarthritis		Psoriatic Arthritis	
Physician	Patient	Physician	Patient	Physician	Patient
Inclusion					
New enrollment of a patient speaking a national language					
<ul style="list-style-type: none"> Disease characteristics Clinical data Lab values Medication Important health issues Adverse Event Report 	<ul style="list-style-type: none"> HAQ RADAI-5 SF 12 EuroQoL Socioeconomic questionnaire 	<ul style="list-style-type: none"> Disease characteristics Clinical data Lab values Medication Important health issues Adverse Event Report 	<ul style="list-style-type: none"> BASDAI BASFI ASAS HI SF 12 EuroQoL Socioeconomic questionnaire Disease coping 	<ul style="list-style-type: none"> Disease characteristics Clinical data Lab values Medication Important health issues Adverse Event Report 	<ul style="list-style-type: none"> DLQI HAQ SF 12 EuroQoL Socioeconomic questionnaire
at regular intervals:		at regular intervals:		at regular intervals:	
<ul style="list-style-type: none"> RX: Hands and feet ap 		<ul style="list-style-type: none"> RX: Pelvis ap Lumbar spine ap/lat Cervical spine lat 		<ul style="list-style-type: none"> RX: Hands and feet ap Lumbar spine ap/lat Cervical spine lat Pelvis ap 	
Optional:		Optional:		Optional:	
<ul style="list-style-type: none"> Biosamples Ultrasound scan 		<ul style="list-style-type: none"> Biosamples Ultrasound scan 		<ul style="list-style-type: none"> Biosamples 	
Annual check					
The SCQM recommends to carry out an annual check at least once a year. An annual inspection can already be scheduled after 5 months after the last annual inspection.					
<ul style="list-style-type: none"> Disease characteristics Clinical data Lab values Medication Important health issues Adverse Event Report 	<ul style="list-style-type: none"> HAQ RADAI-5 SF 12 EuroQoL Socioeconomic questionnaire 	<ul style="list-style-type: none"> Disease characteristics Clinical data Lab values Medication Important health issues Adverse Event Report 	<ul style="list-style-type: none"> BASDAI BASFI ASAS HI SF 12 EuroQoL Socioeconomic questionnaire Disease coping 	<ul style="list-style-type: none"> Disease characteristics Clinical data Lab values Medication Skin manifestations Important health issues Adverse Event Report 	<ul style="list-style-type: none"> DLQI HAQ SF 12 EuroQoL Socioeconomic questionnaire
at regular intervals:		at regular intervals:		at regular intervals:	
<ul style="list-style-type: none"> RX: Hands and feet ap 		<ul style="list-style-type: none"> RX: Pelvis ap Lumbar spine ap/lat Cervical spine lat 		<ul style="list-style-type: none"> RX: Hands and feet ap Lumbar spine ap/lat Cervical spine lat Pelvis ap 	
Optional:		Optional:		Optional:	
<ul style="list-style-type: none"> Biosamples Ultrasound scan 		<ul style="list-style-type: none"> Biosamples Ultrasound scan 		<ul style="list-style-type: none"> Biosamples 	
Interim control					
Interim checks are recommended in the following cases: at every medical checkup if the data in the registry is used for disease management.					
<ul style="list-style-type: none"> Clinical data Lab values Medication Important health issues Adverse Event Report 	<ul style="list-style-type: none"> HAQ RADAI-5 EuroQoL 	<ul style="list-style-type: none"> Clinical data Lab values Medication Important health issues Adverse Event Report 	<ul style="list-style-type: none"> BASDAI BASFI ASAS HI EuroQoL 	<ul style="list-style-type: none"> Clinical data Lab values Medication Important health issues Adverse Event Report 	<ul style="list-style-type: none"> DLQI HAQ EuroQoL
Optional:		Optional:		Optional:	
<ul style="list-style-type: none"> Biosamples Ultrasound scan 		<ul style="list-style-type: none"> Biosamples Ultrasound scan 		<ul style="list-style-type: none"> Biosamples 	

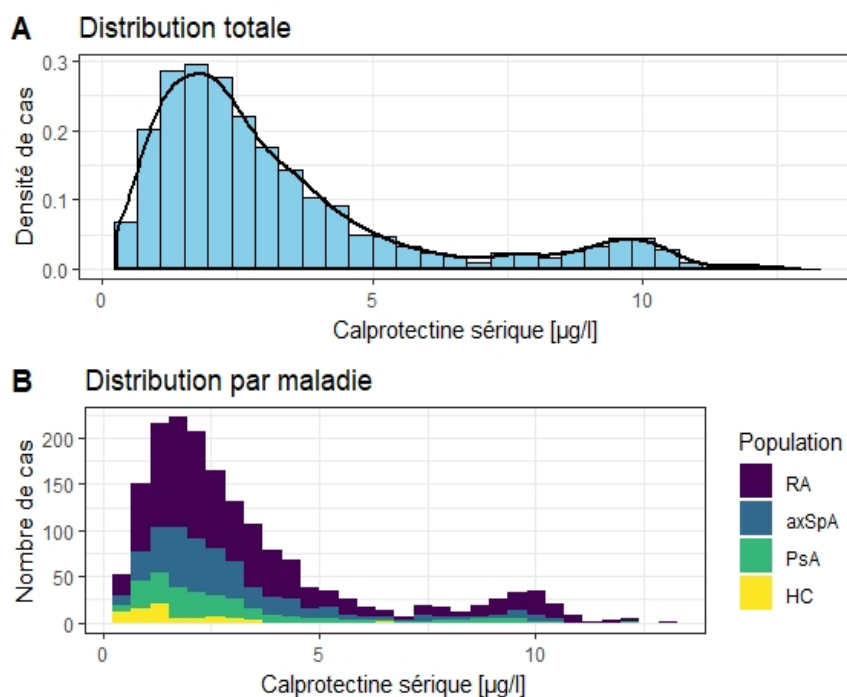
Le groupe contrôle provient quant à lui d'une population en bonne santé issue de la **cohorte de dépistage précoce de la PR (SCREEN-RA)**¹³⁴. Cette cohorte suisse regroupe une population très proche de celle du registre SCQM, puisqu'il s'agit d'individus apparentés au premier degré à des patients atteints de PR. Nous avons également retenu l'absence d'arthralgie, et l'absence de facteur de risque génétique (représenté par l'épitope partagé) ou immunologique (absence d'anticorps FR ou anti-CCP) comme critère d'inclusion au groupe contrôle. Au total, nous avons inclus 72 individus sains, appariés

avec le groupe PR pour l'âge et le sexe, ce qui permet notamment d'étudier le rôle de la calprotectine comme marqueur diagnostique de la PR.

L'ensemble de ces sujets ont eu une prise de sang (effectuée entre 2011 et 2013 pour les groupes malades, et en 2018 pour le groupe contrôle). Les échantillons ont été congelés, maintenu à -80°C jusqu'à leur envoi à *Inova Diagnostics*, un laboratoire de recherche spécialisé dans les maladies auto-immunes, basé à San-Diego, Californie, USA. Le dosage de la calprotectine dans le sérum a été réalisé par technique immuno-enzymatique ELISA en 2015 et en 2018. Le kit ELISA QUANTA Lite Calprotectin utilisé en 2018 a été recalibré avec celui employé en 2015 afin de s'assurer d'avoir la même courbe d'étalonnage pour les groupes malades et contrôle.

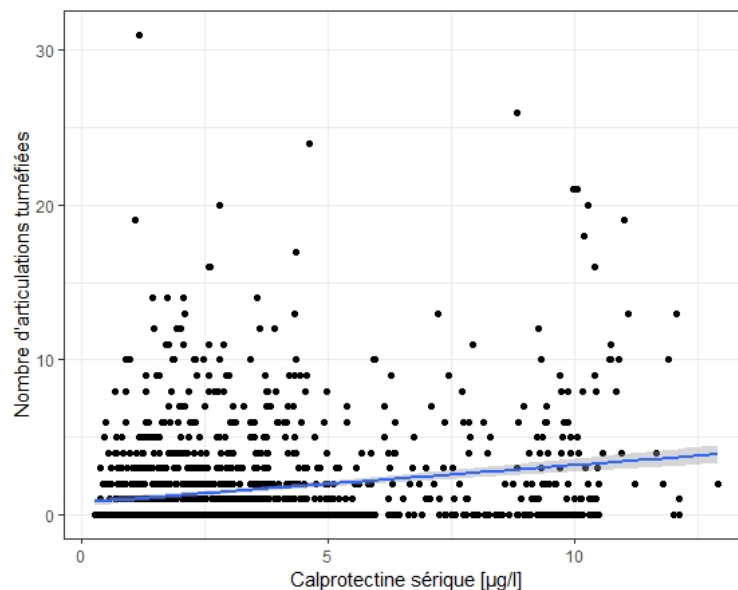
Afin d'investiguer la relation entre les taux de calprotectine et l'activité de la maladie, nous avons opté pour une analyse de quartile plutôt qu'une analyse de corrélation. Ce choix méthodologique était basé sur la distribution de la calprotectine dans notre population d'étude. En effet, comme le montre la figure 6, les taux de calprotectine ne présentaient pas une distribution de type Gaussienne. La partie A de la figure, représentant l'histogramme des mesures de calprotectine, montre également la courbe de densité. Celle-ci présentait une distribution de type « *positively skewed* », fréquemment observée pour les biomarqueurs. Par ailleurs, le test statistique de normalité, le Shapiro-Wilk ($w=0.815$, $p<0.001$), confirme la non-normalité de la distribution. La figure B montre que cette même distribution était présente dans les 3 populations de malades étudiées, ainsi que dans le groupe contrôle.

Figure 6 : Distribution des concentrations sériques de calprotectine au sein de l'échantillon total (A) et, en superposition, par maladies (B)



Une analyse de corrélation présuppose également une relation linéaire entre les variables étudiées, ce qui n'est pas toujours le cas pour un biomarqueur. La figure 7 montre la relation entre la calprotectine et le nombre d'articulations tuméfiées pour les 3 groupes de malades réunis. La courbe de régression linéaire présente une pente effectivement très faible, à 0.16 (calculée par analyse de régression linéaire).

Figure 7 : Scatterplot illustrant la relation entre la calprotectine sérique et le nombre d'articulations tuméfiées pour l'ensemble des patients inclus dans l'étude. La ligne bleue représente la régression linéaire, et son intervalle de confiance à 95%.



Pour ces raisons, les résultats de l'étude sont présentés par quartiles de calprotectine. Nous avons catégorisé les sujets selon les quartiles de calprotectine pour chacune des pathologies étudiées. Ensuite, nous avons comparés les différents paramètres cliniques définissant l'activité de ces maladies parmi les différents quartiles. Les tests statistiques employés sont le test de Wilcoxon pour la comparaison des taux médians de calprotectine entre les groupes de malades et les contrôles sains, le test de Kurksal-Wallis pour la comparaison de variables continues entre les quartiles, et enfin le trend test pour la comparaison entre les variables catégoriques. Cette méthodologie nous a semblé plus sensible et appropriée au vu de la distribution de la calprotectine et de l'hétérogénéité de la population.


B. L'article original

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Serum calprotectin: a promising biomarker in rheumatoid arthritis and axial spondyloarthritis

Matthias Jarlborg^{1*} , Delphine S. Courvoisier¹, Céline Lamacchia¹, Laura Martinez Prat², Michael Mahler², Chelsea Bentow², Axel Finckh¹, Cem Gabay¹, Michael J. Nissen¹ and on behalf of the physicians of the Swiss Clinical Quality Management (SCQM) registry

Abstract

Background: Calprotectin (S100A8/S100A9 protein) is known as a damage-associated molecular pattern (DAMP) protein and reflects mainly neutrophil activation. Serum calprotectin levels might be a good alternative to acute-phase protein as a biomarker in inflammatory rheumatic diseases. The aim of this study is to investigate the association of serum calprotectin with disease activity and severity in rheumatoid arthritis (RA), axial spondyloarthritis (axSpA), and psoriatic arthritis (PsA).

Methods: Serum calprotectin was measured in patients with RA, axSpA, and PsA from the prospective Swiss Clinical Quality Management (SCQM) registry. Asymptomatic first-degree relatives of RA patients were used as healthy controls (HC). Outcomes included swollen joint count (SJC), Disease Activity Score (DAS), Health Assessment questionnaire (HAQ), joint radiographs, and ultrasound power Doppler (USPD) score for RA; Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI), Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS) and coxitis for axSpA; and SJC and Disease Activity Index for Psoriatic Arthritis (DAPSA) for PsA. Comparison of outcomes by calprotectin quartile levels was performed using Kruskal-Wallis tests for continuous outcomes or trend tests for categorical outcomes.

Results: A total of 1729 subjects [RA = 969, axSpA = 451, PsA = 237, and HC = 72] were included. Median levels of serum calprotectin were higher in each disease group compared to HC ($p < 0.01$). In RA patients, all clinical outcomes were statistically different between quartiles of serum calprotectin, indicating an association between calprotectin levels and higher disease activity (SJC, DAS, and USPD scores) and severity (joint radiographs and HAQ). In axSpA, an association between calprotectin levels and ASDAS score ($p < 0.01$) and prevalence of coxitis ($p = 0.02$) was observed. For PsA patients, SJC and DAPSA did not differ across calprotectin quartiles.

Conclusions: This large study supports the association of serum calprotectin levels with disease activity in both RA and axSpA, but not in PsA.

Keywords: Serum calprotectin, S100A8/S100A9, Biomarker, Rheumatoid arthritis, Psoriatic arthritis, Axial spondyloarthritis

* Correspondence: matthias.jarlborg@hcuge.ch

¹Geneva University Hospital, 26 avenue de Beau-Séjour, 1206 Geneva, Switzerland

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

Serum biomarkers are frequently used as diagnostic tools as well as for evaluation of disease activity and treatment response in inflammatory rheumatic diseases (IRD). C-reactive protein (CRP) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) are routinely measured for disease monitoring. However, less than 50% of patients with axial spondyloarthritis (axSpA) and psoriatic arthritis (PsA) present with an elevated CRP [1, 2]. Furthermore, anti-interleukin (IL)-6 therapies (such as tocilizumab) have a direct blocking effect on CRP [3, 4], which precludes its use to assess treatment response or the occurrence of infection. Thus, new biomarkers are required, particularly in rheumatoid arthritis (RA), axSpA, and psoriatic arthritis (PsA).

Calprotectin (or leukocyte protein L1) is a potentially interesting biomarker for a number of IRD. Calprotectin is a heterodimeric complex of two non-covalently associated calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9. They belong to the S100 proteins family which regroups 25 members [5]. These two proteins are also known as myeloid-related protein (MRP) 8 and 14 or calgranulin A and B. Although debated, it seems that they are functionally active when present in their heterodimeric form [6], forming the calprotectin complex (S100A8/S100A9). Calprotectin is stored in large amounts in the granulocyte cytosol (40–60% of cytosolic protein content) and has both intracellular and extracellular functions. Inside the cells, it regulates calcium homeostasis, interacts with the cytoskeleton and microtubules and plays a role in intracellular trafficking of phagocytes. Its role for leukocyte transmigration has been recently shown in a mouse model [7]. When released, calprotectin functions as a damage-associated pattern molecules (DAMP) or alarmin, promoting the inflammatory response.

The normal serum levels of calprotectin are estimated to range between 0.1 and 1.6 µg/ml and can be elevated in numerous conditions such as infection, inflammation, or cancer [8]. More recently, a cut-off above 0.9 µg/ml was proposed to distinguish RA from non-inflammatory arthritis [9]. Given its low molecular weight (36.5 kDa), calprotectin may diffuse from inflamed tissues to the blood circulation. Indeed, serum concentrations seem to reflect synovial concentrations, with a ratio of 1:2–3 according to some studies [10, 11]. Both synovial and serum calprotectin levels are elevated in RA, but not in osteoarthritis [10]. A recent meta-analysis demonstrated that circulating and synovial calprotectin correlates with disease activity in RA [12]. Calprotectin levels also correlated with ultrasound synovitis, particularly with power Doppler signal which was not the case for either CRP or ESR [13–15]. Furthermore, calprotectin is potentially an independent predictor of radiological progression [14, 15]. Inconsistent results have been reported regarding

the use of calprotectin as a predictor of treatment response [16–19]. Very little is known about calprotectin and IL-6 inhibition therapies. A single cross-sectional study investigated calprotectin and IL-6 inhibitors. In this cohort of 33 RA patients receiving tocilizumab, serum calprotectin levels seemed to be an accurate biomarker for assessing disease activity [20]. Serum calprotectin levels are also significantly elevated in axSpA and non-radiographic (nr)-axSpA and correlate with CRP as well as with clinical (BASDAI, ASDAS) and radiological (SPARCC) disease activity scores [21, 22]. Moreover, some authors reported that calprotectin was predictive for progression of structural damage in the spine of patients with axSpA [23, 24]. Among patients with PsA, serum calprotectin levels also correlated with disease activity, with higher levels in patients with symmetrical polyarthritis compared to patients with a mono- or oligo-articular presentations [25]. A recent study could also confirm this correlation in early PsA, as well as in early RA [26]. In psoriasis, serum calprotectin levels correlate with the Psoriasis Area and Severity Index (PASI) score [27].

The overall aim of the study was to compare the value of serum calprotectin as a biomarker for disease activity and severity in RA, axSpA, and PsA, in a cohort of patients from the Swiss Clinical Quality Management (SCQM) registry.

Methods

Design and study population

This study is a nested case-control study within the Swiss Clinical Quality Management (SCQM) registry. This national cohort was established in 1996 and includes patients with a confirmed diagnosis of RA, axSpA, and PsA. The diagnosis is established according to the expertise of board-certified rheumatologists. Clinicians participating in the SCQM are office or hospital-based rheumatologists. They provide clinical patient data and ultrasound examination data (for RA patients), on a regular basis. In addition, patients fill out a number of patient-reported outcome (PRO) questionnaires at each visit. This registry has been described in more detail in a previous article [28].

The present study includes all participants in the SCQM registry with a blood sample available between March 2011 and April 2013. Asymptomatic first-degree relatives (FDRs) of RA patients, from the SCREAM-RA cohort [29], were used as healthy controls (HC). Participants from this Swiss multicenter cohort study of RA FDRs were matched to the RA population in terms of age and sex. They had no signs of autoimmunity, defined as the absence of anti-citrullinated peptide antibodies (ACPAs), rheumatoid factor (RF), and without shared epitope and no joint complaints. This study was

approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Geneva, and all individuals signed an informed consent form prior to enrolment, in accordance with the Declaration of Helsinki.

Exposure of interest and outcome parameters

Serum calprotectin levels were measured using the QUANTA Lite Calprotectin ELISA (Inova Diagnostics, San Diego, Research Use Only for serum/plasma). All values are expressed in micrograms per milliliter. Levels of CRP (mg/l) and ESR (mm/h) were also documented in each disease group. Differences in calprotectin levels in each disease group were compared with the Wilcoxon test. As the distribution of serum calprotectin in our cohort is non-normal (Shapiro-Wilk normality test $w = 0.815$, p value < 0.001) and as the relationships between calprotectin and the outcome parameters are non-linear, we chose to categorize calprotectin levels into quartiles for each disease group. Comparison of clinical outcomes by calprotectin quartile levels was then performed using the Kruskal-Wallis tests for continuous outcomes or trend tests for categorical outcomes.

We examined the cut-off for the serum calprotectin level as marker for disease activity with a receiver operating characteristic (ROC) analysis.

For RA patients, outcome measures included clinically assessed scores such as the swollen joint count (SJC), tender joint count (TJC), and self-reported scores such as the Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index (RADAI) and the health assessment questionnaire (HAQ) disability index. We also used composite scores such as the Clinical Disease Activity Index (CDAI) and Disease Activity Score (DAS28). Hand and feet radiographs were assessed regularly over time (until 2016) with a validated scoring method, the Ratingen score [30]. Radiographs are evaluated prospectively by an assessor blinded to the clinical information. Multivariable analyses were corrected for age, sex, smoking status, disease duration, disease activity (DAS28), number of prior biologics, and calendar year of biosampling.

For musculoskeletal ultrasound assessments in RA patients, we used a standardized semiquantitative (0 to 3) scoring system for grayscale (GS) mode and Power Doppler (PD). This score was developed by the Swiss Sonography in Arthritis and Rheumatism (SONAR) group, based on the recommendations from the OMERACT group [31], and has demonstrated good correlation with clinical disease activity and sensitivity to change in an observational cohort study [32]. The SONAR score includes 22 joints (the same joints as the DAS28, but excluding the 2 joints in the thumbs and the shoulders). A total GS-mode score of at least 10 (out of 66) or a total PD-score of at least 1 (out of 66) was defined as a positive SONAR score in this study, suggesting active

inflammatory disease. Multivariable regression models were used to compare the association of CRP and calprotectin with USPD, and the proportions of explained variance were estimated using R^2 .

In a subgroup analysis, we performed the ROC and Kruskal-Wallis analyses among patients treated with tocilizumab during at least 1 month ($n = 92$) to compare the capacity of calprotectin and CRP to detect a DAS28-ESR score equal or superior to 3.2 (corresponding to moderate or severe disease activity). We restricted the analysis to the subjects who had provided a blood sample within 30 days of clinical examination.

For axSpA patients, our main outcomes were clinical disease activity scores focusing on axial involvement and disability, such as the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI), the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI), and the Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS) [33]. We also examined the physician global disease activity scale (graded from 0 to 10). Clinical signs of peripheral disease were also investigated, such as the SJC, coxitis, enthesitis, and dactylitis.

In PsA, the TJC, the SJC, and the Disease Activity Index for Psoriatic Arthritis (DAPSA) were the main outcomes for articular involvement. For skin evaluation, we dichotomized the reported extent of skin involvement into absent (no lesion and almost no lesion) or present (mild, moderate or severe involvement). The Dermatology Life Quality Index (DLQI) self-reported score was also included.

All analyses were performed using R v3.5.1 (R foundation, Vienna).

Results

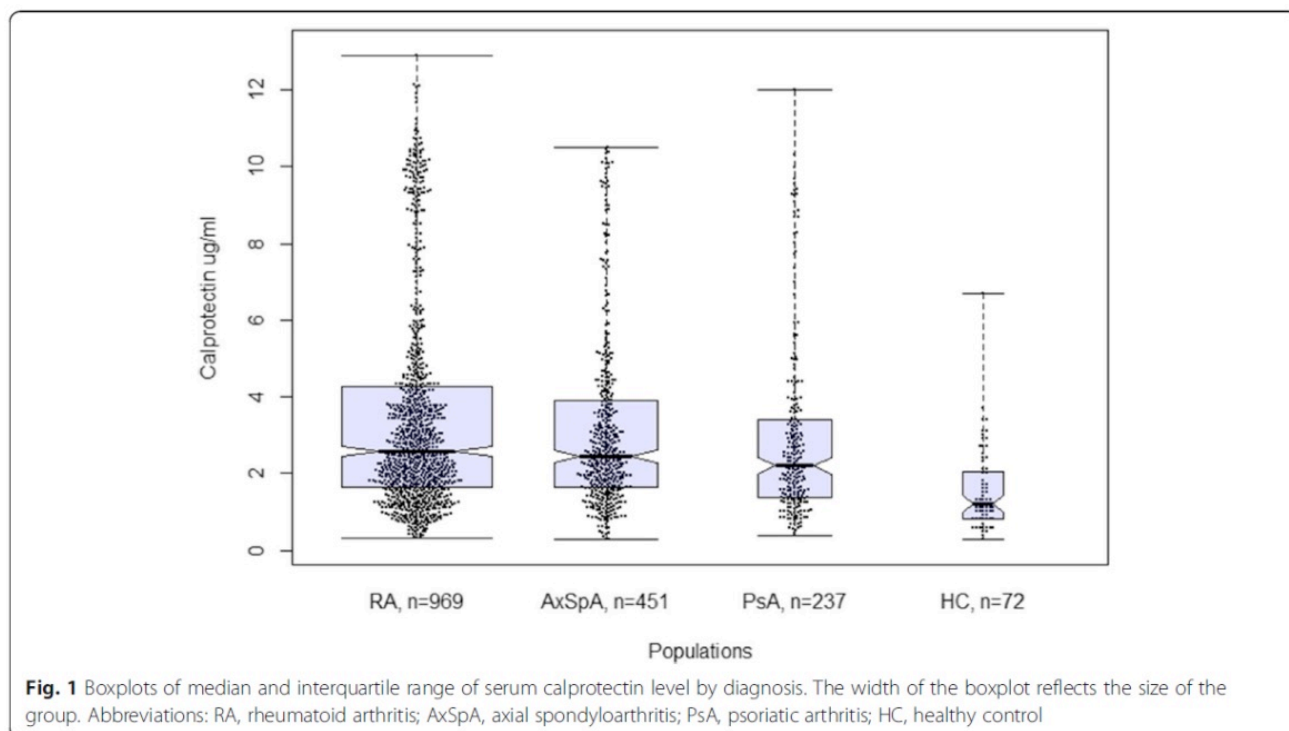
Population characteristics

A total of 1729 subjects [RA = 969, axSpA = 451, PsA = 237, and HC = 72] were included in the study. Clinical characteristics of the different populations are shown in Table 1. Among RA patients, 751 (77.5%) met the 2010 ACR/EULAR classification score. In axSpA, 361 (80.0%) were positive for the Assessment of Spondyloarthritis International Society (ASAS) or the Modified New-York Criteria. In PsA, 198 (83.5%) had positive Classification Criteria for Psoriatic Arthritis (CASPAR). The median time interval between blood collection and clinical examination (outcomes) was 0 days (IQR 0 to 6 days). Musculoskeletal ultrasound evaluations were available in 209 RA patients. The median time interval between the blood collection and the date of ultrasound assessment was 0 days (IQR - 1.5 to 22.5). Among them, 85 (40.7%) had ultrasound and blood collection performed on the same day. A total of 851 RA patients (87.8%) had at least one available joint radiograph, with a median Ratingen score of 4 (range 1–17). RA patients and the matched

Table 1 Population characteristics and median serum calprotectin levels in each group. All results are mean (with standard deviation), except those with an asterisk* which are median [with interquartile range] and those marked with a [#] which are number of patients (%). Abbreviations: BMI body mass index, CRP C-reactive protein, ESR erythrocyte sedimentation rate, GCS glucocorticoids, cDMARDs conventional disease-modifying anti-rheumatic drugs, bDMARDs biological disease-modifying anti-rheumatic drugs, TNFi TNF inhibitors

	Rheumatoid arthritis	Axial spondyloarthritis	Psoriatic arthritis	Healthy control	p value
n	969	451	237	72	
Gender = male [#]	250 (25.8)	268 (59.4)	136 (57.4)	13 (18.1)	< 0.01
Age, year	57.6 (13.2)	44.0 (12.3)	51.5 (12.2)	56.5 (8.3)	< 0.01
Disease duration, year	10.9 (10.1)	9.9 (9.8)	7.9 (8.4)	–	< 0.01
BMI kg/m ²	26.2 (5.4)	26.0 (4.9)	27.5 (5.4)	24.1 (3.4)	< 0.01
Smoker [#]	435/758 (57.4)	146/264 (55.3)	101/168 (60.1)	34/72 (47.2)	0.37
Calprotectin µg/ml*	2.6 [1.7, 4.3]	2.4 [1.6, 3.9]	2.2 [1.4, 3.4]	1.2 [0.8, 2.0]	< 0.01
CRP mg/l*	3.0 [1.0, 7.9]	3.0 [1.0, 8.0]	3.0 [1.0, 7.9]	–	0.39
ESR mm/h*	12.0 [6.0, 22.0]	8.0 [4.0, 17.0]	8.0 [3.0, 14.0]	–	0.62
Swollen joint count*	1.0 [0.0, 3.0]	0.0 [0.0, 0.0]	0.0 [0.0, 2.0]	–	< 0.01
Disease activity score ¹	2.8 [2.0, 3.9]	2.3 [1.5, 3.2]	12 [5.1, 24.0]	–	–
Patients on GCS [#]	277 (28.6)	3 (0.7)	19 (8.0)	–	< 0.01
Patients on cDMARDs [#]	645 (66.6)	75 (16.6)	142 (59.9)	–	< 0.01
Patients on bDMARDs [#]	557 (57.5)	184 (40.8)	108 (45.6)	–	< 0.01
TNFi [#]	205 (21.2)	180 (39.9)	100 (42.2)	–	< 0.01
Tocilizumab [#]	92 (9.5)	3 (0.7)	3 (1.3)	–	< 0.01
Rituximab [#]	172 (17.8)	0 (0.0)	1 (0.4)	–	< 0.01

¹Composite scores: DAS28-ESR for RA, ASDAS-CRP for AxSpA, and DAPSA for PsA are presented



HC group demonstrated a higher percentage of women and older age than patients with axSpA and PsA. There were no differences in CRP ($p = 0.39$) or ESR ($p = 0.62$) levels between the 3 disease groups.

Median levels of serum calprotectin for each of the 3 IRD groups were significantly higher compared to the HC ($p < 0.01$; Fig. 1). No significant difference in calprotectin levels between RA patients and axSpA patients was observed ($p = 0.19$). The highest calprotectin levels were found in RA patients (median 2.6 [1.7–4.3] $\mu\text{g/ml}$; mean 3.5 $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD } 2.7$) and the lowest in the HC group (median 1.2 [0.8, 2.0] $\mu\text{g/ml}$; mean 1.5 $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD } 1.0$). There were no differences in median calprotectin levels between young onset RA ($n = 771$) and elderly onset RA ($n = 177$), with the cut-off at 60 years of age ($p = 0.59$). A ROC analysis demonstrated that serum calprotectin could discriminate RA patients from matched HC with a good specificity but poor sensitivity (Fig. 2). A calprotectin threshold of 3.5 $\mu\text{g/ml}$ (corresponding to 2 standard deviations above the mean level in HC) yielded 97% specificity and 34% sensitivity.

Serum calprotectin as a marker of disease activity in rheumatoid arthritis

In RA, higher calprotectin serum levels were associated with more severe forms of the disease. The proportion of males was significantly higher towards the upper quartile ($p = 0.01$). No differences existed with regard to age, body mass index, or disease duration between quartiles. All clinical disease activity scores were statistically different across serum calprotectin quartiles, showing higher disease activity with the highest serum calprotectin level quartile (Table 2). This was true for PRO scores (RADAI, HAQ), clinical assessments (TJC, SJC), and composite scores (DAS28, CDAI). In supplementary figure S1, a ROC analysis shows the performance of serum calprotectin to discriminate low from moderate/high disease activity according to DAS28-ESR in a population of early RA (defined by a disease duration of less than 24 months). The calprotectin threshold of 3.5 $\mu\text{g/ml}$ yielded 79% specificity and 57% sensitivity.

A total of 560 RA patients (57.8%) had a normal CRP level at the sampling date, defined as less than 5 mg/l. In

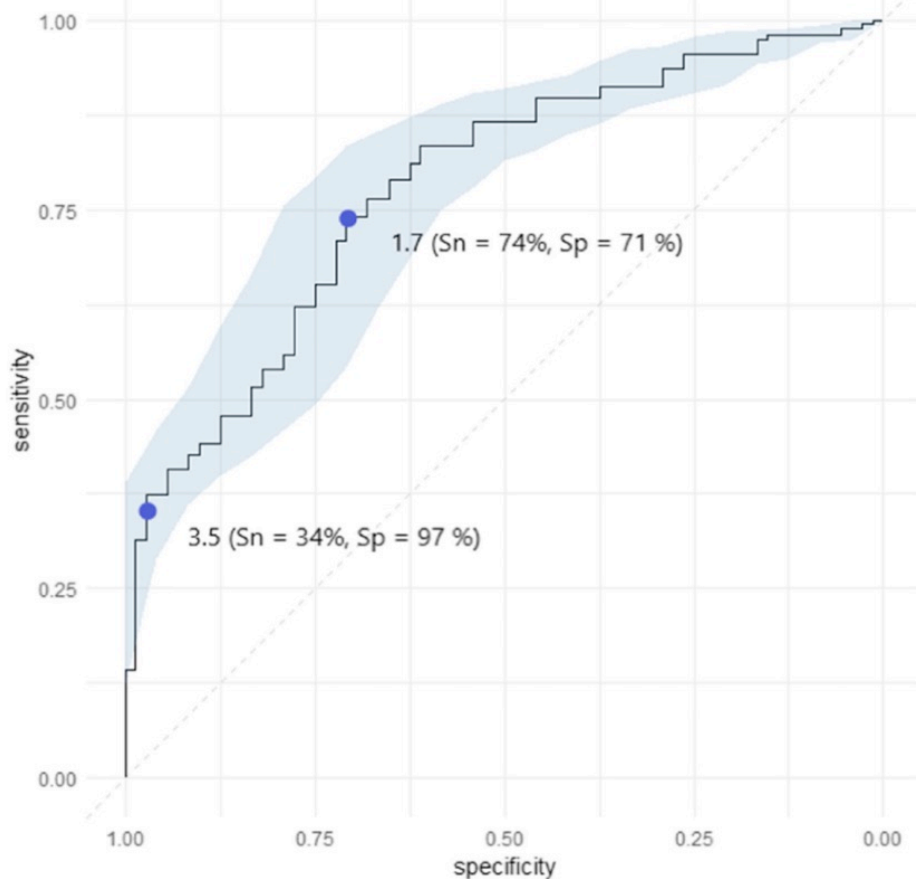


Fig. 2 Receiver operating characteristic (ROC) curve of serum calprotectin as diagnostic marker in rheumatoid arthritis. Rheumatoid arthritis ($n = 969$) versus healthy individuals ($n = 72$). Thresholds of 3.5 $\mu\text{g/ml}$ and 1.7 $\mu\text{g/ml}$ (threshold with the highest sum sensitivity + specificity) and confidence interval for sensitivity are plotted. Area under the curve: 0.78, 95% CI 0.73–0.83 (DeLong). Abbreviations: Sn, sensitivity; Sp, specificity

Table 2 Characteristics of the patients with rheumatoid arthritis stratified by calprotectin percentiles. All results are mean (with standard deviation), except those with an asterisk* which are median [with interquartile range] and those marked with a ⁵ which are number of patients (%). *Abbreviations:* BMI body mass index, CRP C-reactive protein, ESR erythrocyte sedimentation rate, RADAI Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index, HAQ Health Assessment Questionnaire, CDAI Clinical Disease Activity Index, DAS28 28-joints Disease Activity Score, US ultrasound, SONAR Swiss Sonography in Arthritis and Rheumatism, ACR/EULAR American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism, RF rheumatoid factor, ACPA anti-citrullinated peptide antibodies

Serum calprotectin quartile [µg/ml]	0–1.7	1.7–2.6	2.6–4.3	4.3–13	p value
n	243	242	242	242	
Age years	56.6 (13.0)	57.2 (13.0)	58.3 (13.8)	58.3 (12.8)	0.41
Elderly onset ⁵¹	38 (15.6)	51 (21.1)	45 (18.6)	43 (17.8)	0.77
Disease duration, years	10.6 (10.1)	10.8 (10.0)	10.8 (10.0)	11.3 (10.5)	0.92
Gender = male ⁵	53 (21.8)	56 (21.3)	65 (26.9)	76 (31.4)	0.01
BMI kg/m ²	25.3 (5.0)	26.3 (5.5)	26.3 (5.9)	27.0 (5.2)	0.16
CRP mg/l*	2.0 [1.0, 4.6]	2.0 [1.0, 7.0]	2.2 [1.0, 7.0]	4.2 [2.0, 12.0]	< 0.01
ESR mm/h*	8.0 [5.0, 16.0]	10.0 [6.0, 20.0]	12.0 [5.5, 22.5]	16.0 [8.0, 30.0]	< 0.01
Tender joint count	2.6 (4.3)	3.2 (4.8)	3.6 (5.2)	4.0 (5.6)	0.02
Swollen joint count	1.3 (2.5)	1.7 (2.8)	2.2 (3.3)	3.4 (4.5)	< 0.01
RADAI score	2.3 (1.8)	2.9 (2.2)	2.9 (2.2)	3.3 (2.2)	< 0.01
HAQ	0.6 (0.6)	0.8 (0.7)	0.8 (0.7)	1.0 (0.7)	< 0.01
CDAI	7.3 (7.9)	9.8 (9.9)	11.2 (11.7)	12.3 (13.4)	< 0.01
DAS28 CRP	2.5 (1.0)	2.8 (1.1)	2.8 (1.2)	3.2 (1.4)	< 0.01
DAS28 ESR	2.6 (1.3)	2.9 (1.3)	3.0 (1.3)	3.5 (1.5)	< 0.01
DAS28 ESR moderate/high ⁵²	58/190 (30.5)	78/196 (39.8)	83/193 (43.09)	118/200 (59.0)	< 0.01
DAS28 ESR remission ⁵³	103/190 (54.2)	86/196 (43.9)	78/193 (40.4)	60/200 (30.0)	< 0.01
US score B mode score	8.9 (6.5)	9.1 (6.3)	10.4 (5.3)	11.6 (8.7)	0.13
US Power Doppler score	2.2 (5.9)	2.0 (4.0)	2.0 (3.0)	4.7 (6.1)	0.01
SONAR positive ⁵	28/44 (63.6)	30/47 (63.8)	31/47 (66.0)	58/71 (81.7)	0.02
ACR/EULAR 2010 Criteria	6.7 (2.1)	7.1 (2.1)	7.3 (2.2)	7.6 (2.1)	< 0.01
RF positive ⁵	157/232 (67.7)	164/233 (70.4)	172/228 (75.4)	179/236 (75.8)	0.02
ACPA positive ⁵	144/226 (63.7)	145/223 (65.0)	158/217 (72.8)	159/227 (70.0)	0.06
Rheumatoid nodules ⁵	36/232 (15.5)	51/232 (21.9)	46/226 (20.3)	59/223 (26.4)	0.01

¹Elderly onset = age of onset after 60 years of age

²Proportion of patients with a DAS28 ESR ≥ 3.2

³Proportion of patients with a DAS28 ESR < 2.6

this subgroup, without acute phase reactants, we also demonstrated a statistically significant association with calprotectin quartiles levels and SJC ($p = 0.02$). The median calprotectin levels were also statistically different between patients with moderate/high disease activity (DAS28-ESR ≥ 3.2, $n = 165$) and low disease activity (DAS28-ESR < 3.2, $n = 352$) in this subgroup, with a median [IQR] of respectively 2.8 [1.7–4.3] µg/ml and 2.2 [1.5–3.6] µg/ml (Wilcoxon test, $p = 0.005$).

Regarding the subgroup of 209 patients with available ultrasound examinations, USPD scores were significantly higher in the uppermost quartile ($p = 0.007$). In univariable regression models, both CRP ($R^2 = 0.02$, $p = 0.04$) and calprotectin ($R^2 = 0.10$, $p < 0.001$) were associated with elevated USPD scores, albeit with a very low proportion of variance explained. Multivariable model

analysis revealed that calprotectin alone was independently associated with USPD scores. The addition of CRP to this model did not improve the association (likelihood ratio test between models $p = 0.14$). Furthermore, the combination of calprotectin and CRP was more predictive than CRP alone ($p < 0.001$). The number of patients with a positive SONAR score also differed significantly difference across quartiles ($p = 0.02$). Supplementary figure S2 demonstrates the sensitivity and specificity of calprotectin and CRP to detect a positive SONAR score, suggestive of active disease. The ability of calprotectin to detect a positive SONAR score was better in patients with a disease duration of less than 5 years.

Among the 92 (9.5%) RA patients treated with tocilizumab, 56 (60.9%) had an available blood collection within 30 days of the clinical examination. The median

levels of serum calprotectin were statistically higher in patients with one or more swollen joints compared to patients with no swollen joints ($p = 0.03$; supplementary figure S3). We found no difference for CRP levels ($p = 0.1$; supplementary figure S3). According to the DAS28-ESR, 12 of 49 subjects with data available (24.5%) had moderate or high disease activity (score ≥ 3.2). The mean calprotectin level differed significantly between the group in remission or low disease activity ($3.2 \mu\text{g/ml} \pm 2.6 \text{ SD}$) and the group with moderate to high disease activity ($6.5 \mu\text{g/ml} \pm 4.2 \text{ SD}$) ($p = 0.002$). This was not the case for the median level of CRP ($p = 0.17$). Median level of calprotectin and CRP are described in supplementary figure S4. The ROC analysis on the same figure demonstrates that calprotectin is more accurate to detect patients with a DAS28-ESR score above 3.2 than CRP, with an area under the curve of 0.8 and 0.71 respectively.

Serum calprotectin as a marker of disease severity in rheumatoid arthritis

Higher quartiles of serum calprotectin were associated with a significantly higher prevalence of RF seropositivity ($p = 0.02$) and a significantly higher number of items of the ACR/EULAR classification score ($p < 0.01$). The presence of rheumatoid nodules was also more frequently reported in the highest quartile of calprotectin

($p = 0.04$). Similar results were obtained with the subgroup of patients known to present positive 2010 ACR/EULAR classification criteria.

A total of 70 RA patients (7.2%) with the highest calprotectin levels (above $9.46 \mu\text{g/ml}$) had significantly higher baseline Ratingen scores compared to patients with normal calprotectin levels, in both univariable and multivariable analyses ($p = 0.04$ and $p = 0.02$, respectively). Supplementary figure S5 demonstrates the evolution of the Ratingen score over time in relation to the calprotectin quartile levels. The highest quartile was associated with a significantly higher baseline Ratingen score ($p = 0.01$), although the change over time was similar across quartiles. These results remained significant in adjusted analyses ($p = 0.01$).

Serum calprotectin as a marker of disease activity in axial spondyloarthritis

In axSpA, the mean calprotectin level was $3.2 \mu\text{g/ml}$ ($\text{SD} \pm 2.7$). As shown in Table 3, an association between higher calprotectin quartiles and higher ASDAS scores ($p = 0.01$) was observed. When each criterion of ASDAS score was tested separately, only CRP was different across quartiles. Physician global disease activity scale was also significantly higher across quartiles ($p = 0.02$). Although there was an association between calprotectin

Table 3 Characteristics of the patients with axial spondyloarthritis stratified by calprotectin percentiles. All results are mean (with standard deviation), except those with an asterisk* which are median [with interquartile range], and those marked with a ⁵ which are number of patients (%). Abbreviations: BMI body mass index, CRP C-reactive protein, ESR erythrocyte sedimentation rate, BASDAI Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index, BASFI Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index, ASDAS Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score

Serum calprotectin quartile [$\mu\text{g/ml}$]	0–1.6	1.6–2.4	2.4–3.9	3.9–13	<i>p</i> value
<i>n</i>	113	113	112	113	
Disease duration, years	10.4 (10.2)	8.5 (9.8)	9.9 (9.8)	10.6 (9.4)	0.37
Age years	45.9 (11.4)	44.4 (12.7)	43.0 (11.3)	42.7 (13.7)	0.20
Gender = male ⁵	62 (54.9)	62 (54.9)	67 (59.8)	77 (68.1)	0.03
BMI kg/m^2	25.3 (4.7)	26.3 (4.8)	26.3 (5.4)	26.3 (4.7)	0.44
ESR mm/h^*	6.0 [4.0, 11.5]	8.0 [4.0, 17.5]	8.0 [4.0, 16.0]	10.0 [4.0, 25.0]	0.01
CRP mg/l^*	3.0 [1.0, 8.0]	2.0 [1.0, 8.0]	3.0 [1.0, 8.0]	4.0 [2.0, 13.0]	< 0.01
BASDAI score	3.6 (2.3)	4.0 (2.4)	3.5 (2.4)	4.1 (2.3)	0.19
BASFI score	2.1 (2.3)	2.7 (2.6)	2.3 (2.3)	2.8 (2.5)	0.22
ASDAS score	2.1 (0.9)	2.4 (1.0)	2.2 (1.1)	2.7 (1.0)	0.01
ASDAS moderate/high ⁵¹	40/79 (50.6)	47/81 (58.0)	37/65 (56.9)	49/72 (68.1)	0.04
ASDAS remission ⁵²	14/79 (17.7)	16/81 (19.8)	20/65 (30.8)	4/72 (5.56)	0.20
Physician global disease activity	1.9 (1.6)	2.4 (2.0)	2.2 (2.0)	2.6 (1.8)	0.02
Swollen joint count	0.4 (0.9)	0.6 (1.8)	0.4 (0.9)	0.3 (1.2)	0.46
Hip involvement ⁵	3 (2.7)	3 (2.7)	5 (4.5)	10 (8.8)	0.02
Enthesitis ⁵	32 (28.3)	38 (33.6)	40 (35.7)	36 (31.9)	0.68
Dactylitis ⁵	2 (1.8)	0 (0.0)	5 (4.5)	3 (2.7)	0.51

¹Proportion of patients with an ASDAS score ≥ 2.1

²Proportion of patients with an ASDAS score < 1.3

quartiles and the proportion of patients with moderate or high disease activity according to ASDAS score ($p = 0.04$), we did not find any association with the proportion of patients in remission. When focusing on the extra-axial manifestations, we found no association between serum calprotectin quartiles and clinical manifestations, including SJC, enthesitis, or dactylitis. However, there was significantly more inflammatory hip involvement in the highest calprotectin quartile ($p = 0.02$). With the exception of a higher proportion of males across the quartiles, there were no differences regarding the other population characteristics (age, body mass index or disease duration). Same results were obtained with the subgroup meeting the ASAS or the Modified New-York criteria.

Serum calprotectin as a marker of disease activity in psoriatic arthritis

PsA patients had significantly lower calprotectin levels (mean $2.9 \mu\text{g/ml} \pm 2.3 \text{ SD}$) compared to RA ($p < 0.01$) and axSpA ($p = 0.02$) patients. All clinical activity scores (TJC, SJC, and DAPSA) did not differ across calprotectin quartiles (Table 4). For the other biological markers, only ESR was higher across calprotectin quartiles. Regarding cutaneous psoriasis, the severity of skin involvement was significantly higher in the upper quartiles ($p = 0.01$). Similar results were obtained with subgroups of patients meeting the CASPAR criteria, or when excluding patients in remission according to the DAPSA score ($\text{DAPSA} \leq 4$). Similarly, we observed the same

association between calprotectin quartiles and skin involvement when focusing on patients with a disease duration of less than 24 months. In these different subgroups, we did not demonstrate any associations with joint involvement. In contrast to RA and axSpA, there was a higher percentage of females in the upper quartiles ($p = 0.04$).

Discussion

This is the largest study of serum calprotectin in patients with RA, axSpA, and PsA including cross-sectional as well as prospective analyses, with supporting evidence of the role of calprotectin as a potential prognostic biomarker for joint-related rheumatic diseases. In our study, serum calprotectin levels in the HC group were similar to levels found in the literature, with a median level of $1.2 \mu\text{g/ml}$. Consistent with previous reports, we found higher levels of serum calprotectin in RA, axSpA, and PsA patients compared to the healthy control group. In RA, serum calprotectin levels were associated with disease activity (SJC and CDAI) and disease severity (HAQ and Ratingen score). A significant association between calprotectin quartiles levels and articular inflammation on ultrasound PD was also observed. Despite the low sensitivity of calprotectin, it has a good specificity to differentiate RA patients from healthy controls (even in this established disease cohort where the majority of patients were treated and well controlled). In association to other biomarkers (mainly ACPA and RF), serum calprotectin may be helpful to detect inflammatory disease in

Table 4 Characteristics of the patients with psoriatic arthritis stratified by calprotectin percentiles. All results are mean (with standard deviation), except those with an asterisk* which are median [with interquartile range] and those marked with a ⁵ which are number of patients (%). Abbreviations: BMI body mass index, CRP C-reactive protein, ESR erythrocyte sedimentation rate, DAPSA disease activity in psoriatic arthritis (< 15: low, 15–28: moderate, > 28 high disease activity), DLQI Dermatology Life Quality Index

Serum calprotectin quartile [$\mu\text{g/ml}$]	0–1.4	1.2–2.2	2.2–3.4	3.4–12	<i>p</i> value
<i>n</i>	60	59	59	59	
Disease duration, years	8.3 (8.7)	8.6 (8.3)	7.5 (8.7)	7.4 (7.9)	0.84
Age years	53.6 (12.5)	50.1 (11.1)	49.8 (12.8)	52.4 (12.4)	0.27
Gender = male ⁵	37 (61.7)	39 (66.1)	34 (57.6)	26 (44.1)	0.04
BMI kg/m^2	27.4 (4.9)	27.7 (5.2)	26.0 (4.6)	28.8 (6.7)	0.19
ESR mm/h^*	6.0 [2.0, 12.0]	7.0 [2.0, 13.0]	8.0 [4.0, 12.0]	11.0 [6.0, 20.0]	0.01
CRP mg/l^*	3.0 [1.0, 8.0]	2.5 [1.0, 8.0]	3.0 [1.0, 6.8]	3.4 [1.8, 7.8]	0.38
Tender joint count	3.9 (9.3)	3.3 (6.4)	4.1 (8.9)	4.8 (8.5)	0.84
Swollen joint count	1.8 (4.5)	1.3 (2.5)	1.1 (2.5)	2.2 (4.4)	0.33
DAPSA	18.2 (23.5)	15.6 (17.5)	18.4 (16.8)	21.1 (24.2)	0.80
DAPSA moderate/high ⁵¹	14/36 (38.9)	12/39 (30.8)	14/31 (45.2)	13/28 (46.4)	0.35
DAPSA remission ⁵²	6/36 (16.7)	9/39 (23.1)	7/31 (22.6)	4/28 (14.3)	0.86
DLQI	3.2 (5.1)	3.0 (4.5)	4.5 (5.5)	4.6 (7.3)	0.44
Reported skin manifestation ⁵	14/43 (32.6)	22/39 (56.4)	23/47 (48.9)	23/38 (60.5)	0.01

¹Proportion of patients with an ASDAS score ≥ 2.1

²Proportion of patients with an ASDAS score < 1.3

patients complaining of arthralgia. However, further studies are required to confirm this hypothesis [9].

In axSpA, an association between serum calprotectin and physician global disease activity and ASDAS scores was found. Serum calprotectin does not seem to be a good marker for axial disease activity (BASDAI, BASFI). Nevertheless, it correlated more strongly with peripheral articular involvement, and a significant association between serum calprotectin quartiles levels and hip involvement was observed. To our knowledge, this is the first study showing an association of serum calprotectin level with large joint involvement in axSpA.

Surprisingly, we did not find any associations between disease activity and calprotectin levels in PsA patients. Other studies demonstrated a correlation between serum calprotectin and disease activity in a polyarticular PsA population [34] or in early PsA [26]. One explanation could be the low SJC in axSpA and PsA compared to RA patients (Table 1). Another explanation could be the distribution of joint involvement. As already mentioned, calprotectin levels were found to be higher in patients with polyarticular PsA [25]. In a previous work focusing on PsA subtypes in the SCQM cohort, Stekhoven et al. showed that only a minority of patients had a polyarticular pattern (16 out of 957) in this Swiss cohort [35]. Finally, an interesting study observed a different distribution of calprotectin expression in the synovial tissue of patients with PsA compared to RA and SpA [11]. This might also suggest a different role of calprotectin in the pathophysiology in PsA.

The serum calprotectin levels are influenced by local inflammation and synovial fluid calprotectin levels [10, 36]. Thus, we hypothesize that serum calprotectin levels reflect the amount of synovial inflammation, which is higher in polyarticular disease or in large joint involvement such as the hip. This observation is further supported by a correlation between calprotectin and the USPD score, with calprotectin outperforming CRP. The swollen joint count was also significantly different across calprotectin quartiles, even in the subgroup of patients with normal CRP levels. Recently, a prospective study of RA patients with normal CRP levels confirmed an association between calprotectin levels and disease activity in multivariate analyses [37]. Similarly, in a cross-sectional study of 87 patients receiving a TNF inhibitor, calprotectin seemed to be more accurate than the acute-phase reactants to discriminate disease activity [38].

Our results also suggest that calprotectin could be a useful biomarker for monitoring disease activity in RA patients and may add additional information to that provided by CRP. This observation is further underlined by the superiority of calprotectin over CRP in patients treated with tocilizumab. Indeed, as opposed to CRP, calprotectin is not produced by hepatocytes in response

to inflammatory cytokines. It is mainly released via passive mechanisms when tissues are damaged (through necrotic cells and formation of neutrophil extra-cellular trap). Calprotectin is also a good marker of neutrophil activation and can therefore be more useful than CRP in some diseases, like RA, where neutrophil activation is present [39]. Therefore, calprotectin is not considered as a bona fide acute phase protein and could represent a good alternative when determination of acute-phase proteins cannot be reliably used such as in patients on anti-IL-6 therapies.

Interestingly, higher calprotectin levels were also associated with a higher prevalence of rheumatoid nodules, RF seropositivity, radiographic damage, and HAQ. These observations might suggest that serum calprotectin could also be a biomarker of disease severity and prognosis in RA, but this has to be further evaluated in a longitudinal study. Other authors have demonstrated that calprotectin is associated with radiographic progression [14] and cardiovascular risk [40]. Biologically, it has been shown that the principal extracellular effect of calprotectin is to amplify the inflammatory process through several mechanisms which may contribute to joint damage. Acting as a DAMP, it facilitates the activation of the TLR-4 signaling [41, 42], leading to secretion of proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, and TNF, via the activation of NF- κ B and p38 MPAK pathways [43].

This study has several limitations. Firstly, no longitudinal samples were collected, and consequently, we were unable to study the evolution of the calprotectin levels over time. Secondly, most of the patients had longstanding disease, and practically, all patients were on treatment with 40.8 to 57.5% of participants on a biologic, agent depending on the diagnosis. This may reduce the probability of demonstrating a positive association with the serum calprotectin level. Nonetheless, we demonstrated several significant associations between calprotectin and disease activity in both RA and axSpA. Despite the availability of detailed clinical characteristics, some characteristics such as the PASI skin score were not available. Another potential limitation is that the blood samples were not always performed on the same day as the clinical evaluation, although the time difference was minimal and unlikely to have influenced the results.

The strengths of this study include the large cohort size that is representative of the general population with inflammatory joint disease, including patients from outside tertiary hospitals, as well as the availability of detailed clinical, biological, and imaging data.

Conclusions

This large study provides further evidence for the role of serum calprotectin as a potential biomarker for

monitoring disease activity in RA patients. Furthermore, calprotectin represents a useful biomarker when CRP is normal or difficult to interpret, such as in patients treated with medications that suppress IL-6. We also observed an association between the serum calprotectin level and disease activity of axSpA patients, especially those with hip involvement. Conversely, in our oligoarticular-predominant population of PsA patients, we did not observe any associations between serum calprotectin levels and disease activity.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s13075-020-02190-3>.

Additional file 1 : Figure S1. Receiver operating characteristic (ROC) curve of serum calprotectin as a disease activity marker in early rheumatoid arthritis. **Figure S2.** Ultrasound score in Rheumatoid Arthritis (RA): Calprotectin versus C-reactive protein (CRP). **Figure S3.** Swollen Joint Count (SJC) in rheumatoid arthritis patients treated with Tocilizumab: calprotectin versus C-reactive protein. **Figure S4.** Disease Activity Score in rheumatoid arthritis patients on tocilizumab: Calprotectin versus C-reactive protein (CRP). **Figure S5.** Ratingen score evolution over time for each calprotectin quartile levels in the RA population.

Abbreviations

ACPAs: Anti-citrullinated peptide antibodies; ASAS: Assessment of Spondyloarthritis International Society; ASDAS: Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score; AxSpA: Axial spondyloarthritis; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI: Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; CASPAR: Classification Criteria for Psoriatic Arthritis; CDAI: Clinical Disease Activity Index; CRP: C-reactive protein; DAPSA: Disease Activity index for Psoriatic Arthritis; DAS: Disease Activity Score; DLQI: Dermatology Life Quality Index; ESR: Erythrocyte sedimentation rate; FDRs: First-degree relatives; GS: Grayscale; HAQ: Health Assessment questionnaire; HC: Healthy controls; IRD: Inflammatory rheumatic diseases; PASI: Psoriasis Area and Severity Index; PD: Power Doppler; PRO: Patient-reported outcome; PsA: Psoriatic arthritis; RA: Rheumatoid arthritis; RADAI: Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index; RF: Rheumatoid factor; ROC: Receiver operating characteristic; SCQM: Swiss Clinical Quality Management registry; SJC: Swollen joint count; TJC: Tender joint count; USP: Ultrasound power Doppler

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

All authors read and approved the final manuscript.

Funding

No funding was received for this paper.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Geneva, and all individuals signed an informed consent form prior to enrolment, in accordance with the Declaration of Helsinki.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

L Martinez Prat, M Mahler, and C Bentow are employees of Inova Diagnostics, no share or stocks. All other authors declare no conflicts of interest. The SCQM is financially supported by pharmaceutical industries and donors. A list of financial supporters can be found on www.scqm.ch/sponsors

Author details

¹Geneva University Hospital, 26 avenue de Beau-Séjour, 1206 Geneva, Switzerland. ²Inova Diagnostics, Inc, San Diego, USA.

Received: 29 December 2019 Accepted: 22 April 2020

Published online: 06 May 2020

References

- Baraliakos X, Sieper J, Chen S, Pangan AL, Anderson JK. Non-radiographic axial spondyloarthritis patients without initial evidence of inflammation may develop objective inflammation over time. *Rheumatology*. 2017;56(7):1162–6. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex081>.
- Sokolova MV, et al. A set of serum markers detecting systemic inflammation in psoriatic skin, entheses, and joint disease in the absence of C-reactive protein and its link to clinical disease manifestations. *Arthritis Res Ther*. 2020;22. <https://doi.org/10.1186/s13075-020-2111-8>.
- Juhl P, Thudium CS, Gudmann NS, Karsdal MA, Bay-Jensen A-C, Siebuhl AS. IL-6 receptor inhibition modulates type III collagen and C-reactive protein degradation in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-tumour necrosis factor therapy: analysis of connective tissue turnover in the tocilizumab RADIATE study. *Clin Exp Rheumatol*. 2018;36(4):568–74.
- Chiu W-C, Lai H-M, Ko C-H, Chen J-F, Hsu C-Y, Chen Y-C. Ultrasound is more reliable than inflammatory parameters to evaluate disease activity in patients with RA receiving tocilizumab therapy. *J Investig Med*. 2018;66(6):1015–8. <https://doi.org/10.1136/jim-2017-000705>.
- Donato R, et al. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med*. 2013;13(1):24–57.
- Vogl T, et al. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood*. 2004;104(13):4260–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0446>.
- Gran S, et al. Imaging, myeloid precursor immortalization, and genome editing for defining mechanisms of leukocyte recruitment *in vivo*. *Theranostics*. 2018;8(9):2407–23. <https://doi.org/10.7150/thno.23632>.
- Johne B, et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol*. 1997;50(3):113–23.
- Grossi V, et al. A proposed serum calprotectin IgG cut-off level for diagnosing inflammatory arthritis. *Curr Rheumatol Rev*. 2017;13(2):93–7. <https://doi.org/10.2174/1573397112666160629085231>.
- Berntzen HB, Olmez U, Fagerhol MK, Munthe E. The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol*. 1991;20(2):74–82.
- Kane D, Roth J, Frosch M, Vogl T, Bresnihan B, FitzGerald O. Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(6):1676–85. <https://doi.org/10.1002/art.10988>.
- Bae S-C, Lee YH. Calprotectin levels in rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity: a meta-analysis. *Postgrad Med*. 2017;129(5):531–7. <https://doi.org/10.1080/00325481.2017.1319729>.
- Humakova J, et al. Serum calprotectin (S100A8/9): an independent predictor of ultrasound synovitis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:252. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0764-5>.
- Jonsson MK, et al. Calprotectin as a marker of inflammation in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(12):2031–7. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-211695>.
- Hammer HB, et al. Calprotectin (a major S100 leucocyte protein) predicts 10-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(1):150–4. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.103739>.
- Nielsen UB, Bruhn LV, Ellingsen T, Stengaard-Pedersen K, Hornung N. Calprotectin in patients with chronic rheumatoid arthritis correlates with disease activity and responsiveness to methotrexate. *Scand J Clin Lab Invest*. 2018;78(1–2):62–7. <https://doi.org/10.1080/00365513.2017.1413591>.
- Smith SL, et al. The predictive value of serum S100A9 and response to etanercept is not confirmed in a large UK rheumatoid arthritis cohort.

- Rheumatol (Oxford). 2017;56(6):1019–24. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew387>.
18. Tweehuysen L, et al. Predictive value of serum calprotectin (S100A8/A9) for clinical response after starting or tapering anti-TNF treatment in patients with rheumatoid arthritis. *RMD Open*. 2018;4(1):e000654. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2018-000654>.
 19. Choi IY, Gerlag DM, Holzinger D, Roth J, Tak PP. From synovial tissue to peripheral blood: myeloid related protein 8/14 is a sensitive biomarker for effective treatment in early drug development in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2014;9(8):e106253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106253>.
 20. Inciarte-Mundo J, et al. Calprotectin more accurately discriminates the disease status of rheumatoid arthritis patients receiving tocilizumab than acute phase reactants. *Rheumatol (Oxford)*. 2015;54(12):2239–43. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kev251>.
 21. Huang J, Yin Z, Song G, Cui S, Jiang J, Zhang L. Discriminating value of calprotectin in disease activity and progression of nonradiographic axial spondyloarthritis and ankylosing spondylitis. *Dis Markers*. 2017;2017:7574147. <https://doi.org/10.1155/2017/7574147>.
 22. Gupta L, Bhattacharya S, Agarwal V, Aggarwal A. Elevated levels of serum MRP8/14 in ankylosing spondylitis: associated with peripheral arthritis and active disease. *Clin Rheumatol*. 2016;35(12):3075–9. <https://doi.org/10.1007/s10067-016-3448-x>.
 23. Turina MC, et al. Calprotectin serum level is an independent marker for radiographic spinal progression in axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(9):1746–8. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205506>.
 24. Rademacher J, et al. Added value of biomarkers compared with clinical parameters for the prediction of radiographic spinal progression in axial spondyloarthritis. *Rheumatol (Oxford)*. 2019. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez025>.
 25. Hansson C, Eriksson C, Alenius G-M. S-calprotectin (S100A8/S100A9): a potential marker of inflammation in patients with psoriatic arthritis. *J Immunol Res*. 2014;2014:696415. <https://doi.org/10.1155/2014/696415>.
 26. Sakellariou G, et al. Serum calprotectin as a marker of ultrasound-detected synovitis in early psoriatic and rheumatoid arthritis: results from a cross-sectional retrospective study. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;37(3):429–36.
 27. Qian M, Song N-J. 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*. 2018;22(13):4299–309. https://doi.org/10.26355/eurev_201807_15426.
 28. E. Uitz, J. Fransen, T. Langenegger, et G. Stucki, Clinical quality management in rheumatoid arthritis: putting theory into practice. *Swiss Clinical Quality Management in Rheumatoid Arthritis Rheumatol (Oxford)* 39 5, p. 542–549, mai 2000.
 29. Alpizar-Rodriguez D, et al. The prevalence of anticitrullinated protein antibodies increases with age in healthy individuals at risk for rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2017;36(3):677–82. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3547-3>.
 30. Rau R, Wassenberg S, Herborn G, Stucki G, Gebler A. A new method of scoring radiographic change in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1998; 25(11):2094–107.
 31. Zufferey P, et al. Recommendations for the use of ultrasound in rheumatoid arthritis: literature review and SONAR score experience. *Swiss Med Wkly*. 2013. <https://doi.org/10.4414/smww.2013.13861>.
 32. Zufferey P, et al. Ultrasound evaluation of synovitis in RA: correlation with clinical disease activity and sensitivity to change in an observational cohort study. *J Bone Spine*. 2014;81(3):222–7. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2013.08.006>.
 33. Machado P, et al. Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS): defining cut-off values for disease activity states and improvement scores. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(1):47–53. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.138594>.
 34. Inciarte-Mundo J, et al. 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*. 2018;20(1):275. <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1764-z>.
 35. Stekhoven D, et al. Hypothesis-free analyses from a large psoriatic arthritis cohort support merger to consolidated peripheral arthritis definition without subtyping. *Clin. Rheumatol*. 2017;36(9):2035–43. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3637-2>.
 36. Frosch M, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000;43(3):628–37. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200003\)43:3<628::AID-ANR20>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200003)43:3<628::AID-ANR20>3.0.CO;2-X).
 37. Wang Y, Liang Y. Clinical significance of serum calprotectin level for the disease activity in active rheumatoid arthritis with normal C-reactive protein. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019;12(3):1009–14.
 38. Inciarte-Mundo J, et al. Serum calprotectin versus acute-phase reactants in the discrimination of inflammatory disease activity in rheumatoid arthritis patients receiving tumor necrosis factor inhibitors. *Arthritis Care Res*. 2016; 68(7):899–906. <https://doi.org/10.1002/acr.22795>.
 39. Bach M, Moon J, Moore R, Pan T, Nelson JL, Lood C. A neutrophil activation biomarker panel in prognosis and monitoring of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2020;72(1):47–56. <https://doi.org/10.1002/art.41062>.
 40. Angel K, Provan SA, Fagerhol MK, Mowinckel P, Kvien TK, Atar D. Effect of 1-year anti-TNF- α therapy on aortic stiffness, carotid atherosclerosis, and calprotectin in inflammatory arthropathies: a controlled study. *Am J Hypertens*. 2012;25(6):644–50. <https://doi.org/10.1038/ajh.2012.12>.
 41. Vogl T, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med*. 2007;13(9): 1042–9. <https://doi.org/10.1038/nm1638>.
 42. Kiyoko GW, et al. Spatiotemporal expression of endogenous TLR4 ligands leads to inflammation and bone erosion in mouse collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol*. 2016;46(11):2629–38. <https://doi.org/10.1002/eji.201646453>.
 43. Sunahori K, 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 Res Ther*. 2006;8(3):R69. <https://doi.org/10.1186/ar1939>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



C. Matériel supplémentaire (figures)

Figure S1: Receiver operating characteristic (ROC) curve of serum calprotectin as a disease activity marker in early rheumatoid arthritis. Moderate/high activity (n=58) versus low activity (n=53), according to DAS28 ESR. Thresholds of 3.5 µg/ml and 2.5 µg/ml (threshold with the highest sum sensitivity + specificity) and confidence interval for sensitivity are plotted. Area under the curve: 0.74. Boxplots of median calprotectin levels (with interquartile range) of the two groups are also shown (Wilcoxon test was used to compare median levels). Abbreviations: Sn, sensitivity; Sp, specificity

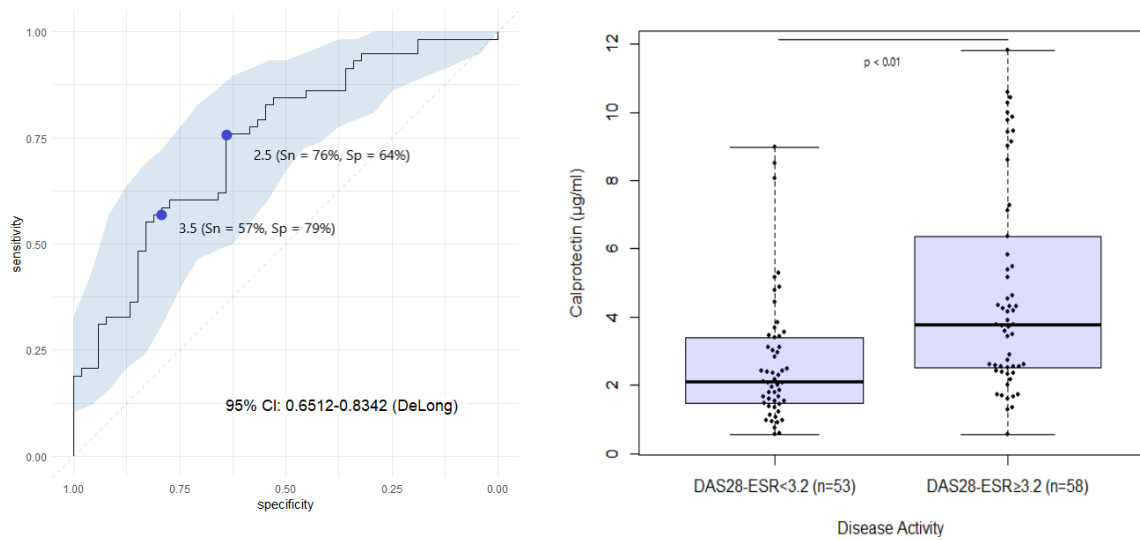


Figure S2: Ultrasound score in Rheumatoid Arthritis (RA): Calprotectin versus C-reactive protein (CRP). Receiver operating characteristic (ROC) curve of the ability of serum calprotectin and CRP to detect a positive Swiss Sonography in Arthritis and Rheumatism (SONAR) score in patients with RA. For calprotectin, thresholds of 1.5 $\mu\text{g/ml}$ (mean serum calprotectin in HC), 3.5 $\mu\text{g/ml}$ and threshold with the highest sum sensitivity + specificity are plotted. For CRP, thresholds of 5.0 mg/l (usual threshold) and threshold with the highest sum sensitivity + specificity are plotted. Abbreviations: AUC, Area Under Curve, 95%CI, 95% Confidence Interval; Sn, Sensitivity; Sp, Specificity.

A: ROC curves on the 209 patients who had an ultrasonography examination: 147 had a positive SONAR score, and 62 were negative.

B: ROC curves on 82 patients with ultrasonography examination and a disease duration less than 5 years: 55 had a positive SONAR score, and 27 were negative.

C: Boxplots of median levels (with interquartile range) of calprotectin and CRP in the 209 RA patients with SONAR negative score versus SONAR positive (Wilcoxon test was used to compare median levels).

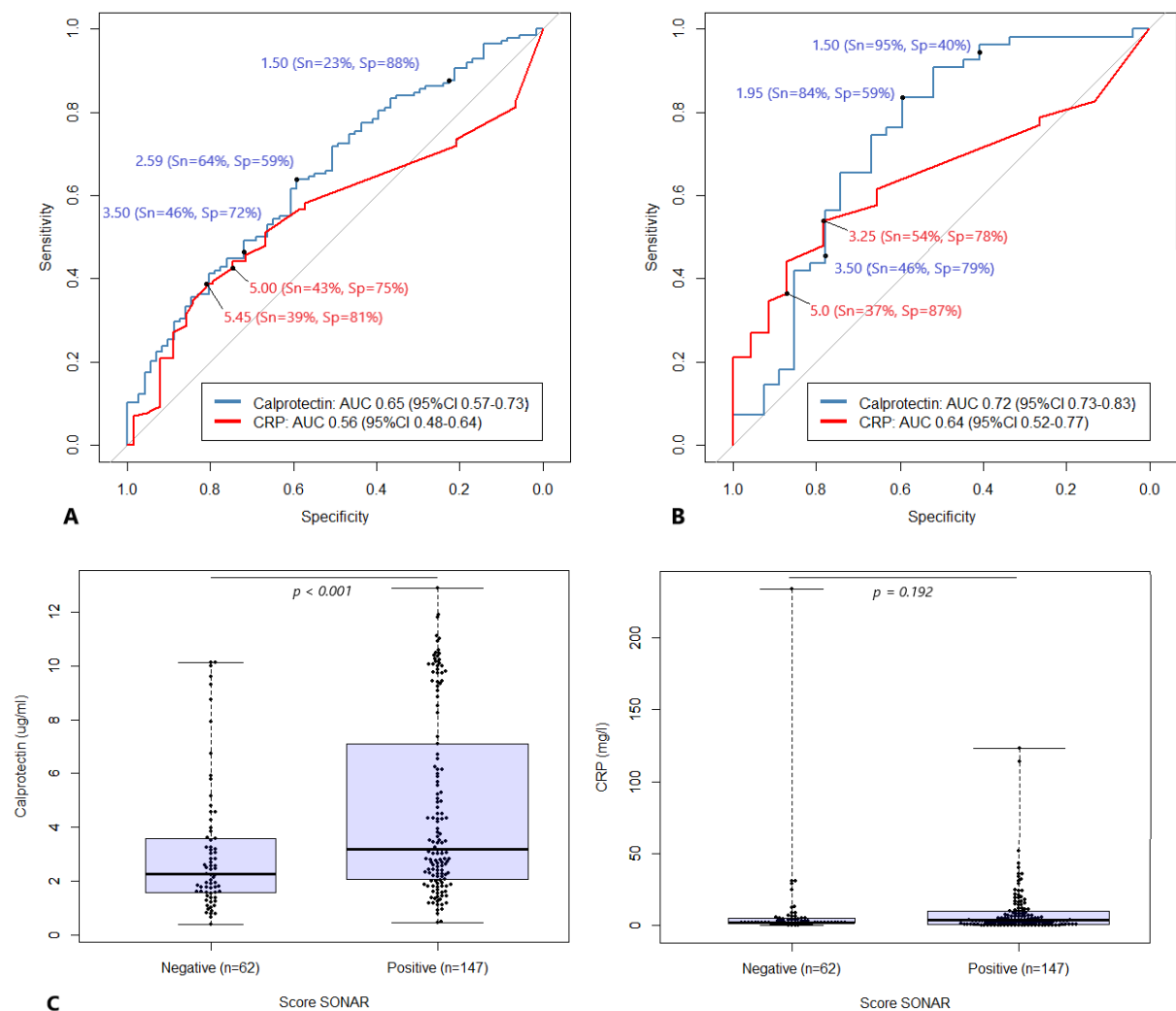


Figure S3: Swollen Joint Count (SJC) in rheumatoid arthritis patients treated with Tocilizumab: calprotectin versus C-reactive protein.

Boxplots of median levels (with interquartile range) of calprotectin (A) and C-Reactive Protein (CRP) (B) in 51 RA patients treated with tocilizumab without swollen joint versus one or more swollen joint. Wilcoxon test was used to compare median levels.

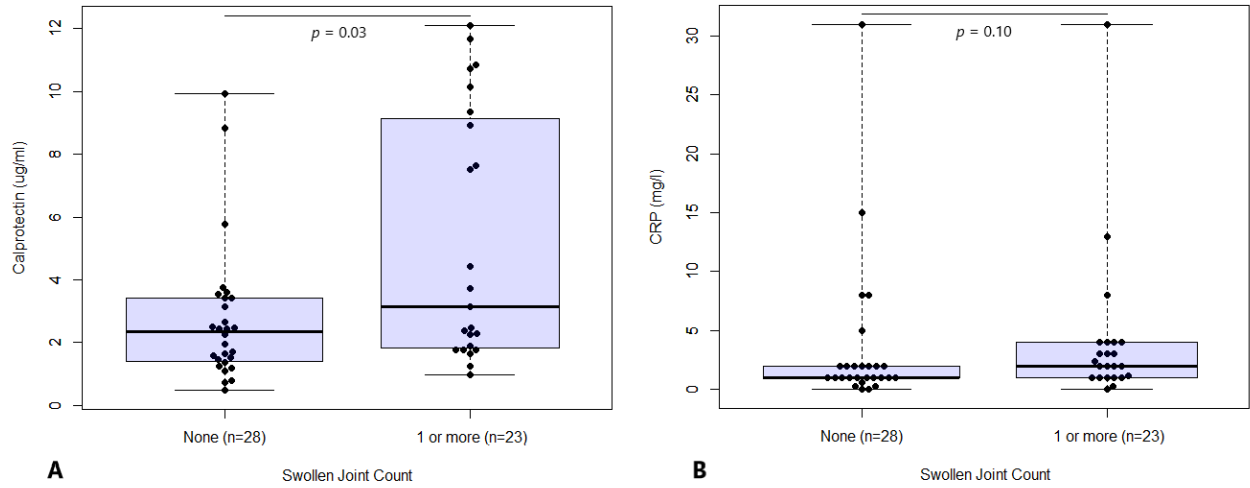


Figure S4: Disease Activity Score in rheumatoid arthritis patients on tocilizumab: Calprotectin versus C-reactive protein (CRP)

A. Boxplots of median levels (with interquartile range) of calprotectin and CRP in RA patients treated with tocilizumab with low disease (DAS28-ESR < 3.2) versus moderate to high disease activity (DAS28-ESR ≥ 3.2). Wilcoxon test was used to compare median levels.

B. Receiver operating characteristic (ROC) curve of the ability of serum calprotectin and CRP to detect a DAS28-ESR above 3.2 in the same population. For calprotectin, thresholds of 3.5 µg/ml and 3.735 µg/ml (threshold with the highest sum sensitivity + specificity) are plotted. Area under the curve: 0.80. 95% CI: 0.66-0.96 (DeLong). For CRP, thresholds of 5.0 mg/l (usual threshold) and 2.7 µg/ml (threshold with the highest sum sensitivity + specificity) are plotted. Area under the curve: 0.71. 95% CI: 0.56-0.91 (DeLong)

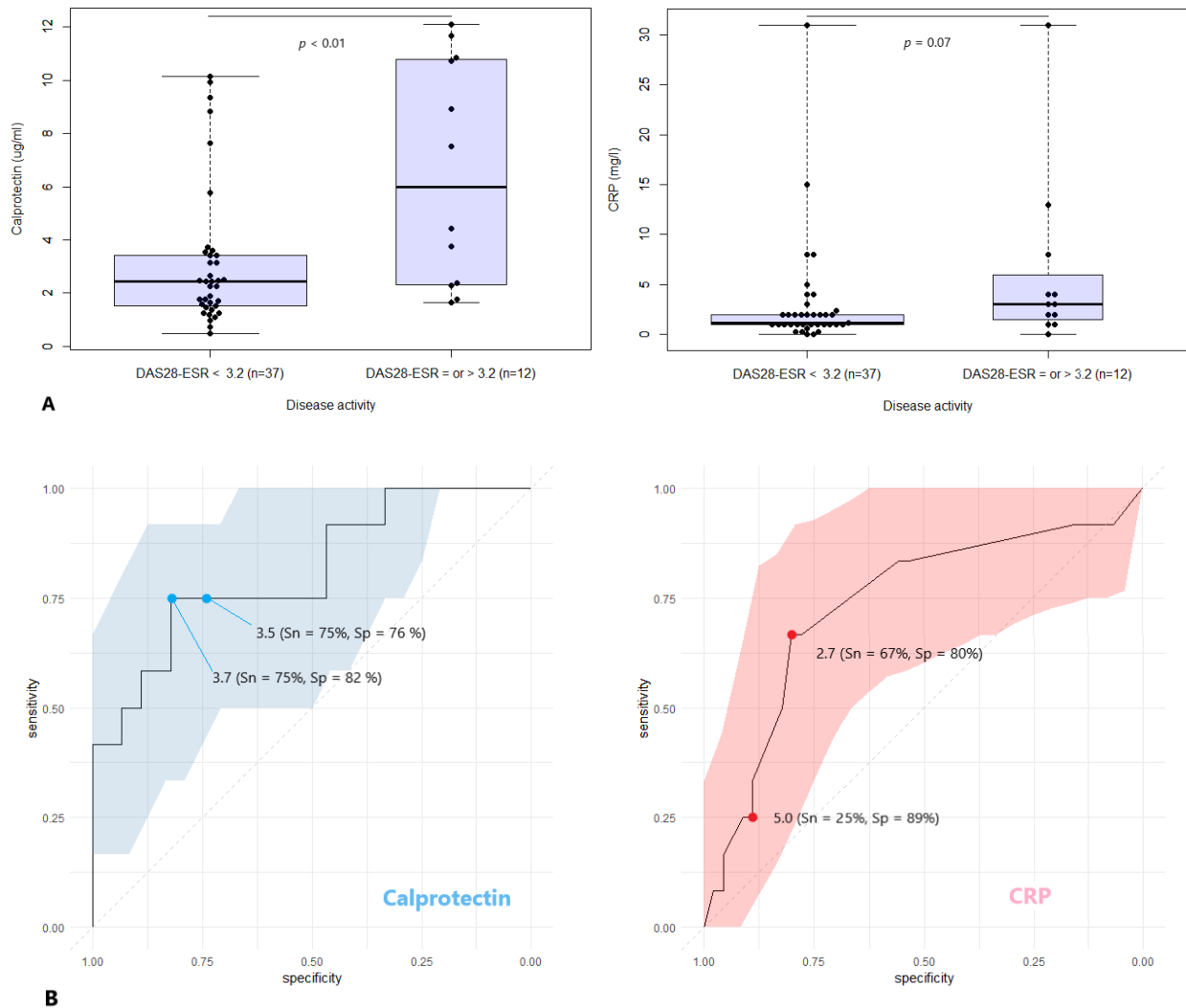
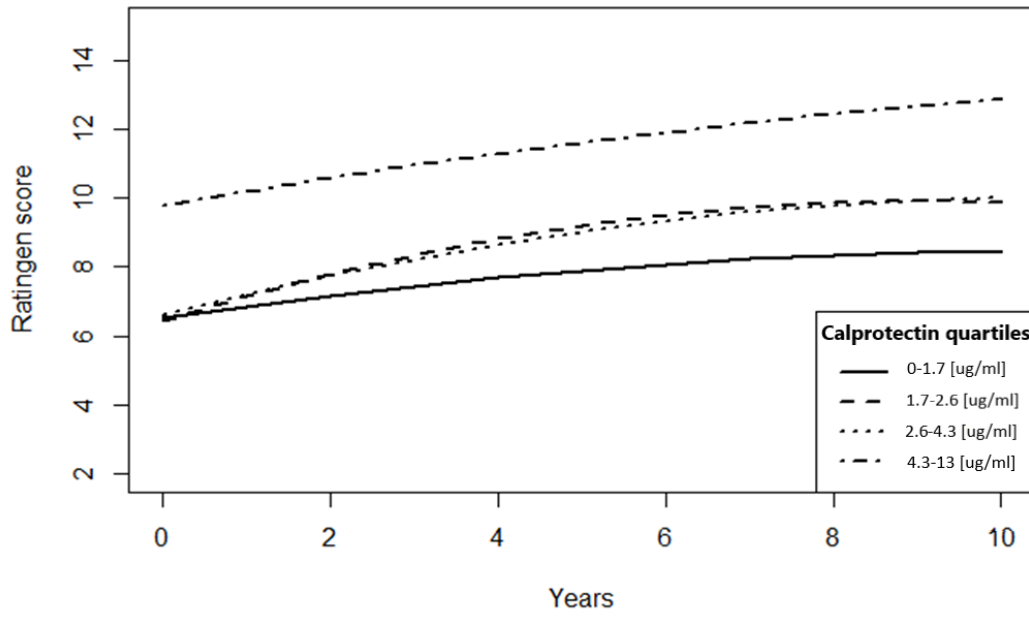


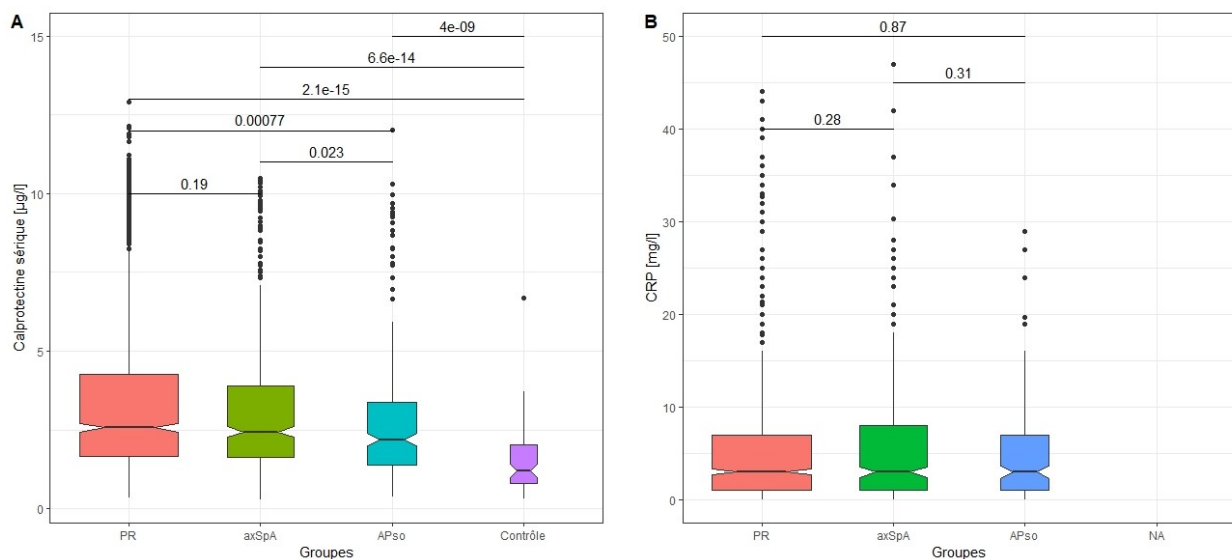
Figure S5: Ratingen score evolution over time for each calprotectin quartile levels in the RA population.



D. Discussion et commentaires sur les résultats de l'étude

Les principaux résultats de l'étude ont été exposés dans le manuscrit original, dans le chapitre précédent. Comme la plupart des autres études, nous retrouvons des taux significativement plus élevés dans les trois groupes de malades par rapport aux contrôles sains. La figure 8 montre les valeurs médianes de calprotectine sérique avec les écarts interquartiles pour chaque groupe. Un élément intéressant qui en ressort est de constater que les taux médians de calprotectine (illustrés dans la figure A avec l'intervalle de confiance à 95%) sont significativement plus bas dans le groupe APso par rapport aux groupes PR ($p=0.0008$, Wilcoxon test) et SpA ($p=0.02$, Wilcoxon test).

Figure 8 : Boxplots des valeurs de calprotectine (A) et de CRP (B) pour chaque groupe. Le boxplot représente la médiane et les écarts interquartiles. La largeur du boxplot est représentative de la taille de l'échantillon. L'encoche centrale représente l'intervalle de confiance à 95% de la médiane. La ligne verticale représente les limites des valeurs minimales et maximale définie par $Q1-1.5*IQR$ et $Q3+1.5*IQR$. Les points isolés sont les valeurs extrêmes. Les valeurs p sont représentées.



Ce résultat est différent par rapport à d'autres études qui retrouvent, pour la plupart, des taux de calprotectine similaires chez les patients avec PR et APso. Cependant, il est important de rappeler que ces études ont comparé les deux pathologies à un stade plus précoce dans l'évolution de la maladie et avec des formes plus actives. Il peut également s'agir d'une différence qui reflète des mécanismes physiopathologiques différents entre ces 3 pathologies, comme l'avait suggéré une étude reportant une localisation différente de la calprotectine dans la membrane synoviale chez les patients avec APso

par rapport à la PR⁹¹. En effet, les analyses immunohistochimiques avaient montré une expression plus importante des protéines S100A8 et S100A9 par les granulocytes et monocytes infiltrant la couche synoviale profonde dans l'APso par rapport à la PR et la SpA. Il existait également une expression importante de l'antigène au niveau de l'infiltrat inflammatoire périvasculaire et des cellules endothéliales au sein de cette couche dans l'APso. Par contre, il n'y avait pas de différence d'expression au sein de la couche superficielle ou bordante de la synoviale, ni de différence de concentration de calprotectine dans le liquide synovial. Cela pourrait suggérer que la migration des cellules myélomonocytaires de la couche profonde à la couche bordante de la synoviale est diminuée dans l'APso.

Par contre, il n'y avait pas de différence significative entre les taux de CRP (en valeur moyenne ou médiane) entre les 3 groupes de malades (Figure 8, B). Cette dissociation relative entre la CRP et la calprotectine dans le groupe APso reste évidemment à confirmer par des études comparant les deux biomarqueurs. Une des hypothèses que l'on pourrait évoquer, et pouvant expliquer l'élévation préférentielle de la CRP dans l'APso, est l'influence du syndrome métabolique dans le psoriasis et l'arthrite psoriasique. Nous observons en effet un indice de masse corporelle significativement plus élevé dans le groupe APso (cf Table 1 du manuscrit). De nombreuses études ont montré que le psoriasis et l'APso sont associés à un syndrome métabolique¹³⁵ et que celui-ci peut être à l'origine d'un syndrome inflammatoire avec élévation modérée des valeurs de CRP¹³⁶. Dans le groupe APso, il est intéressant de noter qu'il existe une tendance à une corrélation entre la CRP et l'IMC ($r=0.16$, $p=0.07$, Spearman), alors que ce n'est pas le cas pour la calprotectine ($r=0.007$, $p=0.93$, Spearman).

Concernant l'association avec l'activité de la maladie, l'analyse des sous-groupes définis par les quartiles de calprotectine a pu confirmer des différences significatives de plusieurs paramètres reflétant l'activité de la maladie pour la PR et la SpA, mais pas l'APso. Malgré les raisons méthodologiques évoquées précédemment, une analyse de corrélation est effectuée afin de résumer les résultats dans le tableau 5. Celle-ci est réalisée avec le test de Spearman qui suppose une distribution non-normale. Bien que très faible, témoignant d'une pente de régression linéaire très peu marquée, les coefficients de corrélation sont positifs et statistiquement significatifs pour la plupart des variables qui l'étaient également dans les analyses de quartiles. Ces résultats sont donc consistants avec ceux présentés dans l'étude, et confirment l'association entre les taux de calprotectine et l'activité de la maladie pour la PR et la SpA.

Tableau 5 : Analyses de corrélations

Groupes	Variables corrélées	Coefficient r	Valeur P
Tous (n=1729)	Nombre d'articulations tuméfiées	0.14	<0.001
PR (n=969)	DAS28-VS	0.25	<0.001
	Nombre d'articulations tuméfiées	0.23	<0.001
	HAQ	0.21	<0.001
SpA (n=451)	ASDAS-CRP	0.18	0.002
	Atteinte coxofémorale	0.11	0.024
APso (n=237)	DAPSA	0.04	0.632
	Nombre d'articulations tuméfiées	0.02	0.813
	Atteinte cutanée reportée	0.23	0.002

Pour la PR, des différences significatives entre les quartiles de calprotectine se retrouvent à la fois pour des marqueurs purement cliniques (compte d'articulations douloureuses ou tuméfiées, CDAI, RADAI) mais aussi composites (DAS28-CRP, DAS28-VS) et biologiques (CRP et VS). Une analyse restreinte aux PR avec des valeurs de CRP normales (<5mg/l), exposée dans le tableau 1, confirme l'association entre la calprotectine et le nombre d'articulations tuméfiées dans ce sous-groupe de patients. Nous retrouvons également une variation significative du score HAQ. Ce score, comprenant 8 aspects fonctionnels de la vie quotidienne, témoigne du handicap fonctionnel et constitue un marqueur de la sévérité de la maladie¹³⁷. D'autres publications ont également retrouvé une corrélation entre le HAQ et la calprotectine, notamment une étude longitudinale¹³⁸.

Tableau 1 : Caractéristiques d'un sous-groupe de patients avec PR (n=561) définis par une valeur de C-réactive protéine (CRP) < 5mg/l, stratifiés par quartiles de calprotectine

Serum Calprotectin quartile [ug/ml]	0-1.5	1.5-2.4	2.4-3.8	3.8-13	p
n	141	140	140	140	
Age (années)	55.7 (13.1)	57.4 (12.7)	58.1 (13.4)	57.8 (12.7)	0.40
Durée de la maladie, années	11.3 (10.9)	11.2 (10.0)	10.7 (10.3)	10.3 (9.0)	0.80
Genre = male [§]	27 (19.1)	32 (22.9)	38 (27.1)	40 (28.6)	0.04
IMC kg/m ²	25.1 (4.3)	25.0 (4.5)	25.6 (5.5)	25.4 (6.0)	0.89
CRP mg/l*	1.0 [1.0, 3.0]	2.0 [1.0, 3.0]	2.0 [1.0, 3.0]	2.0 [1.0, 3.0]	0.40
VS mm/h*	8.0 [4.0, 14.0]	8.0 [5.0, 14.0]	8.0 [4.0, 16.8]	10.0 [4.0, 19.0]	0.16
Articulations douloureuses	2.2 (3.6)	2.5 (3.6)	3.2 (5.0)	3.0 (5.2)	0.20
Articulations tuméfiées	1.2 (2.2)	1.4 (2.4)	1.6 (2.5)	2.2 (3.2)	0.02
RADAI score	2.2 (1.8)	2.5 (2.1)	2.7 (2.1)	2.6 (2.0)	0.26
HAQ	0.5 (0.6)	0.7 (0.7)	0.7 (0.7)	0.8 (0.6)	0.05
CDAI	6.7 (7.2)	7.2 (7.2)	8.6 (8.8)	8.2 (9.0)	0.39
DAS28 CRP	2.2 (0.9)	2.4 (0.9)	2.5 (1.1)	2.5 (1.1)	0.11
DAS28 ESR	2.4 (1.2)	2.7 (1.1)	2.6 (1.2)	3.5 (1.5)	0.06

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne (avec déviation standard), sauf ceux marqués par * qui sont des médianes avec l'écart interquartile, et par § représentant un nombre avec le pourcentage

Pour ce qui est de la SpA, nous avons retrouvé une association significative des taux sériques de calprotectine avec l'ASDAS, l'appréciation générale du médecin, ainsi que les autres biomarqueurs sanguins (CRP et VS). L'ASDAS est un score composite qui comprend à la fois des critères d'activité sur le plan axial ou général (douleur rachidienne, raideur, activité globale), périphérique (articulations douloureuses ou tuméfiées) et biologique (CRP). Le rôle de la calprotectine dans ce contexte est donc à relativiser puisque ce score et l'appréciation du médecin sont certainement influencés par la CRP. Nous n'avons pas observé d'association entre les niveaux de calprotectine et le compte articulaire dans ce groupe. En revanche, nous retrouvons une association significative avec la présence d'une atteinte de l'articulation coxofémorale. Dans le registre SCQM, la présence d'une atteinte de la hanche est reportée sur la base d'argument clinique mais également par l'imagerie (IRM, scanner ou radiologie standard). Il s'agit donc d'une association importante à soulever puisqu'elle peut être le témoin de la sévérité de la maladie. En effet, l'atteinte coxofémorale, fréquente dans la SpA¹³⁹, est connue pour entraîner des dommages structuraux pouvant souvent conduire à une arthroplastie de hanche¹⁴⁰. Par ailleurs, une association entre la présence d'une atteinte radiologique plus sévère au niveau axial et la présence d'une atteinte coxofémorale a été documentée¹⁴¹. Contrairement à d'autres publications, nous n'avons pas retrouvé d'association avec les scores BASDAI et BASFI. Ceci peut s'expliquer par l'hétérogénéité de cette population, qui est traitée depuis de longues années et peut également présenter des manifestations périphériques. Malgré une médiane légèrement plus basse dans le groupe SpA par rapport au groupe PR, la différence n'est pas significative entre ces deux groupes ($p=0.19$). Il y a donc une élévation de la calprotectine tout aussi importante que dans le groupe PR par rapport aux contrôles sains, et ce en dépit d'un faible nombre d'articulations périphériques affectées dans le groupe SpA. L'élévation de la calprotectine sérique peut donc être indirectement le signe d'une activité inflammatoire axiale que nous ne sommes pas parvenus à mesurer. Par exemple, nous n'avons malheureusement pas de données radiologiques concernant l'inflammation subaiguë visible par IRM (quantifiées notamment par le score de SPARCC) à disposition dans cette étude. De même, nous n'avons pas pu établir de lien avec une éventuelle maladie digestive sous-jacente. Cela illustre les limitations des études de registres où certaines données importantes ne sont pas toujours disponibles. Dans notre étude, seuls 22 patients parmi le groupe SpA avaient des données disponibles sur la présence d'une éventuelle maladie inflammatoire digestive associée (avec seulement 1 cas positif rapporté). Des études ciblant le rôle de la calprotectine dans les différentes formes de spondylarthrites seraient donc bienvenues dans ce contexte.

Dans notre analyse, nous n'avons observé aucune association entre l'activité de la maladie et les quartiles de calprotectine dans le groupe APso. Des analyses complémentaires, effectuée dans deux sous-groupes APso sont présentés ci-dessous. Dans le tableau 2, nous avons sélectionné uniquement

les patients présentant une maladie active. Le tableau 3 montre un sous-groupe de patients avec une rhumatisme psoriasique d'évolution récente. Dans ces deux sous-groupes (se rapprochant des études positives), nous n'avons pas pu observer de différence significative en ce qui concerne les signes d'activité de la maladie entre les quartiles de calprotectine. Bien que le nombre de patients soit limité, nous retrouvons toujours l'association avec l'atteinte cutanée.

Tableau 2 : Caractéristiques d'un sous-groupe de patients APso (n=100) définis par une maladie active avec score DAPSA \geq 5; n=100 , stratifiés par les quartiles de calprotectine

Serum Calprotectin quartile [$\mu\text{g/ml}$]	(0,1.28]	(1.28,2.04]	(2.04,2.98]	(2.98,Inf]	<i>p</i>
n	25	25	25	25	
Genre = male \S (%)	12 (48.0)	14 (56.0)	15 (60.0)	11 (44.0)	0.86
Indice de masse corporelle	28.0 (6.1)	28.8 (5.8)	27.5 (5.5)	28.7 (8.1)	0.92
Durée de la maladie, années	7.0 (8.1)	10.1 (7.5)	7.4 (7.3)	10.2 (12.1)	0.44
Age, années	55.1 (11.1)	48.0 (11.6)	50.3 (13.1)	52.4 (12.6)	0.20
Articulations douloureuses	6.9 (13.2)	4.2 (6.8)	7.8 (13.2)	3.6 (5.9)	0.43
Articulations tuméfiées	2.9 (6.5)	1.8 (3.4)	1.7 (3.3)	1.9 (2.9)	0.73
VS mm/h*	7.0 [3.0, 13.0]	8.0 [6.0, 13.5]	8.0 [2.8, 12.0]	10.0 [6.0, 16.0]	0.17
CRP mg/l*	3.0 [1.0, 8.0]	5.0 [1.2, 8.0]	4.0 [1.0, 8.0]	5.4 [1.9, 8.0]	0.94
DAPSA	24.6 (25.8)	18.2 (16.9)	24.8 (18.6)	25.2 (23.7)	0.62
Atteinte cutanée rapportée \S (%)	7/25 (28.0)	12/25 (48.0)	18/25 (72.0)	17/25 (68.0)	<0.01

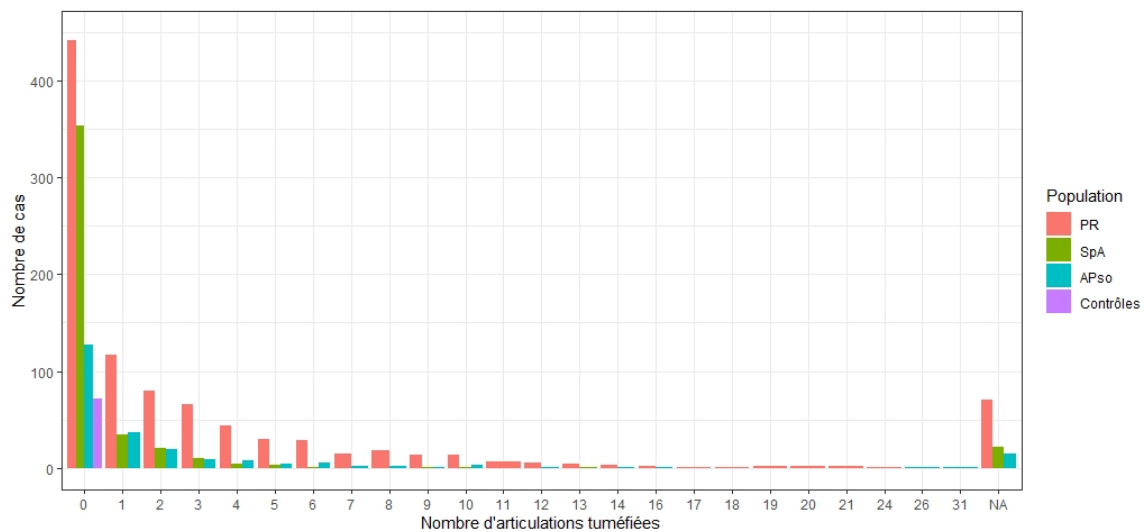
Tableau 3 : Caractéristiques d'un sous-groupe de patients APso (n=46) définis par une maladie débutante (< 2 ans d'évolution), stratifiés par les quartiles de calprotectine

Serum Calprotectin quartile [$\mu\text{g/ml}$]	(0,1.48]	(1.48,2.42]	(2.42,3.38]	(3.38,Inf]	<i>p</i>
n	12	11	11	12	
Genre = male \S (%)	7 (58.3)	8 (72.7)	2 (18.2)	5 (41.7)	0.11
Indice de masse corporelle	28.7 (5.8)	28.4 (4.6)	24.5 (3.5)	30.7 (10.2)	0.25
Durée de la maladie, années	0.8 (0.4)	0.8 (0.8)	0.6 (0.3)	0.6 (0.5)	0.55
Age, années	50.3 (12.1)	47.5 (10.0)	42.5 (12.7)	50.4 (14.7)	0.41
Articulations douloureuses	2.8 (4.7)	2.7 (3.0)	4.5 (3.8)	7.0 (12.1)	0.44
Articulations tuméfiées	2.0 (2.8)	1.2 (2.1)	1.5 (1.8)	5.4 (7.3)	0.08
VS mm/h*	5.0 [2.0, 10.8]	12.0 [4.0, 13.0]	9.5 [6.5, 11.5]	24.0 [14.0, 32.0]	0.01
CRP mg/l*	2.5 [1.0, 3.8]	3.0 [1.5, 11.0]	4.0 [1.5, 6.8]	5.8 [3.6, 16.3]	0.21
DAPSA	16.5 (10.3)	24.2 (15.7)	15.8 (6.7)	35.6 (25.7)	0.14
Atteinte cutanée rapportée \S (%)	3/10 (30.0)	6/9 (66.7)	3/6 (50.0)	6/6 (100)	0.01

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne (avec déviation standard), sauf ceux marqués par * qui sont des médianes avec l'écart interquartile, et par \S représentant un nombre avec le pourcentage

Cette absence de relation entre la calprotectine et l'activité de l'APso sur le plan articulaire peut s'expliquer par le faible nombre d'articulations atteintes dans le groupe d'APso. La figure 9 montre en effet que de façon globale, l'ensemble des patients inclus dans cette étude et en particulier dans le groupe APso et SpA ont très peu d'articulations touchées. Dans le groupe APso, la majorité des cas n'ont au maximum qu'une ou deux articulations tuméfiées.

Figure 9 : Histogramme représentant le nombre d'articulations tuméfiées pour chaque groupe



En conclusion, nous avons pu démontrer une association claire entre l'activité de la maladie et la calprotectine pour la PR et la SpA en moindre mesure, et ceci, même dans une population hétérogène présentant une maladie bien traitée. Malgré un faible nombre d'articulations touchées, le compte articulaire reste un indicateur clinique associé avec les taux sériques de calprotectine dans la PR.

III. DISCUSSION

La calprotectine est une protéine aux propriétés biologiques intéressantes et dont le fonctionnement n'a pas encore été parfaitement élucidé. Sa mesure dans les selles reste la méthode de choix comme moyen de dépistage des maladies inflammatoires de l'intestin. Son coût, sa facilité d'accès et surtout sa bonne sensibilité ont rendu son utilisation courante dans ce contexte. Il est donc naturel que de nombreuses études ont tenté d'explorer son utilité potentielle comme biomarqueur sanguin dans les maladies inflammatoires, et en particulier les rhumatismes inflammatoires chroniques.

L'étude présentée ici, ainsi que la revue de littérature démontrent très clairement que la calprotectine sérique est élevée en cas de processus inflammatoire. Ceci est vrai pour l'ensemble des rhumatismes chroniques étudiés, ce qui en fait un marqueur peu spécifique mais relativement sensible. Néanmoins, il est important de rappeler que la calprotectine est également un marqueur associé à des maladies dites « non inflammatoires », en particulier le syndrome métabolique comme le diabète de type 2 et l'obésité^{142 143}. Certains auteurs se sont également intéressés aux liens avec les facteurs de risques cardiovasculaires et ont pu mettre en évidence que la calprotectine constitue un facteur de risque indépendant de mortalité cardiovasculaire^{150 151}.

En tant que modalité isolée, son absence de spécificité rend le dosage sérique de la calprotectine peu utile dans le processus diagnostique. Toutefois, il peut exister des différences de taux sériques avec notamment des concentrations plus basses dans l'APso dans notre étude, et en fonction du stade de la maladie (qui seraient plus élevés en début de maladie selon la littérature ^{144 88}). Ceci peut s'expliquer par les propriétés même de la calprotectine qui est un marqueur plus spécifique du système immunitaire inné et de l'activation des neutrophiles¹⁴⁵. Dans notre cohorte de patients atteints de PR, elle s'est néanmoins révélée relativement sensible pour différencier les malades des contrôles sains. Elle peut donc constituer une aide diagnostique lorsqu'elle s'ajoute à un faisceau d'indices en faveur d'une maladie inflammatoire. Dans ce contexte, on peut évoquer les PR séronégatives et les SpA non radiographiques ou sans élévation de la CRP. Elle peut également être utile pour le diagnostic de rhumatisme inflammatoire plus rare, comme par exemple la maladie de Still de l'adulte ou la forme systémique d'arthrite juvénile idiopathique.

Une étude s'est intéressée à la capacité de la calprotectine de différencier les arthralgies liées à une PR des arthralgies non inflammatoires. Un taux sérique supérieur à 0.9 µl/ml permettait de les distinguer avec une sensibilité de 95.3%¹⁴⁶. Des analyses protéomiques dans le plasma ont également révélé que les protéines S100A8/A9 étaient surexprimées quel que soit le stade de la PR¹⁴⁷. La calprotectine permettrait alors de pouvoir dépister plus précocement la maladie, donnant ainsi les

moyens d'éviter un retard de diagnostic et de prise en charge qui restent encore trop longs malgré les nombreux outils radiologiques et biologiques à disposition.

Son rôle comme biomarqueur d'activité de la maladie a également été étudié extensivement. Il existe de nombreuses études identifiant une corrélation ou une association avec l'activité de la maladie. En particulier, il existe une association entre la calprotectine sérique et le nombre d'articulations tuméfiées. A l'instar d'autres publications, nous avons pu le démontrer dans notre cohorte de patients PR, et également chez ceux présentant une valeur de CRP dans la norme. Dans une analyse de régression linéaire multiple, une étude a montré qu'une diminution des taux sériques de la protéine S100A8/A9 permet de prédire l'amélioration du nombre d'articulations tuméfiées après l'initiation d'un traitement au début de la maladie, ce qui n'était pas le cas de la CRP¹³⁶. Ce marqueur aurait donc l'avantage de pouvoir mieux identifier l'inflammation articulaire que ne le ferait la CRP. Ceci est également souligné par sa capacité à prédire une activité échographique Doppler, qui surpasse celle de la CRP dans notre étude. L'hypothèse évoquée est sa capacité à diffuser du compartiment intra-articulaire (riche en granulocytes et donc en calprotectine) vers le compartiment sanguin. La calprotectine, principale *alarmine* du liquide synovial, constituerait donc un meilleur biomarqueur de l'activité inflammatoire articulaire ; et pourrait donc compléter à ce titre l'utilité de la CRP. Comme démontré dans notre étude, l'association avec l'activité de la maladie semble être claire dans la PR et la SpA, mais reste plus difficilement démontrable dans l'APso. Plusieurs hypothèses pouvant expliquer cette différence ont été proposées : notamment la présentation majoritairement pauciarticulaire de l'APso, ainsi que des différences au niveau de la physiopathologie de la maladie et de l'expression de la calprotectine au niveau synovial.

Il faut admettre cependant que son utilité en tant que biomarqueur d'activité ne semble pas suffisamment prometteur au point de surpasser les autres biomarqueurs et devenir pratique courante. La calprotectine se présente par contre comme une alternative crédible dans certains cas particuliers où justement ces biomarqueurs font défauts, notamment des patients avec PR ou axSpA sans élévation des marqueurs de la phase aigüe, ou des patients traités par des anticorps bloquant la voie de signalisation de l'IL-6. Dans la cohorte suisse, nous avons pu observer que les niveaux de calprotectine restaient associés avec le nombre d'articulations tuméfiées dans un sous-groupe de patients PR sans élévation de la CRP. De même, nous avons pu montrer que la calprotectine est supérieur à la CRP pour détecter une maladie active chez des patients PR traités par tocilizumab.

Finalement, la calprotectine semble également être un **marqueur de sévérité de la maladie**. Bien que le design de notre étude ne soit pas le plus approprié pour l'analyse des facteurs pronostiques, nous avons pu mettre en évidence plusieurs associations relevant de la sévérité de la maladie. Pour la PR,

nous observons un score HAQ plus sévère avec les quartiles les plus hauts. De même, la présence de nodules rhumatoïdes et de FR sont plus fréquemment observés lorsque la calprotectine sérique est élevée. Plus marquant encore, le dernier quartile est significativement associé à des scores de la progression radiographique (Ratingen) plus sévères, témoignant d'une maladie érosive.

Le rôle pro-inflammatoire et la capacité à induire des érosions osseuses de la calprotectine ont été étudié dans plusieurs modèles murins, notamment avec un modèle séronégatif de souris déficiente en IL-1Ra¹⁴⁸, et dans les modèles d'arthrite induite par l'immunisation au collagène de type 2⁴³ et induite par l'antigène (albumine d'origine bovine)¹⁴⁹. De surcroît, le phénotype du modèle induit par l'antigène est moins sévère (avec réduction de l'inflammation et des érosions) chez des souris génétiquement déficientes en S100A9¹⁵⁰. Des études *in vitro* ont montré que les protéines S100A8¹⁵¹ et S100A9¹⁵² participent à la différenciation et à l'activation des ostéoclastes impliqués dans les érosions osseuses. Il est également connu que la calprotectine induit l'augmentation de la sécrétion de certaines métalloprotéinases (MMP3, MMP9 et MMP13 principalement) reconnues pour leur rôle dans la dégradation des matrices extra-cellulaires osseuses et cartilagineuses¹⁵⁰.

Ces constatations amènent à envisager de cibler la calprotectine du point de vue thérapeutique. Si certains traitements couramment employés en rhumatologie ont un impact sur la biologie de la calprotectine (comme l'hydroxychloroquine et la modulation du TLR-4, ou la colchicine et son influence sur les microtubules), il n'existe actuellement pas de thérapies spécifiques ciblant les protéines S100A8 ou S100A9. Dans le modèle murin, un groupe canadien a observé une inhibition de la migration des neutrophiles en réponse aux lipopolysaccharides¹⁵³ et en cas d'infection pulmonaire à *Streptococcus Pneumonia*¹⁵⁴ grâce à l'utilisation d'anticorps neutralisants.

IV. CONCLUSION

En conclusion, le dosage de la calprotectine dans le sérum est intéressant pour mesurer à la fois l'activité et la sévérité des rhumatismes inflammatoires chroniques, tels que la PR et la SpA. Son rôle comme biomarqueur diagnostique semble moins certain en regard de sa faible spécificité, mais peut s'avérer toutefois très utile pour détecter le caractère inflammatoire de certaines arthralgies difficilement caractérisables, même en l'absence d'élévation de la CRP. Dans ce contexte, la calprotectine offre une alternative valable aux biomarqueurs conventionnels.

La calprotectine possède des propriétés biologiques différentes des protéines de la phase aiguë, et témoigne d'une inflammation locale à prédominance neutrophilique. En quantité importante au sein des granulocytes, elle participe à renforcer le processus inflammatoire, pouvant aussi jouer un rôle pathogénique.

V. REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble des personnes qui ont permis la réalisation de ce travail, et en particulier :

- Le Professeur Cem Gabay qui m'a confié ce travail, guidé dans mes choix professionnels, et m'a permis d'effectuer un premier pas dans la recherche en rhumatologie.
- Le Dr Michael Nissen qui m'a supervisé pour la réalisation de ce travail, mais aussi tout au long des activités cliniques et en particulier l'échographie musculosquelettique.
- La Professeur Delphine Courvoisier qui a pris le temps de m'enseigner l'utile logiciel R, et m'a transmis avec enthousiasme une partie de son savoir sur les statistiques.
- Le Professeur Axel Finckh qui a permis d'apporter les cas-contrôles de l'étude, et pour ses conseils avisés.
- La Docteur Céline Lamacchia, biologiste, pour son aide dans la recherche des données.
- Laura Martinez Prat, Michael Mahler et Chelsea Bentow de *Inova Diagnostic* pour leur collaboration efficace.

Je remercie également le Professeur J Roth et T Vogel qui m'ont reçu à l'institut d'immunologie de l'université de Münster pour une visite de leur laboratoire et une discussion sur la calprotectine.

Et bien-sûr, je remercie l'ensemble de l'équipe de rhumatologie de Beau-Séjour, avec qui j'ai eu le réel plaisir de collaborer durant la réalisation de ce travail :

- Les infirmières : Catherine Hassan Zadeh, Isabelle Duparc, Murielle Saunier, Nathalie Morland, Olivia Studer
- Les secrétaires : Lilian Furlanetto, Marie-Carmen Horvarth, Marie-Claire Monnard, Mireille Vilon
- Les collègues rhumatologues : Dre Charlotte Girard, Dre Emmanuela Pareti, Dre Anne-Cécile Debrach, Dr Ilias Lazarou, Dr Michele Iudici, Prof. Pierre-André Guerne, Dr Stéphane Genevay.

VI. BIBLIOGRAPHIE

1. Giacomelli, R. *et al.* Guidelines for biomarkers in autoimmune rheumatic diseases - evidence based analysis. *Autoimmun. Rev.* **18**, 93–106 (2019).
2. FDA-NIH Biomarker Working Group. *BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource.* (Food and Drug Administration (US), 2016).
3. Califf, R. M. Biomarker definitions and their applications. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **243**, 213–221 (2018).
4. Eusebi, P. Diagnostic accuracy measures. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* **36**, 267–272 (2013).
5. Pincus, T., Yazici, Y. & Sokka, T. Quantitative measures of rheumatic diseases for clinical research versus standard clinical care: differences, advantages and limitations. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **21**, 601–628 (2007).
6. Robinson, W. H. & Mao, R. Biomarkers to guide clinical therapeutics in rheumatology? *Curr. Opin. Rheumatol.* **28**, 168–175 (2016).
7. Baraliakos, X., Sieper, J., Chen, S., Pangan, A. L. & Anderson, J. K. Non-radiographic axial spondyloarthritis patients without initial evidence of inflammation may develop objective inflammation over time. *Rheumatology* **56**, 1162–1166 (2017).
8. Sokka, T. & Pincus, T. Erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein, or rheumatoid factor are normal at presentation in 35%-45% of patients with rheumatoid arthritis seen between 1980 and 2004: analyses from Finland and the United States. *J. Rheumatol.* **36**, 1387–1390 (2009).
9. Littlejohn, E. *et al.* The ratio of erythrocyte sedimentation rate to C-reactive protein is useful in distinguishing infection from flare in systemic lupus erythematosus patients presenting with fever. *Lupus* **27**, 1123–1129 (2018).
10. Abolghasemi, S., Gitipour, A. & Morteza, A. The sensitivity, specificity and accuracy of anti-citrulline antibody test in diagnosis of rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* **33**, 1027–1030 (2013).
11. Nielen, M. M. J. *et al.* Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* **50**, 380–386 (2004).
12. Nielsen, S. F., Bojesen, S. E., Schnohr, P. & Nordestgaard, B. G. Elevated rheumatoid factor and long term risk of rheumatoid arthritis: a prospective cohort study. *BMJ* **345**, e5244 (2012).
13. Syversen, S. W. *et al.* High anti-cyclic citrullinated peptide levels and an algorithm of four variables predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis: results from a 10-year longitudinal study. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 212–217 (2008).
14. Rönnelid, J. *et al.* Longitudinal analysis of citrullinated protein/peptide antibodies (anti-CP) during 5 year follow up in early rheumatoid arthritis: anti-CP status predicts worse disease activity and greater radiological progression. *Ann. Rheum. Dis.* **64**, 1744–1749 (2005).
15. Turesson, C., O’Fallon, W. M., Crowson, C. S., Gabriel, S. E. & Matteson, E. L. Occurrence of extraarticular disease manifestations is associated with excess mortality in a community based cohort of patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **29**, 62–67 (2002).
16. Ajeganova, S. *et al.* The association between anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies and radiographic progression in early rheumatoid arthritis: a study exploring replication and the added value to ACPA and rheumatoid factor. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 112–118 (2017).
17. Spinelli, F. R. *et al.* Association between antibodies to carbamylated proteins and subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskelet. Disord.* **18**, 214 (2017).

18. Pavlidis, P., Chedgy, F. J. & Tibble, J. A. Diagnostic accuracy and clinical application of faecal calprotectin in adult patients presenting with gastrointestinal symptoms in primary care. *Scand. J. Gastroenterol.* **48**, 1048–1054 (2013).
19. Berntzen, H. B., Munthe, E. & Fagerhol, M. K. The major leukocyte protein L1 as an indicator of inflammatory joint disease. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* **76**, 251–256 (1988).
20. Nordal, H. H., Fagerhol, M. K., Halse, A.-K. & Hammer, H. B. Calprotectin (S100A8/A9) should preferably be measured in EDTA-plasma; results from a longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **78**, 102–108 (2018).
21. Dale, I., Fagerhol, M. K. & Naesgaard, I. Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. *Eur. J. Biochem.* **134**, 1–6 (1983).
22. Andersson, K. B. *et al.* The leucocyte L1 protein: identity with the cystic fibrosis antigen and the calcium-binding MRP-8 and MRP-14 macrophage components. *Scand. J. Immunol.* **28**, 241–245 (1988).
23. 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. *J. Biol. Chem.* **266**, 7706–7713 (1991).
24. Steinbakk, M. *et al.* Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet Lond. Engl.* **336**, 763–765 (1990).
25. Marenholz, I., Lovering, R. C. & Heizmann, C. W. An update of the S100 nomenclature. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1282–1283 (2006).
26. Donato, R. 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 (2001).
27. Nakashige, T. G., Zhang, B., Krebs, C. & Nolan, E. M. Human calprotectin is an iron-sequestering host-defense protein. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 765–771 (2015).
28. Besold, A. N. *et al.* Role of Calprotectin in Withholding Zinc and Copper from *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **86**, (2017).
29. Korndörfer, I. P., 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. *J. Mol. Biol.* **370**, 887–898 (2007).
30. Roth, J. *et al.* 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 (1993).
31. Leukert, N. *et al.* Calcium-dependent tetramer formation of S100A8 and S100A9 is essential for biological activity. *J. Mol. Biol.* **359**, 961–972 (2006).
32. Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M. & Tessier, P. A. Proinflammatory Activities of S100: Proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 Induce Neutrophil Chemotaxis and Adhesion. *J. Immunol.* **170**, 3233–3242 (2003).
33. Simard, J.-C., Noël, C., Tessier, P. A. & Girard, D. Human S100A9 potentiates IL-8 production in response to GM-CSF or fMLP via activation of a different set of transcription factors in neutrophils. *FEBS Lett.* **588**, 2141–2146 (2014).
34. Vogl, T. *et al.* MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood* **104**, 4260–4268 (2004).
35. T, H. *et al.* S100A9 Is a Novel Ligand of EMMPRIN That Promotes Melanoma Metastasis. *Cancer research* vol. 73

https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23135911/?from_single_result=S100A9+is+a+novel+ligand+of+EMMPRIN+that+promotes+melanoma+metastasis&expanded_search_query=S100A9+is+a+novel+ligand+of+EMMPRIN+that+promotes+melanoma+metastasis (2013).

36. Austermann, J., Spiekermann, C. & Roth, J. S100 proteins in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **14**, 528–541 (2018).
37. Roth, J. *et al.* 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 (1993).
38. Gran, S. *et al.* Imaging, myeloid precursor immortalization, and genome editing for defining mechanisms of leukocyte recruitment *in vivo*. *Theranostics* **8**, 2407–2423 (2018).
39. Rammes, A. *et al.* 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 (1997).
40. Carrión, M. *et al.* VIP modulates IL-22R1 expression and prevents the contribution of rheumatoid synovial fibroblasts to IL-22-mediated joint destruction. *J. Mol. Neurosci. MN* **52**, 10–17 (2014).
41. Ometto, F. *et al.* Calprotectin in rheumatic diseases. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **242**, 859–873 (2017).
42. Vogl, T. *et al.* Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat. Med.* **13**, 1042–1049 (2007).
43. Kiyeko, G. W. *et al.* Spatiotemporal expression of endogenous TLR4 ligands leads to inflammation and bone erosion in mouse collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* **46**, 2629–2638 (2016).
44. Holzinger, D. *et al.* Myeloid-related proteins 8 and 14 contribute to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in gout. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **66**, 1327–1339 (2014).
45. Narumi, K. *et al.* Proinflammatory Proteins S100A8/S100A9 Activate NK Cells via Interaction with RAGE. *J. Immunol.* **194**, 5539–5548 (2015).
46. Bøyum, A. *et al.* Calprotectin (S100A8/S100A9) and Myeloperoxidase: Co-Regulators of Formation of Reactive Oxygen Species. *Toxins* **2**, 95–115 (2010).
47. Zygiel, E. M. & Nolan, E. M. Transition Metal Sequestration by the Host-Defense Protein Calprotectin. *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 621–643 (2018).
48. Lusitani, D., Malawista, S. E. & Montgomery, R. R. Calprotectin, an Abundant Cytosolic Protein from Human Polymorphonuclear Leukocytes, Inhibits the Growth of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **71**, 4711–4716 (2003).
49. Brophy, M. B., Hayden, J. A. & Nolan, E. M. Calcium Ion Gradients Modulate the Zinc Affinity and Antibacterial Activity of Human Calprotectin. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 18089–18100 (2012).
50. Austermann, J. *et al.* Alarmins MRP8 and MRP14 Induce Stress Tolerance in Phagocytes under Sterile Inflammatory Conditions. *Cell Rep.* **9**, 2112–2123 (2014).
51. Johne, B. *et al.* Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol. Pathol. MP* **50**, 113–123 (1997).
52. Addimanda, O. *et al.* Elevated serum levels of alarmin S100A8/A9 in patients with hand osteoarthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **37**, 885 (2019).

53. Ruan, G. *et al.* Associations between serum S100A8/S100A9 and knee symptoms, joint structures and cartilage enzymes in patients with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **27**, 99–105 (2019).
54. Baillet, A. *et al.* Synovial fluid proteomic fingerprint: S100A8, S100A9 and S100A12 proteins discriminate rheumatoid arthritis from other inflammatory joint diseases. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **49**, 671–682 (2010).
55. Berntzen, H. B., Olmez, U., Fagerhol, M. K. & Munthe, E. The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand. J. Rheumatol.* **20**, 74–82 (1991).
56. Kane, D. *et al.* Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 1676–1685 (2003).
57. Bromley, M. & Woolley, D. E. Histopathology of the rheumatoid lesion. Identification of cell types at sites of cartilage erosion. *Arthritis Rheum.* **27**, 857–863 (1984).
58. Asif Amin, M., Fox, D. A. & Ruth, J. H. Synovial cellular and molecular markers in rheumatoid arthritis. *Semin. Immunopathol.* **39**, 385–393 (2017).
59. Bae, S.-C. & Lee, Y. H. Calprotectin levels in rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity: a meta-analysis. *Postgrad. Med.* **129**, 531–537 (2017).
60. Jonsson, M. K. *et al.* Calprotectin as a marker of inflammation in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 2031–2037 (2017).
61. Hurnakova, J. *et al.* Serum calprotectin may reflect inflammatory activity in patients with active rheumatoid arthritis despite normal to low C-reactive protein. *Clin. Rheumatol.* (2018) doi:10.1007/s10067-018-4091-5.
62. Kawashiri, S. *et al.* Ultrasonographic examination of rheumatoid arthritis patients who are free of physical synovitis: power Doppler subclinical synovitis is associated with bone erosion. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **53**, 562–569 (2014).
63. Hurnakova, J. *et al.* Serum calprotectin may reflect inflammatory activity in patients with active rheumatoid arthritis despite normal to low C-reactive protein. *Clin. Rheumatol.* **37**, 2055–2062 (2018).
64. Wang, Y. & Liang, Y. Clinical significance of serum calprotectin level for the disease activity in active rheumatoid arthritis with normal C-reactive protein. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **12**, 1009–1014 (2019).
65. Hammer, H. B. *et al.* Calprotectin (a major S100 leucocyte protein) predicts 10-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 150–154 (2010).
66. Nielsen, U. B., Bruhn, L. V., Ellingsen, T., Stengaard-Pedersen, K. & Hornung, N. Calprotectin in patients with chronic rheumatoid arthritis correlates with disease activity and responsiveness to methotrexate. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **78**, 62–67 (2018).
67. Patro, P. S., Singh, A., Misra, R. & Aggarwal, A. Myeloid-related Protein 8/14 Levels in Rheumatoid Arthritis: Marker of Disease Activity and Response to Methotrexate. *J. Rheumatol.* **43**, 731–737 (2016).
68. Choi, I. Y., Gerlag, D. M., Holzinger, D., Roth, J. & Tak, P. P. From synovial tissue to peripheral blood: myeloid related protein 8/14 is a sensitive biomarker for effective treatment in early drug development in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One* **9**, e106253 (2014).
69. Choi, I. Y. *et al.* MRP8/14 serum levels as a strong predictor of response to biological treatments in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 499–505 (2015).

70. Nair, S. C. *et al.* A Personalized Approach to Biological Therapy Using Prediction of Clinical Response Based on MRP8/14 Serum Complex Levels in Rheumatoid Arthritis Patients. *PLoS One* **11**, e0152362 (2016).
71. Smith, S. L. *et al.* The predictive value of serum S100A9 and response to etanercept is not confirmed in a large UK rheumatoid arthritis cohort. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **56**, 1019–1024 (2017).
72. Inciarte-Mundo, J. *et al.* Calprotectin more accurately discriminates the disease status of rheumatoid arthritis patients receiving tocilizumab than acute phase reactants. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **54**, 2239–2243 (2015).
73. Inciarte-Mundo, J. *et al.* Serum Calprotectin Versus Acute-Phase Reactants in the Discrimination of Inflammatory Disease Activity in Rheumatoid Arthritis Patients Receiving Tumor Necrosis Factor Inhibitors. *Arthritis Care Res.* **68**, 899–906 (2016).
74. Rudwaleit, M. *et al.* The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 777–783 (2009).
75. Redeker, I. *et al.* Determinants of diagnostic delay in axial spondyloarthritis: an analysis based on linked claims and patient-reported survey data. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **58**, 1634–1638 (2019).
76. Braun, J. *et al.* Impact of baseline C-reactive protein levels on the response to secukinumab in ankylosing spondylitis: 3-year pooled data from two phase III studies. *RMD Open* **4**, e000749 (2018).
77. Maksymowych, W. P. Biomarkers for Diagnosis of Axial Spondyloarthritis, Disease Activity, Prognosis, and Prediction of Response to Therapy. *Front. Immunol.* **10**, 305 (2019).
78. Hu, H., Du, F., Zhang, S. & Zhang, W. Serum calprotectin correlates with risk and disease severity of ankylosing spondylitis and its change during first month might predict favorable response to treatment. *Mod. Rheumatol.* **29**, 836–842 (2019).
79. Turina, M. C., Yeremenko, N., Paramarta, J. E., De Rycke, L. & Baeten, D. Calprotectin (S100A8/9) as serum biomarker for clinical response in proof-of-concept trials in axial and peripheral spondyloarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **16**, 413 (2014).
80. Huang, J. *et al.* Discriminating Value of Calprotectin in Disease Activity and Progression of Nonradiographic Axial Spondyloarthritis and Ankylosing Spondylitis. *Dis. Markers* **2017**, 7574147 (2017).
81. Gupta, L., Bhattacharya, S., Agarwal, V. & Aggarwal, A. Elevated levels of serum MRP8/14 in ankylosing spondylitis: associated with peripheral arthritis and active disease. *Clin. Rheumatol.* **35**, 3075–3079 (2016).
82. Klingberg, E., Oleröd, G., Hammarsten, O. & Forsblad-d'Elia, H. The vitamin D status in ankylosing spondylitis in relation to intestinal inflammation, disease activity, and bone health: a cross-sectional study. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* **27**, 2027–2033 (2016).
83. Klingberg, E. *et al.* A longitudinal study of fecal calprotectin and the development of inflammatory bowel disease in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 21 (2017).
84. Cypers, H. *et al.* Elevated calprotectin levels reveal bowel inflammation in spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 1357–1362 (2016).
85. Turina, M. C. *et al.* Calprotectin serum level is an independent marker for radiographic spinal progression in axial spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 1746–1748 (2014).
86. Hansson, C., Eriksson, C. & Alenius, G.-M. S-calprotectin (S100A8/S100A9): a potential marker of inflammation in patients with psoriatic arthritis. *J. Immunol. Res.* **2014**, 696415 (2014).

87. Inciarte-Mundo, J. *et al.* 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 (2018).
88. Sakellariou, G. *et al.* Serum calprotectin as a marker of ultrasound-detected synovitis in early psoriatic and rheumatoid arthritis: results from a cross-sectional retrospective study. *Clin. Exp. Rheumatol.* **37**, 429–436 (2019).
89. Sokolova, M. V. *et al.* A set of serum markers detecting systemic inflammation in psoriatic skin, enthesal, and joint disease in the absence of C-reactive protein and its link to clinical disease manifestations. *Arthritis Res. Ther.* **22**, 26 (2020).
90. Madland, T. M., Larsen, A. & Brun, J. G. S100 proteins calprotectin and S100A12 are related to radiographic changes rather than disease activity in psoriatic arthritis with low disease activity. *J. Rheumatol.* **34**, 2089–2092 (2007).
91. Kane, D. *et al.* Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 1676–1685 (2003).
92. Qian, M. & Song, N.-J. 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 (2018).
93. Schonthaler, H. B. *et al.* S100A8-S100A9 protein complex mediates psoriasis by regulating the expression of complement factor C3. *Immunity* **39**, 1171–1181 (2013).
94. Aochi, S. *et al.* Markedly elevated serum levels of calcium-binding S100A8/A9 proteins in psoriatic arthritis are due to activated monocytes/macrophages. *J. Am. Acad. Dermatol.* **64**, 879–887 (2011).
95. Soyfoo, M. S., Roth, J., Vogl, T., Pochet, R. & Decaux, G. Phagocyte-specific S100A8/A9 protein levels during disease exacerbations and infections in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* **36**, 2190–2194 (2009).
96. Kuruto, R. *et al.* Myeloid calcium binding proteins: expression in the differentiated HL-60 cells and detection in sera of patients with connective tissue diseases. *J. Biochem. (Tokyo)* **108**, 650–653 (1990).
97. Nordal, H. H. *et al.* Calprotectin (S100A8/A9), S100A12, and EDTA-resistant S100A12 complexes (ERAC) in primary Sjögren's syndrome. *Scand. J. Rheumatol.* **43**, 76–78 (2014).
98. Haga, H. J. *et al.* Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity. *Lupus* **2**, 47–50 (1993).
99. Šumová, B. *et al.* Circulating S100 proteins effectively discriminate SLE patients from healthy controls: a cross-sectional study. *Rheumatol. Int.* **39**, 469–478 (2019).
100. Tydén, H. *et al.* Increased serum levels of S100A8/A9 and S100A12 are associated with cardiovascular disease in patients with inactive systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **52**, 2048–2055 (2013).
101. Frosch, M. *et al.* Expression of MRP8 and MRP14 by macrophages is a marker for severe forms of glomerulonephritis. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 198–206 (2004).
102. Tantivitayakul, P. *et al.* Elevated expressions of myeloid-related proteins-8 and -14 are danger biomarkers for lupus nephritis. *Lupus* **25**, 38–45 (2016).
103. Lood, C. *et al.* 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 (2011).

104. Loser, K. *et al.* The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells. *Nat. Med.* **16**, 713–717 (2010).
105. Wakiya, R. *et al.* Hydroxychloroquine modulates elevated expression of S100 proteins in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **28**, 826–833 (2019).
106. Cuida, M., Halse, A. K., Johannessen, A. C., Tynning, T. & Jonsson, R. Indicators of salivary gland inflammation in primary Sjogren's syndrome. *Eur. J. Oral Sci.* **105**, 228–233 (1997).
107. Brun, J. G. *et al.* Sjögren's syndrome in inflammatory rheumatic diseases: analysis of the leukocyte protein calprotectin in plasma and saliva. *Scand. J. Rheumatol.* **23**, 114–118 (1994).
108. Jazzar, A. A., Shirlaw, P. J., Carpenter, G. H., Challacombe, S. J. & Proctor, G. B. Salivary S100A8/A9 in Sjögren's syndrome accompanied by lymphoma. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **47**, 900–906 (2018).
109. Nistala, K. *et al.* Myeloid related protein induces muscle derived inflammatory mediators in juvenile dermatomyositis. *Arthritis Res. Ther.* **15**, R131 (2013).
110. Seeliger, S. *et al.* Expression of calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 in inflammatory muscle diseases. *Am. J. Pathol.* **163**, 947–956 (2003).
111. Xu, X. *et al.* Increased expression of S100A8 and S100A9 in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. A correlation with organ involvement and immunological abnormalities. *Clin. Rheumatol.* **32**, 1501–1510 (2013).
112. van Bon, L. *et al.* Proteomic analysis of plasma identifies the Toll-like receptor agonists S100A8/A9 as a novel possible marker for systemic sclerosis phenotype. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 1585–1589 (2014).
113. Fietta, A. *et al.* Analysis of bronchoalveolar lavage fluid proteome from systemic sclerosis patients with or without functional, clinical and radiological signs of lung fibrosis. *Arthritis Res. Ther.* **8**, R160 (2006).
114. Hesselstrand, R. *et al.* Biomarkers from bronchoalveolar lavage fluid in systemic sclerosis patients with interstitial lung disease relate to severity of lung fibrosis. *Respir. Med.* **107**, 1079–1086 (2013).
115. Shibata, F. *et al.* Fibroblast growth-stimulating activity of S100A9 (MRP-14). *Eur. J. Biochem.* **271**, 2137–2143 (2004).
116. He, Z., Zhu, Y. & Jiang, H. Inhibiting toll-like receptor 4 signaling ameliorates pulmonary fibrosis during acute lung injury induced by lipopolysaccharide: an experimental study. *Respir. Res.* **10**, 126 (2009).
117. Holzinger, D. *et al.* Myeloid-related proteins 8 and 14 contribute to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in gout. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **66**, 1327–1339 (2014).
118. Kienhorst, L. B. E. *et al.* Gout Is a Chronic Inflammatory Disease in Which High Levels of Interleukin-8 (CXCL8), Myeloid-Related Protein 8/Myeloid-Related Protein 14 Complex, and an Altered Proteome Are Associated With Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **67**, 3303–3313 (2015).
119. Ryckman, C. *et al.* Monosodium urate monohydrate crystals induce the release of the proinflammatory protein S100A8/A9 from neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 433–440 (2004).
120. Ryckman, C. *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 Rheum.* **48**, 2310–2320 (2003).

121. Rousseau, L.-S. *et al.* S100A9 potentiates the activation of neutrophils by the etiological agent of gout, monosodium urate crystals. *J. Leukoc. Biol.* **102**, 805–813 (2017).
122. Baillet, A. *et al.* Calprotectin discriminates septic arthritis from pseudogout and rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **58**, 1644–1648 (2019).
123. Kim, H.-A., An, J.-M., Nam, J.-Y., Jeon, J.-Y. & Suh, C.-H. Serum S100A8/A9, but not follistatin-like protein 1 and interleukin 18, may be a useful biomarker of disease activity in adult-onset Still's disease. *J. Rheumatol.* **39**, 1399–1406 (2012).
124. Guo, Q. *et al.* Serum calprotectin--a promising diagnostic marker for adult-onset Still's disease. *Clin. Rheumatol.* **35**, 73–79 (2016).
125. Jung, S.-Y., Park, Y.-B., Ha, Y.-J., Lee, K.-H. & Lee, S.-K. Serum calprotectin as a marker for disease activity and severity in adult-onset Still's disease. *J. Rheumatol.* **37**, 1029–1034 (2010).
126. Kim, H.-A. *et al.* TLR4 Endogenous Ligand S100A8/A9 Levels in Adult-Onset Still's Disease and Their Association with Disease Activity and Clinical Manifestations. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
127. Mitrovic, S. & Fautrel, B. New Markers for Adult-Onset Still's Disease. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* **85**, 285–293 (2018).
128. Girard, C. *et al.* Elevated serum levels of free interleukin-18 in adult-onset Still's disease. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **55**, 2237–2247 (2016).
129. Frosch, M. *et al.* The myeloid-related proteins 8 and 14 complex, a novel ligand of toll-like receptor 4, and interleukin-1beta form a positive feedback mechanism in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* **60**, 883–891 (2009).
130. Wittkowski, H. *et al.* MRP8 and MRP14, phagocyte-specific danger signals, are sensitive biomarkers of disease activity in cryopyrin-associated periodic syndromes. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 2075–2081 (2011).
131. Gucenmez, O. A. *et al.* Role of fecal calprotectin in the assessment of intestinal inflammation in children with familial Mediterranean fever. *Int. J. Rheum. Dis.* **21**, 1844–1848 (2018).
132. Demirbaş, F. *et al.* Fecal calprotectin in children with familial Mediterranean fever in the attack-free period. *Pediatr. Int. Off. J. Jpn. Pediatr. Soc.* **61**, 1140–1145 (2019).
133. Asan, G. *et al.* Can Calprotectin Show Subclinical Inflammation in Familial Mediterranean Fever Patients? *J. Korean Med. Sci.* **35**, e63 (2020).
134. Alpizar-Rodriguez, D. *et al.* The prevalence of anticitrullinated protein antibodies increases with age in healthy individuals at risk for rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **36**, 677–682 (2017).
135. Lin, Y. C. *et al.* Relationship between metabolic syndrome and carotid intima-media thickness: cross-sectional comparison between psoriasis and psoriatic arthritis. *Arthritis Care Res.* **66**, 97–103 (2014).
136. Borska, L. *et al.* Systemic Inflammation, Oxidative Damage to Nucleic Acids, and Metabolic Syndrome in the Pathogenesis of Psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
137. Aletaha, D., Smolen, J. & Ward, M. M. Measuring function in rheumatoid arthritis: Identifying reversible and irreversible components. *Arthritis Rheum.* **54**, 2784–2792 (2006).
138. Madland, T. M., Hordvik, M., Haga, H.-J., Jonsson, R. & Brun, J. G. Leukocyte protein calprotectin and outcome in rheumatoid arthritis. A longitudinal study. *Scand. J. Rheumatol.* **31**, 351–354 (2002).
139. Wink, F. *et al.* High prevalence of hip involvement and decrease in inflammatory ultrasound lesions during tumour necrosis factor- α blocking therapy in ankylosing spondylitis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **58**, 1040–1046 (2019).

140. Burki, V. *et al.* Prevalence and characteristics of hip involvement in spondyloarthritis: a single-centre observational study of 275 patients. *Clin. Exp. Rheumatol.* **30**, 481–486 (2012).
141. Chen, H.-A. *et al.* Factors associated with radiographic spinal involvement and hip involvement in ankylosing spondylitis. *Semin. Arthritis Rheum.* **40**, 552–558 (2011).
142. Pedersen, L. *et al.* Plasma calprotectin and its association with cardiovascular disease manifestations, obesity and the metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus patients. *BMC Cardiovasc. Disord.* **14**, 196 (2014).
143. Calcaterra, V. *et al.* Serum Calprotectin Level in Children: Marker of Obesity and its Metabolic Complications. *Ann. Nutr. Metab.* **73**, 177–183 (2018).
144. Hammer, H. B., Haavardsholm, E. A. & Kvien, T. K. Calprotectin (a major leucocyte protein) is associated with the levels of anti-CCP and rheumatoid factor in a longitudinal study of patients with very early rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* **37**, 179–182 (2008).
145. Bach, M. *et al.* A Neutrophil Activation Biomarker Panel in Prognosis and Monitoring of Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **72**, 47–56 (2020).
146. Grossi, V. *et al.* A Proposed Serum Calprotectin IgG Cut-Off Level for Diagnosing Inflammatory Arthritis. *Curr. Rheumatol. Rev.* **13**, 93–97 (2017).
147. Nys, G. *et al.* Targeted proteomics reveals serum amyloid A variants and alarmins S100A8-S100A9 as key plasma biomarkers of rheumatoid arthritis. *Talanta* **204**, 507–517 (2019).
148. Geven, E. J. W. *et al.* S100A8/A9, a potent serum and molecular imaging biomarker for synovial inflammation and joint destruction in seronegative experimental arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 247 (2016).
149. Di Ceglie, I. *et al.* Fcγ receptor-mediated influx of S100A8/A9-producing neutrophils as inducer of bone erosion during antigen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **20**, 80 (2018).
150. van Lent, P. L. E. M. *et al.* Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 1750–1758 (2008).
151. Grevers, L. C. *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 Rheum.* **63**, 1365–1375 (2011).
152. Dapunt, U. *et al.* Neutrophil-derived MRP-14 is up-regulated in infectious osteomyelitis and stimulates osteoclast generation. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 575–582 (2015).
153. Vandal, K. *et al.* Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171**, 2602–2609 (2003).
154. Raquil, M.-A., Anceriz, N., Rouleau, P. & Tessier, P. A. Blockade of antimicrobial proteins S100A8 and S100A9 inhibits phagocyte migration to the alveoli in streptococcal pneumonia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 3366–3374 (2008).